



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN DE MIMÓTOPOS DEL
ANTÍGENO 85 DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

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 :

JORGE MOISÉS VALENCIA DELGADILLO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jorge M. Valencia

FECHA: 30-11-2004

FIRMA:

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Identificación de Mimótopos del Antígeno 85 de Mycobacterium tuberculosis".

realizado por **VALENCIA DELGADILLO JORGE MOISÉS**

con número de cuenta **095314268** , quien cubrió los créditos de la carrera de:

BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis
Propietario

Dra. **LUZ MARÍA LOPÉZ MARÍN**

Propietario

Dr. **RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ**

Propietario

Dra. **GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN**

Suplente

Dr. **KAREN MANUCHARYAN**

Suplente

Biól. **GONZALO ASARIEL ACERO GALINDO**

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS



**UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz María López Marín por haberme aceptado en su laboratorio y guiado durante mi tesis.

Al Dr. Karen Manoutcharian y la Dra. Goar Gevorgian por haberme transmitido tantas ideas.

Al Dr. Mancilla por compartirme sus experiencias.

Biol. Erika Segura por su ayuda en el desarrollo de las metodologías.

Biol. Patricia Espinosa por su ayuda en la purificación del antígeno 85.

Biol. Gonzalo Acero por toda la ayuda en el desarrollo del Phage Display.

Biol. Erik González por su ayuda en la secuenciación, lectura y análisis de las secuencias, purificación de DNA.

M. en C. Prisco Palma por haberme ayudado a esclarecer misterios científicos, así como por sus brillantes aportaciones en bioinformática y proteómica.

Mis papas Jorge y Lupita por quererme y apoyarme.

A Erich por ser buen hermano.

Mi abuelita Margarita por decirme que siempre me distinga.

Marcia por ser muy linda, inteligente y comprenderme como soy.

A mis amigos del laboratorio: Paulina, Juan Carlos, Kika, Leticia, Maxine, Alberto, Andrea, Ivone y a Yuko Nakamura quien procesó los datos de tuberculosis en México.

Mis amigos de la Facultad de Ciencias, Kendo Enrique, Baig, Felipe, Carlitos, Abril, Bety, Marilu, Citlali, Google, PubMed, Fabiola, Carlina, Edgar, Ester, Mitzi, Carmen, Osiris, Yoatzin, Salvador, Poncho, Millulus, Alaniso.

A, Maru, Hector tocayo, Nancy, Andres Bendesky y la biomatemática.

A Sammy y sus papas Eduardo y Mari, a Blanquita y Elia, a Maxi y Alinka.

A Paola, Beto, Amanda y sus papas.

Mis amigos de la Escuela Nacional de Música, Quetzal, Emilio, Pavel, Juan Carlos, Abel, Jaime, Norman, Maida.

Mis amigos del Escuadrón SOS, Aldo, Albatros 25, Raúl, Pedro, Dulce, Miriam, Iván, Neto, Evaristo, Gerardo, Chio, Yhave, Irene, Sofí, Elsa, Brenda, Fabricio, Fernando, Juan Carlos S y R, Benjamín, Munguia, Gabriel, Matías, Pollo, Vaca, Oso.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	9
Historia de la Tuberculosis	9
Situación Mundial de la Tuberculosis	11
Contagio de la tuberculosis	12
Síntomas de la enfermedad	13
Diagnóstico	14
Tratamiento	17
La Vacuna actual en contra de la tuberculosis	19
Respuesta inmune a tuberculosis	20
Características del bacilo	23
El complejo del Antígeno 85	26
Phage Display	27
Mimótopos	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
JUSTIFICACIÓN	32
ESQUEMA METODOLÓGICO	33
MATERIAL Y MÉTODOS	34
Cultivo de micobacterias	34
Obtención de proteínas de filtrado de cultivo	34
Cuantificación de proteínas (Bradford)	34

Purificación de proteínas por HPLC	35
Purificación de proteínas por Electroforesis	36
Tinción Directa	36
Electro elución	36
Electroforesis analítica	37
Tinción de Plata (modificada de Blon)	37
Esquema de inmunización	38
Transferencia de Geles	38
Inmunoblot	38
ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	39
Bioselección	40
Titulación de los Fagos	41
Amplificación de los Fagos	41
Purificación de ADN de cadena sencilla de los Fagos	43
Secuenciación del ADN de cadena sencilla de los Fagos	44
Análisis de similitud de Secuencias	45
Ensayos de ELISA	45
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	73

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
DOTS	Directly Observed Treatment Short-Course
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
kDa	Kilo Daltones
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque forming unit
PPD	Purified Protein Derivative
PSA	Persulfato de Amonio
PVDF	Poli-viniledenfluoruro
TB	Tuberculosis
TBE	TRIS-BORATE-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIS	(Tris [hydroxymethyl] aminomethane)

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad neumopática obstructiva crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Anualmente se reportan a nivel mundial 8 millones de nuevos casos de tuberculosis, y alrededor de 2 millones de personas mueren por causa de esta enfermedad. Se calcula que 1/3 de la población mundial es portadora del bacilo, lo que equivale a 2 mil millones de personas infectadas. Una persona con tuberculosis activa puede contagiar hasta 15 personas en un año con el solo hecho de respirar o toser cerca de ellas. Esto, aunado al incremento de cepas resistentes a fármacos antituberculosos, la moderada eficacia de las vacunas disponibles y la ineficacia de los métodos actuales de diagnóstico, han impedido el control de esta enfermedad. Por ello, el desarrollo de nuevas vacunas y métodos de diagnóstico más efectivos ayudarían considerablemente en el control y erradicación de la enfermedad.

Una de las características que hacen al bacilo resistente a fármacos es la composición química de su pared celular. La biogénesis de la pared involucra diferentes proteínas, una de ellas es el complejo del antígeno 85 (Ag85). Este complejo está compuesto de tres proteínas de entre 30 y 32 kDa, es altamente inmunogénico y se ha reportado que un 70% de de los enfermos con tuberculosis tienen anticuerpos contra este antígeno (con una especificidad de 95%), siendo este complejo uno de los mejores inmunógenos por lo cual ha sido propuesto como reactivo de inmunodiagnóstico y como subunidad de vacunación.

Desafortunadamente la obtención de este antígeno requiere de laboratorios de nivel III de bioseguridad, así como personal y equipo especializado, lo que dificulta su producción. Este antígeno se ha producido por métodos de ADN recombinante (en *Listeria* sp y *E. Coli*) para utilizarse en pruebas de serodiagnóstico, pero los resultados no han sido tan satisfactorios como los obtenidos con el antígeno nativo. Esto probablemente se debe a problemas en el plegamiento de las tres subunidades del complejo Ag85. También se ha intentado usar como antígenos péptidos sintéticos (de 20 residuos contenidos en la secuencia del Ag85), pero sin obtener resultados satisfactorios, probablemente debido a que no estén representadas las regiones más inmunogénicas. Respecto a esto, varios estudios de la respuesta humoral en individuos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* apuntan hacia una alta proporción de anticuerpos dirigidos en contra de epítomos conformacionales.

El despliegue en fagos (Phage Display) es una herramienta que utiliza bibliotecas de péptidos o proteínas expresadas en fagos filamentosos, para identificar ligandos de interés. En el caso de bibliotecas de péptidos, la elevada diversidad de los mismos nos permite inclusive encontrar epítomos conformacionales y/o mimótopos. Un mimótopo es un péptido que imita funcionalmente a un epítomo (región de la proteína que es reconocida por un anticuerpo). Los mimótopos pueden clasificarse de dos maneras, la primera es dependiendo si mimetizan epítomos lineales (secuencia de aminoácidos lineales que mimetizan un epítomo), o epítomos conformacionales (secuencia de aminoácidos que mimetiza una estructura tridimensional), y la segunda es si

estos tienen capacidades antigénicas (mimótopos que son reconocidos por un anticuerpo como si fueran el antígeno original pero no pueden inducir una respuesta inmune), o inmunogénicas (son parecidos a los antigénicos solo que estos son capaces de inducir una respuesta inmune idéntica al antígeno original).

La disponibilidad de mimótopos/epítomos del Ag85 constituiría una alternativa para la producción de nuevas y mejores herramientas de diagnóstico serológico más sencillas y a costos muy bajos, así como la disponibilidad de posibles subunidades de vacunación.

En el presente trabajo se produjo un suero policlonal anti-Ag85 en conejo, con el cual se tamizaron 3 diferentes bibliotecas peptídicas comerciales, expresadas en fagos filamentosos M13 con insertos de 7, 9 y 12 residuos de aminoácidos. Se identificaron 9 clonas altamente reactivas al suero anti-Ag85, que expresaron 8 secuencias diferentes que mimetizan regiones del Ag85. Actualmente se evalúa su uso como reactivos en el serodiagnóstico de la tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

Historia de la Tuberculosis

La tuberculosis, también conocida como peste blanca o tisis, es una enfermedad antigua. Se han encontrado evidencias de lesiones en huesos de momias de la época predinástica de Egipto las cuales datan de hace más de 5400 años (Crubezy *et al.*, 1998), así como también ADN perteneciente al bacilo con aproximadamente 3000 años de antigüedad (Zink *et al.*, 2003).

Alrededor del siglo IV antes de cristo, Hipócrates de Cos contribuyó enormemente al conocimiento de la enfermedad de tuberculosis, él creó la palabra "tisis" que quiere decir consunción. Esta enfermedad ha cobrado la vida de millones de individuos, incluyendo personajes importantes en la historia, por ejemplo a mediados del siglo XVII en Francia, murió el rey Carlos IX por empiema pleural (presencia de pus o microorganismos, en la cavidad pleural) y posteriormente el rey Luis XIII de tuberculosis pulmonar (Neyra, 1975).

El médico Xavier Bichat, autor de la "Patología General" murió de meningitis tuberculosa. En el siglo XIX también otros personajes importantes también murieron a causa de la tuberculosis como: Chopin, Paganini y el medico Laënnec, este último fue uno de los más ilustre clínicos de la tisiología e inventor de la auscultación por medio del estetoscopio.

En 1869 Villemin demuestra que la tuberculosis es una enfermedad contagiosa transmisible; unos años después Boehmer y Dettweiller crean los primeros sanatorios para tuberculosos en Alemania. En 1882, Robert Koch descubre el bacilo responsable de la enfermedad y reporta el cultivo exitoso del bacilo tuberculoso, además de una técnica de tinción para detectarlo, posteriormente prepara la primera tuberculina antigua. Koch realizó algunos experimentos con el bacilo, y comprobó que al inyectar el cultivo puro del bacilo en conejos éstos desarrollan la enfermedad activa.

Unos años después Von Pirquet crea la prueba de cutirreacción a la tuberculina, la cual es mejorada después por Mantoux, dando como resultado la prueba de intradermorreacción. En Italia Carlo Forlanini introduce el método del neumotórax artificial en el tratamiento de la enfermedad en 1892, primer método activo de terapia de esta enfermedad. Unos años después Sir Robert Phillip crea el primer Dispensario Antituberculoso (Neyra, 1975).

A principio del siglo XX, los franceses Calmette y Guérin atenuaron la virulencia del bacilo tuberculoso bovino (*Mycobacterium bovis*) mediante el cultivo repetido del bacilo, y crearon la vacuna BCG (Bacilo Calmette Guérin) contra la tuberculosis, y es hasta finales de la Segunda Guerra Mundial, cuando Waksman descubre la estreptomycin, primer antibiótico eficaz contra la tuberculosis (Neyra, 1975).

Situación Mundial de la Tuberculosis

El bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* es uno de los patógenos que cobra más vidas humanas cada año (Marques-Gomes, 2004). Se estima que alrededor del mundo un tercio de la población está infectada con el bacilo lo que equivale a dos mil millones de personas, y al menos 8 millones de personas mueren al año por esta enfermedad (Fig. 1), (Collins, 1998).

La Organización de Naciones Unidas, consciente de este problema, ha firmado en conjunto con la Organización Mundial de la Salud un acuerdo internacional llamado "Declaración del Milenio". Una de las metas de este documento es reducir los índices de personas infectadas con esta enfermedad (Objetivo 6, Meta 8, Indicador 24), para lo cual resulta urgente el desarrollo de nuevas herramientas de serodiagnóstico así como de nuevos fármacos y vacunas (Torres *et al.*, 2004).

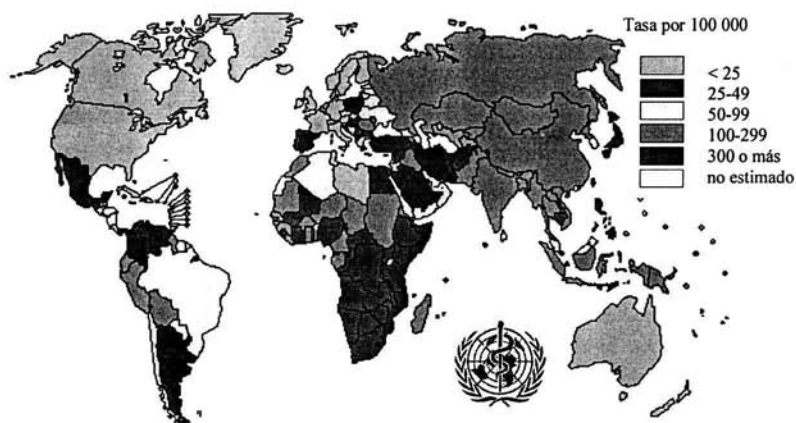


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en el 2002, (World Health Organization, 2004).

