



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MIMÓTOPOS PEPTÍDICOS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y SU USO
EN INMUNODIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

LETICIA KURI CERVANTES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN



2006



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Kuri
Cervantes
Leticia
56 81 71 01
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
403053461

2. Datos del tutor

López
Marín
Luz María

3. Datos del sinodal 1

Ortega
Soto
Enrique

4. Datos del sinodal 2

Manucharyan
Airapetian
Karen

5. Datos del sinodal 3

Córdova
Alarcón
Emilio Joaquín

6. Datos del sinodal 4

Ramos
Morales
Patricia

7. Datos del trabajo escrito

Mimótopos peptídicos de *Mycobacterium tuberculosis* y su uso en
inmunodiagnóstico
110 p
2006

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Luz María López Marín del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Agradezco a todos los miembros del H. Jurado por sus valiosos comentarios y críticas a la presente tesis.

Dra. Luz María López Marín

Dr. Enrique Ortega Soto

Dr. Karen Manucharyan

Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

Dra. Patricia Ramos Morales

A la Dra. Luz por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y participar con ella en este proyecto.

A la Biol. Erika Segura Salinas y al Biol. Gonzalo Acero Galindo por su apoyo y amistad. Este trabajo no se hubiera podido concluir sin su valiosa ayuda.

A la Dra. Clara I. Espitia Pinzón, quien generosamente donó anticuerpos y la proteína utilizados en este estudio.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la U.N.A.M. en el Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto #IN218506).

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Tuberculosis

I.1.1. Generalidades

I.1.2. Patogenia de la enfermedad

I.1.3. Respuesta inmune contra la tuberculosis

I.1.4. Epidemiología

I.2. Métodos de diagnóstico

I.2.1. Características de los métodos de diagnóstico

I.2.2. Diagnóstico de tuberculosis

I.2.3. Diagnóstico serológico

I.3. Tratamiento de la tuberculosis

I.4. Vacunación

I.5. Proteína de 38 kDa (P38)

I.6. Mimótopos

I.7. Despliegue en fagos

II. JUSTIFICACIÓN

III. HIPÓTESIS

IV. OBJETIVOS GENERALES

V. OBJETIVOS PARTICULARES

VI. MATERIAL Y METODOLOGÍA

VI.1. Esquema metodológico

- VI.2. Proteína de 38 kDa y suero anti-P38
- VI.3. Muestras biológicas
- VI.4. Verificación de la reactividad del suero hiperinmune de conejo anti-P38 con la proteína de 38 kDa mediante la técnica de ELISA
- VI.5. Titulación del suero hiperinmune de conejo anti-P38 mediante la técnica de ELISA
- VI.6. Bioselección
- VI.7. Propagación de fagos
- VI.8. Titulación de fagos
- VI.9. Determinación de la reactividad de sueros de conejo con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA
- VI.10. Determinación de la reactividad de sueros humanos con P38 mediante la técnica de ELISA
- VI.11. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA
- VI.12. Purificación de ADN de cadena sencilla
- VI.13. Secuenciación de ADN de cadena sencilla
- VI.14. Análisis de similitud de secuencias

VII. RESULTADOS

- VII.1. Verificación de la reactividad del suero hiperinmune de conejo anti-P38 con la proteína de 38 kDa mediante la técnica de ELISA
- VII.2. Titulación del suero hiperinmune de conejo anti-P38 mediante la técnica de ELISA
- VII.3. Bioselección, propagación y titulación de fagos
- VII.4. Determinación del mimetismo antigénico de péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA
- VII.5. Determinación de la reactividad de sueros humanos con P38 mediante la técnica de ELISA
- VII.6. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

VI.7. Purificación de ADN de cadena sencilla

VI.8. Secuenciación de ADN de cadena sencilla

VI.9. Análisis de similitud de secuencias

VIII. DISCUSIÓN

IX. CONCLUSIONES

X. PERSPECTIVAS

XI. APÉNDICES

Apéndice I. Evaluación de mimótopos del Ag85 de *Mycobacterium tuberculosis* como reactivos de diagnóstico serológico para la tuberculosis

Apéndice II. Obtención de proteína de 38 kDa y suero anti-p38

Apéndice III. Secuencia nucleotídica de las clonas seleccionadas

Apéndice IV. Reactivos utilizados

XII. REFERENCIAS

XIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

GLOSARIO

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica que afecta principalmente a los pulmones, causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente, es una de las enfermedades de mayor impacto en el mundo. El diagnóstico depende principalmente de análisis radiográfico y examen clínico, confirmado por baciloscopía y cultivo bacteriano a partir de muestras de esputo. Estos métodos son poco eficaces debido al bajo índice de detección, así como a los altos riesgos y costos que éstos representan. Por ello, la disponibilidad de métodos rápidos, simples y eficaces es de primera necesidad.

