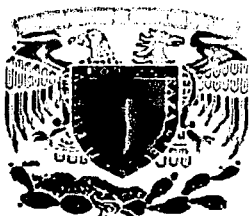


00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

54

FACULTAD DE CIENCIAS

“ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS PROTEICOS SECRETADOS DE Mycobacterium tuberculosis PARA SU USO EN DIAGNÓSTICO”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM



MÉXICO, D.F. FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2003

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.

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**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:  
"Electroforesis bidimensional para la identificación de antígenos proteicos  
secretados de Mycobacterium tuberculosis para su uso en diagnóstico".

realizado por JUAN CARLOS GALLARDO PEREZ  
con número de cuenta 9427508-1 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

DRA. LUZ MARIA LOPEZ MARIN

Propietario

M.en C. JUANA MABEL HERNANDEZ ALTAMIRANO

*Juana Mabel Altamirano*

Propietario

M.en C. FERNANDO RAMOS REYES

*Fernando Ramos Reyes*

Suplente

DRA. SARA ALICIA QUIROZ BARROSO

*Sara Alicia Quiroz Barroso*

Suplente

BIOL. EXP. GONZALO ACERO GALINDO

*Gonzalo Acero Galindo*

Consejo Departamental de Biología

M.en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DE BIOLOGÍA

## **DEDICATORIAS:**



A mis papás Juan y Judith:

Por brindarme la oportunidad de vivir y disfrutar este mundo. A ustedes porque me han dado la oportunidad de estudiar y superarme día tras día al enseñarme que solo con el esfuerzo y la dedicación se consigue el éxito.

Gracias.

A mis hermanas: Judith y Silvia con quienes compartí una infancia y juventud llenas de alegría.



A Adriana Guzmán Gallegos:

La compañera de mi vida. Gracias por tu apoyo y por tu amor.

Gracias por brindarme la oportunidad de vivir una vida nueva, por todo lo que hemos vivido juntos.

Tú y yo tenemos recuerdos más largos que el camino que se estrecha por delante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A mis abuelos:

Doña Luz y Don Juan en el Estado de México y a Doña Miguelina y Don Arturo en Coscomatepec,  
Veracruz por haber sido tan cariñosos y buenos conmigo.  
De la misma manera gracias a mis tíos, primos y amigos: Arturo, Naty, Martín, Víctor, Paty, Daniel,  
Lupe, Toña, Roberto, Ricardo, Oscar, Polo, Consuelo, Reyes, Fely, Mtra. Martha.  
Por supuesto, a peluche y chispa.

Con respeto y gratitud a mis excelsos maestros de la carrera de Biología en la Facultad de Ciencias  
y con nostalgia a mis compañeros y amigos con los que aprendí la belleza de nuestra profesión.

A mis compañeros de laboratorio:

Paulina, Paty, Érika, Jorge, Prisco, Yuko, Gonzalo, Karla.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias:

Adalucía, Mario, Mauricio, Sergio, Gaby, Lourdes, Selene, Verónica, Ana Cristina, Anne, Lorena,  
Michael, Ivonne, Elidia, Mariana, Jethro.

*Estudí Ciencia por la Ciencia misma,  
porque al igual que la Música, la Literatura y el Arte  
es toda una aventura para la mente  
y un alimento para el espíritu.*

*...así, la cosa más elevada que somos capaces de concebir, resulta directamente de la guerra de la  
naturaleza, del drama del hambre y de la muerte. Mientras este planeta ha ido girando se han  
desarrollado y se están desarrollando, a partir de un principio tan sencillo, infinidad de formas, las  
más bellas y maravillosas.*

-Darwin, C. On the Origin of the Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of  
favored races in the Struggle of Life (1859).

*Fluyen las palabras como lluvia interminable en un vaso de papel, se deslizan mientras cruzan, se  
escabullen, a través del universo.  
Olas de alegría, estanques de tristeza van a la deriva por mi mente, poseyéndome y acariciándome.*

-Lennon & McCartney, Across the Universe.

*The wild and windy night that the rain washed away  
has left a pool of tears crying for the day  
Why leave me standing here?  
Let me know the way.*

-Lennon & McCartney, The Long and Winding Road.

*Y, de tiempo en tiempo, se oye el reloj de ébano de la sala de terciopelo. Y entonces, durante un  
momento, todo se detiene, todo enmudece, excepto la voz del reloj. Los sueños se quedan  
helados, paralizados en sus posturas. Y después, todo no es más que locura, locura de una  
memoria que se agita en lo abominable.*

E. A. Poe

## **AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco a la Dra. Luz María López Marín, mi asesora de Tesis, por su ayuda brindada durante todo este tiempo que realicé mi trabajo en su laboratorio del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A la Dra. Sara Alicia Quiroz Barroso por su revisión de este trabajo de Tesis.

A la M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano por sus acertados comentarios en la revisión de este trabajo.

Al M. en C. Fernando Ramos Reyes por la revisión crítica a este trabajo y por sus excelentes clases de Inmunología.

Al Biol. Exp. Gonzalo Acero Galindo por la revisión de este trabajo de tesis así como por su ayuda prestada en el laboratorio.

A la Biol. Érika Segura Salinas por toda su ayuda profesional y consejos durante mi estancia en el laboratorio.

Al CONACYT (proyecto 33578-M) y al fondo Ricardo J. Zevada por el financiamiento para la realización de este trabajo.

Al Programa de Becas de Tesis de Licenciatura en proyectos de investigación, PROBETEL, por la beca concedida para la realización de este trabajo.

## INDICE:

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	5
1.1 Historia de la tuberculosis.....	5
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	9
1.2.1 Antígenos proteicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	12
1.3 Transmisión de la tuberculosis.....	13
1.4 Epidemiología. Importancia de la tuberculosis.....	15
1.5 Inmunología y patogénesis de la tuberculosis.....	17
1.5.1 Desarrollo de la enfermedad.....	18
1.6 Importancia del diagnóstico de casos activos de tuberculosis y métodos de diagnóstico.....	22
1.6.1 Baciloscopia.....	22
1.6.2 Cultivo.....	23
1.6.3 Técnicas ordinarias de identificación.....	23
1.6.4 Radiografía del tórax.....	23
1.6.5 Sondas de ADN.....	24
1.6.6 Reacción en cadena de la polimerasa.....	24
1.6.7 Pruebas cutáneas para el diagnóstico de la enfermedad.....	24
1.6.8 Serodiagnóstico.....	25
1.7 Electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE).....	27
1.8 Transferencia de las proteínas a membrana y Western Blotting.....	30
1.9 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.....	32
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	33
<b>HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>ESQUEMA METODOLÓGICO</b> .....	36



<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
2.1 Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
2.2 Obtención de las proteínas del filtrado de cultivo.....	37
2.3 Sueros.....	38
2.4 Solubilización de las proteínas del filtrado de cultivo utilizando inobilinas.....	39
2.4.1 Separación de proteínas en primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).....	40
2.4.2 Separación de proteínas en segunda dimensión: SDS-PAGE.....	42
2.5 Solubilización de las proteínas del filtrado de cultivo utilizando anfolitos.....	43
2.5.1 Separación de proteínas en primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).....	43
2.5.2 Separación de proteínas en segunda dimensión: SDS-PAGE.....	44
2.6 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.....	45
2.7 ELISA.....	45
2.8 Western Blotting.....	46
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 Obtención de proteínas del filtrado de cultivo.....	47
3.2 Separación de proteínas en geles de doble dimensión.....	48
3.3 Reactividad de los sueros de pacientes sanos y con tuberculosis a las proteínas del filtrado de cultivo.....	51
3.4 Obtención de sueros hiperinmunes anti-proteínas del filtrado de cultivo.....	53
3.5 Western Blotting.....	55
<b>4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>5. REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>I</b>

## ABREVIATURAS:

2D-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Dos Dimensiones

AIF: Adyuvante Incompleto de Freund

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CHAPS: (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane- sulfonate)

CMI: Inmunidad Mediada por Células

DTH: Hipersensibilidad de Tipo Retardada

DTT: Ditiotreitól

D.O.: Densidad Óptica

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

HLA: Antígenos de Leucocitos Humanos

IEF: Isoelectroenfoque

IL: Interleucina

IPG: Gradiente de pH de las Inmobilinas

INF $\gamma$ : Interferón gamma

KDa: Kilodaltones

LAM: Lipoarabinomanano

LCF: Líquido Cefalorraquídeo

MA: Macrófago Alveolar

nm: nanómetros

OT: Old Tuberculin (Tuberculina Vieja)

PI: Punto Isoeléctrico

PIM's: Fosfatidil Inositol Manósido

PPD: Derivado Proteico Purificado

PBS: Phosphate Buffer Saline (Buffer Salino de Fosfatos)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio

SIDA: Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida

TB: Tuberculosis

V/h: Volts-hora

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**RESUMEN:**

*La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo de Koch, Mycobacterium tuberculosis, el cual cobra más vidas humanas que cualquier otro patógeno en el mundo. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada. El bacilo tuberculoso se ha aclimatado a la revolución antibiótica debido en parte a la renuencia de las personas por completar su tratamiento intensivo de seis meses y, más recientemente, por la aparición de formas resistentes a fármacos. Además, el patógeno ha establecido una asociación mortal con el virus de la inmunodeficiencia humana.*

*La tuberculosis es una enfermedad tan antigua como la historia misma y uno de los principales retos en este campo de investigación ha sido, desde siempre, encontrar un método de diagnóstico eficiente ya que los métodos actuales tienen baja sensibilidad y especificidad y consumen mucho tiempo.*

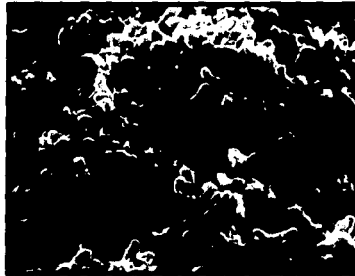
*Con el uso de nuevas tecnologías que permiten el análisis de proteomas, como es el caso de la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) es factible poner en evidencia más y nuevos antígenos proteicos del bacilo que cubran la gama de respuestas de anticuerpos de los pacientes y que, por lo tanto, sean de interés diagnóstico.*

*En este trabajo se presenta una comparación de dos metodologías distintas para la separación de antígenos proteicos secretados de Mycobacterium tuberculosis basadas en las herramientas proteómicas de 2D-PAGE, los cuales pueden ser posteriormente evaluados para conocer su reactividad contra sueros de pacientes tuberculosos y brindar información en el diagnóstico de la enfermedad.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN:

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa originada por el bacilo de Koch, *Mycobacterium tuberculosis* (figura 1), el cual cobra más vidas humanas cada año que cualquier otro patógeno bacteriano (Parrish et al., 1998).



**Figura 1.** *Mycobacterium tuberculosis*.

De alguna manera, el bacilo ha adoptado un patrón de existencia pacífica con el hospedero humano en la forma de una infección quiescente o aletargada, estableciendo un reservorio masivo de individuos infectados, que se estima en un tercio de la población mundial (Kochi, 1991). Sin embargo, puede disparar una destrucción progresiva y mortal de los pulmones en la población que sufre de la enfermedad activa, como consecuencia de alguna inmunodepresión, y actuar como una fuente para su posterior diseminación (Young, 1998).

El bacilo tuberculoso se ha aclimatado a la revolución antibiótica debido en parte a la renuencia de las personas por completar su tratamiento intensivo de seis meses y, más recientemente, por la aparición de formas resistentes a fármacos. Además, el patógeno ha establecido una asociación mortal con el virus de la inmunodeficiencia humana: una susceptibilidad incrementada a la tuberculosis está asociada con las primeras etapas de la infección por VIH, y la tuberculosis, a su vez, acelera la progresión del SIDA (Young, 1998).

La tuberculosis es una enfermedad tan antigua como la historia misma y uno de los principales retos en este campo de investigación ha sido, desde siempre, encontrar un método de diagnóstico eficiente que permita distinguir entre individuos no infectados, infectados no sintomáticos y con tuberculosis activa para conseguir el tratamiento oportuno contra la enfermedad. Las pruebas diagnósticas que dan falsos positivos son potencialmente peligrosas, no tanto por el tratamiento innecesario que se brinda al paciente, sino porque no se podría brindar atención a otro paciente que tal vez sí requiera el tratamiento.

Los métodos de diagnóstico actuales como el cultivo, la baciloscopia y las pruebas cutáneas son poco sensibles, inespecíficos, demorados, y algunos en estudio como el PCR, demasiado caros. Por esta razón las pruebas serológicas surgen ahora como una alternativa oportuna si se ponen en evidencia y se identifican nuevos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

El inmunodiagnóstico (o serodiagnóstico) de la tuberculosis, no obstante su enorme potencial, no ha llegado a establecerse en la práctica médica debido, probablemente, a la carencia de reactivos bien caracterizados y fácilmente disponibles, y a la presencia de pruebas de diagnóstico más rápidas, pero más costosas, como son las de biología molecular.

Sin embargo, se piensa que los métodos de diagnóstico serológicos pueden tener una muy alta resolución, ser simples, baratos, y pueden ser aplicados a gran escala, sobre todo en países con economías emergentes como México.

La micobacteria causante de la tuberculosis contiene diferentes clases de antígenos (proteínas, polisacáridos, lípidos) así como conjugados de estos. Entre los antígenos mayormente reconocidos por los anticuerpos de individuos tuberculosos destacan algunos antígenos proteicos ya identificados (Ver Sección 1.2.1).

Uno de los principales problemas radica precisamente en identificar esos antígenos proteicos. Es necesario evidenciar más antígenos presentes en el proteoma de *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual permitirá contar con una variedad extensa de estos antígenos que cubra el espectro de respuestas ocasionado por la variabilidad inmunogenética de cada individuo, cuyos patrones HLA determinan la reactividad hacia ellos. De esta manera será posible evitar los falsos negativos que se obtienen cuando el diagnóstico está basado en uno o unos cuantos antígenos.

Con el uso de nuevas tecnologías que permiten el análisis de proteomas, como es el caso de la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE), es factible poner en evidencia e identificar más y nuevos antígenos proteicos del bacilo que, mediante ensayos de Western Blotting, pondrían en evidencia proteínas que reaccionen con los sueros de pacientes tuberculosos (con diferente respuesta inmune humoral) aumentando así la sensibilidad y la especificidad del ensayo diagnóstico. La técnica 2D-PAGE permite separar cientos o miles de proteínas y ejecutar un mejor análisis de ellas (Smaglik, 2001).

Se ha sugerido que las respuestas de anticuerpos de pacientes tuberculosos son homogéneas, al analizarlos por 2D-PAGE (Samanich et al., 2001), aunque en la práctica se observa una variedad de respuestas antigénicas (Bassey et al., 1996). Por lo tanto, se requiere un cóctel de un gran número de antígenos (cuyas condiciones para identificarlos deben ser unificadas en cuanto a la técnica empleada para evidenciarlos, etapas de la tuberculosis en las que se obtienen esos antígenos, etc.) para una prueba de serodiagnóstico eficiente de la tuberculosis.

En este trabajo se presenta una revisión de la tuberculosis que incluye: perspectiva histórica, características del bacilo tuberculoso, etapas de la enfermedad y métodos de diagnóstico más comunes. Asimismo, se muestra la obtención de una colección de sueros, de individuos mexicanos con tuberculosis pulmonar activa, clasificados de acuerdo con su respuesta a los antígenos del bacilo tuberculoso; la obtención de anticuerpos policlonales en contra de los mismos antígenos y, la comparación de dos metodologías para la separación de antígenos proteicos mediante 2D-PAGE.

Quedan así sustentadas las bases que permitirán identificar los antígenos proteicos de mayor utilidad para el mejor inmunodiagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

## 1. ANTECEDENTES:

### 1.1 Historia de la tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad que ha estado presente en muchas culturas alrededor del mundo. Los primeros escritos sugerentes de tuberculosis proceden de la India, del año 700 A.C., y describen una enfermedad pulmonar crónica caracterizada por consunción (Schlossberg, 1999). Existen numerosas evidencias de la presencia de TB en el mundo antiguo. Se han encontrado lesiones raquídeas características de la tuberculosis en restos humanos del periodo neolítico (Haas y Hass, 1995), y las pinturas en las tumbas egipcias ponen de manifiesto la formación clásica de la giba de la enfermedad de Pott (Rossman y McGregor 1996); asimismo, se ha detectado ADN de *Mycobacterium* en una momia egipcia de 5,400 años de edad (Crubézy et al., 1998). Hipócrates, en el año 380 A.C., realizó una descripción minuciosa de un trastorno pulmonar llamado *tisis*, que en términos literales significa "fundirse" o "derretirse", siendo esa la idea general sobre las consecuencias de la enfermedad (Rossman y McGregor, 1996). Aristóteles sugirió que la enfermedad era causada por una sustancia exhalada hacia el aire en el aliento del paciente.

La mejor prueba de la presencia de tuberculosis en la antigüedad vino de una momia Inca de un niño de 8 años de edad que vivió en el año 700 D. de C. (Schlossberg, 1999). La radiografía de la espina lumbar mostró evidencia de la enfermedad de Pott.

Mucho tiempo después, en el siglo XV, el anatomista holandés, Francisco Silvio, describió pequeños nódulos duros en los pulmones de los individuos que tenían consunción, y que llamó tubérculos, y emitió la teoría de que la tisis se desarrollaba a partir de úlceras (cavidades) dentro del pulmón (Rossman y McGregor, 1996).