En México la tuberculosis se encuentra dentro de las 16 enfermedades más importantes (Ponce de León *et al.*, 1996), destacando las zonas de ambas líneas fronterizas y poblaciones desfavorecidas socioeconómicamente como las comunidades indígenas del sur del país (Fig. 2).

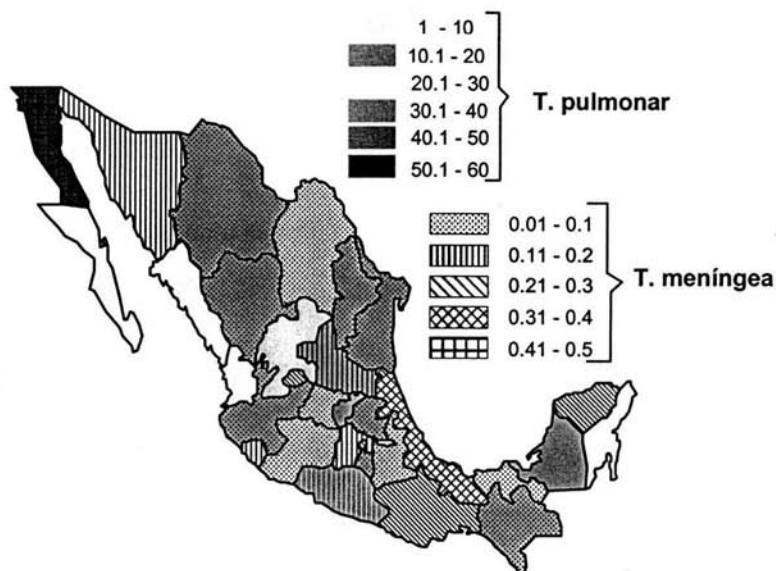


Figura 2. Incidencia estimada de tuberculosis pulmonar y meníngea en México, (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud 2001, procesó Nakamura-López Y.).

Contagio de la tuberculosis

Una persona con tuberculosis (TB) activa puede contagiar hasta 15 personas en un año con solo respirar cerca de ellas. Esto, aunado al incremento de cepas resistentes a fármacos antituberculosos, la moderada eficacia de las vacunas disponibles y la deficiencia en la confiabilidad de los métodos actuales de diagnóstico, han impedido el control de esta enfermedad.

Una persona infectada puede contagiar a otras al momento de toser, estornudar o hablar; ya que quedan aerosoles con bacilos suspendidos en el aire pudiendo entrar a vías aéreas superiores (faringe, cavidades nasales, laringe, traquea parte superior), y posteriormente a vías aéreas inferiores (traquea parte inferior, bronquios, bronquiolos, alveolos pulmonares), en donde los bacilos son fagocitados por macrófagos alveolares infectando al individuo (Schlossberg *et al.*, 1999).

En algunos casos esta enfermedad también puede diseminarse desde los pulmones hacia otros órganos del cuerpo como riñón o hígado, por medio del torrente sanguíneo o el sistema linfático.

Síntomas de la enfermedad

La tuberculosis es una enfermedad de tipo neumopática obstructiva crónica (anteriormente catalogada como enfermedad pulmonar obstructiva crónica), su agente causal, *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, es un patógeno que se reproduce predominantemente en los macrófagos alveolares del hospedero.

La tuberculosis es una enfermedad que afecta principalmente a los pulmones, pero también puede atacar cualquier otro órgano del cuerpo. Los síntomas generales de esta enfermedad son fiebre, pérdida de peso, letargo, malestar general, sudoraciones nocturnas, escalofríos, dolor articular, inflamación abdominal, glándulas inflamadas, disnea (sensación de dificultad respiratoria), dolor retro esternal, y en caso de tuberculosis pulmonar se

presenta tos, esputo (secreción pulmonar que se expulsa cuando se presenta tos profunda), desarrollo de granulomas (tumores granulares) en los tejidos infectados (Martini, 1997), y hemoptisis (tos con sangre) lo cual es síntoma de destrucción pulmonar, y un mecanismo de diseminación de las bacterias a nuevos hospederos (Glickman *et al.*, 2001). Estos signos y síntomas no son solo exclusivos de esta enfermedad.

Los pacientes portadores del bacilo que experimentan algún tipo de inmunodepresión pueden desarrollar más rápido la enfermedad activa y la destrucción progresiva de tejido pulmonar (Young *et la.*, 1998).

Diagnóstico

El bacilo *Mycobacterium tuberculosis* puede estar latente varios años en un individuo antes de generar la enfermedad (Parrish, 1998). Actualmente se cuenta con diferentes métodos de diagnóstico pero ninguno de ellos es totalmente efectivo.

Uno de los métodos más utilizados para detectar la infección latente es el PPD (purified protein derivative) o prueba de Mantoux, el cual es una solución isotónica estéril de tuberculina. La tuberculina se obtiene del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en un medio sintético (McEvoy, 1994). El otro método utilizado para detectar la infección activa es la baciloscopia, la cual consiste en teñir con fuccinia las expectoraciones de los pacientes en busca de bacilos ácido alcohol resistentes.

De acuerdo con la OMS, una de las prioridades actuales es el poder contar con métodos para el rastreo de la enfermedad pulmonar activa, forma contagiosa responsable de la diseminación de la pandemia. El diagnóstico tradicional de la TB activa se basa en la tinción específica de *Mycobacterium* o en su cultivo a partir de muestras de esputo (baciloscopia y cultivo, respectivamente), (Seiler *et al.*, 2003). Para hacer frente a los problemas de baja sensibilidad, tardanza o requerimientos de infraestructura costosa inherentes a estas técnicas tradicionales (Tabla 1), varios métodos alternativos se encuentran en estudio.

Para rastrear la tuberculosis activa en amplias poblaciones se requiere de tecnologías accesibles, por lo que un método de diagnóstico sencillo, eficaz y de bajo costo ayudaría ampliamente a controlar esta enfermedad. El inmunodiagnóstico podría representar una opción capaz de cumplir con estas características, así como con los estándares marcados por la OMS en cuanto a sensibilidad (>70% de los enfermos deben poder diagnosticarse) (WHO, 1997). Sin embargo, la gran limitante consiste en la difícil disponibilidad de antígenos específicos que pueden obtenerse a partir de micobacterias cultivadas. Por ejemplo *M. tuberculosis*, tiene un tiempo de duplicación de más de 24 horas, y es un patógeno de alto riesgo biológico.

Tabla 1. Características de los métodos actuales de diagnóstico en TB activa.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Radiografía de tórax	<ul style="list-style-type: none"> Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> Costo elevado Inespecífico Requiere infraestructura especializada Requiere personal capacitado 	Bloom, 1994.
Baciloscopía	<ul style="list-style-type: none"> Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> Poco sensible Inútil para diagnóstico de TB extrapulmonar Necesidad de ser reproducido durante 3 días consecutivos Puede requerirse lavado gástrico o bronco aspiración Requiere de personal capacitado Exposición del personal al patógeno 	Warren <i>et al.</i> , 2000; Bloom, 1994
Cultivo	<ul style="list-style-type: none"> Generalmente específico Posibilidad de ser combinado con pruebas de sensibilidad a fármacos 	<ul style="list-style-type: none"> Muy lento (4 a 12 semanas) Inútil para diagnóstico de TB extrapulmonar Exposición del personal al patógeno Posibilidad de falsos positivos Necesidad de infraestructura muy costosa Requiere de personal capacitado 	Bruman <i>et al.</i> , 1997; Bloom, 1994.
PCR	<ul style="list-style-type: none"> Rápido Específico para bacilos del complejo <i>M. tuberculosis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> Costo elevado Poco sensible a partir de muestras biológicas Varios reportes sobre in especificidad (para la sonda IS6110) Requiere de infraestructura especial Requiere personal capacitado 	Bloom, 1994; Noordhoek <i>et al.</i> , 1993.
Inmunodiagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> Rápido Posibilidad de ser realizado en sistemas que no requieren infraestructura especial ni capacitación Posibilidad de diagnóstico para tuberculosis extra pulmonares e infantil 	<ul style="list-style-type: none"> La sensibilidad no llega a ser total debido a casos con anergia Falta de disponibilidad de antígenos específicos y sensibles Diferencias en el reconocimiento de antígenos debido a factores genéticos en la población 	Bothamley <i>et al.</i> , 1989; Bloom, 1994; Chan <i>et al.</i> , 2000; Daniel, 1987.

La prueba de PPD consiste en inyectar una solución de este compuesto por vía intradermal, los individuos que sean portadores del bacilo o hayan estado en contacto con el, producirán una reacción de hipersensibilidad retardada (Reynolds, 1993). Generalmente a las 48 o 72 horas después de la aplicación se mide el diámetro de la induración producida por la reacción, si el diámetro es mayor a 5mm (Centers for Disease Control and Prevention, 2000) es necesario que se realicen otros estudios como una baciloscopía o una radiografía de tórax (American Thoracic Society, 2000), para confirmar que es portador del bacilo. Los pacientes que presentan depresión del sistema inmune, dermatitis atópica, o daños en la piel causados por el sol, pueden resultar en falsos negativos (Markowitz *et al.*, 1993). También algunos pacientes pueden presentar reacciones adversas en el sitio de la inyección como necrosis, ulceración, comezón y ampollas (Foll, 2002).

En algunas ocasiones algunos pacientes que se realizan la prueba de PPD varias veces, pueden llegar a presentar un fenómeno de sensibilidad a dicha prueba, lo que resultaría en el diagnóstico de pacientes falsos positivos (Menzie, 1999).

Tratamiento

Actualmente existe un programa diseñado por la OMS llamado DOTS por sus siglas en inglés (Directly Observed Treatment Short-Course), (Small, 1999). Este tratamiento consta principalmente de la combinación de diferentes fármacos como Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Estreptomina y Etambutol, los cuales son administrados por periodos de aproximadamente 6

meses. La OMS ha creado una organización llamada "STOP TB" la cual proporciona de manera gratuita (bajo ciertos lineamientos) tratamientos anti-tuberculosos a zonas de países en vías de desarrollo que tengan una alta tasa de pacientes infectados.

La isoniacida inhibe la síntesis de los ácidos micólicos de la micobacteria, los cuales son esenciales para la formación de su pared. Se sabe que la resistencia que la bacteria obtiene a este fármaco está relacionada con la sobreexpresión del gene *inhA*, y la supresión del gene *katG* el cual codifica la catalasa micobacteriana (enzima que degrada el peróxido y produce CO₂) (Morlock *et al.*, 2003).

La rifampicina es un antibiótico contra cocos gram positivos y negativos, es producido por *Streptomyces mediterranei*. Este medicamento actúa uniéndose a la subunidad β de la polimerasa del ARN bacteriano, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero, la bacteria adquiere resistencia cuando muta el gene *rpoB* de esta subunidad (Mariam *et al.*, 2004).

El etambutol (EMB) actúa inhibiendo la polimerización de arabinogalactano y lipoarabinomanano, siendo su principal blanco la arabinosyltransferasa, el EMB también favorece la acción de fármacos lipofílicos (como la rifampicina). La micobacteria se vuelve resistente a este fármaco cuando se produce una mutación en el gene *embB* el cual codifica la arabinosyltransferasa (Lety *et al.*, 1997).

La pirazinamida es un fármaco similar a la nicotinamida, estable, ligeramente hidrosoluble es absorbido por los macrófagos ayudándolos a matar a los bacilos en un medio ácido (Wade *et al.*, 2004). En cambio la estreptomycin tiene una absorción deficiente por las células, por lo que su acción principal es en la parte extra celular.

Algunos de estos fármacos han comenzado a ser ineficientes en el tratamiento de la tuberculosis, debido a que en algunas ocasiones los pacientes abandonan su tratamiento favoreciendo la aparición de nuevas cepas multi drogo resistentes.

La Vacuna actual contra tuberculosis

En 1882 cuando se identificó *Mycobacterium tuberculosis* como el agente etiológico de la tuberculosis, se comenzaron a desarrollar formas para prevenir y tratar esta enfermedad. Albert Calmette y su ayudante Camille Guérin descubren una cepa virulenta de bacilo tuberculoso bovino que perdía su virulencia después de realizar cultivos sucesivos (vacuna BCG). Con esta cepa se comenzaron a hacer inmunizaciones y es en 1921 cuando se empezó a utilizar esta vacuna en toda Europa.

La eficacia de esta vacuna ha sido ampliamente cuestionada. Brewer, realizando un meta-análisis encontró que el BCG protege un 50% en promedio en contra de la forma activa de la infección (Brewer, 2000).

Respuesta inmune a la tuberculosis

Al momento en que una persona con tuberculosis activa tose, aeroliza bacilos los cuales pueden llegar hasta los alvéolos pulmonares de un individuo sano, en donde pueden ocurrir dos situaciones. La primera es que el individuo sano elimine a los bacilos y la segunda es que estos bacilos infecten al individuo (Young *et al.*, 2002).

Cuando un individuo se infecta con *M. tuberculosis*, generalmente se produce una respuesta inmune para formar granulomas constituidos principalmente de macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y monocitos con el fin de confinar a los bacilos patógenos. El individuo porta el bacilo tuberculoso pero sin presentar los síntomas de la enfermedad. A esto se le denomina tuberculosis latente (Chan *et al.*, 1994). En el caso de que el individuo por alguna razón presente inmunosupresión, los bacilos tuberculosos proliferarán rápidamente por todo el organismo, y comenzará a presentar los signos y síntomas de la enfermedad activa convirtiéndose en un foco de infección (Tiruvilumala *et al.*, 2002).

Durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, los macrófagos fagocitan a los bacilos y procesan los antígenos en el fagolisosoma para posteriormente presentarlos por medio de MHC-II a linfocitos T CD4⁺, mientras que los antígenos que se encuentran en el citoplasma de las células infectadas son presentados por medio de MHC-I a linfocitos T CD8⁺ (Kaufmann, 2001). Recientemente se ha encontrado que moléculas CD1 pueden presentar antígenos de tipo no proteicos como lípidos, fosfolípidos, y lípidos isoprenoides

(Sugita *et al.*, 2004), abriendo un nuevo panorama en la inmunidad contra tuberculosis ya que estas moléculas pueden presentar algunos lípidos característicos del bacilo *M. tuberculosis* como el lipoarabinomamano (Torrelles *et al.*, 2004).

La respuesta inmune protectora contra la tuberculosis se basa principalmente en la inmunidad mediada por una respuesta tipo Th1 (Vanham *et al.*, 1997; García-Sancho, 2001). Algunos de los factores que participan en la respuesta tipo Th1 son las citocinas IL-12 y TNF- α derivados de macrófagos y monocitos, y la IL-2 e IFN- γ de linfocitos T. Estas citocinas son esenciales para la activación de los mecanismos microbicidas de los macrófagos y la eliminación de los bacilos (Barnes, 1994). También se sabe que es importante la participación de citocinas de la respuesta inmune tipo Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), las cuales inhiben los efectos de la respuesta Th1, evitando que esta sea tan fuerte que lesione al individuo (Demissie *et al.*, 2004).

El bacilo tuberculoso emplea diferentes métodos para evitar que el sistema inmune lo destruya. En primer lugar el bacilo puede interactuar con la célula huésped (preferentemente macrófagos), mediante el uso de receptores tipo "toll" (TLR), (Krutzik *et al.*, 2001), o de receptores que promueven la fagocitosis como el receptor de manosa, el CD14, receptores del complemento (CR1, CR3, CR4), receptores "scavenger", receptores de la fracción cristalizante de anticuerpos IgG (Fc γ Rs), (Ernst, 1998) y receptores de fibronectina.

Una vez fagocitado, algunos de los mecanismos que utiliza el macrófago para destruir al bacilo son: la generación de radicales libres de oxígeno para estallido respiratorio (Ismail *et al.*, 2002) y la producción de intermediarios de nitrógeno reactivos vía L-arginina (Flynn *et al.*, 2001). Sin embargo, las cepas virulentas de *M. tuberculosis* son capaces de inhibir múltiples funciones del macrófago, como la maduración del fagosoma, la señalización por Ca^{2+} y fosfatidil inositol 3 cinasa así como rutas de apoptosis entre, otras (Fig. 3), (Koul *et al.*, 2004).

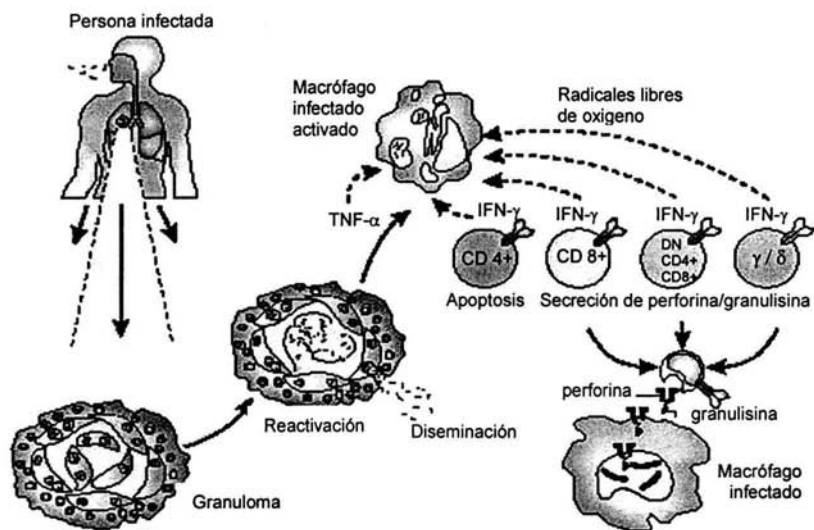


Figura 3. Respuesta Inmune a *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2001).

Estudios recientes han demostrado que existe un efecto sinérgico entre el bacilo de *M. tuberculosis* y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), ya que se ha demostrado que hay un incremento en la replicación y la mutación del virus, principalmente en la secuencia V3 de la glicoproteína 120. Esto probablemente se deba a que *M. tuberculosis* incrementa la expresión en

macrófagos del co-receptor de superficie CXCR4 (CD184) por lo cual el virus prefiere utilizar este co-receptor sobre CCR5 (CD159), lo que facilita la entrada del virus (Hoshino, 2004).

También se ha observado un aumento exacerbado en la susceptibilidad contra la tuberculosis en individuos infectados con el VIH (inmunosupresión), ya que la inmunidad contra *M. tuberculosis* es principalmente mediada por células T CD4⁺ (Pacheco, 2000).

Características del bacilo

Se le dio el nombre de *Mycobacterium* ya que cuando se cultiva *in vitro*, el bacilo forma colonias parecidas a los micelios de algunos hongos (Fig. 4), y *tuberculosis* por que el sistema inmune forma pequeños granulomas o tubérculos constituidos principalmente de macrófagos alrededor del bacilo (Fig. 5) para intentar aislarlo (Orme, 1995).

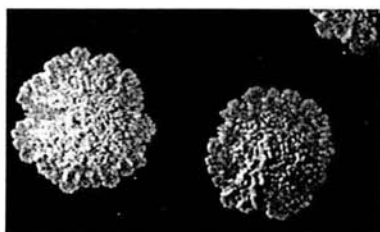


Figura 4. Colonias del bacilo de *M. tuberculosis* (Center for Tuberculosis Research, Johns Hopkins University, EUA).



Figura 5. Bacilo de *M. tuberculosis* (Wadsworth Center, EUA).

La mayoría de las micobacterias son organismos saprófitos de vida libre que pueden encontrarse en una amplia variedad de ambientes, algunas de las especies de interés clínico son *M. bovis*, *M. leprae* y *M. tuberculosis* (Goodfellow *et al.*, 1998).

Una de las principales características que le confieren resistencia al género de *Mycobacterium* es su pared celular, ésta es hasta mil veces más impermeable a solutos hidrofílicos que la pared de *Escherichia coli*, lo que la hace resistente a deshidratación, a la absorción de ciertos antibióticos y a daños por ácidos y bases fuertes (Draper, 1998). Cuando se tiñen los bacilos con fucsina, éstos son muy resistentes a la decoloración con alcohol ácido, a esta propiedad se le denomina tinción ácido-alcohol resistente o tinción de Ziehl-Neelsen (Draper, 1998).

La pared se divide en cuatro secciones, las cuales son:

- Zona externa de grosor variable
- Zona transparente al paso de electrones
- Zona densa al paso de electrones
- Membrana plasmática

En la zona densa al paso de electrones encontramos peptidoglicano y arabinogalactano, en la zona transparente al paso de electrones se encuentran lípidos, como los ácidos micólicos (estos últimos responsables principales de la impermeabilidad de la pared), y en la zona externa de grosor variable se encuentran polisacáridos, lípidos y proteínas (Brennan *et al.*, 1994), (Fig.6 y 7).

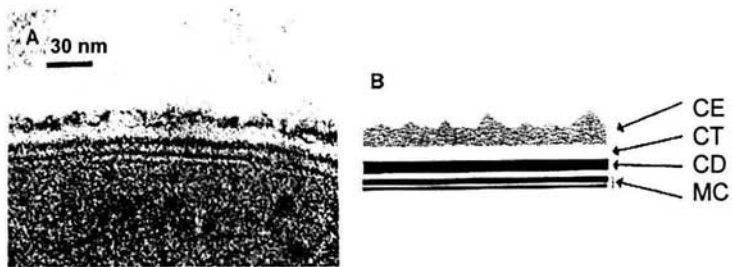


Figura 6. Micrografía electrónica de la pared de *M. tuberculosis*, capa externa de grosor variable (CE), capa transparente al paso de electrones (CT), capa densa al paso de electrones (CD), membrana citoplasmática (MC) (Brennan *et al.*, 1994)

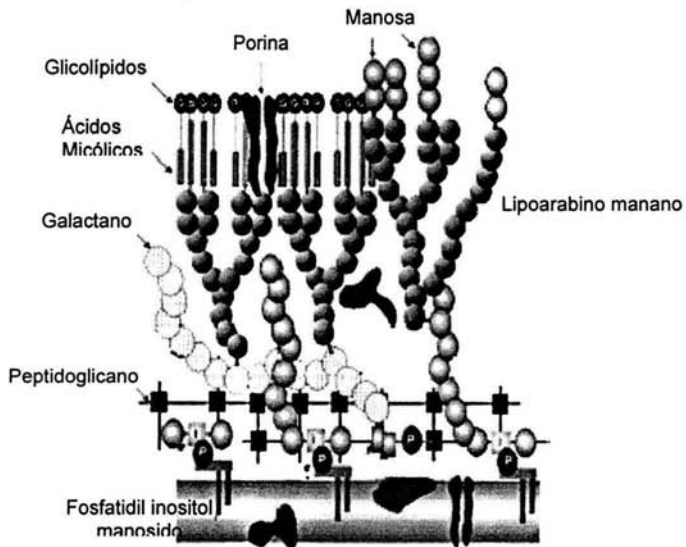


Figura 7. Modelo de la pared celular de *Mycobacterium* (Quesniaux *et al.*, 2004).

El complejo del Antígeno 85

El bacilo tuberculoso contiene entre sus múltiples proteínas un complejo formado por tres isoformas, todas ellas involucradas en la síntesis de la pared celular transfiriendo ácidos micólicos (Gobec *et al.*, 2004). Se trata de proteínas altamente inmunogénicas y antigénicas de entre 30-32 kDa, llamadas el complejo del Antígeno 85 (Ag85).

El complejo del Ag85 se encuentra principalmente en la capa externa de grosor variable junto con lípidos y polisacáridos, aunque también es secretado fuera del fagosoma que contiene al bacilo (Beatty *et al.*, 2000). Hay evidencias de que este antígeno ayuda a la micobacteria a infectar a los macrófagos del huésped por la vía del receptor de fibronectina, lo que lo hace un candidato ideal para blanco de nuevas drogas (Ronning *et al.*, 2004).

Este antígeno es, quizá, la proteína que mayor protección ha conferido hasta ahora, en ensayos para vacunación en contra de la tuberculosis (Mustafa, 2002). El complejo es llamado el antígeno preponderante del bacilo tuberculoso, encontrándose respuesta humoral en la mayor parte de enfermos con tuberculosis activa (Landowski *et al.*, 2001); ha sido propuesto como uno de los reactivos más prometedores para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (Daffé, 2000) ya que se ha reportado que tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 95% (Sada *et al.*, 1990), por lo que sería una subunidad de vacunación y un reactivo de diagnóstico eficaz (Mustafa, 2001).

Desafortunadamente para la obtención de este antígeno se necesitan laboratorios de nivel 3 de bioseguridad, así como personal y equipo especializado en la manipulación de agentes infecciosos, lo que dificulta su producción. Este antígeno se ha sintetizado de manera recombinante a partir de *E. coli* y *Listeria* sp (Miki *et al.*, 2004), y también se han sintetizado péptidos de diferentes regiones y tallas de dicho antígeno (Samanich *et al.*, 200). Pero estos intentos no han brindado resultados alentadores que permitan su empleo para reemplazar a la proteína nativa, ya que con el antígeno nativo se tiene un 79% de reconocimiento en inmuno diagnóstico y con el antígeno recombinante solo se obtiene 10% de reconocimiento, en pacientes que previamente han sido catalogados como positivos en métodos de baciloscopia (Samanich *et al.*, 2000).

Phage Display

El Phage Display o despliegue en fago, es una técnica en la cual se pueden expresar en la superficie del fago filamentoso diferentes moléculas unidas a las proteínas de superficie (pIII y pVIII). La gran diversidad de bibliotecas construidas con este sistema ha permitido una amplia aplicación en diferentes áreas para identificar la interacción ligando-receptor, la búsqueda de regiones antigénicas/inmunogénicas y la identificación de mimótopos de motivos antigénicos y/o inmunogénicos (Tabla 2).

En la década de los setenta se comenzó a utilizar fagos M13 como vehículos para clonar y secuenciar fragmentos de DNA, a mediados de los ochenta George Smith demuestra que se pueden utilizar estos fagos para

generar bibliotecas con información genética, esto lo hace insertando un fragmento de la enzima Eco RI en la proteína de superficie pIII de un fago filamentoso M13 (Smith, 1985). A principios de los noventa se generan las primeras bibliotecas de péptidos expresados en fagos, las cuales se utilizan para identificar ligandos específicos (Cwrla *et al.*, 1990).

Actualmente se dispone de bibliotecas comerciales de péptidos expresados en fagos con una gran diversidad de alrededor de 1×10^9 combinaciones diferentes, dependiendo de la longitud del inserto (Jaime *et al.*, 1990; Steven *et al.*, 1990). La proteína de superficie pIII, que se expresa de 3 a 5 copias en cada fago (Fig. 8), es la más utilizada para desplegar moléculas de interés de diferentes longitudes.