La proteína de 38 kDa (P38) es un antígeno glicolipoproteico inmunodominante del bacilo tuberculoso, involucrado en el metabolismo y transporte de fosfatos. Ha sido propuesto como uno de los reactivos más prometedores para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

En este trabajo se identificaron 21 mimótopos de la proteína de 38 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* expresados en fagos y se evaluaron como potenciales reactivos para el inmunodiagnóstico serológico de la tuberculosis. A partir de una biblioteca de dodecapéptidos expresados en fagos se realizó una bioselección por afinidad a anticuerpos policlonales anti-proteína de 38 kDa (P38). Se eligieron al azar 21 clonas y se verificó el mimetismo antigénico de los péptidos seleccionados mediante reconocimiento del suero anti-P38.

Se secuenciaron las clonas seleccionadas y se compararon con la de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, encontrando similitudes de hasta el 75% en dos de ellas.

Mediante la realización de ensayos preliminares se evaluó la eficacia de los mimótopos peptídicos de la proteína de 38 kDa para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis, proponiéndolo como un método eficaz, seguro, rápido y económico.

MIMÓTOPOS PEPTÍDICOS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* Y SU USO EN INMUNODIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La tuberculosis

I.1.1. Generalidades

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, crónica, que afecta principalmente a los pulmones, aunque puede infectar a otros órganos, causada por *Mycobacterium tuberculosis* y ocasionalmente por *Mycobacterium bovis* (responsable de la TB en bovinos y humanos que hayan ingerido leche proveniente de animales enfermos). Existen registros de la presencia de la micobacteria en huesos datados en el año 5 400 a.C. (Salo *et al*, 1994; Crubézy *et al*, 1998), cuando la TB se manifestaba principalmente como una infección ósea, llamada enfermedad de Pott. El bacilo *M. tuberculosis* fue descubierto por Robert Koch en 1882. El término micobacteria se derivó de la formación de colonias parecidas a los micelios de algunos hongos cuando el bacilo se cultiva *in vitro*. El término tuberculosis se acuñó por la formación de estructuras tipo tubérculo en los pulmones durante el desarrollo de la enfermedad.

De acuerdo con el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, (novena edición, 2005) el bacilo de Koch ha sido clasificado dentro del género *Mycobacterium*, orden *Actinomycetales*, en la familia *Mycobacteriaceae*. Las micobacterias muestran características particulares que las diferencian de otras bacterias como un alto contenido de lípidos en la pared celular (hasta el 60%), resistencia a la desecación, crecimiento extremadamente lento en cultivo, son bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), altamente hidrofóbicas, resisten condiciones de álcalis, ácidos y oxidantes diluidos (Villalba *et al*, 1999).

M. tuberculosis es una bacteria aerobia, no esporulada, requiere aproximadamente de 15 a 20 horas para su multiplicación y puede sobrevivir con facilidad en el medio intracelular (Figura 1a). Mide de 0.2 a 0.8µm de ancho por 2 a

7µm de largo. Forma colonias rugosas, secas y de color crema (Figura 1b). Su temperatura óptima de crecimiento es 37°C y necesita medios de cultivo enriquecidos, como el Lowenstein-Jensen, que contiene glicerol (Villalba et al, 1999).

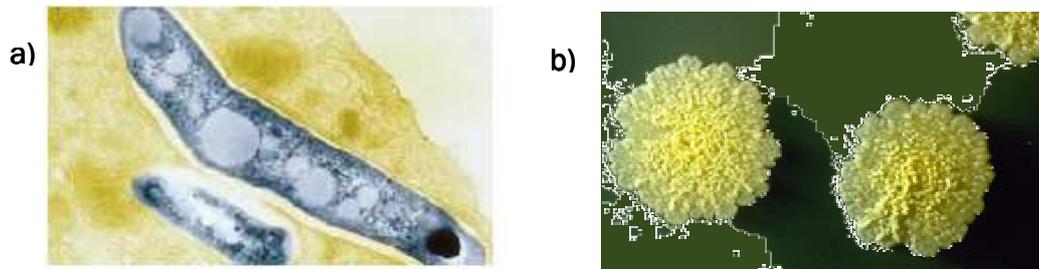


Figura I. *Mycobacterium tuberculosis*. a) Microfotografía. b) Colonia de *M. tuberculosis*, formando estructuras similares a los micelios de algunos hongos.