En 1839 Johann Schönlein sugirió por primera vez el nombre de *tuberculosis* y, en 1861, Oliver Wendell empleó el término *peste blanca* para llamar la atención sobre la prevalencia devastadora de la tuberculosis en la sociedad (Haas y Hass, 1995).

Convencido de que el aire fresco y frío de la montaña propiciaba la curación, Brehmer estableció el primer sanatorio para tuberculosos en Alemania, en 1854, su régimen estaba constituido por dieta nutritiva, ejercicio suave e hidroterapia (Dubos, 1982).

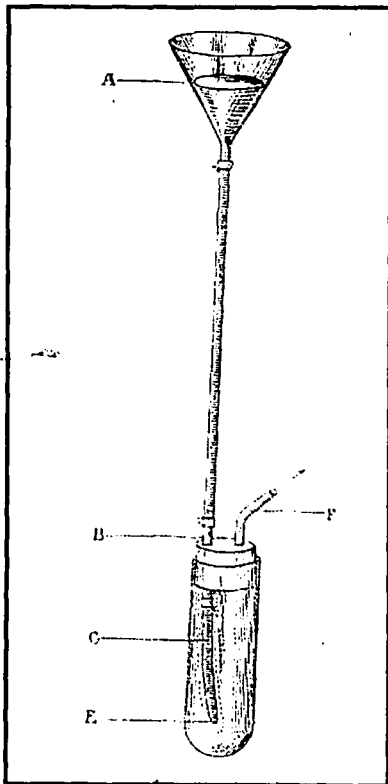
En 1865 un cirujano de la fuerza francesa, Villemin, describió los resultados de una serie de elaborados experimentos sobre la inoculación de animales con tejido infectado de tuberculosis y la transmisión de la enfermedad de animal a animal (Haas y Hass, 1995). Antes de estos hallazgos pocos consideraban que la tuberculosis era transmisible, la mayoría consideraba que la enfermedad era hereditaria (Grange y Bishop, 1982).

Un nuevo giro en la historia de esta enfermedad se dio poco después, cuando Robert Koch, en 1882, reportó que había cultivado exitosamente el bacilo tuberculoso en su laboratorio (Koch, 1982). Al inyectar cultivos obtenidos de sueros de pacientes en conejos, demostró que *M. tuberculosis* es la única causa de esta enfermedad altamente infecciosa en los humanos (Collins, 1998). El mismo Koch aisló la tuberculina, una proteína proveniente del filtrado de cultivo del bacilo. Aconsejó tratar a los pacientes con tuberculosis con dosis subcutáneas de esta tuberculina (Sakula, 1982). Este tratamiento producía una reacción febril en plazo de 4 a 5 horas. Se le dio un uso curativo pero, a causa de las secuelas que propiciaba en las personas, se rechazó como agente para curar la consunción menos de un año después de que se descubrió (Rossman y McGregor 1996). Koch no se percató de que había descubierto lo que se convertiría en una de las pruebas diagnósticas más ampliamente utilizadas: la hipersensibilidad de tipo retardada (DTH; Ver Sección 1.5). Se desarrollaron a continuación nuevos métodos para administrar el antígeno, estos son: la prueba cutánea (Von Pirquet); prueba percutánea (Moro); prueba conjuntival (Calmette); y prueba intracutánea (Mantoux) (Collins, 1998). Los dos tipos de tuberculina que se emplean en la actualidad son: tuberculina concentrada por calor en medio sintético, conocida como tuberculina vieja (OT, del inglés *Old Tuberculin*) y derivado proteico purificado. Más tarde se prepararon fracciones químicas de OT y se describieron fracciones proteicas A B C y D además de fracciones de polisacáridos I y II (Rossman y McGregor 1996). Se encontró que las fracciones A y B estimulaban la reacción de tuberculina. Los esfuerzos por producir un producto más purificado mediante precipitación con sulfato de amonio dieron por resultado el derivado proteico purificado (PPD) que rápidamente llegó a ser la preparación estándar



para la prueba de tuberculina (Collins, 1998).

En México también se establecieron sanatorios que se encontraban a las afueras de la Ciudad. En 1895 el maestro Alfonso L. Herrera señaló la importancia del aire rarificado en el tratamiento de la tuberculosis (Herrera y Vergara, 1896). En 1896 reportó a la Sociedad Científica Antonio Alzate los resultados de la rarificación de aire con cámaras neumáticas que, al ser administrado a los pacientes con tuberculosis, les ocasionaba una mejoría en cuanto a la disminución de la fiebre y a la reducción de bacilos de Koch en el esputo de tuberculosos. En la figura 2 se observa un facsímil de la cámara neumática empleada en ese tiempo.



**Figura 2.** Cámara neumática para la compresión y decompresión del aire. Un embudo (A) se comunica con un tubo de vidrio (B) y éste con otro tubo de caucho (C), de diámetro pequeño y cerrado en su extremidad (E). El tubo de caucho se introduce en una probeta cerrada con un tapón que sólo permite la entrada del tubo de vidrio (B) y un tubo que permite establecer el vacío (F). Se vierte agua en el embudo y se crea el vacío en (F). El tubo de caucho se dilata y se contrae debido al aire que viene desde fuera y reestablece la presión a través de (F).

El aire enrarecido (ácido carbónico denso) queda en el fondo del aparato durante un breve periodo de tiempo. Este aire es el que succionan a intervalos de tiempo los pacientes.

La descompresión y dilatación del pulmón permiten una distribución uniforme de sangre regularizando la circulación lo que ocasiona un incremento de glóbulos rojos y blancos (Herrera y Vergara, 1896).

En 1898, 16 años después de la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* por Koch, Arloing describió una prueba de aglutinación y, en 1918, Petroff reportó el uso de la fijación del complemento para el diagnóstico de la tuberculosis. Después de estos inicios muchas pruebas serológicas fueron evaluadas como la hemaglutinación y el radioinmunoensayo (Freedman et al., 1966). Sin embargo, la dificultad técnica para reproducir estos procedimientos limitó su aplicación clínica.

La situación cambió dramáticamente con la introducción del ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) por Engvall y Perlman en 1972.

Otro desarrollo importante fue brindado por los bacteriólogos franceses Calmette, quien, junto con Guérin, usó medios de cultivo específicos para atenuar la virulencia del bacilo de la tuberculosis bovina, creando las bases para la vacuna BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) contra la TB usada ampliamente en nuestros días (Dubos, 1982).

Finalmente, luego de la Segunda Guerra Mundial comenzó un camino hacia el tratamiento de la tuberculosis con quimioterapia (Collins, 1998). Dos propiedades de los fármacos anti-TB son su actividad antibacteriana (isoniazida, rifampina, estreptomina) y su capacidad para inhibir el desarrollo de resistencia (isoniazida, rifampina, etambutol) aunque también se ha observado, en la actualidad, resistencia del bacilo tuberculoso contra estos fármacos.

## 1.2 *Mycobacterium tuberculosis*.

Las micobacterias no se tiñen fácilmente por el método de Gram y están agrupadas en bacterias “ácido-alcohol resistentes” con alto contenido G+C (Prescott et al., 1999). Su morfología general es muy parecida a la de los hongos.

El género *Mycobacterium* está compuesto por bacterias aerobias que son bastoncillos rectos o ligeramente incurvados con 2-6  $\mu\text{m}$  de largo, sin motilidad y sin producción de endosporas (Wayne y Kubica, 1986), cuya característica principal es la propiedad tintorial llamada acidorresistencia relacionada con el alto contenido de lípidos de la pared celular. La acidorresistencia es la resistencia a la decoloración con ácidos débiles de carbol fuchsin y tinciones similares (Levy-Frebault y Portal, 1992). Su tiempo de división es de 12-24 horas (Rossman y McGregor, 1996), son positivos a la catalasa (Wayne y Díaz, 1979) y aunque algunas micobacterias son saprofitos de vida libre, son mejor conocidos como parásitos de animales (Wayne y Kubica, 1986).

El agente causante de tuberculosis en humanos, otros primates, perros y algunos animales en contacto con el hombre es *Mycobacterium tuberculosis*, el cual crece muy lentamente en cultivo (su periodo de división es de 24 horas aproximadamente, debido tal vez, a la construcción de la maquinaria biosintética para la formación de su pared celular); forma colonias con aspecto rugoso, secas y de color crema que tardan en ser visibles de 15 a 30 días (Villalba et al., 1999). Los bastoncillos tienen un tamaño de 0.3-0.6 $\mu\text{m}$  x 1-4 $\mu\text{m}$  (Wayne y Kubica, 1986). La temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C, su pH óptimo es de 6.4-7. Su clasificación es la siguiente:

**Reino:** Procarionte

**Clase:** Actinobacteria

**Orden:** Actinomycetales

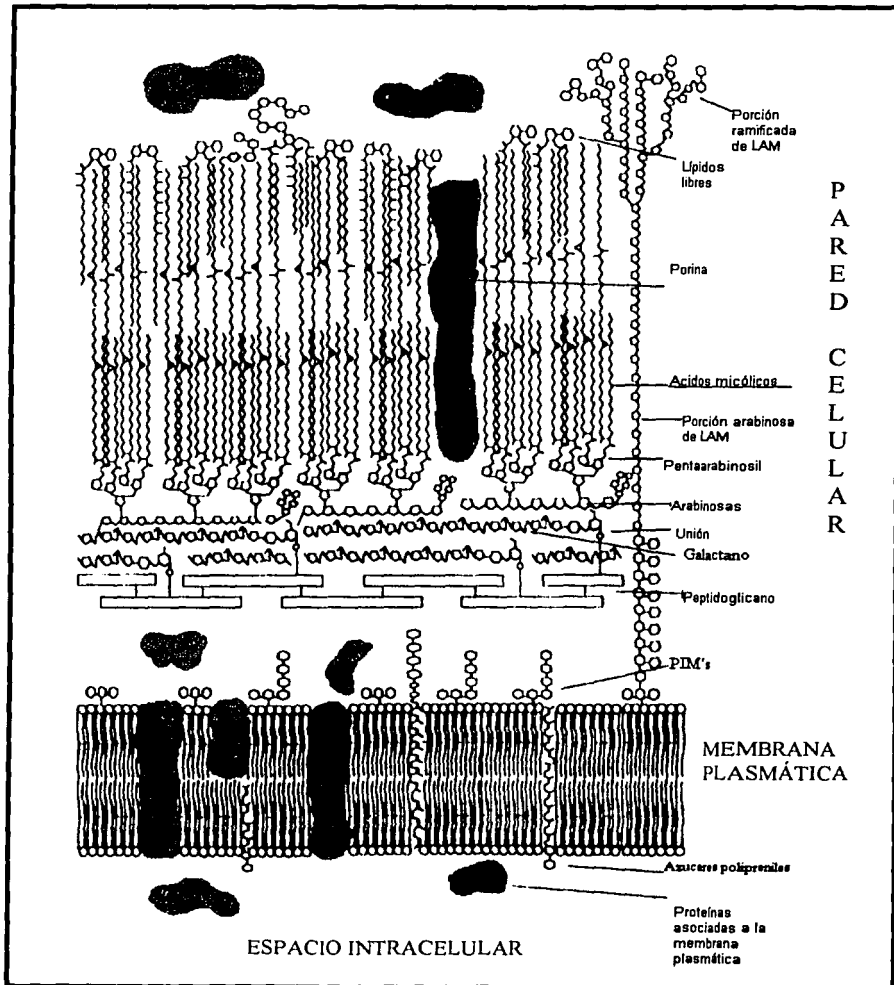
**Suborden:** Corynebacterineae

**Familia:** Mycobacteriaceae

**Género:** Mycobacterium

**Especie:** *Mycobacterium tuberculosis*.

Koch fue el primero en comentar lo inusual de la pared celular de *M. tuberculosis*, y su importancia en la fisiología micobacteriana se refleja en el vasto repertorio de genes involucrados en el metabolismo de polisacáridos y lípidos (Young, 1998). Su pared celular tiene un muy alto contenido de lípidos, principalmente los ácidos micólicos de 60-90 átomos de carbono (figura 3).



**Figura 3.** Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

La pared celular rica en lípidos, es un excelente ejemplo de una estructura evolucionada de un ancestro saprofito que confiere obvia ventaja al patógeno que usa la transmisión a través de aerosol (Kauffman, 2000). Hay 2 características principales de la pared celular de *M. tuberculosis*: el complejo masivo peptidoglicano/arabinogalactano/ácidos micólicos y el lipoarabinomanano (LAM). Los ácidos micólicos de micobacterias son estructuralmente similares en *Nocardia*, *Rhodococcus* y otros actinomicetes por su alto contenido de átomos de carbón, lo que forma una barrera impermeable y constituye la capa electrotransparente (Levy-Frebault y Portal, 1992). El LAM está unido a la pared celular por enlaces no covalentes y es un factor de alto potencial virulento, sobre todo cuando está bloqueado con una o más unidades de manosa, y probablemente es responsable en parte, de la patogenicidad del bacilo (McDonough y Bloom, 1996). Igualmente virulentos serían otros antígenos unidos de manera no covalente específicos de especie como los sulfolípidos y las acil trealosas (McNeil et al., 1990). Finalmente, la pared celular constituye una barrera que protege al microorganismo del estrés ambiental además de contribuir a la persistencia de la enfermedad al hacer resistente al bacilo a muchos fármacos (McNeil et al., 1990).

*M. tuberculosis* tiene un genoma de 4.4 millones de pares de bases y el potencial metabólico para existir en una gran variedad de ambientes, incluyendo vías asociadas con el metabolismo anaeróbico (Young, 1998). Esto es importante puesto que, aunque la bacteria requiere oxígeno para su crecimiento en el laboratorio, la sobrevivencia anaeróbica prolongada debe ser necesaria para la persistencia a largo plazo en los tejidos (Wayne y Hayes, 1996).

La información genética requerida para causar la enfermedad es frecuentemente intercambiada entre las bacterias por un proceso llamado "transferencia horizontal", y existe evidencia de que tal proceso puede ocurrir en *M. tuberculosis* (Young, 1998). Su genoma contiene elementos genéticos móviles conocidos como secuencias de inserción así como genes derivados de virus (Cole et al., 1998). Al comparar diferentes cepas de *M. tuberculosis*, Cole y colaboradores, 1998, sugieren que estos genes probablemente se adquirieron antes de establecerse en su nicho relativamente aislado dentro del pulmón.

### **1.2.1 Antígenos proteicos de *Mycobacterium tuberculosis*.**

Se sabe que las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* (referidas como proteínas del filtrado de cultivo) inducen fuertes respuestas inmunes a la tuberculosis (Lyashchenko et al., 1998). La característica notable de esta fracción proteica es su inmunodominancia. Se ha visto que estas proteínas inducen una respuesta protectora por parte de las células T (Hubbard et al., 1992). El perfil proteico del filtrado de cultivo es dependiente del tiempo de cultivo, además, el medio de cultivo, la temperatura y la agitación pueden afectar el perfil de proteínas visualizadas (Sonnenberg y Belisle, 1997). La principal fuente de antígenos proteicos de *M. tuberculosis* son las proteínas citoplásmicas liberadas luego de la autólisis. Las proteínas secretadas, especialmente las tempranas, juegan un rol importante en la estimulación de la respuesta inmune protectora del hospedero (Andersen, 1994). Antígenos del filtrado de cultivo contienen tanto proteínas secretadas como citoplásmicas. Se ha encontrado que la mayoría de los péptidos citoplásmicos y de pared celular son inmunorreactivos, causando ya sea respuesta inmune humoral o celular (Brennan, 1989). La membrana celular es otra fuente de antígenos proteicos obtenidos luego de la ruptura del bacilo (figura 3).

Entre las principales proteínas del bacilo se encuentran las de estrés (proteínas de choque térmico) como la DnaK, GroEL y GroES. La membrana celular del bacilo contiene proteínas cuya función es tal vez el transporte de nutrientes o la formación de poros para que los nutrientes pasen (Brennan, 1989). Una de éstas es la proteína de 19 KDa (así denominada, junto con otras proteínas, debido a que aún no se conoce su función) que en realidad es una lipoproteína que se ancla a la pared celular. Otra es la proteína de 38 KDa involucrada en el transporte de fosfatos (Andersen, 1994). Otro antígeno abundante es el complejo proteico de 30-32 KDa (Ag 85 que consiste de 3 proteínas de 30-32 KDa llamadas MP44, MP59 y MP45 o bien, 85A, B y C). Algunas proteínas son verdaderas proteínas exportadas pero otras simplemente se desprenden de la pared celular del bacilo en donde trabajan como enzimas biosintéticas (Rossman y McGregor, 1996). Varias proteínas caracterizadas aparecen al principio en el filtrado de cultivo tales como GroES, superóxido dismutasa (que desactiva radicales de oxígeno producidos por el hospedero) y el complejo

Ag 85 del que se dice es un poderoso inmunógeno y tiene como función parte de la biosíntesis de la pared celular (Belisle et al., 1997). También se han detectado ESAT-6 de 6 KDa, MPT64 de 24 KDa y MPT 32 de 45 KDa, entre otras.