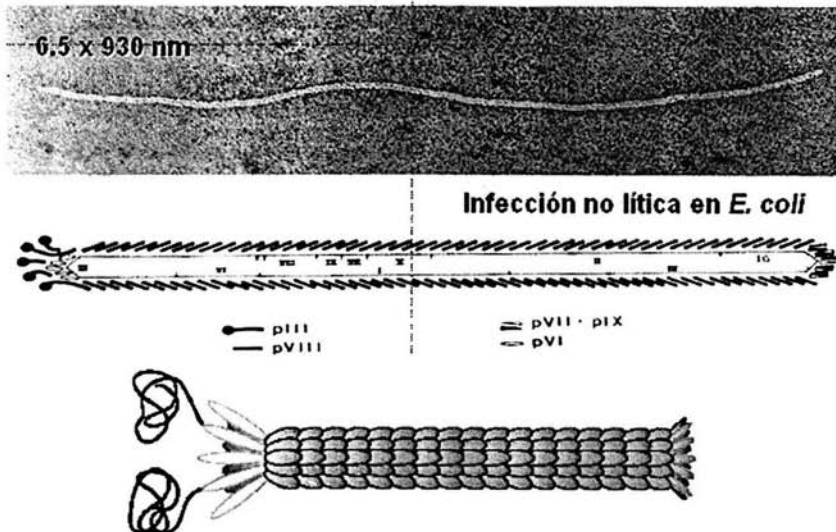


Figura 8. Micrografía y esquema de un fago M13 (Kay *et al.*, 1996; Smothers *et al.*, 2002)

En este trabajo se utilizaron por separado bibliotecas comerciales peptídicas con longitudes de 7, 9 y 12 aminoácidos. En el caso de la biblioteca de 9 aminoácidos los insertos están flanqueados en sus dos extremos por cisteínas adquiriendo una estructura secundaria en forma de aro o "loop".

Tabla 2. Diferentes aplicaciones del Phage Display (Smothers *et al.*, 2002).

Tipo de biblioteca	Aplicación
Péptidos	Interacciones proteína – péptido, DNA, RNA, glicolípidos, etc. Identificación de sitios específicos de pegado para Diagnóstico Receptores agonistas o antagonistas Inhibición de enzimas Mimetismo o identificación de epítopos Determinación de sustratos específicos de proteasas Diseño de vacunas Identificación de marcadores específicos de células o tejidos
Fragmentos de anticuerpos	Identificación de sitios específicos de pegado para Terapia y diagnóstico humano Receptores agonistas o antagonistas Inhibición de enzimas Identificación de marcadores específicos de células o tejidos
Bibliotecas de cDNA Bibliotecas de DNA genómico	Identificación de complejos proteicos naturales Determinación de sustratos específicos de enzimas Interacciones proteína – proteína y epítopos Cambios de función en proteínas como: Incremento en la afinidad de pegado Alteraciones de especificidad de pegado Alteración en la especificidad de la enzima al sustrato Cinética enzimática

Mimótopos

Un mimótopo es un péptido que imita (mimetiza) estructural y/o funcionalmente una región. Un epítipo es cualquier secuencia, estructura (lineal o conformacional) o región de una proteína que es reconocida por un anticuerpo o por un linfocito T, la cual es susceptible de ser sustituida por un mimótopo. Los mimótopos pueden ser inmunogénicos (generan una respuesta inmune), o antigénicos (reaccionan con anticuerpos generados por el antígeno original pero no son capaces de montar una respuesta inmune específica por el antígeno).

Estos mimótopos pueden tener aplicaciones como herramientas de diagnóstico (Santamaría *et al.*, 2001) y como subunidades de vacunación (Cwirla *et al.*, 1990; Meola *et al.*, 1995), entre otras.

Algunas ventajas de los mimótopos son:

- Pueden tener una mayor capacidad inmunogénica que los antígenos originales.
- Menor posibilidad de reacción cruzada inmunológica.
- Identificar epítopos conformacionales.

Las ventajas de las biomoléculas que se obtienen utilizando este método son:

- Bajo costo.
- Sencillez en su proceso de elaboración.
- Alto rendimiento.
- Capacidad inmunorreactiva.
- Mimetizar epítopos lineales y conformacionales de péptidos/proteínas o moléculas no proteicas.

HIPÓTESIS

Mediante el rastreo de bibliotecas peptídicas es posible la identificación de mimótopos de epítomos lineales y conformacionales del Ag85 de *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVOS

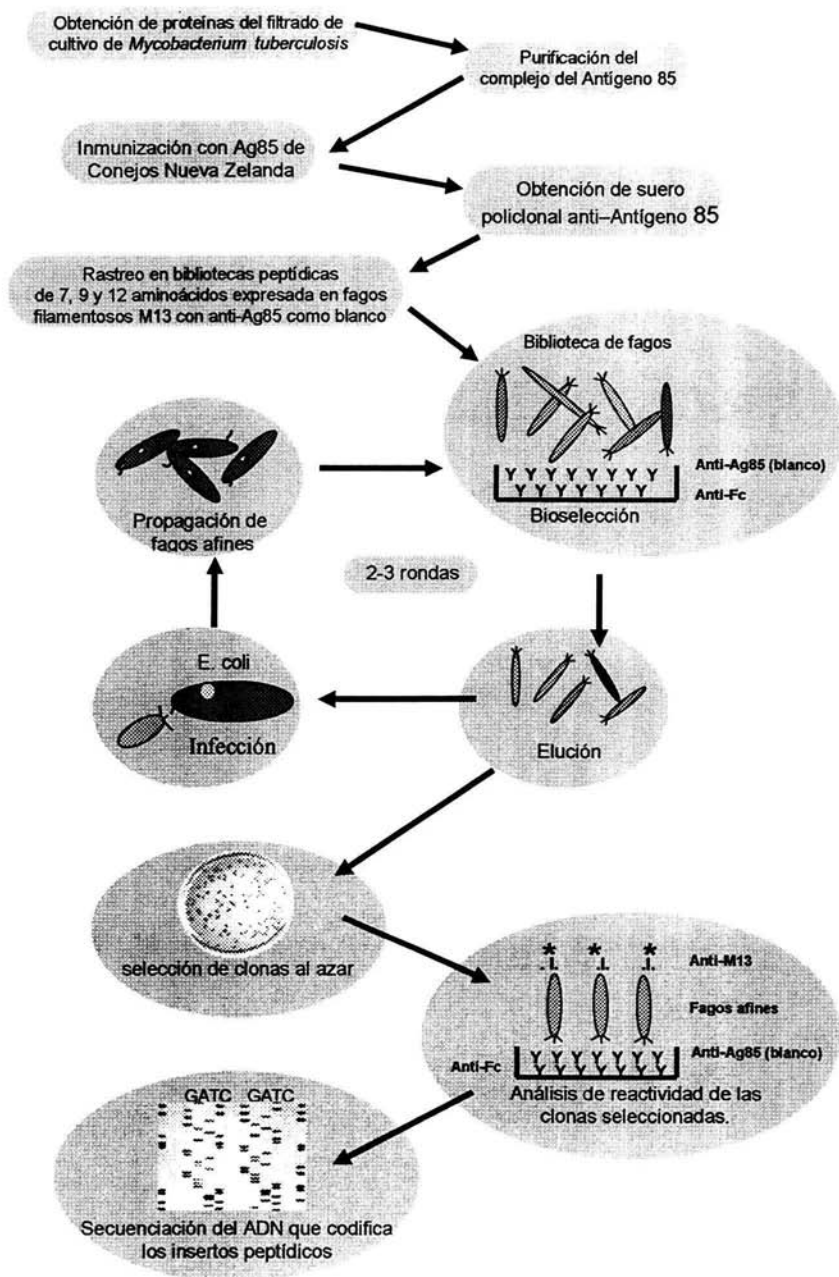
Identificación de epítomos/mimótopos de epítomos del complejo proteico del antígeno 85 de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la técnica denominada Phage Display.

JUSTIFICACIÓN

El Ag85 es una molécula altamente antigénica e inmunogénica formada por 3 isoformas. Es considerada como uno de los mejores candidatos para inmudiagnóstico de tuberculosis activa, así como para vacunación. Estudios anteriores muestran que mediante la tecnología de "Phage Display", es posible identificar péptidos que mimeticen epítomos lineales y conformacionales de antígenos proteicos, y que dichos péptidos podrían ser útiles como reactivos de inmuno diagnóstico (Santamaría, 2003). Asimismo, la expresión en fagos filamentosos de epítomos inmunogénicos parece constituir una forma novedosa y eficaz para vacunación (Manoutcharian *et al.*, 2004).

La expresión en fagos filamentosos de péptidos que mimeticen epítomos de *Mycobacterium tuberculosis* representaría una alternativa para la fácil producción de reactivos para inmudiagnóstico y vacunación. En ambos casos, es bien conocido que un solo epítomo no sería suficiente para abarcar el amplio panorama de la respuesta inmune encontrada en humanos, por lo que resulta conveniente el identifica epítomos/mimótopos de múltiples motivos. En el caso específico de mimótopos para inmudiagnóstico, la identificación puede ser regulada mediante el rastreo de bibliotecas peptídicas, utilizando múltiples ligandos del Ag85, como sería con el uso de anticuerpos policlonales producidos en contra de las 3 isoformas del complejo.

ESQUEMA METODOLÓGICO



MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de micobacterias

Mycobacterium tuberculosis cepa H37Rv fue sembrada en matraces conteniendo 800ml de medio líquido Sauton (ver apéndice A) estéril enriquecido (con ácido pirúvico 0.5%, glucosa 0.5%), por 3 semanas a 37°C sin agitación (Kitaura *et al.*, 2000).

Obtención de proteínas de filtrado de cultivo

Se hicieron 3 filtrados del medio de cultivo en membranas de PVDF (Millipore Bedford MA., E.U.A.) con poro de diámetro de 1.2, 0.45 y 0.22 μ respectivamente. Al medio de cultivo filtrado se le agregó sulfato de amonio saturando al 50% (Diagrama 1, ver apéndice C), y se dejó en agitación durante 1 día a 4°C (Dixon, 1953). Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10000 RPM 20 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, el precipitado (Pr1) fue dializado en cartuchos para diálisis con diámetro de poro de 10kDa (Pierce, Rockford IL. E.U.A.), a 4°C en agitación constante por 1 día en agua bidestilada. Al sobrenadante (Pr2) se le agregó sulfato de amonio hasta saturarlo y se dejó 1 día a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 RPM 20 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, el precipitado (Pr2) fue dializado.

Cuantificación de proteínas (Bradford)

Ambos precipitados fueron cuantificados por el método modificado de Bradford (Bradford, 1976). En este ensayo se utilizó una solución madre (PBS-BSA 1mg/ml), a partir de la cual se hicieron diluciones (5, 10, 15, 20 y 25 μ g/ml) en PBS. Posteriormente se colocó en una placa de ELISA (Nunc Maxi Sorp,

Denmark) por triplicado 80µl de cada una de las soluciones estándar, así como de ambos dializados (en dilución 1:50, 1:100 y 1:200). Se agregó 20µl de reactivo Bradford (BioRad, Hércules CA., E.U.A.) a cada pozo y después de 5 minutos, se leyó la placa a una longitud de onda de 595 nm. Se calculó la regresión lineal con los datos obtenidos y se determinó la concentración de proteínas.

Purificación de proteínas por HPLC

Uno de los métodos ensayados para purificar el antígeno 85 fue el de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). El tipo de cromatografía utilizada (reportado por Belisle *et al.*, 1997) fue de interacción hidrofóbica en una columna (1.6x10cm) Hi-Load Phenyl Sepharose HP (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La columna fue cargada con 4.5mg/ml de la muestra (Pr1) a un flujo de 1ml por minuto y se realizó un lavado con tres volúmenes de la solución A [10mM KH₂PO₄ (pH 7.5), 1mM EDTA, 1mM DTT]. El complejo del antígeno 85 fue eluido por separado usando: 30ml de la solución B [10mM Tris-HCl (pH 8.6), 1mM EDTA, 1mM DTT], seguido de un gradiente lineal en 40ml compuesto 100% de solución B hasta llegar a una concentración 100% de solución C [10mM Tris-HCl (pH8.6), 1mM EDTA, 1mM DTT, 50% Etilénglicol (v/v)], y 10ml de la solución C 100% (Belisle *et al.*, 1997). Las longitudes de onda utilizadas fueron 280, 254 y 215 nm. Se recolectaron las muestras correspondientes a los picos detectados y se cuantificaron las proteínas (por el método de Bradford).

Purificación de proteínas por Electroforesis

Las proteínas de interés se purificaron por electroforesis preparativa (SDS-PAGE) utilizando geles de acrilamida (170x150x3mm) al 4% para el concentrador [Acrilamida 30%, Buffer de fosfatos 0.5M (pH 6.8), PSA 10%, TEMED (ver apéndice B)], y al 10% para el separador [Acrilamida 30%, Buffer de fosfatos 1.5M (pH 8.8), PSA 10%, TEMED (ver apéndice B)], a 90 volts por 12 horas. Se cargaron 5mg de muestra preparada (hervida por 5 minutos con buffer de aplicación, ver apéndice B) y peso molecular preteñido (Prestained SDS-PAGE Standard Low Range, BioRad Hércules CA., E.U.A.), (Copeland, 1994).

Tinción Directa

El gel preparativo se tiñó con KCl 0.1M hasta que se vieron las bandas de las proteínas. Se cortó la banda correspondiente a la altura de 30-32kDa. La banda se incubó en H₂O bidestilada hasta que se destiñó por completo (Copeland, 1994).