La cepa más frecuentemente utilizada de *M. tuberculosis*, denominada H37Rv, contiene un genoma formado por un cromosoma circular de 4.4 megabases (4 411 529 pares de bases) y aproximadamente 4 000 genes (Figura II). Las especies del género *Mycobacterium* presentan un alto contenido de G+C (61-71%) en su ADN. *M. tuberculosis* difiere de otras bacterias por su gran cantidad de genes que codifican para la producción de enzimas involucradas en la generación y catálisis de moléculas lipídicas (Cole *et al*, 1998; Camus *et al*, 2002).

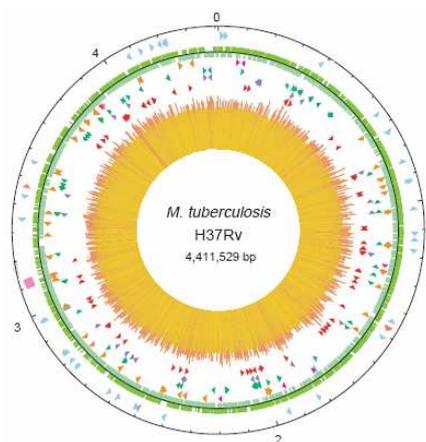


Figura II. Mapa circular del cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV.

I.1.2. Patogenia de la enfermedad

M. tuberculosis es capaz de desarrollar una infección en diferentes tejidos. De acuerdo con el tejido en el que se aloje el bacilo, la enfermedad puede clasificarse como pulmonar, pleural, linfática, ósea o articular, genitourinaria, diseminada o miliar, meníngea y peritoneal (American Thoracic Society, 2000).

El principal mecanismo de transmisión de la TB es vía aérea. Una persona infectada puede contagiar a otras al momento de toser, estornudar o hablar, ya que, al hacerlo, produce y libera aerosoles que contienen bacilos (Villalba *et al*, 1999; Raja, 2004). Típicamente, la TB se desarrolla después de una exposición repetida o prolongada a la tos de una persona con infección activa (Ringold, 2005). Cuando un individuo ha sido infectado con el bacilo, puede desarrollar inmediatamente la enfermedad o presentar una infección latente. Aproximadamente el 10% de las personas infectadas desarrollan TB activa (Kaufmann, 2001). Se dice que una persona tiene TB activa cuando desarrolla la infección y se produce una lesión de los órganos. En caso contrario, el individuo tiene TB latente, es decir, la persona es portadora de la bacteria pero no presenta signos de infección activa. El estado de latencia en el que el bacilo permanece dentro del tejido infectado refleja una disminución en el metabolismo bacteriano debida a la acción de la respuesta inmune celular que contiene, más no erradica la enfermedad (Bloom, 1994; Young y Robertson, 1998). De acuerdo con el Comité para la Revisión de los Estándares de Diagnóstico de la Sociedad Torácica Americana y el CDC (Centro de Control de Enfermedades) de Estados Unidos, un paciente con TB activa es aquel con historia clínica y exploraciones complementarias que conducen al diagnóstico, aunque el criterio definitivo lo constituye el aislamiento del bacilo de Koch (Flynn y Chan, 2001). Una persona con TB activa puede contagiar hasta quince personas en un año con el solo hecho de respirar o toser cerca de ellas (WHO Global Report, 2006).

Cuando los bacilos infectan los lóbulos pulmonares inferiores provocan inflamación y son fagocitados por los macrófagos alveolares. Dentro del macrófago, el bacilo se multiplica y destruye a la célula del hospedero. Algunos bacilos llegan a la

circulación linfática o sanguínea y se diseminan a otras regiones del organismo. Las lesiones pulmonares y la diseminación ocurren de tres a diez semanas después de la infección. En este tiempo se monta una respuesta inmune celular en contra de *M. tuberculosis*. La gran mayoría de los bacilos son destruidos durante este periodo. Sin embargo, algunos de ellos pueden quedar latentes dentro de los macrófagos, ganglios y nódulos linfáticos y desarrollar una TB activa cuando el cuerpo se encuentre en condiciones de inmunosupresión (Villalba *et al*, 1999).