### 1.3 Transmisión de la tuberculosis.

Aunque la tuberculosis puede afectar cualquier órgano del cuerpo el pulmón es virtualmente el portal de entrada. El bacilo es comúnmente descargado en la atmósfera por aerolización de secreción pulmonar de un paciente enfermo al toser, estornudar o hablar (figura 4). La aerolización es el proceso en el cual las células micobacterianas entran en aerosol. Una vez que las micobacterias son aerolizadas su capacidad para infectar a un paciente es dependiente de múltiples factores como el tamaño de las gotas, humedad atmosférica y corrientes de aire (Rossman y McGregor, 1996). Además, las micobacterias en gotas de aerosol ricas en materia orgánica son inducidas a muerte por radicales libres derivados de peróxido de hidrógeno al estar en contacto con el sol (Falkinham, 1997). Existen diversos factores que intervienen en determinar la transmisión de la infección a partir de una persona infectada con el bacilo (cuadro 1) y la historia natural de la tuberculosis en los contactos infectados (Grange, 1992).

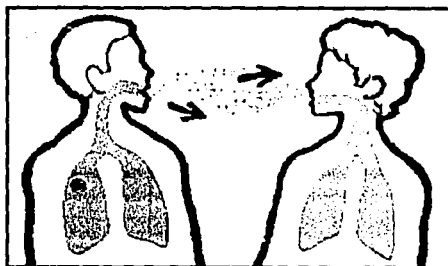


Fig. 4. Las bacterias de la tuberculosis se transmiten a través del aire.

Las gotas de aerosol que se liberan se secan rápidamente dejando gotitas con núcleo (en inglés denominadas *droplet nuclei*) algunas de las cuales contienen bacilos que pueden iniciar una infección. Sólo las partículas que contienen 1 ó 3 bacilos tuberculosos son capaces de iniciar la infección debido a que permanecen suspendidos en el aire que entra a

los espacios alveolares (Falkinham, 1997). Gotas muy grandes caen al piso, y las droplet nuclei de 1 a 10 µm de tamaño están más tiempo en la atmósfera y son en su mayor parte atrapados en los pasajes nasales superiores o son empujados a la faringe por los mecanismos mucociliares del tracto respiratorio inferior, luego son inocuamente tragados y digeridos (Schlossberg, 1999).

**CUADRO I**

<b>LA TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN ES DEPENDIENTE DE VARIOS FACTORES.</b>
a) La presencia de grandes números de bacilos vivos en el esputo del paciente y la patogenicidad del bacilo.
b) Aerolización del esputo en pequeñas partículas aéreas cuando el paciente tose o habla (con TB pulmonar).
c) Duración apropiada de la exposición al aire infectado.
d) Susceptibilidad del hospedero.

La tuberculosis es una enfermedad altamente infecciosa y su transmisión requiere usualmente exposición prolongada y estrecha con un paciente que tenga grandes números de bacilos en su esputo. Existe evidencia clínica de que, en adición a la virulencia innata del bacilo tuberculoso, la respuesta del hospedero a *M. tuberculosis* juega un rol principal en determinar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Schluger y Rom, 1998). La vasta mayoría de las personas infectadas con el bacilo nunca desarrollarán enfermedad clínica. Algunas desarrollarán enfermedad activa en el contexto de algún deterioro de su sistema inmune como el que es causado por la infección por el VIH, desnutrición, o un tumor avanzado (Young, 1998).

La transmisión del bacilo a los humanos a partir de especies animales susceptibles y sus productos (como la leche) puede ser posible (Prescott et al., 1999).



**1.4 Epidemiología. Importancia de la tuberculosis.**

Se ha estimado que cerca de la tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (cuadro 2). La mayoría de las personas infectadas residen en los países con economías emergentes. Más aún, en los países industrializados, 80% de los individuos infectados tienen 50 años de edad o más; en los países en desarrollo se considera que 75% de las personas infectadas tienen menos de 50 años, lo que indica que la transmisión prosigue con cada nueva generación (Kochi, 1991). Para el año 2000 la situación mundial de la tuberculosis no ha mejorado. Un estudio estadístico reveló que 8.3 millones de personas se infectaron en el año 2000 y 8% de estos casos estuvieron asociados al VIH (Corbett et al., 2003).

Cada segundo una persona se infecta con el bacilo alrededor del mundo. La industrialización, urbanización, sobrepoblación, estatus socioeconómico y disponibilidad de los servicios de salud son factores de riesgo para padecer la TB.

**CUADRO 2**

<b>IMPACTO DE LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO</b>
1/3 de la población mundial está infectada con el bacilo de la tuberculosis (2050 millones de personas alrededor del mundo).
Cada segundo una persona se infecta en el mundo.
Cada año 1.87 millones de personas mueren de tuberculosis (aproximadamente 5,000 personas diarias).
Cada año se estima que 8 millones de personas desarrollan enfermedad activa.
Las personas VIH positivas son 30 veces más susceptibles de desarrollar la enfermedad.

En México, en el año 2000 se estableció un Programa de Micobacteriosis, cuyo objetivo es abatir la morbilidad y mortalidad por tuberculosis.

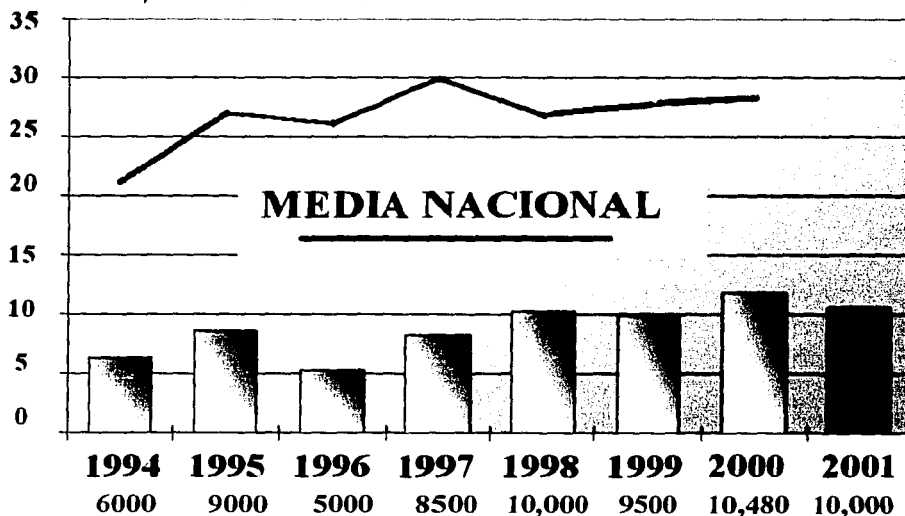
Dos de las estrategias del programa son:

- ❖ La intensificación de acciones de pesquisa, en mayores de 15 años, para detectar casos nuevos de tuberculosis en sintomáticos respiratorios.
- ❖ La realización del diagnóstico oportuno para la tuberculosis.

En el año 2000 la secretaria de salud reportó un total de 10480 nuevos casos de tuberculosis activa, 9206 de los cuales fueron de tuberculosis pulmonar, siendo el Estado de México y Veracruz los estados más afectados por esta causa.

La tuberculosis constituye la 12ª causa de mortalidad en mexicanos en edad productiva (INEGI, SSA/DGEI, 2000). Las barras de la figura 5 muestran el número de personas muertas por tuberculosis en México indicando que de 1994 a 2001 la enfermedad no se ha erradicado y, por el contrario, se observa un ligero incremento en el número de personas con infección activa. La línea roja indica el número de casos reportados de personas con tuberculosis (sumados los pacientes con tuberculosis activa y no activa).

**TASA X 100,000 HABITANTES**



**Fig. 5.** Mortalidad (barras verdes) y morbilidad (línea roja) por tuberculosis pulmonar en México (INEGI, SSA/DGEI, 2000).

### 1.5 Inmunología y patogénesis de la tuberculosis.

La inmunidad protectora contra la tuberculosis descansa principalmente en los linfocitos T CD4+. Se ha observado que estos linfocitos T son estimulados para proliferar *in vitro* con PPD y en particular con la proteína de choque térmico de 65 KDa (así como con antígenos no proteicos) y por lo tanto, se cree que estas células en particular participan en la resistencia contra la micobacteria (McDonough y Bloom, 1996) y probablemente lo hacen en las primeras etapas de la infección. Un rol para las células T  $\gamma\delta$  es sostenido por estudios funcionales que demuestran su capacidad para exhibir citotoxicidad y producir INF $\gamma$  en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* (Bonato et al., 1998).

Las células T CD4+ contribuyen a la protección contra el bacilo mediante la producción de citocinas, las cuáles activan a los macrófagos infectados para matar a la bacteria intracelular (Stenger y Modin, 1999). Entre estas citocinas, el INF $\gamma$  parece ser la molécula crucial en humanos, la cuál induce intermediarios de nitrógeno reactivos. Se ha mostrado que las células T CD4+ específicas para PPD, lisan eficientemente una variedad de blancos usando tanto la vía de Fas como la del ligando de Fas, y la vía de exocitosis de gránulos citotóxicos (Lewinsohn et al., 1998)

El linfocito CD4+ activado por antígeno secreta IL-2, que expande la respuesta inmune antimicobacteriana del interferón gamma (INF $\gamma$ ), que es un potente activador de macrófagos. Los macrófagos, que son los contenedores de los bacilos, adquieren mayor capacidad bacteriostática o bactericida al ser activados por el INF $\gamma$  (McDonough, y Bloom, 1996).

Existen algunos indicios de que la subpoblación de células Th1 es la responsable de la inmunidad protectora y de que los linfocitos Th2 facilitan la infección tuberculosa (Stenger y Modin, 1999). En la respuesta tipo Th1 los linfocitos secretan IL-2 e INF $\gamma$  y esto se asocia con la citotoxicidad contra patógenos intracelulares. Por su parte, en la respuesta tipo Th2 los linfocitos secretan IL-4, 5, 6 y 10 que estimulan a las células B a combatir patógenos extracelulares. De esta manera, los linfocitos Th1 ejercen efecto protector en virtud de su capacidad de secretar INF $\gamma$ , que, como ya se ha señalado, es un activador de

macrófagos.

### **1.5.1 Desarrollo de la enfermedad.**

Una vez dentro del alveolo pulmonar *M. tuberculosis* debe iniciar una serie de etapas que determinarán si la infección procede o no.

Las armas del hospedero son:

- Macrófagos activados que ingieren y matan al bacilo.
- La habilidad para detener el crecimiento de un bacilo en un macrófago no activado al causar la muerte del macrófago (al formar tejido caseoso sólido).

Las armas del bacilo son:

- La habilidad para multiplicarse en macrófagos no activados.
- La habilidad para multiplicarse extracelularmente en tejido caseoso líquido.

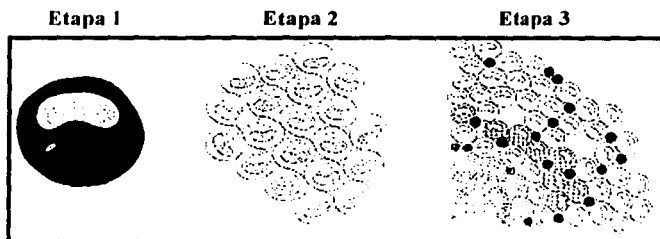
A continuación se muestran las diferentes etapas de la progresión de la tuberculosis de acuerdo con Schlossberg (1999):

**Etapas 1. Etapa de no crecimiento bacteriano** (7 días luego de la infección), en la cual el bacilo es usualmente destruido o inhibido por el macrófago alveolar (MA) residente maduro que lo ingiere. En esta etapa el macrófago fue activado de manera inespecífica por cualquier otra partícula ajena al organismo. En la mayoría de los individuos la infección termina aquí (figura 6).

Si el bacilo no es destruido, a causa de algún deterioro del sistema inmune por ejemplo, se multiplica y eventualmente destruye al MA.

**Etapas 2. Etapa simbiótica (término no estrictamente biológico)** (7 a 21 días luego de la infección) en la cual el microorganismo crece logarítmicamente dentro del macrófago inmaduro (no activado) recién llegado del torrente sanguíneo a la lesión en desarrollo (ahora llamado tubérculo). Es llamada etapa simbiótica porque: 1) el bacilo se multiplica localmente sin aparente daño al hospedero y, 2) los macrófagos se acumulan y se dividen (figura 6). El bacilo no daña al macrófago ya que el hospedero aún no ha desarrollado daño a tejido por hipersensibilidad de tipo retardada.

**Etapa 3. Etapa de necrosis caseosa** en la cual el número de bacilos viables permanece estacionario debido a que su crecimiento es inhibido por la respuesta inmune contra antígenos de tuberculina liberados por el bacilo. La respuesta inmune que se monta es un daño al tejido por DTH, la cual mata a los macrófagos que se cargaron de bacilos en la etapa 2. La lesión entonces contiene un centro caseoso sólido dentro del cual el bacilo, ahora extracelular, no se multiplica. Alrededor de este centro se encuentran macrófagos inactivados (figura 6).



**Fig. 6.** Etapas de la tuberculosis pulmonar. Etapa 1: un macrófago alveolar que ha ingerido y destruido los bacilos tuberculosos en la vacuola fagocítica. El citoplasma de este macrófago está sombreado de negro para representar un alto grado de activación (altos niveles de enzimas lisosomales y oxidativas). Etapa 2: un tubérculo primario en el cual el bacilo se multiplica logarítmicamente dentro de los macrófagos provenientes del torrente sanguíneo. Estos nuevos fagocitos no están activados y son incompetentes. Etapa 3: Un tubérculo de 3 semanas de edad con un centro necrótico caseoso y una acumulación periférica de macrófagos parcialmente activados (difusamente sombreados) y linfocitos (círculos negros pequeños). Las primeras etapas de activación ocurren cuando la respuesta inmune que causa daño al tejido mata a los macrófagos no activados que han permitido a los bacilos crecer logarítmicamente dentro de ellos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

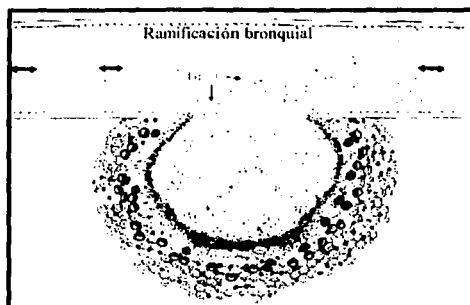
**Etapa 4. Es la etapa que usualmente determina si la enfermedad será clínicamente aparente.** La inmunidad mediada por células (CMI) juega un rol principal. Si sólo se desarrolla una pobre CMI, los bacilos escapan de las orillas de ese centro caseoso sólido y se multiplican otra vez en los macrófagos no activados. Otra vez la DTH citotóxica mata a esos macrófagos, causando un agrandamiento del centro caseoso y la progresión de la enfermedad. Si se monta una buena CMI, un manto de macrófagos altamente activados rodea la necrosis caseosa. Estos macrófagos ingieren, destruyen o inhiben el bacilo que escapa de la lesión. Si el individuo es susceptible, los bacilos comienzan de nuevo la infección (figura 7).



**Fig. 7.** Etapa 4a: un centro caseoso de 4 a 5 semanas de edad en un paciente susceptible. Los bacilos que escapan de los extremos de este centro son ingeridos por macrófagos no activados. En esos macrófagos otra vez el bacilo encuentra el ambiente intracelular favorable para crecer. Otra vez la respuesta inmune de daño al tejido mata a estas células y el área de la necrosis caseosa se agranda. El bacilo se expande a otros tejidos y comienza su destrucción. Etapa 4b: un centro caseoso de 4 a 5 semanas de edad en un paciente resistente. El centro caseoso permanece con un tamaño pequeño debido a que los macrófagos altamente activados los ingieren. Si el centro caseoso permanece sólido y no se licua, la enfermedad podría ser arrestada por esta CMI.

**Etapa 5. Etapa de licuefacción.** El bacilo evade las defensas del organismo cuando el centro caseoso presenta signos de licuefacción y se multiplica extracelularmente (figura 8). Aún una buena CMI es inefficiente para controlar a los bacilos en ese estado. La alta concentración de productos de tuberculina causa una respuesta de daño al tejido por DTH que erosiona la pared bronquial formando una cavidad. El bacilo entra entonces a las ramificaciones bronquiales y se expande a otras partes del pulmón y, posteriormente, al ambiente externo durante un arrastre de tos. El arresto de la enfermedad en esta etapa depende de la carga antigénica.

**Etapa 5**



**Fig. 8.** Etapa 5. Una cavidad pequeña recientemente formada descargando el material caseoso licuificado en un bronquio. Hay una enorme cantidad de bacilos y aumenta la probabilidad de mutación resultando en la resistencia antimicrobiana. Esos bacilos abruma la CMI causando la progresión de la enfermedad y la destrucción del tejido local, incluyendo la pared de un bronquio adyacente. El material caseoso licuificado es descargado a las corrientes de aire, el bacilo se disemina hacia otras partes del pulmón y, luego, al ambiente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **1.6 Importancia del diagnóstico de casos activos de tuberculosis y métodos de diagnóstico.**

En la actualidad el diagnóstico de la tuberculosis se realiza empleando métodos bacteriológicos, métodos inmunológicos, químicos y de biología molecular. Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas y son los métodos serológicos (incluidos en los inmunológicos) los que pueden llegar a ser más confiables y útiles por la especificidad y bajo costo que pueden tener. Las siguientes son las ventajas del diagnóstico rápido y eficiente de la enfermedad:

- Conseguir el tratamiento oportuno de los pacientes con tuberculosis.
- Abatimiento de muertes (5000 personas diariamente mueren de TB alrededor del mundo).
- Evitar el contagio de más personas (cada caso activo infecta aproximadamente de 10 a 15 personas en un año).