Electro elución

Las celdas de elución fueron armadas con membrana de diálisis (con diámetro de poro 10kDa). El gel correspondiente a la banda de 30-32kDa se colocó en pequeños trozos dentro de la celda, y se agregó Buffer de corrida 0.1X (ver apéndice B) a la cámara y a las celdas. Se aplicó una corriente de 5mA (por cada celda) durante 3 horas a 4°C, teniendo cuidado de colocar la trampa de recuperación del lado positivo. Una vez transcurrido este tiempo se descartó el buffer de la celda y se recuperó el buffer que contenía la trampa de

recuperación (según instrucciones del fabricante de la cámara Little Blue Tank, ISCO). Posteriormente se cuantificaron las proteínas (por el método de Bradford).

Electroforesis analítica

Las proteínas (30-32kDa) ya purificadas fueron analizadas por electroforesis analítica (SDS-PAGE) utilizando geles de acrilamida (100x80x1.5mm) al 4% para el concentrador [Acrilamida 30%, Buffer de fosfatos 0.5M (pH 6.8), PSA 10%, TEMED (ver apéndice B)] y al 12.5% para el separador [Acrilamida 30%, Buffer de fosfatos 1.5M (pH 8.8), PSA 10%, TEMED (ver apéndice B)]. Se cargaron 20µg de muestra por pozo y 10µg peso molecular preteñido (Prestained SDS-PAGE Standard Low Range, BioRad Hercules CA., E.U.A.). Se aplicó un voltaje de 120 volts por 2 horas (Copeland, 1994).

Tinción de Plata (modificada de Blon)

El gel analítico se tiñó con plata de la siguiente manera: solución fijadora [metanol 50%, ácido acético 10%] por 30 minutos, posteriormente se incubó por 15 minutos en una solución [metanol 5% y ácido acético 1%]. Se lavó con H₂O bidestilada (5 minutos 3 veces), y se incubó 90 segundos en Na₂S₂O₃·5H₂O al 0.02%. Se lavó nuevamente y se incubó 1 hora en AgNO₃ al 0.2%. Se realizó otro lavado con H₂O bidestilada (1 minuto 3 veces), se incubó en la solución de revelado (ver apéndice B) hasta que el gel comenzó a ponerse oscuro. Se aplicó la solución de paro [ácido acético 6%] 10 minutos.

Posteriormente se hicieron varios lavados (H₂O bidestilada) y el revelado fue digitalizado (Copeland, 1994).

Esquema de inmunización

Se inmunizó subcutáneamente un conejo Nueva Zelanda hembra albina de 2.5kg con 300µg de proteína en 1ml de adyuvante incompleto de Freund. Se le administró un refuerzo a la 3ª semana, con 200µg de proteína en 1ml de adyuvante incompleto de Freund. Dos refuerzos idénticos fueron administrados a la 6ª y a la 10ª semana. Al término de la semana numero 12 se sacrifico y el suero obtenido fue almacenado a -20°C (Dillon et al., 1999).

Transferencia de Geles

Se transfirieron las proteínas de los geles a membranas de PVDF. La membrana y el gel se dejaron reposar 20 minutos en buffer de transferencia (ver apéndice B). Posteriormente se armó la cámara de transferencia en el siguiente orden: papel filtro para transferencia (previamente humedecido en el buffer), membrana, gel de acrilamida, papel filtro para transferencia (previamente humedecido en el buffer) y la tapa de la cámara de transferencia. Se aplicó una corriente de 20 volts por 25 minutos, la membrana se lavó 3 minutos en PBS y se guardó en papel filtro a 4°C (según instrucciones del fabricante de la cámara de transferencia, Bio-Rad).

Inmunoblot

Una vez transferida la membrana se incubó 3 minutos en PBS y se bloqueó (PBS-BSA al 3%) a temperatura ambiente por 1 hora en agitación.

Posteriormente se lavó (con PBS-Tween 20 al 0.3% 3 minutos 5 veces), y se incubó con anticuerpo anti-antígeno 85 obtenido en conejo (1:1000 en PBS-Tween 20 al 0.03%) toda la noche a 4°C en agitación. Se lavó nuevamente y se dejó la membrana incubando con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a la fosfatasa (Sigma, St. Louis MO., E.U.A.), diluido (1:5000 en PBS-Tween 20 al 0.03%) por 45 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se lavó (PBS-Tween 20 al 0.3%, 5 veces 3 minutos), y se aplicó el revelador (ver apéndice B) el tiempo suficiente para que se observaran las bandas (Copeland, 1994).

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Se depositó 0.5µg del complejo de proteínas (antígeno 85), diluidas en 100µl de buffer de carbonatos (por pozo), en una placa para ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavó 5 veces con 200µl (PBS-Tween 20 al 0.1%) y se le agregó a cada pozo 200µl de PBS-BSA al 3% al incubándose 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se incubó con el suero policlonal anti-antígeno 85 obtenido del conejo, diluido 1:100 (en PBS-BSA al 0.3%, Tween 20 al 0.1%) por 12 horas a 4°C. Se lavó nuevamente y se incubó con 100µl de anti IgG de conejo conjugado a la fosfatasa (Sigma, St. Louis MO., E.U.A.), dilución 1:5000 (en PBS-BSA al 0.3%), por 1 hora a 37°C. Se lavó y adicionó 100µl de 4-nitrofenilfosfato diluido (1mg/ml en solución amortiguadora de dietanolamina, ver apéndice B) a 37°C. Se incubó al abrigo de la luz el tiempo necesario para obtener la reacción colorimétrica. La densidad óptica se leyó a 405 nm y los resultados fueron graficados (Crowther, 2001).

Bioselección

Para identificar los epítomos/mimótopos del complejo del antígeno 85 de *Mycobacterium tuberculosis* se usaron por separado tres bibliotecas comerciales con péptidos expresados al azar en el extremo amino de la proteína pIII de la superficie del fago filamentoso M13 (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra). Dos de ellas lineales de doce y siete aminoácidos y la otra de siete flanqueados por cisteínas (biblioteca ciclica de 9 aminoácidos). La bioselección se llevó a cabo utilizando una placa de ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark). Cuatro pozos de la placa fueron cubiertos cada uno con 100µl de una dilución (1:18) de anti IgG de conejo H+L (Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.) en PBS, y fue incubada 1 hora a 37°C. Los pozos fueron lavados 10 veces con 200µl (de una solución PBS-Tween 20 al 0.3%). Posteriormente se incubó con 100µl por pozo de una solución de bloqueo (PBS-BSA al 2%) por 1 hora a 37°C, se hicieron 10 lavados con 200µl (PBS-Tween 20 al 0.3%). Posteriormente fueron agregados 100µl por pozo de suero de conejo anti-Ag85 (1:100) en PBS-BSA al 1%, Tween 20 al 0.1%, se incubó por 1 hora a 37°C y se hicieron 10 lavados con 200µl (PBS-Tween 20 al 0.3%). En 450µl de PBS-BSA al 0.1% con Tween 20 al 0.1% se diluyó 10µl (2×10^{11} /ml) de cada biblioteca comercial de fagos (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra). De esta dilución fueron agregados 100µl por pozo y se incubó toda al noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se hicieron 10 lavados y se agregaron 100µl por pozo de trietilamina (0.1M, ver apéndice C) y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se colectó el eluido de los pozos en un mismo tubo y se agregó 200µl de Tris-HCl (1M, pH 7.4), (según especificaciones del fabricante del kit Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs, New England).

Titulación de los Fagos

Después de cada ronda de bioselección de cada uno de los experimentos, se procedió a determinar el número de fagos eluidos. Después de la primera ronda de cada experimento se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio de cultivo 2xYT (ver apéndice A) a partir de los fagos eluidos de las bioselecciones anteriores.

Después de realizar la última dilución, se agregaron los fagos a 200ml de bacterias *Escherichia coli* cepa TG-1 (de un cultivo de toda la noche, $DO_{600} \sim 0.5$), se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente y se agregó 10 μ l de Xgal/IPTG (ver apéndice C). Esta mezcla se agregó a un tubo con 4ml de medio Top agar (fundido, ver apéndice A), se mezcló y se vació en una caja de Petri preparada con medio LB agar (ver apéndice A) para dejarse incubando a 37°C toda la noche. Al día siguiente se obtuvo el título contando las unidades formadoras de placas (pfu), (según especificaciones del fabricante del kit Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs, New England).

Amplificación de los Fagos

Para amplificar el eluido, se cultivaron bacterias *E. coli* TG-1 en 10ml de medio 2xYT (ver apéndice A) en agitación a 37°C durante una noche. De esas bacterias se tomó una dilución 1:100 (tomando 200 μ l) en 50ml de medio 2xYT (ver apéndice A), y se infectaron con 350 μ l de los fagos eluidos. Se amplificó, dejándose en agitación por 4.5 horas a 37°C, posteriormente se centrifugó a 10000 RPM (12000g) por 10 minutos a 4°C. A partir de 40ml del sobrenadante

y se precipitaron los fagos con 1/6 (volumen) de polietilenglicol (PEG/NaCl, ver apéndice C) manteniéndose a 4°C toda la noche.

Después de 16 horas se centrifugó durante 15 minutos a 10000 RPM a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1ml de TBS (ver apéndice C). Después se transfirió la suspensión a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó por 5 minutos a 14000 RPM (16 100g) a 4°C. Se volvió a transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga y se precipitó con 180µl de PEG/NaCl (ver apéndice C) y se incubó en hielo por 1 hora. Después se centrifugó 10 minutos a 14000 RPM a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se recentrifugó 2 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 200µl de TBS (ver apéndice C) y se centrifugó 5 minutos a 14000 RPM a 4°C, para eliminar cualquier residuo insoluble. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrifuga y se obtuvo el eluido amplificado, que posteriormente se tituló para tener $\sim 1 \times 10^{13}$ fagos/ml. De esta forma, los fagos amplificados se usaron para realizar las siguientes rondas de bioselección.

A partir de la segunda ronda de bioselección de cada experimento se llevó a cabo la selección al azar de las clonas individuales a partir del eluido (el numero de clonas seleccionadas fue de 10 a 11 por cada experimento). Cada una de las clonas seleccionadas se amplificó en 10ml de medio 2xYT (ver apéndice A) más 100µl de bacterias *E. coli* TG-1. Se incubaron 4.5 horas en agitación constante a 250rpm a 37°C. Los siguientes pasos son iguales a los llevados a cabo en la amplificación de los eluidos obtenidos de las bioselecciones.

Posteriormente, también se titularon cada una de las clonas amplificadas. Se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio 2xYT (ver apéndice A). Después de realizar las diluciones, se agregaron los fagos en 200µl de bacterias *E. coli* TG-1 (de un cultivo de toda la noche), se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se le agregó 10µl de Xgal-IPTG (ver apéndice C). Esta mezcla se transfirió a 4ml de Top agar fundido (ver apéndice A) y de ahí a una caja de petri con medio LB sólido (ver apéndice A), y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se llevó a cabo el mismo procedimiento para calcular el título (según especificaciones del fabricante del kit Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs, New England).

Purificación de ADN de cadena sencilla de los Fagos

Para la purificación de ADN de cadena sencilla de las clonas seleccionadas al azar, se tomó 1 ml de sobrenadante de la primera centrifugación del proceso de amplificación de cada clona seleccionada, se le agregó 400µl de PEG/NaCl (ver apéndice C) y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se centrifugó 10 minutos a 14000 RPM (16 100g), se desechó el sobrenadante y se centrifugó 30 segundos. Después de tirar el sobrenadante se agregó 200µl de buffer de yodo [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 4M EDTA (ver apéndice C)] y se resuspendió el pellet, se agregaron 500µl de etanol absoluto, se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 14000 RPM, se tiró el sobrenadante y se agregaron 200µl de etanol al 70%. Después de centrifugar 1 minuto, se tiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en

15.5 μl de agua bidestilada. Para verificar la presencia de ADN, se tomaron 2 μl de la muestra y se analizó en un gel de agarosa al 1% (según especificaciones del fabricante del kit Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs New England) (ver apéndice C).

Secuenciación del ADN de cadena sencilla de los Fagos

La secuenciación del ADN de los fagos seleccionados se realizó mediante el uso del kit "17 Sequenase versión 2.0 Quik-Denature plasmid sequencing" (Amershan Life Science, OH) y dATP $\alpha\text{-S}^{35}$ como se describe a continuación. Se incubaron a 37°C durante 10 minutos, 1.5 μl de primer (Sequencing Primer -96 gIII, New England Biolabs, USA) con 2 μl de "plasmid reaction buffer" y 12.5ml de ADN purificado cada uno de los fagos (0.5-3 μl de ADN). La mezcla se incubó en hielo 10 minutos. Posteriormente, se le agregó 1 μl de DTT (dithiotritol) 0.1M, 2 μl de labeling mix (dNTPs de G, T, C; 7.5mM c/u), 0.5 μl de dATP $\alpha\text{-S}^{35}$ (3.75×10^{-13} μCi), y 1 μl de enzima (4 unidades de polimerasa), dejándose incubar 5 minutos a 37°C. Enseguida en 4 tubos por reacción, se agregaron 2.5 μl de ddNTPs (80 μM) nucleótidos análogos de terminación (G, A, T y C), a los cuales se les agregó 4.5 μl de la mezcla anterior dejándose a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada uno de los tubos se les agregó 4 μl de la solución stop y se incubaron a 75°C por tres minutos. Inmediatamente se agregaron 6 μl de cada una de las muestras en los carriles de un gel de poliacrilamida al 8%. Se corrió 4.5 horas a 1800 volts, se secó el gel en un secador de geles durante 60 minutos a 80°C. Se transfirió a un casete en donde se expuso a una placa de rayos X durante 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se reveló la placa y se llevó a cabo la

lectura manual de la misma para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en los insertos de los fagos seleccionados (según especificaciones del fabricante del kit Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs).