Una vez que el bacilo se ha establecido en los pulmones, se reproduce muy lentamente sin impedimentos, debido a la ineficacia de los leucocitos polimorfonucleares para eliminarlos. Ya que se ha desarrollado una respuesta inmune mediada por linfocitos, los bacilos son rodeados por cuatro capas celulares: células epiteliales, células gigantes, linfocitos y fibroblastos, para impedir que continúen su infección. A esta respuesta del organismo se le conoce como primoinfección o lesión granulomatosa (Gennaro, 2000). Los granulomas y la formación de cavidades en los pulmones son el fenómeno clave en la patogénesis de la TB. Los granulomas son un importante mecanismo de contención de la enfermedad, mientras que las cavidades promueven la transmisión de *M. tuberculosis* y contribuyen a la persistencia del bacilo en el organismo (Yew y Leung, 2006).

Los principales síntomas que presenta un enfermo de TB son: fiebre y sudoración (particularmente por la noche), tos persistente que puede asociarse con esputo sanguinolento, pérdida de peso, malestar general, letargo, escalofríos, dolor auricular, glándulas inflamadas, disnea, inflamación abdominal y dolor retro esternal (Ringold, 2005). En el caso de la TB pulmonar, además de los ya mencionados hay otros síntomas característicos como desarrollo de granulomas o tumores granulares y hemoptisis (tos con sangre), lo cual es síntoma de destrucción pulmonar y un mecanismo de diseminación de las bacterias a nuevos hospederos (Glickman y Jacobs, 2001). La mayoría de estos síntomas y signos pueden presentarse en otro tipo de infecciones, generalmente respiratorias, por lo que el cuadro clínico presente en el paciente con TB no permite la rápida identificación de la enfermedad (Chiang *et al*, 1997).

I.1.3. Respuesta inmune contra la tuberculosis

Cuando el bacilo de Koch llega a los alvéolos pulmonares de un nuevo individuo, puede seguir tres rutas (Figura III). La primera, llamada “curación espontánea”, se refiere a los casos en los que la persona no desarrolla una infección (Kaufmann y McMichael, 2005). La segunda ruta es el alojamiento de la micobacteria en las células humanas y su posterior destrucción a causa de una respuesta inmune eficiente. La tercera es la infección del organismo. Solo el 10% de la gente infectada desarrollará TB activa por *M. tuberculosis* (Colston, 1997; Kaufmann y McMichael, 2005). El desarrollo de una infección activa generalmente ocurre en niños cuyo sistema inmune es incapaz de controlar la infección inicial o en reinfección de adultos (Young y Robertson, 1998). Los individuos que ya han desarrollado TB alguna vez tienen mayor riesgo de volver a enfermarse si son re infectados por el bacilo tuberculoso (Yew y Leung, 2006).

Una vez que *M. tuberculosis* infecta a un individuo, lo primero que ocurre es la formación de granulomas o etapa de primoinfección. El individuo es portador de *M. tuberculosis* pero no presenta los síntomas de la enfermedad, es decir, tiene TB latente (Chan y Kaufmann, 1994). Si el individuo se encuentra inmunosuprimido, el bacilo puede proliferar y la enfermedad se manifiesta.

Los macrófagos son el blanco principal del bacilo y, además, son el reservorio más importante de la infección por especies patógenas del género *Mycobacterium* (Russell, 2001). Los bacilos pueden interactuar con su célula hospedera, preferentemente un macrófago, por receptores tipo toll (TLR), o por receptores que promueven la fagocitosis como CD14, receptor de manosa, de complemento (CR1, CR3 y CR4), de la fracción cristalizable de anticuerpos IgG (FcγRs), “scavenger” o de rescate y de fibronectina. Durante la respuesta inmune, los macrófagos fagocitan a los bacilos y procesan los antígenos en un fagolisosoma para después presentarlos a los linfocitos T CD4⁺ en el contexto del MHC-II, o a un linfocito T CD8⁺ en el contexto del MHC-I (Colston, 1997). Después de haber sido fagocitado, *M. tuberculosis* es retenido

dentro de una vacuola fagocítica hasta que la célula hospedera muere por necrosis o por apoptosis (Russell, 2001). Sin embargo, el bacilo tuberculoso ha desarrollado varios métodos para evitar que el sistema inmune lo destruya. Las micobacterias patógenas tienen la capacidad de detener el proceso natural de maduración de fagosomas dentro de los macrófagos (Russell, 2001). Además, se conoce que los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* tienen una capacidad menor para inducir una respuesta inmune celular en comparación con los sanos (Russell, 2001).