### **1.6.1 Baciloscopia.**

Los frotis del esputo para la captura directa de las micobacterias pueden brindar la primera confirmación del diagnóstico clínico. La coloración más empleada en la mayoría de los laboratorios es la de Ziehl-Neelsen (Blancarte et al., 1994), aunque también se utiliza la de Kinyoun. En la actualidad se prefiere el examen microscópico del frotis del esputo para la detección de bacilos ácidoresistentes (microscopía AFB) pero ésta tiene una baja sensibilidad diagnóstica (30-70%), particularmente cuando el número de especímenes excede la capacidad del laboratorio (Gennaro, 2000). Además, esta técnica no puede diagnosticar tuberculosis infantil (ya que los niños son incapaces de expectorar) así como tampoco infecciones extrapulmonares de la enfermedad.



### **1.6.2 Cultivo.**

Los métodos de cultivo son extremadamente lentos (tardan de 4 a 7 semanas debido a la lentitud del crecimiento de la micobacteria), requieren laboratorios bien equipados y personal altamente capacitado además de que se deben realizar metodologías de tinción que no son específicas (Schlossberg, 1999). El sistema BACTEC para la identificación radiométrica de las micobacterias disminuye el tiempo para detectar cultivos positivos (8-14 días). La desventaja principal del uso de este sistema es el empleo de sustratos radiactivos y la necesidad de medidas instrumentadas especializadas costosas (Rossman y McGregor, 1996). Además, los cultivos pueden contaminarse y puede existir un sobrecrecimiento de especies no micobacterianas resultando en cultivos falsos positivos (Chan et al., 2000).

### **1.6.3 Técnicas ordinarias de identificación.**

Incluyen la determinación de la tasa de crecimiento del bacilo, pero es poco fiable ya que numerosos bacilos de crecimiento lento pueden hacer que aparezcan colonias con profusidad o bien, los tratamientos alcalinos de la muestra clínica pueden dañar micobacterias de crecimiento rápido, lo que hará que se requieran semanas para su desarrollo; la producción de pigmento y la morfología de las colonias suelen variar y por lo tanto complicar el diagnóstico.

### **1.6.4 Radiografía del tórax.**

Por ser una técnica de visualización resulta muy arbitraria además de que ciertas lesiones se confunden con pulmonía y ciertos cánceres pulmonares. Por lo tanto no puede confirmarse el diagnóstico de la tuberculosis.

### **1.6.5 Sondas de ADN.**

En esta técnica un ADN es marcado con un éster de acridinio el cual hibrida con una secuencia en el genoma del bacilo. Se produce luz cuando este éster se oxida por acción del peróxido de hidrógeno y se hidroliza con álcalis potentes, el descubrimiento se efectúa al medir esta reacción quimioluminiscente (Goldsby et al., 2000). Sin embargo, esta técnica resulta con un elevado costo.

### **1.6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite, a partir de un solo fragmento de ADN, la amplificación y la producción *in vitro* de varios millones de copias. De esta forma puede identificarse cualquier fragmento de ADN del microorganismo en una muestra clínica ya sea de esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, sangre y orina (Villalba et al., 1999). La técnica PCR ha sido aplicada en tuberculosis usando diferentes fragmentos de ADN; el que se ha usado con mayor frecuencia es conocido como IS6110, que corresponde a una parte del genoma de *M. tuberculosis*, y del que existen entre 10 y 20 copias por bacteria (Eisenach et al., 1991). Esta secuencia tiene mayor probabilidad de amplificarse que aquellas secuencias con una sola copia.

Los estudios clínicos han demostrado sensibilidad cercanas al 100% en muestras de esputo (Eisenach et al., 1991). Aunque también se sabe que no se ha conseguido una buena reproducibilidad del método (Nordhoek et al., 1996).

Las desventajas de esta técnica es que aún no se cuenta con métodos automatizados comerciales que sean confiables, la alta tasa de contaminación por ser ésta una prueba muy sensible y, finalmente, su elevado costo.

### **1.6.7 Pruebas cutáneas para el diagnóstico de la enfermedad.**

Luego de la infección por micobacterias los linfocitos T quedan sensibilizados. La inyección de tuberculina (o PPD) estimula a los linfocitos y activa la cascada que culmina

en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) (Chan et al., 2000). La reactividad dérmica consiste en vasodilatación, edema e infiltración de linfocitos en el sitio donde se aplicó el antígeno. Puede sobrevenir eritema, un fenómeno inflamatorio agudo caracterizado por enrojecimiento en este sitio como reacción al antígeno de la prueba cutánea. Para realizar la prueba la tuberculina se inyecta de manera intracutánea en el antebrazo para producir una erupción entre 6 y 10 mm de ancho. Entre 48 y 96 horas más tarde el área de induración se mide en milímetros. La prueba de piel de la tuberculina es de utilidad limitada en el diagnóstico de la enfermedad activa debido a los resultados falsos positivos y falsos negativos que suele brindar (Chaparas et al., 1985).

### **1.6.8 Serodiagnóstico.**

En 1898, luego de que Koch identificó *M. tuberculosis*, Arloing describió una prueba de aglutinación para el diagnóstico de la tuberculosis (Findeisen, 1982). La introducción del método de ELISA en 1972 permitió que los estudios serológicos se aplicaran para el diagnóstico de la TB. En este método se identifican los anticuerpos que han sido producidos en contra de *M. tuberculosis* y así se detecta el bacilo en los pacientes. A pesar de que los métodos serológicos pueden ser de gran utilidad, no se ha generalizado el uso de sistemas comerciales en los laboratorios de rutina (Garg et al., 2003). En el inmunodiagnóstico o serodiagnóstico de la tuberculosis, podemos analizar la respuesta inmune humoral de la que se sabe poco para esta enfermedad. Asimismo, estos métodos pueden aplicarse a gran escala, son rápidos y de bajo costo para la población en general si se logran identificar los antígenos micobacterianos que nos permitan un correcto diagnóstico de la enfermedad sin dar reacciones cruzadas. Además, con esos métodos es posible detectar casos de enfermedad extrapulmonar e infantil que con los métodos convencionales es muy difícil lograrlo. Algunos de los antígenos proteicos mejor caracterizados para el serodiagnóstico son: antígeno de 38 KDa; antígeno A-60 que es un complejo que contiene lípidos, proteínas y polisacáridos, un componente termoestable del PPD; antígeno p90; antígeno de 19 KDa; el complejo de antígenos de 45/47 KDa, y el antígeno P32 entre otros (Chan, 2000).

En nuestro país, Espitia y colaboradores realizaron un trabajo en 1991 en el que

encontraron, mediante SDS-PAGE e inmunoblotting con sueros de pacientes tuberculosos contra proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* de 6-8 semanas, 2 bandas gruesas de 65 y 63 KDa y, además, otras bandas frecuentemente reconocidas que son las de 31, 32, 38, 58 y 94 KDa.

En este sentido, éstas pruebas con electroforesis convencional (una dimensión) y Western Blotting presentan algunas contradicciones: en los estudios realizados por Espitia et al, (1991) la proteína de 30-31 KDa no es específica de pacientes tuberculosos (es reconocida por sueros de pacientes sanos), mientras que en otros reportes (Sada et al., 1990) esta misma proteína es muy específica de pacientes tuberculosos (no es muy reconocida por sueros de pacientes sanos).

La electroforesis bidimensional podría ayudar a esclarecer cuáles proteínas son realmente útiles para inmunodiagnóstico ya que es un método que resuelve, de una manera más fina, las proteínas (antígenos) con respecto a las técnicas convencionales de electroforesis en una dimensión en donde distintos antígenos pueden co-migrar, dificultando de esta manera la reacción con sueros de pacientes tuberculosos y ocasionando una errónea interpretación de los datos.

### **1.7 Electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE).**

La electroforesis, de *electros*, que se refiere a la energía de la electricidad, y del griego *phoresis* (traducción: desplazamiento por electricidad), es el estudio de la migración de los iones y las partículas coloidales cargadas cuando están bajo la acción de un campo eléctrico a través de un solvente o una matriz (Rodríguez, 1996). En solución, la fuerza de aceleración generada por el campo eléctrico es opuesta a la fuerza de fricción, la velocidad de una molécula es proporcional a la fuerza del campo y la carga de la molécula, pero inversamente proporcional a su tamaño y a la viscosidad de la solución (Rodríguez, 1996). La electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) es un método ampliamente usado para el análisis de una mezcla compleja de proteínas extraídas de células, tejidos u otras muestras biológicas (Bjellqvist et al., 1998). La técnica original fue introducida por O'Farrel y Klose y se hacían en geles hechos en un tubo y con anfolitos acarreadores (O'Farrel, 1975). Esta técnica separa a las proteínas de acuerdo con dos propiedades fundamentales: la primera dimensión es el isoelectroenfoque (IEF), la cual separa a las proteínas de acuerdo con su punto isoelectrico (PI) (el PI es el pH al cual las proteínas tienen carga neta igual a cero); y la segunda dimensión es la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) la cual separa a las proteínas de acuerdo con su peso molecular (Link, 1999). Las dos dimensiones se realizan en condiciones reductoras y desnaturizantes. Las proteínas son moléculas anfotéricas, contienen cargas netas positivas, negativas o cero dependiendo del pH que las rodea. Las proteínas están cargadas positivamente a valores por debajo de su punto isoelectrico y están cargadas negativamente a valores de pH por encima de su PI (Figura 9). De acuerdo con Rodríguez (1996), cuando se coloca una muestra en el gradiente y se aplica un campo eléctrico, los componentes anfotéricos comienzan a migrar. Si un componente tiene una carga neta negativa, empezará a migrar hacia el ánodo (positivo). Conforme migre encontrará progresivamente un pH bajo y comenzará a protonarse hasta llegar a un pH donde su carga neta será cero (el PI) y se detendrá. Asimismo, cada componente se trasladará hasta su propio PI y también se detendrá. Si una molécula de soluto comienza a difundir fuera del centro de la zona, también ganará o perderá protones, se cargará y se moverá. Esto continuará en tanto se

mantenga el campo eléctrico.

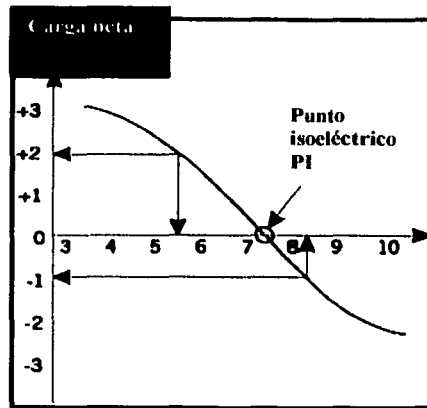
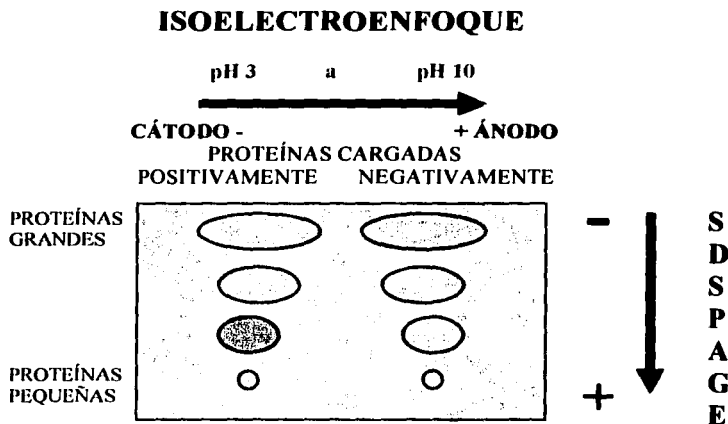


Fig. 9. Carga neta de una proteína como función del pH. En este ejemplo la proteína tiene una carga neta de +2 a pH 5.5, 0 a pH 7.5 (el PI), y -1 a pH 8.5. Cuando se aplica voltaje las proteínas con el PI más bajo (y la carga más negativa) se mueven hacia el ánodo, y las proteínas con el PI mayor (y la carga más positiva) se mueven hacia el cátodo.

Cada spot en el arreglo bidimensional corresponde a una sola especie proteica. La principal aplicación de la 2D-PAGE es el análisis del proteoma el cual incluye la separación sistemática, identificación y cuantificación de muchas proteínas de una muestra simultáneamente. Además, la técnica permite detectar modificaciones post-traduccionales, permite el análisis de la diferenciación celular, la investigación en cáncer, monitoreo de terapias entre otras.

Los geles se presentan de acuerdo con la convención Cartesiana: con los puntos isoelectrónicos ácidos bajos a la izquierda y los bajos pesos moleculares en el fondo (figura 10).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 10.** Diagrama representativo de la separación de las proteínas en 2D-PAGE. Isoelectroenfoque: luego de aplicar el campo eléctrico las proteínas migran dentro del gradiente de pH. Cuando alcanzan el pH en el gradiente igual a sus  $P_I$ 's, su carga neta cae a cero y se enfocan en distintas zonas. SDS-PAGE: las proteínas se desplazan a velocidades que dependen de sus tamaños. Las más pequeñas se mueven más rápido y más lejanas, mientras que las más grandes se mueven más lento y a menor distancia.

Como se ha establecido, el isoelectroenfoque se realiza bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes. En esta primera dimensión las proteínas deben prepararse para lograr un enfoque correcto.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.8 Transferencia de las proteínas a membrana y Western Blotting.

La identificación de una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas puede ser acompañada por una técnica conocida como Inmunoblotting o Western Blotting (Goldsby et al., 2000). En esta técnica una mezcla de proteínas es separada electroforéticamente en un gel de SDS-PAGE. Después, las bandas de proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (membrana de soporte). La membrana une e inmoviliza a las proteínas en el mismo patrón que en el gel original además de que es más fácil de manipular que el gel. La transferencia es de cátodo a ánodo y el ensamblaje de una cámara de transferencia se muestra en la figura 11.

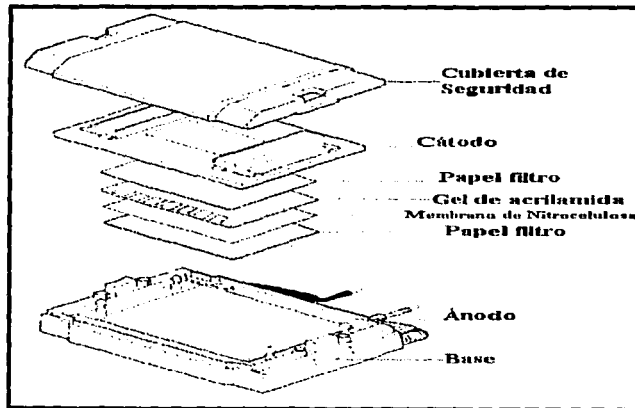


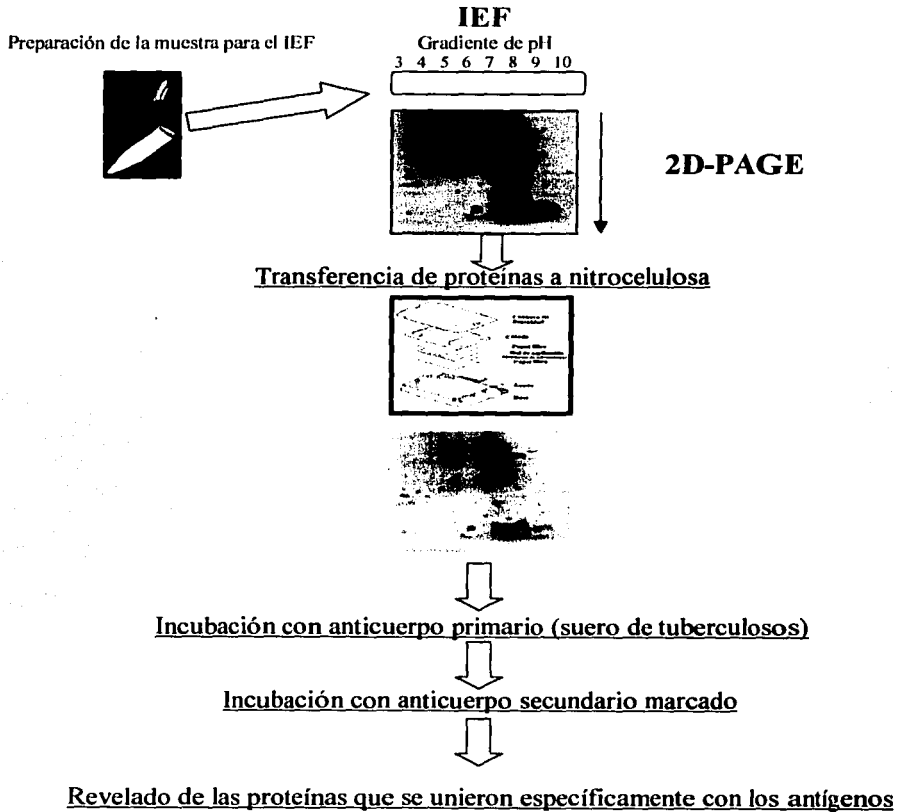
Fig. 11. Ensamblaje de una cámara de transferencia con gel en sándwich (adaptado de Goldsby, 2000).