Análisis de similitud de Secuencias

La similitud de las regiones de aminoácidos entre los insertos de péptidos de las clonas seleccionadas y las secuencias del complejo de proteínas del antígeno 85 se compararon usando los programas de computadora ALIGN y LALING del servidor de Genestream Bioinformatics Resource (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>) y el software BioEdit (Hall, 1999).

Ensayos de ELISA

Para comprobar la reactividad de las clonas individuales con el ligando utilizado para su selección se realizó el siguiente formato de ELISA.

Se sensibilizó una placa para ELISA de 96 pozos (Nunc Maxi Sorp, Denmark), con 100µl por pozo de anticuerpo anti IgG de conejo H+L (Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.), 5µg/ml (1:200) en PBS y se incubó por 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con 400µl de PBS-Tween 20 al 0.2% y se incubó con 200µl de una solución bloqueadora (PBS-BSA al 2%), por 1 hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados con 400µl PBS-Tween 20 al 0.2% y se incubó la mitad de la placa con 100µl de suero preinmune y la otra mitad con el suero anti antígeno 85 dilución 1:100 (en PBS-BSA al 1%, Tween 20 al 0.1%). Se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20 al 0.2% y se agregó a cada pozo (por duplicado, para ambos sueros) 100µl de los fagos (diluidos en PBS-BSA al

1%, Tween 20 al 0.1%, partiendo de una concentración de 5×10^{10} /ml teniendo por pozo 5×10^9) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se realizaron 4 lavados con 400µl PBS-Tween 20 al 0.2% y se incubó la placa con 100µl de anticuerpo anti M13 (Horse Radish Peroxidase/anti M13 Monoclonal Conjugate, Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.) en una dilución 1:5000, por 1 hora a 37°C. Se hicieron cuatro lavados con 400µl PBS-Tween 20 al 0.2% y se agregó 100µl por pozo del sustrato para peroxidasa (ABTS single solution, Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.), se dejó incubar por 15 minutos a 37°C y se midió la absorbancia en un lector de placas automático a 405 nm (Dynex) (Santamaría *et al.*, 2001).

RESULTADOS

A partir de 8 litros de cultivo de 3 semanas de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv en medio de Sauton enriquecido, se precipitaron las proteínas del cultivo filtrado entre las cuales se ha reportado al Ag85 como uno de los principales componentes. Este precipitado se dializó y se cuantificaron las proteínas. El rendimiento del medio de cultivo precipitado al 50% fue de 13.51mg y del medio de cultivo saturado de 5.31mg (Fig. 9).

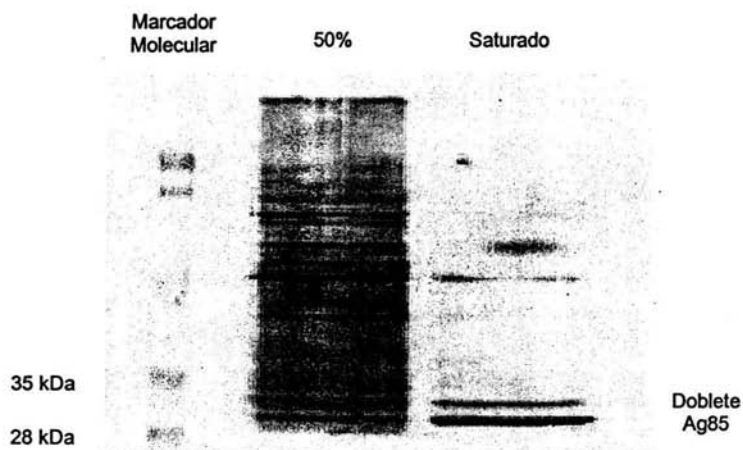


Figura 9. Análisis por electroforesis del filtrado de cultivo precipitado de *M. tuberculosis* y marcador molecular (MM).

Belisle *et al.* reportaron un método de purificación del Ag85 por HPLC, mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (Belisle *et al.*, 1997). Al aplicar este método en el presente trabajo, los perfiles cromatográficos obtenidos fueron reproducibles, encontrándose tres señales proteicas: un primer pico eluido en el volumen muerto [10mM KH₂PO₄ (pH 7.5), 1mM EDTA, 1mM DTT] (solución A), que corresponde a las proteínas sin interacción con la fase ligada, un segundo pico durante la elución con [10mM Tris-HCl (pH 8.6), 1mM EDTA, 1mM DTT] (solución B), y un tercer pico eluido al utilizar un gradiente lineal de [10mM Tris-HCl (pH 8.6), 1mM EDTA, 1mM DTT] (solución B) en [10mM Tris-HCl (pH8.6), 1mM EDTA, 1mM DTT, 50% Etilenglicol (v/v)] (solución C), y que contendría, de acuerdo con lo reportado en la literatura, las 3 isoformas del Ag85 (Fig. 10), (Belisle *et al.*, 1997).

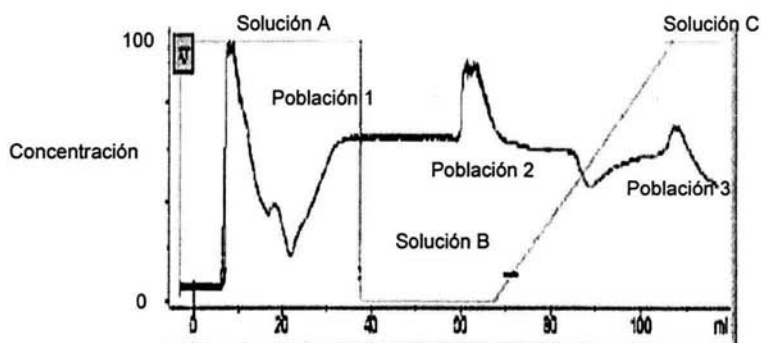


Figura 10. Ensayo de purificación del Ag85 por HPLC (λ 280 nm).

Después de haber realizado el método repetidamente, los eluatos equivalentes fueron reunidos y analizados por SDS-PAGE. Inesperadamente, ninguna banda correspondiente al Ag85 pudo ser visualizada por titulaciones con azul de coomassie, revelando que si el antígeno fue purificado, su cantidad era insuficiente para proseguir el estudio (Fig. 11).

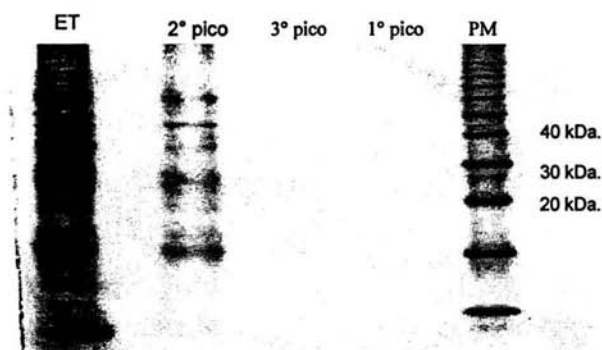


Figura 11. Electroforesis de las fracciones de HPLC, marcador molecular PM, extracto total (ET) como control.

Se selecciono el método de electroforesis preparativa a fin de obtener una cantidad mayor de producto. En un gel de preparativo se cargó 5mg de proteína del filtrado saturado, y se cortaron las bandas correspondientes a 30-32kDa. Con esta técnica se obtuvieron 2.41mg del eluido correspondiente al Ag85 partiendo del precipitado saturado el cual contenía 5.31mg (Fig. 12).

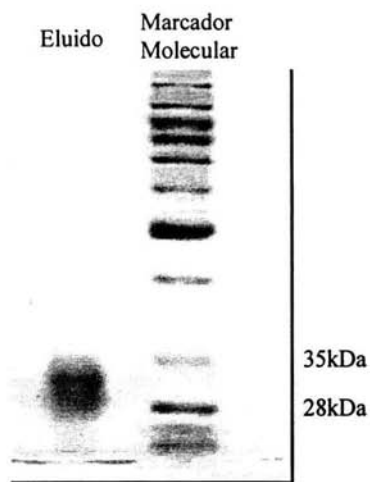


Figura 12. Electroforesis del Ag85 purificado y marcador molecular.

Después de comprobar que estas proteínas correspondían al peso de 30-32 kDa, se analizó su identidad con un Inmuno Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti 30-32kDa IT49 de "Colorado State University" el cual reconoce un motivo compartido en las tres isoformas del Ag85 (Fig. 13).

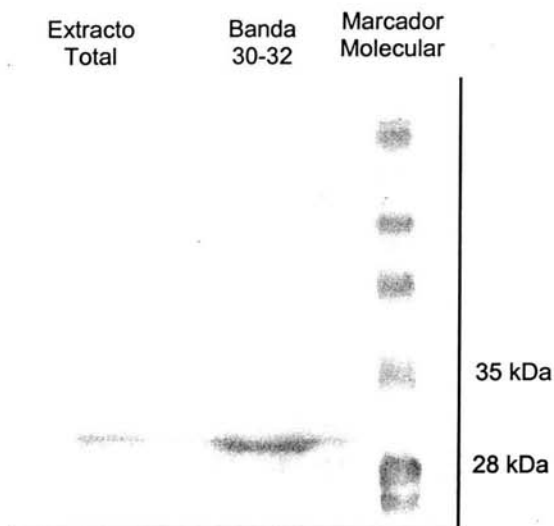


Figura 13. Análisis de la identidad de las proteínas electroeluidas (Banda 30-32kDa), extracto total y marcador molecular.

Después de estos ensayos se observó que la identidad de la proteína correspondía al complejo del Ag85 y estaba altamente purificada.

Ya con el antígeno purificado se procedió a inmunizar un conejo Nueva Zelanda del cual se obtuvo un suero policlonal anti-Ag85 (Fig. 14).

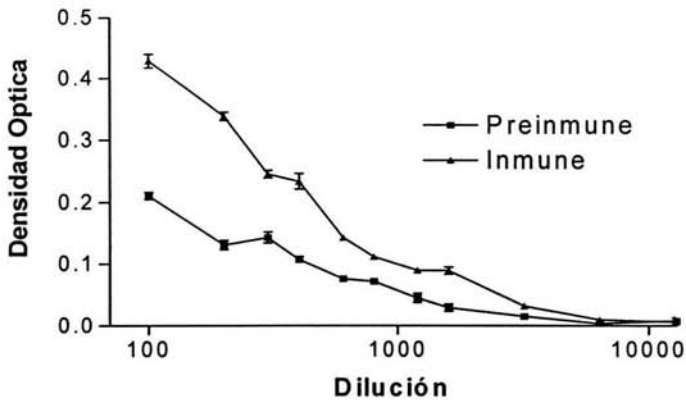


Figura 14. Titulación del suero de conejo inmunizado con Ag85 a 405 nm mediante ELISA.

Con este suero policlonal anti-Ag85 se realizaron tres rondas de bioselección en tres diferentes bibliotecas de péptidos (de 7, 12 aminoácidos y 9 flanqueados por cisteínas) expresados en fagos filamentosos M13, la biblioteca de 9 aa está constituida de 7 residuos flanqueados en sus dos extremos por cisteína, lo que le da las propiedades conformacionales de asa.

Se seleccionaron al azar 10 clones de la ronda número dos y 10 clones de la ronda número tres, de cada biblioteca. Posteriormente se realizó un ensayo inmuno enzimático (ELISA) con el suero policlonal anti-Ag85 y se determinó la reactividad de cada clona (Fig. 15). Con este ensayo se pudieron identificar tres clones altamente reactivos de cada biblioteca teniendo un total de nueve clones reactivos; como control se utilizó una clona con un inserto no relacionado que expresa la secuencia (GTREFRH), y también fagos M13 silvestres, los cuales no expresaban inserto en sus proteínas pIII.

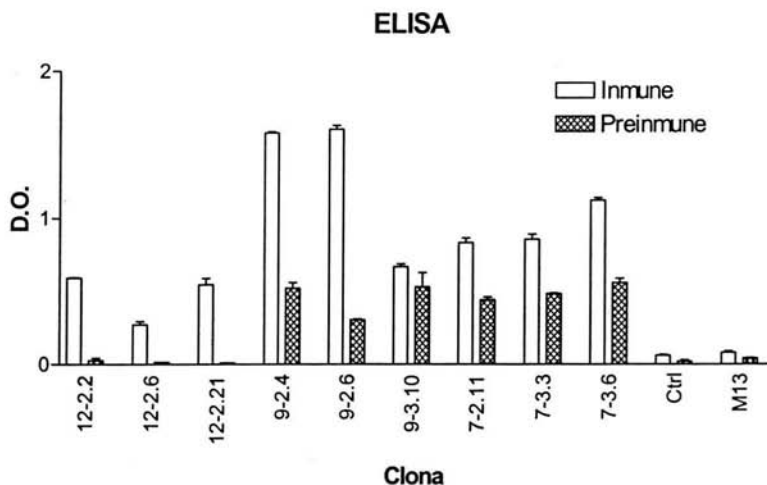


Figura 15. Clonas seleccionadas reactivas con al suero anti Ag85.
 La nomenclatura que se utiliza es: [biblioteca -- ronda . numero de clona],
 se utilizó como control una clona negativa (Ctrl) y M13 (sin egresar algún inserto).

Posteriormente se determinó (por secuenciación de ADN) el inserto que expresa cada una de las clonas. En la Tabla 4 se muestran las secuencias expresadas por las 9 clonas. Se analizó la similitud de los insertos de las clonas seleccionadas entre si mismos y también con respecto a las secuencias del complejo de proteínas del Ag85. Para ello se utilizaron los programas de computadora ALIGN y LALING del servidor de Genestream Bioinformatics Resource (<http://xylian.igh.cnrs.fr/>), y el programa BioEdit. (Hall, 1999).