La inmunidad protectora del cuerpo contra esta enfermedad se da principalmente por los linfocitos T ayudadores, con fenotipo CD4⁺. De acuerdo con la producción de citocinas por parte de los linfocitos T CD4⁺, se han diferenciado dos subpoblaciones de éstos: Th1 y Th2. La respuesta de células Th1 ejerce un efecto protector al secretar interferón gamma (IFN- γ), una citocina responsable del reclutamiento y activación de macrófagos, así como interleucina 2 (IL-2), que expande la respuesta inmune antimicobacteriana de IFN- γ . Las células Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-6 e IL-10, que son permisivas para la infección porque inducen una respuesta ineficiente que podría inhibir los efectos de la respuesta Th1. Así, estas citocinas evitan que la respuesta inmune sea tan fuerte que lesione al individuo (Demissie *et al*, 2004; Villalba *et al*, 1999). Además, los linfocitos T citotóxicos también tienen un papel efector en la eliminación de macrófagos infectados.

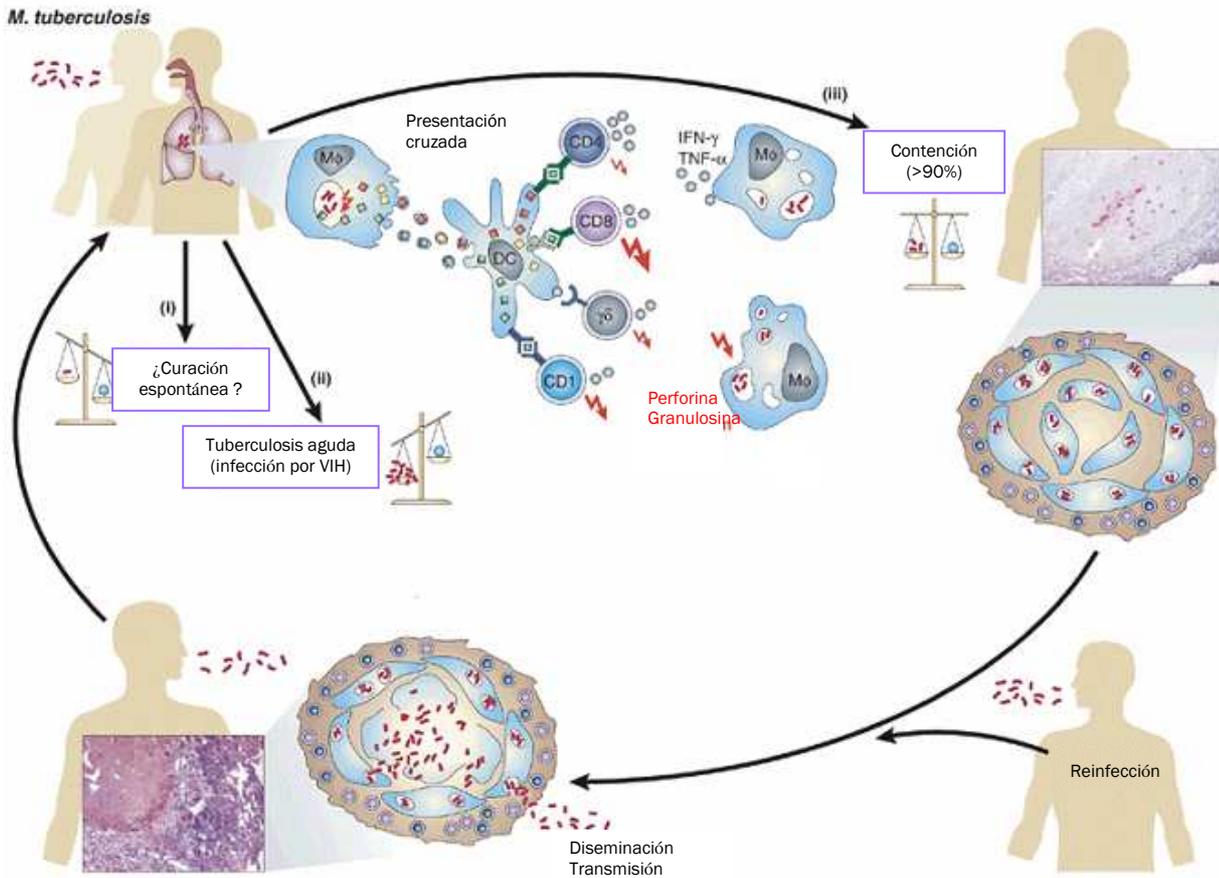


Figura III. Respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis entra al organismo al momento de inhalar gotas que acarrean al bacilo. Este puede seguir tres rutas. (i) El sistema inmune pulmonar erradica inmediatamente la micobacteria. Esta ruta es la menos frecuente. (ii) La infección genera tuberculosis. Esto ocurre frecuentemente en individuos inmunosuprimidos como los enfermos de SIDA. (iii) La infección no genera enfermedad activa debido a que *M. tuberculosis* es contenido dentro de granulomas. En un individuo enfermo, el bacilo es liberado debido a la ruptura de los granulomas llevando a la diseminación y transmisión de la micobacteria. Después de la inhalación, *M. tuberculosis* es fagocitado por los macrófagos alveolares (Mφ) y células dendríticas (DC). Estas células presentan los antígenos a diferentes poblaciones de células T. También ocurre presentación cruzada, permitiendo la transferencia de los antígenos micobacterianos de los macrófagos infectados a las células dendríticas. Las células T restringidas a CD1, células T CD4+, células T CD8+ y linfocitos T γδ participan en la protección. Los macrófagos son activados con IFN-γ y TNF-α. Las células T pueden eliminar micobacterias dentro de macrófagos mediante perforina y granulosina. (Kaufmann y McMichael, 2005).