El Western Blotting es una poderosa técnica ampliamente utilizada para la detección e identificación de proteínas usando anticuerpos. Luego de la transferencia la membrana se bloquea y se incuba con los sueros en estudio (anticuerpos dirigidos contra el antígeno transferido). Posteriormente la membrana se incuba con un anticuerpo secundario que permitirá detectar los anticuerpos que se han unido a los antígenos transferidos a la membrana. Este anticuerpo está ligado a una enzima la cual, al tener actividad sobre su sustrato, produce un compuesto colorido (figura 12) (Towbin, et al., 1989).



**Técnica del Inmunoblotting o Western Blotting**

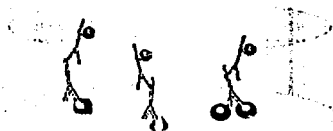
**Migración de proteínas por IEF y posteriormente por SDS-PAGE**



**Fig. 12. Esquema del Western Blotting.**

### 1.9 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. ELISA.

La técnica de ELISA (que proviene de la abreviación del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*). Básicamente consiste en "emparedar" a la molécula que haya de analizarse entre otras dos macromoléculas, una de las cuales se halla conjugada a una enzima, lo cual permite su detección mediante un cromógeno o sustancia luminiscente (figura 13). La técnica de ELISA es sensible, rápida y permite analizar muchas muestras de suero al mismo tiempo ya que no utiliza radioactividad (Lehninger, 1995). En el caso de la detección de anticuerpos en suero, suele emplearse la técnica de ELISA indirecto. Esta técnica consiste en inmovilizar primero una proteína (el antígeno contra el cual vayan dirigidos los autoanticuerpos que queremos detectar) en una fase sólida (existen placas con múltiples pozos con los antígenos ya incorporados), tras su preparación y lavado los pozos son bloqueados y se incuban con los sueros en estudio en diferentes concentraciones y tras los siguientes lavados se incuba con el segundo anticuerpo (anticuerpo anti-inmunoglobulina humana, si es el caso, unida a una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa)) y posteriormente se realiza el revelado, mediante la adición de un sustrato y una sustancia cromógena, que reacciona con la enzima permitiendo su medición con un <sup>422</sup>espectrofotómetro o espectrofluorómetro (Goldsby et al., 2000).



**Fig. 13.** El antígeno se inmoviliza en el fondo de la placa y luego se conjuga al primer anticuerpo. Existe un segundo anticuerpo ligado a una enzima que se une al primer anticuerpo. Al adicionar el sustrato para la enzima se produce una sustancia colorida que indica la presencia del antígeno.

## JUSTIFICACIÓN:

Los métodos de diagnóstico más comunes de la tuberculosis pulmonar como el frotis del esputo y el cultivo fracasan en un 25% de los casos (Espitia, 1991). En este grupo están los niños y pacientes con enfermedad incipiente. Estos casos, además de la existencia de tuberculosis extrapulmonar, hace necesario tener una prueba de serodiagnóstico confiable.

En el presente, una meta de investigación en tuberculosis es la disección de la estructura antigénica del bacilo tuberculoso. Un análisis por 2D-PAGE y Western Blotting puede dar a conocer los antígenos proteicos de *M. tuberculosis* que son más reactivos contra sueros de pacientes tuberculosos y, por lo tanto, pueden ser utilizados como herramientas útiles de serodiagnóstico altamente confiables. La ventaja de poner en evidencia nuevos antígenos aumenta la probabilidad de realizar cócteles antigénicos que puedan reconocer la variabilidad de respuestas de anticuerpos estimuladas en cada etapa de la enfermedad por los individuos infectados. Distinguir entre individuos no infectados, infectados no sintomáticos y con tuberculosis activa es de relevancia fundamental para el correcto diagnóstico y el correcto tratamiento de la enfermedad, lo que evitará que esos individuos sean potenciales focos de infección del bacilo y se disminuya el riesgo de contagio. Además, permitirá una mejor evaluación de nuevas vacunas anti-tuberculosis

Las nuevas herramientas de análisis por electroforesis en dos dimensiones son de vital importancia para poner en evidencia nuevas proteínas de *M. tuberculosis* que en una sola dimensión podrían no separarse adecuadamente debido a la similitud en su peso molecular. Entre estas proteínas se encuentran las isoformas con idéntico peso molecular pero diferente pI.

De esta manera se podrá saber qué antígenos proteicos son característicos de las distintas etapas de la enfermedad y, por lo tanto, pueden servir de diagnóstico de la tuberculosis pulmonar activa.

**HIPÓTESIS:**

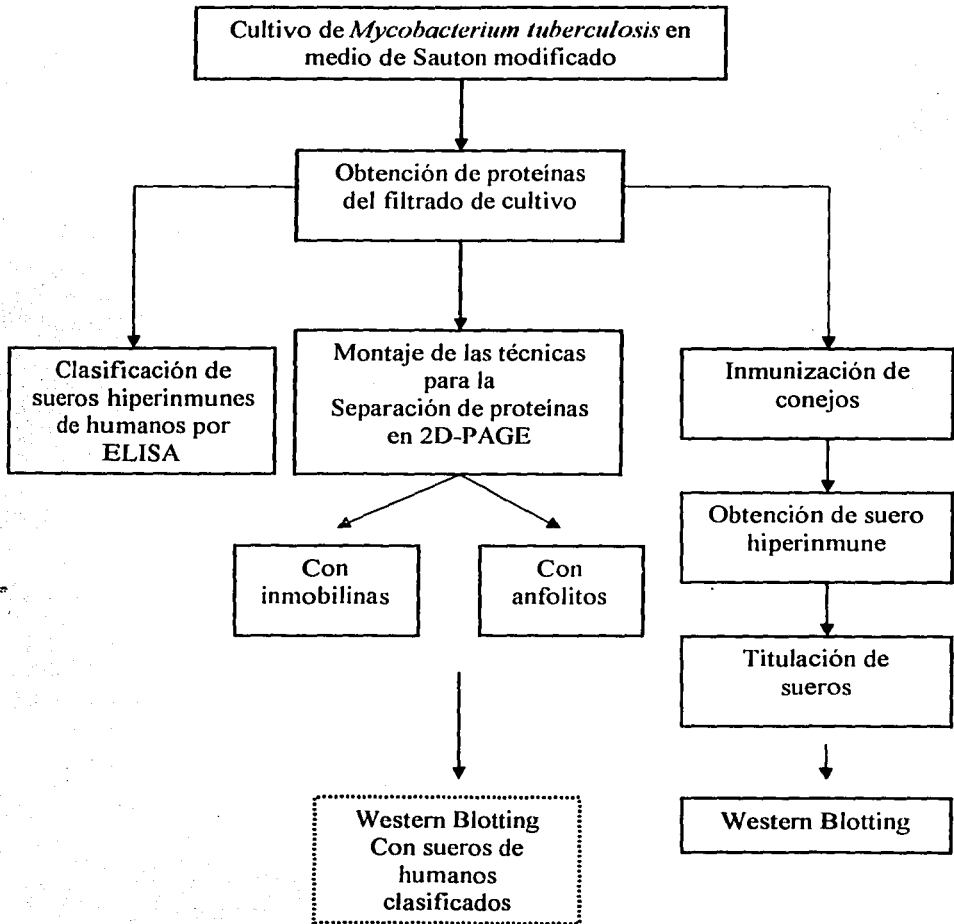
Si las metodologías de análisis de proteomas permiten visualizar gran cantidad de las proteínas secretadas de *Mycobacterium tuberculosis*, será posible detectar una gama de proteínas (antígenos potenciales) que, posteriormente puedan ser evaluados para su uso en diagnóstico.

**OBJETIVOS:**

En este trabajo se adquieren las herramientas y las bases metodológicas para identificar los antígenos proteicos secretados de *Mycobacterium tuberculosis* mediante análisis por 2D-PAGE. De manera específica:

- ∅ Ensayar las técnicas metodológicas para separar las proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* mediante 2D-PAGE.
- ∅ Clasificar una colección de sueros de humanos con tuberculosis pulmonar activa.
- ∅ Producir anticuerpos policlonales en contra de antígenos proteicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

ESQUEMA METODOLÓGICO:



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS:

### 2.1 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

La cepa H37 Rv de *Mycobacterium tuberculosis* fue cultivada durante 3 semanas en medio de Sauton modificado, el cual está enriquecido con 0.5% de glucosa y 0.5% de piruvato (Ver Apéndice A). Cada día, desde el inicio del cultivo, se obtuvo una alícuota del medio de cultivo y se midió su densidad óptica a 450 nm de longitud en un espectrofotómetro.

### 2.2 Obtención de las proteínas del filtrado de cultivo.

Después de 3 semanas de incubación del bacilo, el medio de cultivo se esterilizó por filtración. Para ello los cuerpos celulares fueron separados del medio de cultivo por decantación y, enseguida, el medio de cultivo se pasó a través de membranas Millipore (Millipore Corp., Bedford, Mass) de 1.2  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro sucesivamente. El medio líquido obtenido al final del procedimiento se precipitó con sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ) al 85% de saturación (555 g de sulfato de amonio en 1 L de agua) durante 12 horas a 4°C.

El precipitado fue separado por centrifugación a 10,000 r.p.m. durante 15 minutos y dializado en membranas Spectra/Por (MWCO: 2,000) contra agua bidestilada. Posteriormente, las proteínas fueron liofilizadas, redisueltas en agua milli Q y cuantificadas por el método de Lowry con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (Ver Apéndice B).

Estas proteínas se nombraron proteínas del filtrado de cultivo (FC).

### **2.3 Sueros.**

Los sueros con los que se realizaron las pruebas de estandarización del Western Blotting se obtuvieron a partir de conejos Nueva Zelanda (conejos 1, 2, 3 y 4) los cuales fueron inmunizados con 200 µg de antígeno (proteínas del filtrado de cultivo), 1 ml de Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) y 200 µl de muramil dipéptido, administrados de manera subcutánea (Skeiky et al., 1999). Se realizaron 3 refuerzos con 100 µg de antígeno y AIF a intervalos de 3 semanas y los conejos se sacrificaron a la semana 12 para la obtención del suero. Los sueros se titularon por ELISA.

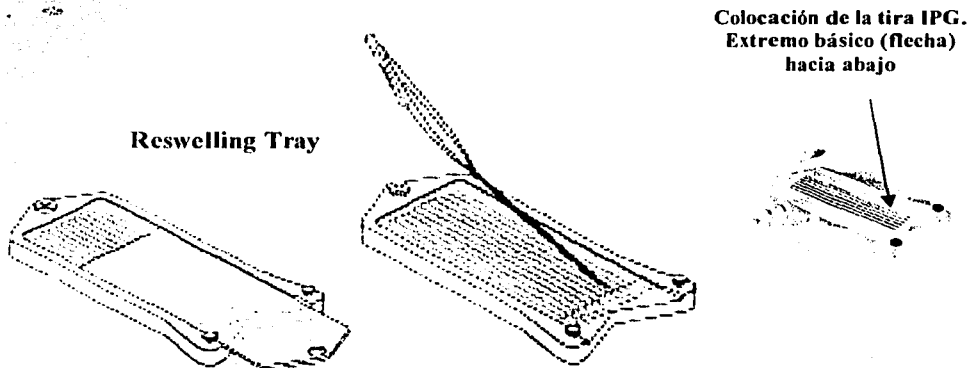
Los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar fueron obsequiados por el Dr. Carlos Hermida del Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" del IMSS y también se obtuvieron sueros normales del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se eligieron un total de 19 sueros de cada grupo debido a que el volumen de cada suero permitía realizar varios ensayos.



**2.4 Solubilización de las proteínas del filtrado de cultivo utilizando inmobilinas.**

Las proteínas del filtrado de cultivo se solubilizaron en solución de rehidratación, la cual se utilizó fresca (Ver Apéndice C). Esta solución se preparó con 8M de urea; 2% (w/v) de CHAPS; azul bromofenol, 7 mg de DTT y agua destilada en un volumen final de 2.5 ml (las cantidades mostradas en adelante hacen referencia a la realización de un solo gel). De esta mezcla se tomaron 250  $\mu$ l y se le añadieron 2% de amortiguador IPG pH 3-10 ó 4-7 (Amersham Biosciences, Suecia) lineal y se mezclaron con 1-1.5 mg de proteína (volumen de 200-250  $\mu$ l) durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo, el volumen total (450-500  $\mu$ l) se depositó a lo largo de una ranura de la bandeja de rehidratación (Reswelling Tray). Después se eliminó la cubierta protectora de una tira IPG pH 3-10 ó 4-7 L (gradiente lineal) de 13 cm (Pharmacia) y se colocó cuidadosamente sobre la solución de rehidratación con el extremo básico (flecha) hacia abajo. Finalmente se añadieron 3 ml de aceite mineral (Dry Strip Cover Fluid) sobre la tira IPG. La tira IPG se rehidrató durante 15 horas.

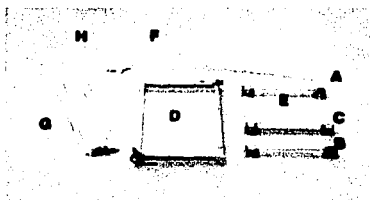


### 2.4.1 Separación de proteínas en primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).

Después de la rehidratación las tiras IPG se sacaron de la bandeja de rehidratación y se enjuagaron con agua destilada. El isoelectroenfoque se realizó en el equipo *Multiphor II* (Amersham Biosciences, Suecia) con sus respectivos componentes.

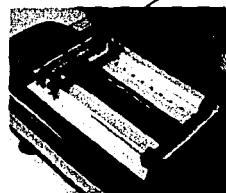


I



II

Extremo básico (flecha) de la tira IPG hacia arriba (hacia el ánodo)



III

Primero se estableció la temperatura del sistema a 20° C con el *Circulador Termostático MultiTemp III* conectado a la placa de enfriamiento (I). Después se colocaron 10 ml de aceite mineral sobre la placa de enfriamiento; encima de ésta se colocó el contenedor de electrodos (D en II); después el alineador de tiras IPG (F). En este último se acomodaron las tiras IPG rehidratadas con el extremo básico (flecha) hacia arriba (hacia el ánodo). En cada extremo de las tiras se pusieron tiras de electrodos (G) humedecidas con 0.5 ml de agua Milli Q y directamente sobre ellas su respectivo electrodo (A, B). Todo se llenó con 20 ml de aceite mineral y se establecieron las correspondientes conexiones del equipo (III).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El isoelectroenfoque se realizó de acuerdo con el siguiente programa:

Tira IFC.	Fase	V h	Voltaje	mA	W
Longitud de la tira= 13 cm	1	1	300	2	5
Rango de pH= 3-10 ó 4-7	2	2,900	3500	2	5
Tipo de gradiente de pH= Lineal	3	18,100	3500	2	5
<b>Total:</b>		<b>21,000</b>	<b>7,300</b>		

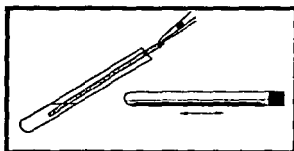
V/h= volts por hora; mA= miliamperes; W= watts.

Por una parte se ensayó el IEF usando solo voltaje y por otra parte se ensayó el IEF usando V/h.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

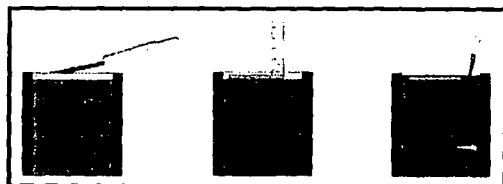
### 2.4.2 Separación de proteínas en segunda dimensión: SDS-PAGE.

Una vez terminado el IEF, la tira IPG fue equilibrada en Solución de Equilibrio (Ver Apéndice D). De esta solución se tomaron 10 ml a los cuales se añadieron 100 mg de DTT. Esta mezcla se colocó en un tubo y así la tira IPG se mantuvo en agitación durante 15 minutos.

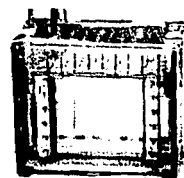


Terminado el proceso de equilibración la tira IPG se bañó con SDS Buffer de Electroforesis (Ver Apéndice E) para permitir su colocación inmediata en el sistema para la segunda dimensión vertical (Hoefer SE 600). La segunda dimensión se resolvió en un gel SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida con 1.5 mm de grosor (Ver Apéndice F). La tira IPG equilibrada se acomodó entre los vidrios del gel SDS-PAGE polimerizado con la ayuda de unas pinzas, evitando dejar espacios entre la tira IPG y el gel SDS-PAGE.

Colocación de la tira IPG sobre el gel SDS-PAGE



Sistema vertical  
Hoefer SE 600



Finalmente, la tira IPG se selló con Solución de Agarosa (Ver Apéndice G) para evitar que se moviera. Las condiciones de corrida fueron 50 V durante 18 horas. Al final, el gel puede teñirse con azul de coomassie (Ver Apéndice H).

## **2.5 Solubilización de las proteínas del filtrado de cultivo utilizando anfolitos.**

Las proteínas del filtrado de cultivo se solubilizaron en buffer de carga (Apéndice I). 20  $\mu$ l de proteína (160  $\mu$ g) fueron disueltos en 20  $\mu$ l de buffer de carga adicionando 5 mg de urea durante 15 minutos.