Tabla 4. Secuencias de péptidos expresados en las clonas reactivas.

Biblioteca Aminoácidos	Nombre	Secuencia
12	12-2.2	GVGNFQIAATS
	12-2.6	NNQTPATSPRMS
	12-2.21	STAQNTQLAATS
C7C (9)	B92.4	DFKFRNV
	B9-2.6	DFKFRNV
	B9-3.10	TRTDYWQ
7	7-2.11	FQLAATN
	7-3.3	HDTTSFA
	7-3.6	YPELRLA

Se pudieron agrupar 4 secuencias (Tabla 5) que comparten el motivo

[N/X] - -Q [L/X] [A/P] A T [S/N]

Tabla 5. Alineación de las clonas agrupadas de acuerdo con su similitud.

Clona 12A	- GVGNFQIAATS - - - -
Clona 12B	- - - - NN - QTPATSPRMS
Clona 12C	STAQNT - QLAATS - - - -
Clona 7A	- - - - - F - QLAATN - - - -

Todas las secuencias fueron alineadas con las tres proteínas del Complejo del Ag85. Algunas clonas muestran una clara similitud con fragmentos del Ag85, mientras que algunas otras tienen poca similitud. En la Tabla 6 se muestra la región de la proteína del complejo con la que tiene mayor similitud cada clona, y se indica si en la bibliografía se encuentra reportada alguna propiedad biológica para esa región. Se encontró que algunas de las regiones mimetizadas estaban reportadas como epítomos de células T o forman parte de regiones de unión a fibronectina.

Tabla 6. Similitud de las clonas reactivas con motivos del Ag85 y efectos biológicos en los que participan indicando el autor quien los reportó ("x" indica que son aminoácidos idénticos y "o" que son intercambiables).

Residuo Ag85A Clona 12-2.2	<pre> 160 170 18 T L I G L A M G D A G G Y K A S D M W G P - - - G - - V E N F G O I A Z T S - - - X X O X O X O </pre>	Epítipo T Roche 1994; D'Souza 2003 Región de unión a fibronectina Peake 1993
Residuo Ag85C Clona 12-2.6	<pre> 280 290 H V L N G A I E P A A L A A P A - - - N N Q T E A T S P R M S - - - X O X X O O X </pre>	No reportada
Residuo Ag85B Clona 12-2.21	<pre> 190 200 N D P I Q Q I P K V A N N T R L - - - S T A G N T Q A A T S - - - X X O X X X </pre>	Epítipo T Roche 1994
Residuo Ag85A Ag85B Clona B9-2.4 B9-2.6	<pre> 230 240 F L E G F V R T S N I Q D A Y N A G F L E N F V R S S N L Q D A Y N A A - - - D F I R N V - - - O X X O </pre>	Epítipo T Roche 1994 Epítipo T Takatsu 2003
Residuo Ag85A Clona B9-3.10	<pre> 260 270 P D S G H S W E V W G A Q L N A - - - H R T - D G Q - - - X O O X X </pre>	Epítipo T Roche 1994; D'Souza 2003
Residuo Ag85C Clona 7-2.11	<pre> 30 40 K V Q E C G G G P H A V Y L L D G R Q D D Y N - - - E C - - - A A T N - - - X X X X O </pre>	Epítipo T D'Souza 2003
Residuo Ag85B Clona 7-3.3	<pre> 250 A G G N A V F N S P P N - - - D T T - S A - - - X O X O </pre>	Epítipo T D'Souza 2003 Región de unión a fibronectina Peake 1993
Residuo Ag85B Clona 7-3.6	<pre> 160 170 G W W T I G A M N D S G - - - Y E R - - - X X X X </pre>	No reportada

Una vez que se alinearon las secuencias y se buscaron reportes en la bibliografía se procedió a determinar por métodos computacionales (Guex *et al.*, 1997) en el antígeno nativo, la posición de la región que se estaba mimetizando. Se determinó que las regiones del antígeno nativo que fueron reconocidas están expuestas en la superficie de la proteína (Fig. 16, Fig. 17 y Fig. 18).



Figura 16. Localización (amarillo) de los sitios mimetizados en el Ag85A (Ronning *et al.*, 2004).



Figura 17. Localización (amarillo) de los sitios mimetizados en el Ag85B
(Anderson *et al.*, 2001).



Figura 18. Localización (amarillo) de los sitios mimetizados en el Ag85C
(Ronning *et al.*, 2004).

DISCUSIÓN

Por la utilidad potencial del Ag85 en el diagnóstico de la tuberculosis, así como por su papel en la inducción de una respuesta protectora tipo Th1, alternativas como la de ADN recombinante, o la síntesis de péptidos, han sido abordadas. Sin embargo, no se han obtenido resultados favorables.

En este trabajo se presenta la identificación de secuencias que mimetizan regiones del Ag85, las cuales pueden ser útiles para diagnóstico y también para constituir una nueva vacuna. Este trabajo es el primero en su clase ya que anteriormente no se habían descrito mimótopos de antígenos proteicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Utilizando la técnica de Phage Display es posible identificar mimótopos de estructuras lineales y conformacionales. Esta técnica también tiene la ventaja de que una vez identificadas las clonas de fagos que expresan en su inserto un motivo que mimetiza al Ag85, dichas clonas se pueden amplificar en pocas horas por infección de *E. coli*, facilitando su disponibilidad en grandes cantidades.

Algunas de las clonas seleccionadas tienen un alto grado de similitud con secuencias lineales del Ag85. Sin embargo, no es posible determinar si los péptidos identificados podrían mimetizar motivos conformacionales de la proteína nativa.

Después del análisis de las secuencias que probablemente se encuentran mimetizadas, pudimos observar que algunas de ellas estaban alineadas en regiones ya reportada como epítomos T, por lo que resulta muy interesante investigar acerca de las propiedades inmunogénicas y protectoras de estos mimótopos.

Takatsu en el 2003, reportó un péptido el cual ha demostrado que favorece la polarización de la respuesta inmune protectora (Th1) contra la tuberculosis (Takatsu *et al.*, 2003). La alineación de las secuencias de las clonas B9-2.4 y B9-2.6 (estas clonas expresan la misma secuencia), coincide con la región reportada por Takatsu, por lo que resulta muy importante el análisis de esta clona, ya que podría estar mimetizando un epítomo T que favorece una respuesta inmune protectora.

CONCLUSIONES

Se identificaron 8 secuencias de mimótopos del Ag85, una de las cuales fue aislada en dos ocasiones.

Todas estas secuencias pueden ser consideradas como mimótopos antigénicos del Ag85 ya que son reconocidas por anticuerpos anti Ag85.

Algunas de las regiones en donde se alinearon las secuencias del inserto ya habían sido reportadas como epítomos T (6 clonas), dos de éstas clonas también están asociadas a regiones involucradas en el reconocimiento por el receptor de fibronectina.

La secuencia encontrada en dos clonas (clona B9-2.4 y B9-2.6), esta alineada en una región del Ag85B la cual corresponde a un péptido que participa en la polarización de la respuesta protectora contra tuberculosis.

PERSPECTIVAS

Evaluar el potencial de los mimótopos seleccionados del Ag85, como:

- Posibles reactivos de diagnóstico.
- Posibles inductores de respuesta celular tipo Th1.
- Posible uso en estudios de fagocitosis de la bacteria por el macrófago mediante el receptor de fibronectina.

BIBLIOGRAFÍA

- American Thoracic Society & Centers for Disease Control and Prevention. 2000. "Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children." Review. *Am J Respir Crit Care Med.* 161 (4Pt1):1376-95.
- Anderson DH, Harth G, Horwitz MA, Eisenberg D. 2001. "An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolyl transferase." *J Mol Biol.* 23;307(2):671-81.
- Barnes PF. 1994. T-cell response and cytokines. ASM Press U.S.A. 417-435 p.
- Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. 2000. "Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages." *Traffic*, 1(3):235-47.
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS, 1997. "Role of the Major Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Cell Wall Biogenesis." *Science*, 276:1420-1422.
- Bloom BR. 1994. "Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control." American Society for Microbiology. Washington DC 637 p.
- Bothamley GH, Beck JS, Schreuder GM D'Amaro J, de Vires RR, Kardjito T, Ivanyi J. 1989. "Association of tuberculosis and *M. tuberculosis* specific antibody levels with HLA." *J Infect Dis.* 159:549-555.
- Bradford MM. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Annual Biochemistry.*, 7; 72:248-54.

- Brennan PJ, Draper P. 1994. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis* In: Bloom BR. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, U.S.A. 271-284 p.
- Brewer, TF, 2000. "Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature". Clin Infect Dis. 31:S64-67.
- Burman WJ, Stone BL, Reves RR, Wilson ML, Yang Z, El-Hajj H, Bates JH, Cave MD. 1997. "The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*." AM j Respir Crit Care Med. 155:321-326
- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. "Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection." MMWR Recomm Rep. 9;49(RR-6):1-51.
- Chan J, Kaufmann S. 1994. Immune mechanisms of protection. ASM Press U.S.A. 389-415 p.
- Chan ED, Heifets L, Iseman MD. 2000. "Immunologic diagnosis of tuberculosis." Tuber Lung Dis. 80:131-140.
- Collins FM. 1998. "Mycobacterial pathogenesis: a historical perspective." Front Biosci. 23;3:e123-32.
- Copeland RA. 1994. "Methods for Protein Analysis". Chapman & Hall New York EUA. 228 p.
- Crowther JR. 2001. "The ELISA Guidebook". Humana Press. EUA. 421pp.
- Crubezy E, Ludes B, Poveda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D. 1998. "Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old." C R Acad Sci III. 321(11):941-51.

- Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. 1990. "Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands." *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382.
- Daffé M. 2000. "The mycobacterial antigens 85 complex – from structure to function and beyond". *Trends Microbiol.* 8(10):438-40.
- Daniel TM, Debanne SM. 1987. "The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay." *Am Rev Respir Dis* 135:1137-1151.
- Draper P. 1998. "The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers." *Front Biosci.* 3:D1253-61.
- Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, Weldingh K, Brock I, Andersen P, Doherty TM. 2004. "Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2." *J Immunol.* 1;172(11):6938-43.
- Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Lewinsohn DM, Coler R, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YA, Orme IM, Roberts A, Steen S, Dalemans W, Badaro R, Reed SG. 1999. "Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel *Mycobacterium tuberculosis* mtb39 gene family". *Infect Immun.* 67(6):2941-50.
- Dixon M, 1953. "A nomogram for ammonium sulphate solutions." *Infect Immun.* 67(6):2941-50.
- D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, Castiglione N, Vanonckelen A, Palfliet K, Huygen K. 2003. "Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A,

- Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun.* 71(1):483-93.
- Ernst JD. 1998. "Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun.* 66(4):1864-1867.
 - Flynn JL, Cah J. 2001. "Immunology of Tuberculosis." *Ann. Rev. Immunol.* 19:93-129.
 - Foll M. 2002. "Reduction of excessive reactions after tuberculin skin test (mendel-mantoux method)." *Gesundheitswesen.* 64(10):544-7.
 - Garcíá-Sancho FM. 2001. "Respuesta immune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura." *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 14(2):114-128.
 - Glickman MS, Jacobs WR Jr. 2001. "Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline." *Cell.* 23;104(4):477-85.
 - Gobec S, Plantan I, Mravljak J, Wilson RA, Besra GS, Kikelj D. 2004. "Phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall." *Bioorg Med Chem Lett.* 5;14(13): 3559-62.
 - Goodfellow M, Magee JG. 1998. "Taxonomy of Mycobacterik. In: *Mycobacteri I. Basic Aspects.*" Gangadharam & Jenkins. Chapman & Hall. Medical Microbiology Series U.S.A. p1-71.
 - Guex N, Peitsch MC. 1997. "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

- Hall TA. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hoshino Y, Tse DB, Rochford G, Prabhakar S, Hoshino S, Chitkara N, Kuwabara K, Ching E, Raju B, Gold JA, Borkowsky W, Rom WN, Pine R, Weiden M. 2004. "*Mycobacterium tuberculosis* induced CXCR4 and chemokine expression leads to preferential X4 HIV-1 replication in human macrophages." J Immunol. 5;172(10):6251-8.
- Ismail N, Olano JP, Feng HM, Walker DH. 2002. "Current status of immune mechanisms of killing intracellular microorganisms." FEMS Microbiol Lett. 207:11-120.
- Kaufmann SH. 2001. "How can immunology contribute to the control of tuberculosis?" Nat Rev Immunol. 1(1):20-30.
- Kay BK, Winter J, McCafferty J. 1996. "Phage Display of Peptides and Proteins A Laboratory Manual." Academic Press USA.
- Kitaura H, Ohara N, Naito M, Kobayashi K, Yamada T. 2000, "Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*." APMIS 108(9):558-64.
- Koul A, Hergert T, Klebl B, Ullrich A. 2004. "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways." Nat Rev Microbiol. 2(3):189-202.
- Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL. 2001. "The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection." Curr Opin Immunol. 13:104-108.