I.1.4. Epidemiología

Actualmente, se reportan a nivel mundial nueve millones de nuevos casos de TB y dos millones de defunciones anuales a causa de la enfermedad (WHO Global Report, 2006). En la Figura IV se muestra la incidencia estimada de TB a nivel mundial. En marzo de 2006, el 80% de las defunciones debidas a TB se reportó en la zona del África Sub-Sahariana. Se calcula que una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* (WHO Global Report, 2006). Sin embargo, se estima que en tan solo el 10% de las personas infectadas se manifiesta la enfermedad (Colston, 1997). Mientras el sistema inmune del individuo permanezca en buen estado, la persona no desarrollará TB activa (Villalba *et al*, 1999).

En México, la TB se encuentra entre las 16 enfermedades de mayor impacto. De acuerdo con la OMS, en marzo de 2006, se reportaron 33 529 casos de TB en el país durante 2004 (WHO Global Report, 2006). Según los reportes del SUIVE¹, en el periodo de enero a diciembre de 2005 se reportaron 17 000 nuevos casos de TB (todas las formas) y 3 000 muertes a causa de la enfermedad. Aproximadamente el 82% del total de los casos reportados y el 62% de las muertes son por TB pulmonar. Las zonas más afectadas son las líneas fronterizas al noroeste y sur del país, así como poblaciones desfavorecidas social y económicamente (Figura V). El 60% de los casos de TB pulmonar se concentran en tan solo nueve estados: Veracruz, Baja California, Chiapas, Guerrero, Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, Oaxaca y Distrito Federal (SUAVE², SEED 2006, datos preliminares).

¹ SUIVE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, EPI-TB, DGE/SSA, 2006. Datos preliminares.

² SUAVE: Sistema Único Automatizado para la Vigilancia Epidemiológica, EPI-TB, DGE/SSA, 2006. Datos preliminares.

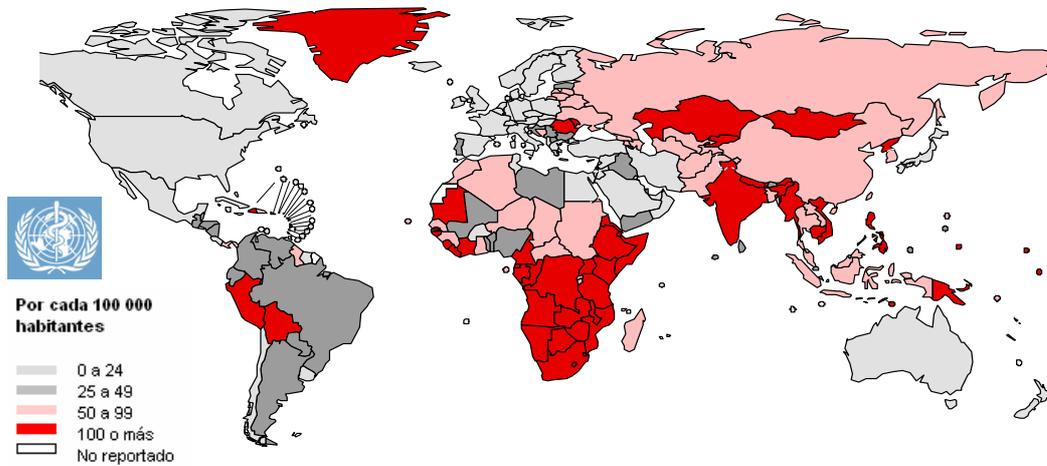


Figura IV. Incidencia estimada de tuberculosis (todas las formas, casos nuevos y recaídas) a nivel mundial en el 2004.
 Fuente: WHO Global Report, TB, 2006.