### **2.5.1 Separación de proteínas en primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).**

Las proteínas fueron separadas por 2D SDS-PAGE de acuerdo con el método de O'Farrel (1975) con menores modificaciones. La primera dimensión se realizó en geles elaborados en tubos capilares de 7.5 centímetros de largo por 0.2 centímetros de ancho. La preparación del gel se realizó de la siguiente manera: se mezclaron 2.2 gr de urea; 600 $\mu$ l de poliacrilamida al 30%; 800  $\mu$ l de Tritón X100 al 10%; 800  $\mu$ l de agua bidestilada; 160  $\mu$ l de anfolitos (pH 4.0-6.0, Pharmacia); y 40  $\mu$ l de anfolitos (pH 4.0-10, Pharmacia). La solución se dejó en agitación algunos minutos para que se disolviera y se desgasificó. Una vez disuelta, a la solución se le adicionaron los catalizadores de la polimerización: 10  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 5  $\mu$ l de TEMED.

Inmediatamente después de adicionar los catalizadores la solución se vertió sobre un tubo sellado por un extremo con papel Parafilm y que contenía a los tubos capilares. Los tubos se llenaron por capilaridad un poco más de  $\frac{3}{4}$  de su longitud total desde el fondo hasta la punta.

Luego de la polimerización los tubos capilares se removieron con cuidado del tubo sellado. Los capilares se limpiaron y se colocaron en una cámara de isoelectroenfoque. La cámara fue ensamblada. En la parte inferior (ánodo, +) se colocó un búffer de 10 mM de ácido fosfórico (0.67 ml de ácido fosfórico concentrado/L) y en la parte superior (cátodo, -) un búffer de 20mM de NaOH (1.6 ml de 50% NaOH / L).

Se eliminaron las burbujas de aire de la parte superior de los capilares y se realizó una pre-corrida con el siguiente voltaje:

10 min. a 200V
10 min. a 300 V
10 min. a 400 V

Una vez terminada la pre-corrida se adicionó la muestra proteica previamente disuelta en buffer de carga (se ensayaron volúmenes finales que fueron de 15 a 45  $\mu$ l) y se corrieron utilizando 2 métodos:

Tiempo	Voltaje	Miliamperes	Watts
Método 1			
Fase 1: 3 hrs	1000 V	0.6 mA	001 W
Método 2			
Fase 1: 12 hrs	400 V	0.2 mA	001W
Fase 2: 1 hr.	500 V	0.1 mA	001W

### **2.5.2 Separación de proteínas en segunda dimensión: SDS-PAGE.**

Inmediatamente después del isoelectroenfóque se preparó un gel de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida (Apéndice F) con espaciadores de 1.5 mm y en formato MiniProtean II, bajo condiciones reductoras como se describe en Laemmli (1970). Con una jeringa y un adaptador los geles capilares se extrajeron del tubo capilar y se colocaron en la parte superior del gel SDS-PAGE. El gel se corrió a 80V durante 3 horas y media. Las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul de coomassie al 0.05% (Apéndice H).

## **2.6 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.**

Una vez terminada la electroforesis en segunda dimensión, el gel se equilibró en buffer de transferencia (Ver Apéndice J) durante 30 minutos. Una membrana Hybond-C (Amersham Life Sciences) se cortó a las mismas dimensiones del gel (14X14 cm) y se equilibró en buffer de transferencia durante 30 minutos también. Dos capas de papel filtro extragruoso se remojaron en este mismo buffer.

La transferencia se realizó en la cámara de transferencia *Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). El orden de ensamblaje de la cámara (evitando dejar burbujas) fue el siguiente: 1 capa de papel filtro sobre el ánodo de platino; membrana Hybond-C; gel SDS-PAGE; 1 capa de papel filtro; y el cátodo (Ver figura 11). Las condiciones de transferencia fueron de 15 V durante 30 minutos (sin exceder 3 mA/cm<sup>2</sup>). La polaridad de la transferencia fue de cátodo a ánodo.

Terminada la transferencia la membrana se lavó en PBS para realizar el Western Blotting, o bien, para verificar la transferencia, una membrana fue teñida con Rojo Ponceau (Ver Apéndice K) durante 15 minutos.

## **2.7 ELISA.**

Tanto los sueros de conejo como los sueros de pacientes con tuberculosis (tuberculosis activa y personas sanas) fueron titulados mediante ELISA para conocer la dilución que, posteriormente, se empleará en los Western Blottings. Los sueros de conejo fueron diluidos a 1:10; 1:50 y 1:100, mientras que los sueros de humanos fueron diluidos 1:10, 1:100 y 1:200 (Ver Apéndice L).

Se depositaron las proteínas del filtrado de cultivo (0.5 µg de proteína en 100 µl de amortiguador de carbonatos) (Ver Apéndice M) en placas de ELISA de 96 pozos especiales para proteínas (Nunc Maxisorp) y se incubaron durante 12 horas a 37° C.

Posteriormente los pozos se saturaron con 200 µl de una solución al 3% de BSA en PBS (Ver Apéndice N) durante una hora a 37° C. Transcurrido este tiempo las placas se lavaron con PBS y, en los pozos, se adicionó el suero de los conejos inmunizados o los

sueros de humano (en las diluciones establecidas anteriormente) diluidas en una solución al 0.3% de BSA en PBS y se incubaron durante una hora a 37° C. Al terminar, los pozos se lavaron 5 veces con PBS durante 5 minutos cada lavado). Después se adicionó, respectivamente, anti-IgG de conejo (diluido 1:8,000) o anti IgG de humano (diluido 1:5,000) conjugados a la fosfatasa y diluidos en una solución al 0.3% de BSA en PBS, y se incubaron durante una hora a 37° C. Después de lavar las placas, se adicionaron 100 µl de *p*-nitrofenil fosfato (1mg/1ml) disuelto en una solución amortiguadora de dietanolamina (Ver Apéndice O) durante 15 minutos hasta la aparición de la coloración amarilla.

Las placas de ELISA se leyeron a 405nm en un lector de microplacas (Opsys MR, Dynex Technologies).

### **2.8 Western Blotting.**

Después de lavar con PBS, la membrana fue bloqueada por inmersión en 0.3% de BSA en PBS durante 12 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo la membrana se incubó con suero (de conejo o de humano) diluido 1:10 en 0.3% de BSA en PBS durante 3 horas. Posteriormente la membrana se lavó en PBS y se incubó con proteína A conjugada a biotina diluida 1:500 en 0.3% de BSA en PBS, durante 30 minutos. Después, la membrana se lavó con PBS y se incubó con estreptavidina peroxidasa diluida 1:500 en 0.3% de BSA en PBS, durante 30 minutos. Finalmente, la membrana se incubó 15 minutos con el sustrato revelador (Ver Apéndice P).

La reacción se detuvo con agua destilada cuando aparecieron bandas de color violeta.



### 3. RESULTADOS:

#### 3.1 Obtención de proteínas del filtrado de cultivo.

Al analizar el medio de cultivo líquido de Sauton enriquecido, se observó que los bacilos crecen adecuadamente en un plazo de alrededor de 3 semanas. Las bacterias crecieron en aproximadamente 21 días (cuando se llegó a una D.O. de 1) alcanzando en este tiempo la fase logarítmica de crecimiento (figura 14).

Es en esta fase cuando se pueden encontrar las mayores cantidades de proteínas secretadas ya que las colonias del bacilo están más activas.

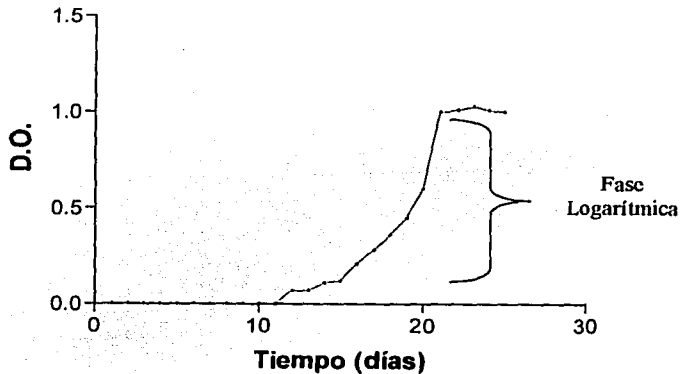


Fig. 14. Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. La fase log (de crecimiento) abarca de los 17 a los 21 días de cultivo.

La cuantificación de las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37 Rv por el método de Lowry, indicó 7.9 mg de proteína por mililitro y se obtuvo un volumen total de 8 ml.

### 3.2 Separación de proteínas en geles de doble dimensión.

El primer gel en establecerse fue el kit de calibración de amplio PI (pH 3-10) para poder observar la separación de algunas isoformas de proteínas como la mioglobina y la anhidrasa B carbónica humana cuyos spots se observan a continuación en la figura 15.

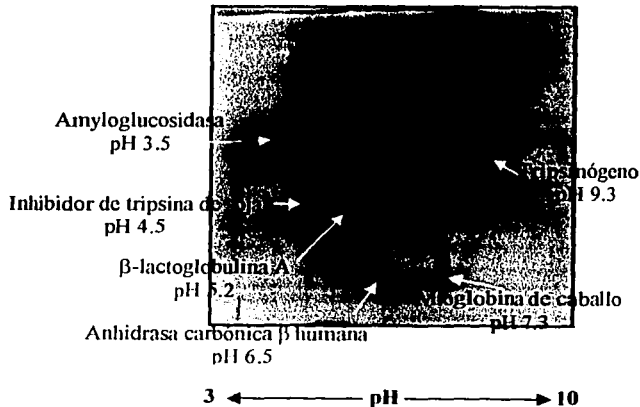


Fig. 15. Estándar de PI.

Posteriormente se procedió a ensayar la separación de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando inmobilinas con tiras IPG pH 3-10 y utilizando voltaje de 3500. Esta prueba mostró una baja resolución en la separación de las proteínas con muy pocos spots detectados y con orientación hacia el pH ácido al ser revelado con azul de coomassie (figura 16a), además, la ausencia de los spots podría indicar una falta de tiempo o de voltaje para el correcto IEF de las proteínas. Las mismas tiras IPG pH 3-10 fueron utilizadas pero ahora fijando la variable V/h lo que permite llegar a voltajes de más de 21,000. Sin embargo, la resolución continuaba siendo el principal problema (figura 16b).

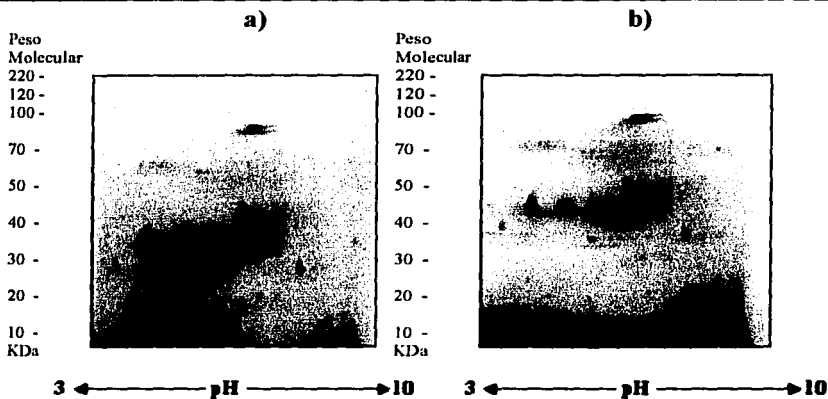


Fig. 16. Isoelectroenfoque utilizando inmobilinas. a) Voltaje final de 3,500; b) voltaje final de 21,000.

Se procedió entonces a utilizar las tiras IPG pH 4-7 ya que se ha reportado (Sonnenberg y Belisle, 1997) que la mayoría de las proteínas secretadas por *Mycobacterium tuberculosis* se concentran en esta zona. La figura 17a muestra las proteínas separadas utilizando la modalidad de voltaje a 3,500. La comparación es evidente cuando se incrementa el voltaje con la modalidad de V/h (figura 17b) en donde es posible apreciar una mayor cantidad de spots mejor enfocados sobre el gel.

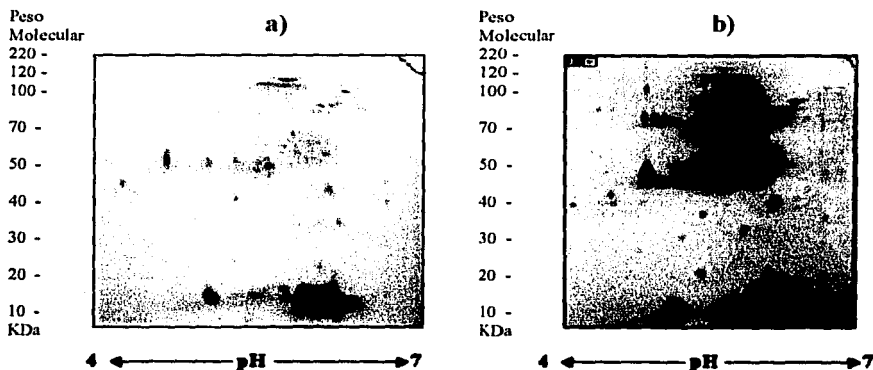
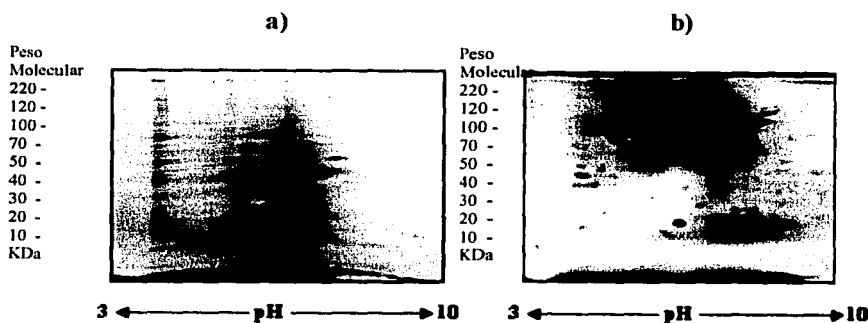


Fig. 17. Isoelectroenfoque utilizando inmobilinas. a) Voltaje final de 3,500; b) voltaje final de 21,000.

En la figura 17b es posible apreciar bandas proteicas en la región de 50-100 KDa con una buena cantidad de isoformas (proteínas con idéntico peso molecular, pero distinto punto isoelectrónico). Estas isoformas son las que no aparecen cuando se realiza una electroforesis en una dimensión, de manera que la 2D-PAGE incrementa la resolución para detectar una mayor gama de antígenos con las que puede unirse el anticuerpo en un suero dado. El pH en el que se localiza la mayor cantidad de estas isoformas oscila aproximadamente entre 4.5 y 6. El IEF, realizado con V/h, se completó en aproximadamente 8 horas. La linealidad en el gradiente de pH permitió un más fácil alcance del punto isoelectrónico de cada proteína. En el gel de la figura 17b es posible apreciar una mayor cantidad de spots separados en el 2D-PAGE. Además, esta metodología es altamente reproducible bajo las mismas condiciones de cada experimento. Cabe mencionar que la variable concentración de proteínas permaneció constante en todos los experimentos.

En comparación, la separación de proteínas según sus PI, utilizando anfolitos, no permitió una buena resolución de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*. La figura 18a muestra el gel con la óptima concentración de proteínas ensayada (un volumen final de 20 µl: aproximadamente 160 µg de proteína del filtrado de cultivo) ya que al colocar una mayor cantidad (180-200 µg de proteína) la resolución disminuye (figura 18b). Por otra parte, con menores cantidades de proteínas no se alcanzan a apreciar spots sobre el gel (no mostrado).



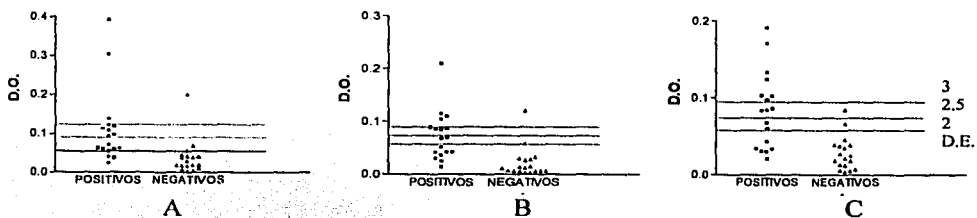
**Fig. 18.** Isoelectroenfoque utilizando anfolitos y con 400 volts durante 12 horas. a) concentración óptima (Ver texto) y, b) Concentraciones mayores a la óptima.

**3.3 Reactividad de los sueros de pacientes sanos y con tuberculosis a las proteínas del filtrado de cultivo.**

Determinar la reactividad de los sueros de pacientes tuberculosos es importante para asegurar que las pruebas, para detectar antígenos candidatos al serodiagnóstico, emplearán los sueros más reactivos a *Mycobacterium tuberculosis*, es decir, los sueros de aquellos pacientes que, debido a su inmunogenética, montaron una mejor respuesta inmune al bacilo tuberculoso que los sueros de otros pacientes enfermos. Esto permitirá la presencia de una mayor cantidad de proteínas que reaccionen contra los antígenos de *M. tuberculosis*.