- Landowski CP, Godfrey HP, Bentley-Hibbert SI, Liu X, Huang Z, Sepulveda R, Huygen K, Gennaro ML, Moy FH, Lesley SA, Haak-Frendscho M. 2001. "Combinatorial use of antibodies to secreted mycobacterial proteins in a host immune system-independent test for tuberculosis." *J Clin Microbiol.* 39(7): 2418-2424.
- Lety MA, Nair S, Berche P, Escuyer V. 1997. "A single point mutation in the embB gene is responsible for resistance to ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*." *Antimicrob Agents Chemother.* 41(12):2629-33.
- Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI. 2004. "Effect of rpoB mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob Agents Chemother.* 48(4):1289-94.
- Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Acero G, Gonzalez E, De Aluja A, Villalobos N, Gomez-Conde E, Sciutto E. 2004. "Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis." *Vet Immunol Immunopathl* 99(1-2):11-24.
- Marques-Gomes MJ. 2004. "Tuberculosis. Future perspectives *Rev Port Pneumol.*" 10(2):135-44.
- Martini F H, E F Bartholomew. 1997. *Essentials of anatomy and physiology.* 1ra Ed. 568pp.
- Markowitz N, Hansen NI, Wilcosky TC, Hopewell PC, Glassroth J, Kvale PA, 1993. "Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons." *Ann Intern Med* 119(3): 185-93.
- McEvoy GK, 1994. "Drug information 94." Bethesda MD:American Society of Hospital Pharmacists. 1631-6.

- Menzies D. 1999. "Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion." *Am J Respir Crit Care Med.* 159(1):15-21.
- Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F, Cortese R, Galfre G. 1995. "Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage." *J Immunol.* 1;154(7):3162-72.
- Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim YH, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y. 2004. "Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51." *Infect Immun.* 72(4):2014-21.
- Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC. 2003. "ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates." *Antimicrob Agents Chemother.* 47(12):3799-805.
- Mustafa AS. 2001. "Biotechnology in the development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis." *Curr Pharm Biotechnol.* 2(2):157-73.
- Mustafa AS. 2002. "Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis." *Mol Immunol.* 39:113-119.
- Neyra J. "Sala Santa Rosa del Hospital Dos de Mayo. Cincuenta años de Tisiología en el Perú." *Revista Peruana de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias*, 1957; 17 (45): 348-352.

- Noordhoek GT, Van Embden JDA, Kolk AHJ. 1993. "Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*." N Engl J Med. 329:2036.
- Orme I. 1995. Immunity to Mycobacteria. Springer-Verlag R.G. Landes Company, U.S.A. 3-70 p.
- Pacheco JD. 2000. "Algunas consideraciones sobre la tuberculosis en el SIDA: aspectos más relevantes." Rev Fac Med UNAM. 43(2):49-51.
- Parrish NM. 1998 "Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*." Trends Microbiol. 6(3):107-112.
- Peake P, Gooley A, Britton WJ. 1993. "Mechanism of interaction of the 85B secreted protein of *Mycobacterium bovis* with fibronectin." Infect Immun. 61(11):4828-34.
- Ponce de León LA, AM Nelson. 1996. "Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A survey in a central region of Mexico". Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. New Orleans, EUA. 128pp.
- Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B. 2004. "Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria." Microbes Infect. 6(10):946-59.
- Reynolds J. 1993. The extra pharmacopeia. 30° Ed. The Pharmaceutical Press. 779-80.
- Roche PW, Peake PW, Billman-Jacobe H, Doran T, Britton WJ. 1994 "T-cell determinants and antibody binding sites on the major mycobacterial

secretory protein MPB59 of *Mycobacterium bovis*." Infect Immun. 62(12):5319-26.

- Ronning DR, Vissa V, Besra GS, Belisle JT, Sacchettini JC. 2004. "*Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity." J Biol Chem. 279:36771-36777.
- Sada E, Ferguson LE, Daniel TM. 1990 "An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000 Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*." J Infect Dis. 162 (4):928-931.
- Samanich KM, Keen MA, Vissa VD, Harder JD, Spencer JS, Belisle JT, Zolla-Pazner S, Laal S. 2000. "Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*". Clin Diagn Lab Immunol. 7(4):662-668.
- Santamaría H, Manoutcharian K, Rocha L, Gonzalez E, Acero G, Govezensky T, Uribe LI, Olguin A, Paniagua J, Gevorkian G. 2001. "Identification of peptide sequence specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries." Clin Immunol. 101(3):296-302.
- Santamaria H. 2003. "Phage display applications in clinical diagnosis." Rev Invest Clin. 55(6):711-8.
- Schlossberg D. 1999. Tuberculosis and nontuberculous Mycobacterial infections. 4ta Ed. 422pp.
- Scott JK, Smith GP. 1990. "Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library." Science. 249:386-390.

- Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud 2001. Datos proporcionados por la Dra. Elizabeth Ferreira Guerrero, Directora de Prevención de Micobacteriosis, SSA.
- Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, Pradl L, Jorg S, Krenn V, Morawietz L, Kaufmann SH, Aichele P. 2003. "Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection." *J Infect Dis.* 1;188(9):1326-31.
- Sugita M, Cernadas M, Brenner MB. 2004 "New insights into pathways for CD1- mediated antigen presentation." *Curr Opin Immunol.* 16(1):90-5. Review.
- Small PM. 1999. "Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS. Directly observed therapy." *Int J Tuberc Lung Dis.* 3(11):949-55.
- Smith GP. Related 1985. "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science.* 14;228(4705):1315-7.
- Smothers JF, Henikoff S, Carter P. 2002. "Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries." *Science.* 18;298(5593):621-2.
- Takatsu K, Kariyone A. 2003. "The immunogenic peptide for Th1 development." *Int Immunopharmacol* 3(6):783-800.
- Torrelles JB, Khoo KH, Sieling PA, Modlin RL, Zhang N, Marques AM, Treumann A, Rithner CD, Brennan PJ, Chatterjee D. 2004. "Truncated structural variants of lipoarabinomannan in *Mycobacterium leprae* and an ethambutol-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*." *J Biol Chem.* 24;279(39):41227-39.

- Torres C, Mujica OJ. 2004. "Health, equity, and the Millennium Development Goals." *Rev Panam Salud Pública.* 15(6):430-9.
- Tiruvilumala P, Reichman LB. 2002. "Tuberculosis." *Ann Rev Public Health.* 23:406-426.
- Vanham G, Tosí Z, Hirsch CS, Wallis RS, Schwander SK, Rich EA, Ellner JJ. 1997. "Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy." *Tuberc Lung Dis.* 78(3):145-158.
- Wade MM, Zhang Y. 2004. "Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*." *J Med Microbiol.* 53(8):769-73.
- Warren JR, Bhattacharya M, De Almeida KN, Trakas K, Peterson LR. 2000. "A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*." *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1559-1562.
- World Health Organization. 1997. *Tuberculosis Diagnostics Workshop: Product Development Guidelines.*
- World Health Organization. 2000. *Fact Sheet Number 104: Tuberculosis.*
- World Health Organization. 2004. *Global Tuberculosis Control Report.*
- Young DB, Robertson BD. 1998. "Approaches to combat tuberculosis." *Curr Opin Biotechnol.* 9(6):650-2.
- Young D, Hussell T, Dougan G. 2002. "Chronic bacterial infections: living with unwanted guest." *Nature Immunol.* 3(11):1026-1032.
- Zink AR, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. 2002. "Molecular analysis of ancient microbial infections.", *Microbiol Letters*, 6;213(2):141-7.
- Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG, 2003. "Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt.", *Epidemiology Infections.* 130(2):239-49.

APÉNDICES

Apéndice A

Medio de cultivo Sauton enriquecido

Citrato de fierro y amonio	0.05g
Sulfato de magnesio	0.50g
Fosfato monopotásico	0.50g
Ácido cítrico	2.00g
Asparagina	4.00g
Glicerol	60g ($\delta=1.2584$) = 47.7ml
H ₂ O cbp	1000ml

Ajustar con NH₄OH a pH 7.3. Esterilizar 30 minutos a 120°C y enriquecer en esterilidad (Ácido Pirúvico 0.5%, Glucosa 0.5% peso/volumen).

LB (Luria Bertani) 1L

Bacto Tryptone	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g

Esterilizado, almacenar a temperatura ambiente.

Top Agar 1L

Bacto Tryptone	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1g
Agarosa	7g

Esterilizado, almacenar a temperatura ambiente.

Medio 2xYT 1L

Bacto Tryptone	16g
Extracto de levadura	10g
NaCl	5g

Esterilizado, almacenar a temperatura ambiente.

Apéndice B

Gel separador 17x15cm, 3mm

Acilamida 30%	40ml
Tris Base 1.5M pH 8.8	30ml
APS 10%	800 μ l
H ₂ O	46.6ml
Temed	80 μ l

Gel concentrador 17x15cm, 3mm

Acilamida 30%	4ml
Tris Base 0.5M pH 6.8	10ml
APS 10%	200 μ l
H ₂ O	26ml
Temed	20 μ l

Gel Separador SDS-PAGE Mini

Porcentaje	10%	12.5%	Unidad
Acrilamida 30%	5	5	ml
Tris Base 1.5M pH 8.8	5	5	ml
APS 10%	100	100	μl
H ₂ O	8	6.2	μl
Temed	10	10	μl

Gel Concentrador SDS-PAGE Mini

Porcentaje	4%	Unidades
Acrilamida 30%	1.3	MI
Tris Base 0.5M pH 6.8	2.5	MI
APS 10%	100	μl
H ₂ O	6	MI
Temed	10	μl

Buffer de Corrida 10X

Glicina	144g
Tris base	30g
SDS	10g

Aforar a 10 litros

Buffer de aplicación 1X

Tris 0.5M pH 6.8	0.5ml
SDS 10%	100μl
Glicerol	1ml
EDTA	7.4mg

Pironina o azul de bromofenol una pizca Aforar a 10ml

Buffer de transferencia

Tris base	3.03g
Glicina	14.48g
Metanol	200ml

Aforar a 1 litro

Solución de revelador para inmunoblot

PBS	10ml
H ₂ O ₂	10μl
Tween 20	0.3%

Diaminobenzidina un granito

Buffer salino de fosfatos PBS 10X

NaCl	80g	1.37M
KCl	2g	0.027M
Na ₂ HPO ₄	14.4g	1M
KH ₂ PO ₄	2.4g	0.01M

Ajustar pH a 7.4 con HCl y aforar a 1 litro.

Solución de revelado para tinción con plata

Na ₂ CO ₃	6gr
HCHO 37%	50μl
Solución Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 0.2%	2ml

Aforar a 100ml

Solución amortiguadora de carbonatos 0.05M, pH 9.6

Solución Na ₂ CO ₃ 0.05M	31.8mg
Aforar a 200ml	
Solución NaHCO ₃ 0.05M	21mg

Aforar a 500ml

Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH de 9.6

Solución amortiguadora de Dietanolamina (Dietanolamina 10% (v/v), pH 9.8).

Dietanolamina	100ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	102mg
NaN ₃	0.40g

Ajustar pH a 9.8 con HCl.

Aforar a 1 litro (conservar al abrigo de la luz).

Apéndice C

PEG/NaCl (8000)

NaCl	2.5M
Polietilenglicol (PEG 8000)	20% (p/v)

Esterilizado, almacenar a temperatura ambiente.

TBS

Tris-HCl (pH 7.5)	50mM
NaCl	150mM

Esterilizado, almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de Yodo

Tris-HCl (pH 8.0)	10mM
EDTA	1mM
NaI	4M

Trietilamina 100mM

Trietilamina (TEA)	13.85 μ l
H ₂ O	1ml

X-Gal/IPTG

X-Gal	1g
IPTG	1.25g
Dimetil formamida	25ml

Mantener a -20°C

TBE 1L

Tris-HCL	54g
Ácido bórico	27.5g
EDTA	20ml

Gel de agarosa 1%

TBE	100ml
Agarosa	1g
Bromuro de etidio	0.5 μ l

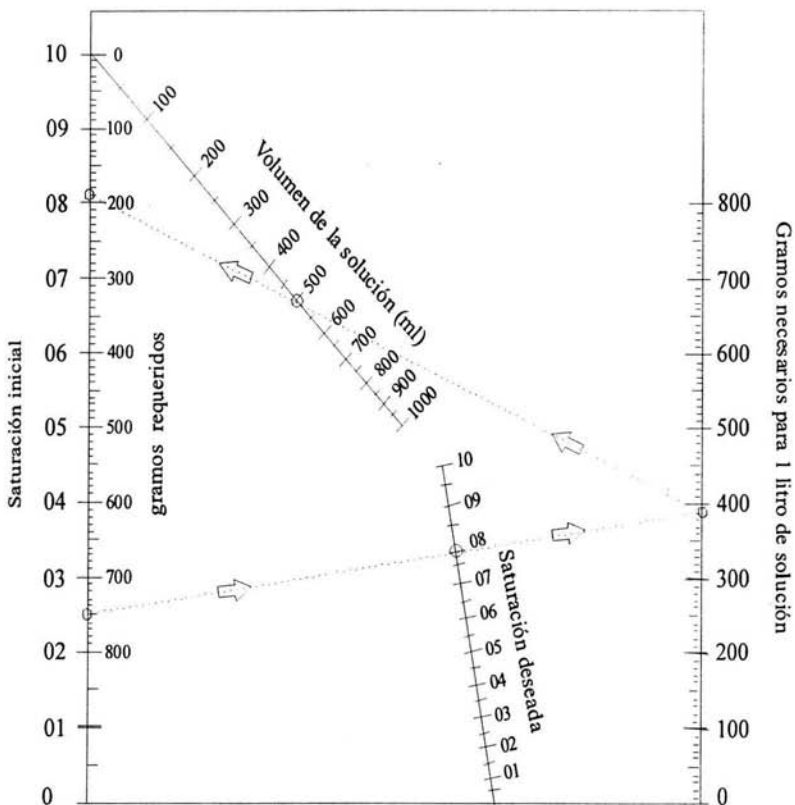


Diagrama 1. Diagrama de saturación con sulfato de amonio a temperatura ambiente, para precipitar proteínas (Dixon, 1953).