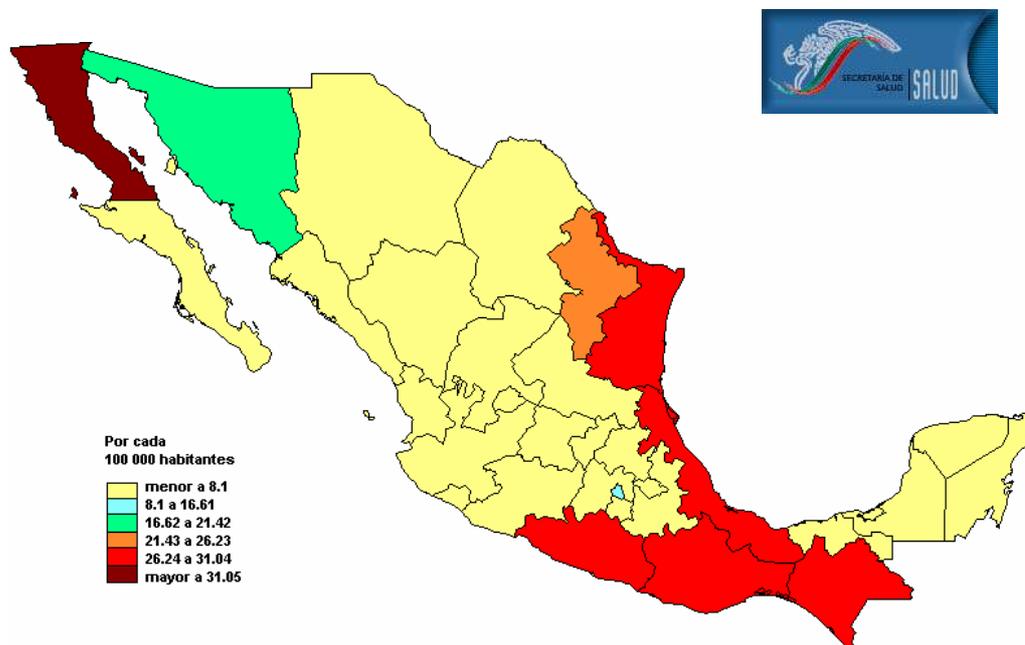


Figura V. Incidencia estimada de tuberculosis pulmonar en México, 2005.
 Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, EPI-TB, DGE/SSA, 2006.

A pesar del desarrollo de diversos tratamientos para el control y la erradicación de la infección, la ineficacia del diagnóstico oportuno de la TB, el desarrollo de la multi-resistencia a fármacos del bacilo, el surgimiento del SIDA como pandemia, así como la pobreza y desnutrición, son factores que no permiten cumplir este objetivo.

I.2. Métodos de diagnóstico

I.2.1 Características de los métodos de diagnóstico

Los parámetros definidos para determinar la efectividad de los métodos de diagnóstico son (Thomas y Debanne, 1987):

- Sensibilidad: número de enfermos que dan un resultado positivo al método/ total de enfermos a quienes se les aplicó el método X 100.
- Especificidad: número de individuos sanos que dan un resultado negativo al método/número total de sanos X 100.
- Exactitud de predicción positiva: número de enfermos/número de sujetos con resultados positivos.
- Exactitud de predicción negativa: número de sanos/número de sujetos con resultados negativos.
- Eficiencia en la predicción: número de sujetos correctamente clasificados/total de sujetos a quienes se les aplicó el método.
- Error en la predicción: número de sujetos erróneamente clasificados/total de sujetos a quienes se les aplicó el método.

I.2.2 Diagnóstico de tuberculosis

Se han desarrollado diversos métodos para el diagnóstico de la TB. En caso de infección activa se utiliza el método de la baciloscopía con tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo de micobacterias mediante el método clásico a partir de muestras de esputo. Otras pruebas son la detección por métodos radiométricos, radiografías, el diagnóstico mediante una reacción en cadena de la polimerasa o PCR y, recientemente, el inmunodiagnóstico (Villalba *et al*, 1999).