Se obtuvieron un total de 19 sueros de pacientes con tuberculosis activa diagnosticados por baciloscopia y cultivo. También se obtuvieron 19 sueros de pacientes sanos. Estos sueros se analizaron por ELISA para clasificar las muestras de pacientes con tuberculosis activa en aquellos que presentan: 1) una alta reactividad a las proteínas de filtrado de cultivo; 2) en aquellos que presentan una mediana reactividad y, 3) en los anérgicos. Esto permitió caracterizar los sueros y hacer conjuntos o pools de hasta 6 sueros (basados en la reactividad por ELISA) para analizarlos en el Western Blotting. Los sueros de individuos sanos también se analizaron por ELISA.

La figura 19 muestra las gráficas para los sueros de los pacientes sanos y con tuberculosis activa.



**Fig.19.** Reactividad de sueros de individuos con tuberculosis pulmonar (positivos) e individuos sanos (negativos) a proteínas del filtrado de cultivo. Los resultados fueron obtenidos por ELISA utilizando sueros diluidos 1:10 (A), 1:100 (B) y 1:200 (C). Se muestran, para cada gráfica, los valores de corte equivalentes al promedio de D.O. obtenidas por los sueros de pacientes sanos (negativos), adicionadas 2, 2.5 y 3 veces la desviación estándar correspondiente.

Para estos sueros se obtuvo su valor de corte a las 2, 2.5 y 3 veces la desviación estándar.

De acuerdo con el ELISA, la reactividad mayor de los sueros positivos es óptima en todas las diluciones por arriba de 2.5 desviaciones estándar, estos son los que presentan una alta reactividad para esta población estudiada. Entre 2 y 2.5 desviaciones estándar se encuentran los individuos con una baja reactividad y por debajo de 2 desviaciones estándar se localizan los pacientes anérgicos o que no responden al bacilo tuberculoso.

Con estos sueros se podrá iniciar, posteriormente, la identificación de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

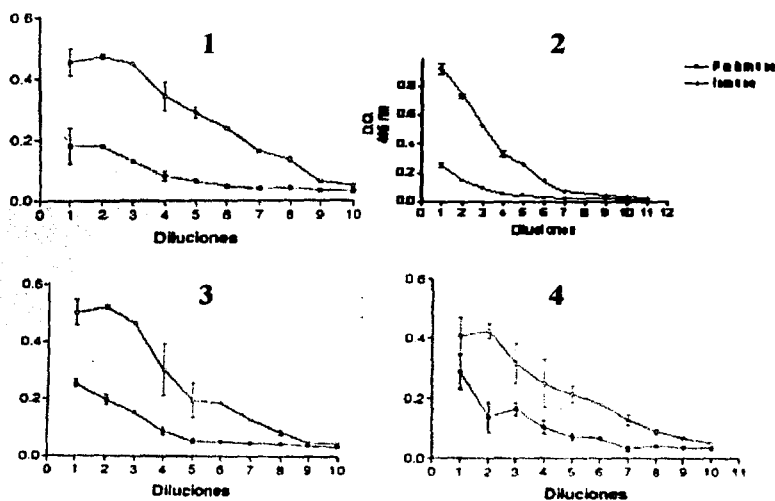
Con base en lo anterior, se recomienda utilizar la dilución 1: 10 en los ensayos de Western Blotting ya que puede ser más sensible y confiable.

### **3.4 Obtención de sueros hiperinmunes anti-proteínas del filtrado de cultivo.**

Los ensayos de Western Blotting necesitan ser reproducibles y presentar el menor ruido de fondo posible si, es que los resultados obtenidos con esta técnica se quieren proponer como una metodología para el diagnóstico de una enfermedad. En el caso que nos ocupa, la cantidad de sueros humanos donados impide realizar demasiados ensayos. Por esta razón, se decidió obtener sueros hiperinmunes de conejos inmunizados con las proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* con los que es factible realizar ensayos previos, estandarizar la técnica y facilitar un poco la metodología al emplear sueros de humanos, de manera que la cantidad de muestra no limite la búsqueda de las condiciones óptimas para los Western Blottings.

El primer paso fue obtener sueros de 4 conejos de la cepa Nueva Zelanda. Los conejos fueron inmunizados con las proteínas del filtrado de cultivo y adyuvante incompleto, tal y como se detalla en Skeiky et al. (1999). Se realizaron 3 inmunizaciones adicionales y al final se obtuvo el suero de cada conejo. En la inmunización de los conejos se utilizó muramil dipéptido como adyuvante ya que el adyuvante completo de Freund tiene *M. tuberculosis* muerta por calor y puede confundir los resultados.

Todos los sueros fueron titulados (figura 20). El título de los sueros fue establecido cuando se encontró una diferencia, entre el suero preinmune y el suero hiperinmune, de 0.2 densidades ópticas. Se encontró que el suero de conejo 2 fue el que mostró una mejor respuesta a la inmunización con un título de entre 1:100 y 1:200 y por lo tanto, se empleará este suero para los ensayos del Western Blotting. El título de los sueros de los conejos 1 y 3 fue encontrado en la dilución 1:800, la del conejo 4 en la dilución 1:200.



**Fig.20.** Titulación por ELISA de todos los sueros de conejos inmunizados con proteínas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*. 1, 2, 3 y 4 representan las gráficas de los cuatro diferentes conejos inmunizados. Las diluciones empleadas se observan en el eje de las X y fueron: 1, 1:100; 2, 1:200; 3, 1:400; 4, 1:800; 5, 1:1600; 6, 1:3200; 7, 1:6400; 8, 1:12800; 9, 1:25600; y 10, 51200. En el eje de las Y se observa la Densidad Óptica a 405 nm. La línea azul (o bien, la línea inferior) representa la densidad óptica del suero de conejo, para cada dilución, antes de ser inmunizado (preinmune); la línea verde (o bien, la línea superior) representa la densidad óptica del suero de conejo, para cada dilución, luego de ser inmunizado (hiperinmune).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 3.5 Western Blotting.

Como un experimento complementario a este trabajo y con la finalidad de comenzar los experimentos concentrados a la identificación de antígenos proteicos para uso diagnóstico, se ensayaron algunos Western Blottings con los sueros hiperinmunes de conejo obtenidos y con el pool de los sueros de humanos clasificados por reactividad. Se utilizó la técnica de 2D-PAGE con inmobilinas tal como se realizó en la figura 17 b.

La dilución utilizada para los ensayos con sueros de conejos fue de 1:100. Al evaluar la reactividad de los sueros de conejo inmunizados contra antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* separados por 2D PAGE se obtuvo un patrón de antígenos reconocidos en el Western Blotting en la región de 50-75 KDa (no mostrado). Esta dilución empleada en los sueros de conejos no permitió distinguir, de manera óptima, los spots en un Western Blotting realizado con sueros de humanos. Por esta razón se decidió utilizar la dilución 1:10 con el pool de 6 sueros encontrados como más reactivos en el ELISA de la figura 19 A. Al evaluar la reactividad de los sueros de humanos con tuberculosis activa se obtuvo un patrón de antígenos reconocidos en el Western Blotting en la región de 50 KDa y 75-105 KDa (figura 21). Estos experimentos deberán ser estandarizados para la identificación de nuevos antígenos.

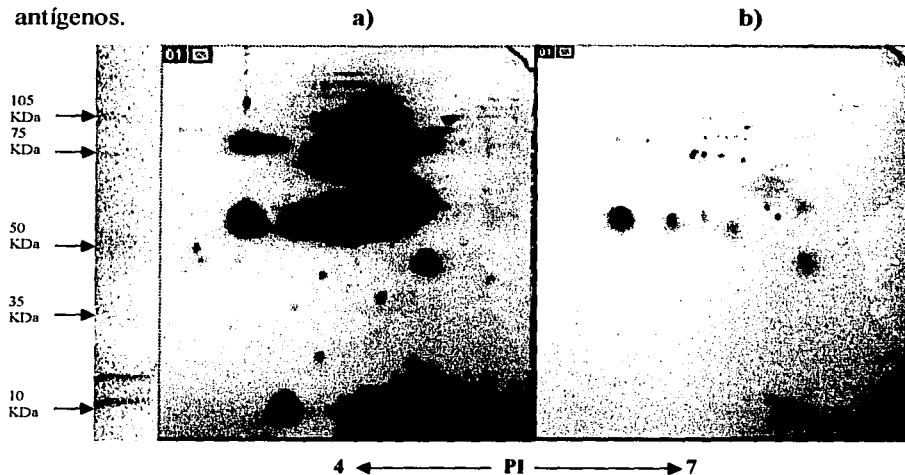


Fig. 21.- Western Blotting para los sueros de humanos más reactivos de acuerdo al ELISA realizado. La dilución empleada fue de dilución 1:10. a) gel teñido con azul de coomassie; b) Western Blotting.

#### 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:

La tuberculosis es una enfermedad que está resurgiendo en la actualidad a nivel mundial. Todavía falta mucho trabajo para erradicar la enfermedad y uno de los principales obstáculos es la carencia de un diagnóstico efectivo. Actualmente el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar está basado en la demostración del bacilo tuberculoso en los frotis del esputo de los pacientes, o bien, en técnicas de cultivo. Se ha observado que estos métodos fracasan en un 25% de los casos además de que no detectan tuberculosis infantil ni extrapulmonar (Espitia et al., 1991). Los métodos de diagnóstico serológicos pueden ser una buena opción debido a que pueden lograr una alta especificidad si se identifican los componentes antigénicos precisos que brindan una prueba clara de la tuberculosis activa.

Los métodos de diagnóstico actuales como el cultivo, la baciloscopía y las pruebas cutáneas son poco sensibles, inespecíficos, demorados, y algunos demasiado caros. Por esta razón las pruebas serológicas surgen ahora como una alternativa oportuna si se ponen en evidencia y se identifican nuevos antígenos, proteicos y lipídicos, de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los métodos de diagnóstico serológicos, como hemos visto en la Introducción de esta tesis, pueden tener una muy alta resolución, ser simples, baratos, y pueden ser aplicados a gran escala, sobre todo en países con economías emergentes como México.

Uno de los principales problemas radica precisamente en identificar esos antígenos proteicos. Es necesario evidenciar más antígenos proteicos presentes en el proteoma de *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual permitirá contar con una variedad extensa de estos antígenos que cubra el espectro de respuestas ocasionado por la variabilidad inmunogenética de cada individuo cuyos patrones HLA determinan la reactividad hacia ellos. De esta manera será posible evitar los falsos negativos que se obtienen cuando el diagnóstico está basado en uno o unos cuantos antígenos.

Con el uso de nuevas tecnologías que permiten el análisis de proteomas, como es el caso de la electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) es factible poner en evidencia e identificar más y nuevos antígenos proteicos del bacilo que, mediante ensayos de Western

Blotting, pondrían en evidencia mezclas de proteínas que reaccionen con los sueros de pacientes tuberculosos (con diferente respuesta inmune humoral) aumentando así la sensibilidad y la especificidad del ensayo diagnóstico.

Una vez identificados estos antígenos (proteicos y lipídicos) será factible aislarlos e incorporarlos en kits de diagnóstico rápido y eficiente. Estos kits, basados en serodiagnóstico, permitirán identificar casos de tuberculosis pulmonar, extrapulmonar e infantil a un mismo tiempo y con una mayor confiabilidad que las pruebas de diagnóstico actuales como el cultivo y la baciloscopia.

De esta forma, la meta primaria, en el serodiagnóstico de la enfermedad, es detectar aquellos antígenos (proteicos o lipídicos) que sean reconocidos por los anticuerpos de pacientes tuberculosos.

En el presente estudio el trabajo se enfocó hacia la separación electroforética para la posterior identificación de antígenos proteicos secretados, debido a la importancia que éstos tienen en el inicio de la patogénesis de la enfermedad, a que son los blancos hacia los que van dirigidos, en primera instancia, las defensas del hospedero y a que pueden distinguir perfectamente la enfermedad activa de la simple infección. El conocimiento derivado de este estudio tiene la finalidad de contribuir al conocimiento de la estructura antigénica de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando una novedosa técnica electroforética que permite realizar un análisis del proteoma: la electroforesis en dos dimensiones.

El antecedente inmediato fue cultivar la cepa H37 Rv de *Mycobacterium tuberculosis* de manera homogénea. En un medio enriquecido con glucosa y ácido pirúvico se obtuvo una fase de crecimiento logarítmica de los 17 a los 21 días. Las bacterias fueron colectadas a los 20-21 días tiempo en el cual se encuentran más activas y es más probable localizar antígenos proteicos evitando la presencia de productos de degradación.

En seguida se procedió a la estandarización de la separación de las proteínas secretadas de *Mycobacterium tuberculosis* en geles de doble dimensión. Para esta meta fue necesario realizar dos técnicas distintas: la separación de proteínas utilizando anfolitos y la separación de proteínas utilizando inmobilinas.

La primera es una técnica manual en donde se establece el gradiente de pH (Ver Material y Métodos) al momento de realizar el gel en un tubo capilar. Es esta la principal

razón por la que estos geles bidimensionales utilizando anfolitos, no son reproducibles de un experimento a otro. El voltaje empleado en estos geles alcanza los 1000 V durante 3 horas (Método 1) pero la muestra no se logra solubilizar completamente. Utilizando el método 2 (400 volts durante 12 horas) es factible apreciar diversos spots, pero su separación es mínima y se ve seriamente perjudicada cuando se incrementa un poco la concentración de proteínas (figuras 18a y b). Esto puede deberse al hecho de que el gradiente de pH se realiza en un tubo capilar de 5 cm de largo en donde la cantidad de proteína colocada es limitada así como la urea y es probable no hallar una completa solubilización de la muestra. Además, es notorio el hecho de que los spots queden centrados debido al tiempo o al voltaje para lograr un correcto enfoque. Es necesario señalar que no es posible incrementar el voltaje utilizando esta técnica debido a que, si se incrementa, la resistencia del aparato se ve afectada y se detiene su funcionamiento. Al incrementar el tiempo de enfoque un par de horas más, pero no se observó cambio alguno. Sin embargo, esta técnica es útil para separar pocas isoformas proteicas dominantes, como se aprecia en la figura 15.

Por su parte, los geles 2D-PAGE utilizando inmobilinas tienen la ventaja de que cuentan con tiras IPG en donde el gradiente ya está formado y el gel solo debe rehidratarse para poder utilizarlo. Esta es la razón fundamental para que estos geles sean reproducibles de experimento a experimento y la presencia de spots sea mayor sobre el gel (Ver figura 17b). Se puede observar en la figura que los spots se encuentran más distribuidos a todo lo largo del gel. Se decidió utilizar un gradiente lineal debido a que este gradiente permite incrementar el voltaje gradualmente y minimiza la agregación de las proteínas en presencia de urea 8 M. Además, se consigue un mejor enfoque de las proteínas debido a que el aparato utilizado (Ver Material y Métodos), permite trabajar en volts-hora (V/h) lo que permite llegar a más de 20,000 volts durante el isoelectroenfoco. La presencia de urea 8 M, CHAPS e IPG buffer mejora considerablemente la solubilización de las proteínas y las separa mejor en tiras IPG de pH 4-7 debido, probablemente, a que se consigue un “zoom” dentro de la zona analizada en donde la mayoría de las proteínas tienen su punto isoceléctrico.

Posteriormente, los sueros de pacientes con tuberculosis activa donados por diferentes laboratorios, fue titulado también por ELISA. Con este procedimiento se logró agrupar cada

siero de acuerdo a su sensibilidad a los antígenos proteicos de *Mycobacterium tuberculosis* como: sueros de alta reactividad, de baja reactividad y anérgicos. De esta clasificación se obtuvo un pool de hasta seis sueros con alta reactividad. Con estos sueros se podrá iniciar, posteriormente, la identificación de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Sin embargo, la cantidad de volumen de este pool no será suficiente para variar las condiciones de los ensayos y optimizarlo. Por esta razón se decidió obtener anticuerpos policlonales en conejo los cuales permitirán determinar las condiciones para obtener una mejor reactividad en el Western Blotting.

Entonces se obtuvieron sueros hiperinmunes de conejos que contienen anticuerpos policlonales contra antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. Cada suero fue titulado por ELISA para obtener la dilución óptima a la cual se puede emplear cada suero para diferentes pruebas serológicas de ensayo.

Con los geles en doble dimensión obtenidos utilizando inmobilinas se procedió a realizar algunos ensayos de Western Blotting con la finalidad de explorar el camino por el que se continuará la investigación después de los resultados obtenidos en este trabajo.

En los ensayos de Western Blotting (sobre un gel bidimensional) se destacó una región de entre los 75-105 KDa, y una leve señal a los 10-20 KDa. Esta última región ha sido reportada también en Western Blotting sobre un antecedente unidimensional (Bassey, 1996). En ambas regiones es posible encontrar diferentes spots del mismo peso molecular pero diferente pH (lo cual indica isoformas) y que deberán ser identificados más adelante. De este trabajo se puede establecer que la región de 75-105 KDa es rica en antígenos proteicos secretados de *Mycobacterium tuberculosis* y cuya caracterización deberá ser revelada para proponerlos como posibles candidatos al serodiagnóstico de la enfermedad activa.

La técnica de electroforesis en dos dimensiones permite una mejor resolución de proteínas (en este caso antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*) que el SDS-PAGE convencional. De esta manera, es posible evidenciar antígenos proteicos que puedan tener el mismo peso molecular pero diferente punto isoelectrónico, una característica que no es apreciable con la separación de proteínas en una dimensión. Es así como el Western Blotting sobre un gel bidimensional puede revelar especificidades de los anticuerpos (sueros de pacientes con tuberculosis activa) a diversos antígenos que en una dimensión no

son evidenciados.

Finalmente, existen algunos puntos importantes para proponer antígenos para el inmunodiagnóstico. Uno de ellos es identificar los antígenos reconocidos sobre un gel bidimensional pero detectados con la mayor cantidad posible de de sueros de enfermos. Otro punto es detectar a los pacientes que son específicos de ciertas etapas de la enfermedad para brindarles un tratamiento adecuado. Para la solución de estos puntos será necesario fortalecer los vínculos entre los laboratorios de investigación científica y los servicios hospitalarios.

El presente estudio sienta las bases metodológicas para poder continuar en el avance de la disección de la estructura antigénica de *Mycobacterium tuberculosis* para su uso en el correcto diagnóstico de la tuberculosis activa.

#### CONCLUSIONES:

- La electroforesis bidimensional utilizando inmobilinas, es una opción eficaz para separar proteínas (isoformas) secretadas de *Mycobacterium tuberculosis*, a diferencia de la electroforesis bidimensional utilizando anfolinas (el método más empleado para identificar isoformas).
- Con esta técnica es posible detectar más interacciones antígeno-anticuerpo y detectar, mediante Western Blotting, aquellos antígenos proteicos de *Mycobacterium tuberculosis* característicos de la enfermedad activa.
- La caracterización de esos antígenos detectados podrá ser de utilidad para incorporarlos a cócteles antigénicos y contribuir a un serodiagnóstico más eficiente de la tuberculosis activa, pulmonar, extrapulmonar e incluso tuberculosis infantil.

## 5. REFERENCIAS:

Andersen, P. 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.* **62**, 2536.

Bassey, E.O., D. Catty & S. Kumararatne. 1996. Candidate antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Dis.* **77**, 136-145.

Belisle, J.T., V.D. Vissa, T. Sievert, K. Tayakama, P.J. Brennan & G.S. Besra. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science.* **276**, 1420-1422.

Blancarte, L., S. Balandrano & G. Anzaldo. 1994. Red Nacional De Laboratorios De Tuberculosis. *Rev. Higiene.* **2**, 136-170.

Bjellqvist, B., P.G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier, W. Postel. 1998. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **6**, 317-339

Bonato, V.D., Lima, V.M., Tascon, R.E., Lowrie, D.B. & C.L. Silva. 1998. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. *Infect. Immun.* **66**, 169-175.

Brennan, P.J. 1989. Structure of Mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* **11**, s40.

Chan, E.D., L. Heifets & M.D. Iseman. 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a

---

---

review. *Tubercle and Lung Dis.* **90**, 131-140.

Chaparas, S.D., H. M. Vandiviere & M.S. Melvin. 1985 Tuberculin test variability with the Mantoux procedure. *Am. Rev. Resp. Dis.* **132**, 175-177.

Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eglmeier, S. Gas, C.E. Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels & B.G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 515-516.

Collins, F.M. 1998. Micobacterial Pathogenesis: A Historical Perspective. *Frontiers in Bioscience.* **3**, e123-132.

Corbett, E.L., C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione & C. Dye. 2003 The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Intern. Med.* **163**, 1009-1021.

Crubézy, E., B. Ludes, J.D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy & D. Montagnon. 1998. Identification d' ADN de *Mycobacterium* dans un mal de ott égyptien de 5400 ans. *Sciences de la Vie.* **321**, 941-951.

Dubos, R. 1982. The Romance of Death. *Am. Lung. Assoc. Bull.* **3**, 5-6.

Eisenach, K.D., M.D. Sifford, M.D. Cave, J.H. Bates & J.T. Crawford. 1991. Detection Of *Mycobacterium tuberculosis* In Sputum Samples Using A PCR. *Am. Rev. Resp. Dis.* **144**, 1160.

Espitia, C., I. Cervera, & R. Mancilla. 1991. The antigenic structure of *Mycobacterium tuberculosis* examined by immunoblot and ELIS. Influence of the age of the culture and the



obtaining method on the composition of the antigenic extracts. *Arch. Invest. Med.* **22**, 101-107.

Falkinham, J. O. 1997. Transmission of Mycobacteria. En: Gangadharam, P.R.J., & P.A. Jenkins (Eds). *Mycobacteria I. Basic aspects*. Chapman & Hall. New York. 178-209p.

Findeisen, D.G. 1982. Tuberculosis and allergy. Steps of knowledge from the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch (24th of March, 1882) to a comprehensive immunodiagnostic, therapy, and prophylaxis. *Allerg. Immunol.* **28**, 3-12.

Freedman, S.O., J. Dolovich, R. Turcotte & F. Sault. 1966. Circulating IgG (7S) hemagglutinins in pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **94**, 896-904.

Garg, S.K., R.P. Tiwari, D. Tiwari, R. Singh, D. Malhotra, V.K. Ramnani, G.B. Prasad, R. Chandra, M. Fraziano, V. Colizzi, P.S. Bisen. 2003. Diagnosis of tuberculosis: Available technologies, limitations, and possibilities. *J. Clin. Lab. Anal.* **17**, 155-163.

Gennaro, M.L. 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis. Suppl.* **3**, S243-S246.

Goldsby, R.A., T. J. Kindt & B.A. Osborne. 2000. *Kuby Immunology*. 4th ed. Freeman. 670pp.

Granje J.M. & P.J. Bishop. 1982. 'Über tuberkulose'. A tribute to Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus. *Tubercle.* **63**, 3-17.

Grange, J. 1992. The mystery of the mycobacterial persister. *Tubercle Lung. Dis.* **73**, 249-251.

Haas, F & S.P. Haas. 1995. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. En: Rom, W.N. & S. Garay (Comps). *Tuberculosis*. Little, Brown

and Company, Boston, EUA.

Herrera, A.L., & D. Vergara. 1896. L'air rarefié dans le traitement de la tuberculose. *Memorias de la Sociedad Científica Antonio Alzate*. **Tomo X**. 95-114.

Hubbard, R.D., M. Flory, & F.M. Collins. 1992. Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. *Clin. Exp. Immunol.* **87**, 94-98.

INEGI, SSA/DGEI, 2000. <http://www.ssa.gob.mx>

Kaufmann, H.E. 2000. Robert Koch's highs and lows in the search for a remedy for tuberculosis. *Nature Medicine Web Focus*: [http://www.nature.com/nm/special\\_focus/tb/](http://www.nature.com/nm/special_focus/tb/)

Koch, R. 1982. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev. Infect. Dis.* **4**, 1270-1274.

Kochi, A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle.* **72**,1.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.

Lehninger, L. 1995. Bioquímica. 4ta edición. Reverté. Nueva York, EUA.

Levy-Frebault, V., & F. Portal. 1992. Proposed Minimal Standars For The Genus *Mycobacterium* And For Description Of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. *Int. J. Systemat. Bacteriol.* **42**, 315-323.

Lewinson, D.M., Bremen, T.T., Xu, J, Lynch, D.H. & K. H. Grabstein. 1998. Human purified protein derivative –specific T CD4+ T cells use both CD-95-dependent and CD-95 independent cytolytic mechanisms. *J. Immunol.* **160**, 2374-2379.

- Link, W. 1999. 2D proteome analysis protocols. Volume 112. New Jersey, 289pp.
- Lyashchenko, L., R. Colangeli, M. Houde, y L.M. Gennaro. 1998. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun.* **66**, 3936-3940.
- McDonough, K.A., y B.R. Bloom. 1996. Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 2763.
- McNeil, I., M. Daffe & P.J. Brennan. 1990. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan components of mycobacterial cell walls. *J. Biol. Chem.* **265**, 18200-18206.
- Nordhoek, G.T., J.D. Embden & A.H. Kolk. 1996. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control studying among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2522-2525.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Parrish, N.M., J.D. Dick, & W.R. Bishai. 1998. Mechanisms Of Latency In *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **6**, 107-112.
- Prescott, L.M., J.P. Harley, & D.A. Klein. 1999. Microbiology. 4ta edición. McGraw-Hill. Boston. 952pp.
- Rodríguez, N.E. 1996. Electroforesis. En: Técnicas en Biología Celular. 1ra Ed. AGT. México, D.F. 208pp.
- Rossmann, M.D., & R.R. McGregor. 1996. Tuberculosis. McGraw-Hill. Philadelphia.

Samanich, K., J. T. Belisle, & S. Laal. 2001. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect. Immun.* **69**, 4600-4609.

Sada, E., L.E. Ferguson & T.M. Daniel. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* **162**, 928-931.

Sakula, A. 1982. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax* **37**, 246-251.

Schlossberg, D. 1999. Tuberculosis and nontuberculous Mycobacterial infections. 4th ed. Pennsylvania. 422pp.

Schluger, N.W., & W.N. Rom. 1998. The host immune response to tuberculosis. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* **57**, 679-691.

Skeiky, Y.A., M.J. Lodes, J.A. Guderian, R. Mohamath, T Bemont, M.R, Alderson & S.G. Reed. 1999. Cloning, expression and immunological evaluation of two putative secreted serine protease antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **67**, 3998-4007.

Smaglik, M. 2001. Proteomic technology: character references. *Nature.* **413**: 869-875.

Sonnenberg, M.G. & J.T. Belisle. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N- terminal amino-acid sequencing and electrospray mass spectrometry. *Infection and immunity.* **65**, 4515-4524.

Stenger, S. & R.L. Modin. 1999. T- cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Microb.* **2**, 89-93.

Towbin, H., T. Stachelin, & J. Gordon. 1989. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27, 495-501.

Villalba, J., J.L. Valdespino, G. Anzaldo, S. Baldrano, M. Bobadilla, A.E. García, R. Mancilla, J. Martínez, H. Olvera, R. Olvera, M. Palacios, G. Quiroz, E. Sada, J.I. Santos, J. Sifuentes, M.A. Vaca & L.B. Yañez. 1999. Tuberculosis. En: De la Fuente, J.R. & J. Sepúlveda (comps.). Diez problemas Relevantes De Salud Pública En México. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Wayne, L.G., & G.A Díaz. 1979. Reciprocal immunological distances of catalase derived from strains of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, and closely related species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 464-465.

Wayne, L.G., & G.P. Kubica. 1986. Family Mycobacteriaceae. En: Holt, J.G. & P.H. Sneath (comps.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore.

Wayne, L.G. & L.G. Hayes. 1996). An in vitro model for sequential study of shift down of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* 64, 2062-2069.

Young, B.D. 1998. Blueprint For The White Plague. *Nature.* 393, 515-516.

## APÉNDICE A

### Medio de Cultivo Líquido de Sauton para Micobacterias pH 7.2-7.3 (1 Litro):

Citrato de fierro y de amonio..... 0.05 g  
Sulfato de magnesio..... 0.50 g  
Fosfato monopotásico..... 0.50 g  
Ácido cítrico..... 2 g  
Asparagina..... 4 g  
Glicerol..... 60 g

Ajustar pH con hidróxido de amonio.

Aforar con Agua Milli Q a..... 1000 ml

Preparar 0.5% de Glucosa (5 g) y 0.5% de Piruvato (5 g), disolver y aforar con agua destilada a un volumen final de 25 ml; filtrar por 0.45 µm. Vertir la mezcla en el medio de cultivo (en esterilidad).

## APÉNDICE B

### Cuantificación de Proteínas por el Método de Lowry:

Tartrato de sodio 2%..... 1 ml  
Sulfato de cobre 2%..... 1 ml  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N..... 98 ml

Disolver estas soluciones. Esta es la *Mezcla*.

BSA..... 1 mg/ml

Tubo	BSA (ml)	Agua (ml)	Proteína µg/ml
1	0.5	0.5	500
2	0.2	0.8	200
3	0.1	0.9	100
4	0.1	1.9	50
5	1 del tubo 4	1	25
6	1 del tubo 5	1	12.5
7	---	1	0

Para el Tubo 8 poner: 10 µl de la proteína en estudio (muestra) y 990 µl de agua.

Agregar 4 ml de la *Mezcla* a cada tubo, agitar en vórtex y esperar 10 minutos.

Folin-Ciocalteu.....1m/1ml

Agregar 4 ml del reactivo Folin-Ciocalteu a cada tubo, agitar y esperar 30 minutos. Al final leer densidad óptica (D.O.) a 600nm.

## APÉNDICE C

### Solución de Rehidratación:

Urea 8M..... 1.2 g  
CHAPS (3-[(3- Cholamidopropyl) dimethyl ammonium]-1-propanesulphonate) 2% (w/v)..... 0.05 g  
Azul Bromofenol.....Traza  
Agua Milli Q..... 1.25 ml  
DTT (Ditiotreitol)..... 7 mg

Tomar 250 µl de esta mezcla y añadir:

IPG Buffer 2% pH 4-7 (v/v)..... 5 µl  
Proteína FC.....1-1.5 mg

## APÉNDICE D

### Solución de Equilibrio:

Tris-Cl 1.5 M; pH 8.8 50 mM..... 6.7 ml  
Urea 6 M..... 72.07 g  
Glicerol 30%..... 69 ml  
SDS 2% (w/v)..... 4 g  
Azul bromofenol..... Traza  
Aforar con Agua Milli Q a..... 200 ml

Previo a su uso adicionar DTT.

Solución de equilibrio..... 10 ml  
DTT (Ditiotreitol)..... 100 mg

## APÉNDICE E

### SDS Buffer de Electroforesis:

Tris Base 25 mM..... 0.75 g  
Glicina 192 mM..... 3.6 g  
SDS 0.1 %..... 0.25 g  
Aforar con Agua Milli Q a..... 250 ml

## APÉNDICE F

### Gel al 10% de Poliacrilamida:

Agua Milli Q.....	13.6 ml
Poliacrilamida 30%.....	11.65 ml
Tris HCl 1.5 M pH 8.8.....	8.7 ml
SDS 10%.....	0.7 ml
Persulfato de amonio 10%.....	230µl

Desgasificar la solución durante 5 minutos.  
Después agregar:

TEMED..... 23µl

Permitir la polimerización durante 1 hora.

## APÉNDICE G

### Solución de Agarosa:

SDS Buffer de Electroforesis.....	100 ml
Agarosa 0.5 %.....	0.5 g
Azul bromofenol.....	traza

Calentar la solución en microondas para disolver la agarosa. No hervir.

## APÉNDICE H

### Tinción con Azul de Coomassie:

Azul de coomassie 0.05%.....	0.125 g
Ácido acético 10%.....	25 ml
Metanol 50%.....	125 ml
Agua Milli Q 40%.....	100 ml

Teñir durante 1 hora o bien, durante una noche. Para desteñir:

Metanol 30%.....	150 ml
Ácido acético 7%.....	35 ml
Aforar con Agua Milli Q a.....	500 ml

## APÉNDICE I

### Buffer de Carga:

Urea.....	2.85 g
10% NP40.....	1 ml
Anfolitos pH 4-6.....	0.08 ml
Anfolitos pH 3.5-10.....	0.02 ml
Mercaptoetanol.....	0.25 ml

Aforar a 5 ml alicuotear y congelar

## APÉNDICE J

### Buffer de Transferencia pH 8.35:

Tris Base 0.025 M.....	0.76 g
Glicina 0.193 M.....	3.62 g
Metanol.....	50 ml
Aforar con Agua Milli Q a.....	250 ml

## APÉNDICE K

### Rojo Ponceau:

Ácido tricloroacético (TCA) 3%.....	3 g
Rojo Ponceau 0.3%.....	0.3 g
Aforar con Agua Milli Q a.....	100 ml

## APÉNDICE L

### Diluciones:

1:2.....	500µl muestra en 500µl de buffer
1:4.....	250µl de muestra en 750µl de buffer
1:5.....	200µl de muestra en 800µl de buffer
1:10.....	100µl de muestra en 900µl de buffer
1:20.....	50µl de muestra en µl de buffer
1:50.....	20µl de muestra en 980 µl de buffer
1:100.....	10µl de muestra en 990µl de buffer
1:200.....	5µl de muestra en 995µl de buffer
1:500.....	2 µl de muestra en 998µl de buffer

## APÉNDICE M

### Buffer de Carbonatos:

Carbonato de sodio anhidro $\text{Na}_2\text{CO}_3$	
0.05M.....	1.06 g/200 ml
Bicarbonato de sodio $\text{NaHCO}_3$	
0.05M.....	2.1 g/500 ml

Mezclar ambas soluciones para obtener un pH de 9.6 con la ayuda de un potenciómetro.

## APÉNDICE N

### 3% BSA en PBS

Albúmina de suero bovino 3%.....	6 g
Aforar con Agua Milli Q a.....	200 ml

Para diluir la solución al 0.3%:

3% BSA en PBS.....	50 ml
Aforar con Agua Milli Q a.....	500 ml

## APÉNDICE O

### Solución Amortiguadora de Dietanolamina al 10% pH 9.8:

Dietanolamina.....	100 ml
Cloruro de magnesio $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	102 mg
Azida de sodio $\text{NaN}_3$ .....	400 mg

Disolver y ajustar a pH 9.8 con HCl concentrado.

Aforar con Agua Milli Q a.....	1000 ml
--------------------------------	---------

## APÉNDICE P

### Sustrato Revelador de Western Blotting:

Peróxido de hidrógeno 30%.....	30 $\mu\text{l}$
4-cloro 1-naftol.....	6 mg
Metanol.....	2 ml
Aforar con Agua Milli Q a.....	8 ml