Las principales características de algunos de los métodos utilizados para el diagnóstico de TB activa son (adaptado de Valencia, 2004):

- *Radiografía de tórax*. Aunque es que es un método de detección rápido, su costo es elevado, es inespecífico, requiere tanto de infraestructura como de personal especializado (Bloom, 1994).
- *Baciloscopía*. Es un método rápido. Las principales desventajas son la baja sensibilidad (50%) ya que requiere de una concentración de 10^{5-6} bacilos/ml para la detección, no es útil en el diagnóstico de la TB extrapulmonar, debe ser reproducido durante los tres días consecutivos a la infección. Puede requerirse un lavado gástrico o bronco aspiración, se necesita de personal capacitado y representa un riesgo de contagio para quien trabaja en él debido a la exposición directa al patógeno. (Bloom, 1994; Warren *et al*, 2000; Pottumarthy *et al*, 2000; Samanich *et al*, 2000; Chan *et al*, 2000).
- *Cultivo*. Las ventajas que ofrece este método son: ser específico y brindar la posibilidad de ser combinado con pruebas de sensibilidad hacia fármacos diversos. Las desventajas son que el crecimiento es muy lento (4-12 semanas), no es útil para el diagnóstico de TB extrapulmonar, hay posibilidad de falsos positivos, requiere de personal capacitado y éste tiene exposición directa al patógeno, por lo que hay riesgo de contagio (Bloom, 1994; Bruman *et al*, 1997).
- *PCR*. Este es un método rápido y específico para bacilos del complejo *M. tuberculosis*. La PCR en tiempo real también ha sido utilizado para la detección específica del bacilo en especímenes clínicos. Esta estrategia permite confirmar diagnósticos y monitorear el progreso de la enfermedad. Sin embargo, el costo de este procedimiento es elevado, es poco sensible a partir de muestras clínicas, requiere de personal capacitado e infraestructura especial (Bloom, 1994; Noordhoek *et al*, 1993; Katoch, 2004).

- *Inmunodiagnóstico*. Este es un procedimiento rápido, no requiere infraestructura ni capacitación especializadas y da la posibilidad de diagnosticar TB extrapulmonares e infantil. Los métodos inmunológicos utilizan respuesta humoral específica o celular para inferir la presencia de la enfermedad en el paciente. Las desventajas de este método son: su sensibilidad puede variar debido a anergia, falta de disponibilidad de antígenos específicos, sensibles, y las diferencias en el reconocimiento de antígenos debido a factores genéticos en la población. La sensibilidad también puede ser baja en casos de TB latente y en poblaciones infectadas con VIH (Daniel y Debanne, 1987; Bothamley *et al*, 1989; Bloom, 1994; Chan *et al*, 2000; Pottumarthy *et al*, 2000).

En el caso del diagnóstico de la infección latente, la prueba más utilizada es la de Mantoux o PPD (derivado purificado de proteína³), también llamada prueba de la tuberculina, basada en una reacción de hipersensibilidad retardada⁴. En la práctica, la prueba de la tuberculina es la única manera de identificar la infección latente ya que, por definición, todo el material de cultivo debe ser negativo para calificar como infección latente (Chan *et al*, 2000). A pesar de su sensibilidad, la prueba del PPD tiene poca especificidad dada la presencia de antígenos de reacción cruzada con *Mycobacterium bovis* BCG y otras micobacterias (Samanich, 1998; Mustafa, 2002). Su uso es ineficaz debido a los falsos-positivos y falsos-negativos que se obtienen con esta prueba (Menzies *et al*, 1994). Los resultados falsos-negativos pueden deberse a la variación de la hipersensibilidad retardada. Este proceso suele ocurrir cuando transcurren largos periodos entre la infección y la prueba (comúnmente en adultos mayores), cuando hay tratamiento con fármacos inmunosupresores o presentan enfermedades que conllevan a inmunosupresión (Chan *et al*, 2000).

Recientemente se han propuesto nuevos métodos de diagnóstico para la TB latente. Uno de los más importantes es la cuantificación de IFN- γ en suero, llamado

³ PPD por sus siglas en inglés.

⁴ Hipersensibilidad retardada (HSR). Reacción inmunitaria en la que la activación de los macrófagos dependiente de los linfocitos T y la inflamación producen lesión de los tejidos (Abbas y Lichtman, 2004).

prueba QuantiFeron-TB Gold (QFT-Gold; Cellestis Ltd., Victoria, Australia). Esta ha demostrado resultados prometedores, con mayor sensibilidad en contraste con las pruebas tradicionales (Brock *et al*, 2004; Yew y Leung, 2006). Sin embargo, aún no se ha probado su aplicación en grandes poblaciones.

Por lo anterior, es esencial desarrollar métodos de diagnóstico simples, rápidos, económicos, que no requieran de personal especializado o de infraestructura avanzada para el control global de la TB.

I.2.3. Diagnóstico serológico

Uno de los enfoques más utilizados en las pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas es el serodiagnóstico, cuyo objetivo es la detección de anticuerpos (Rose, 1998). Sin embargo, se ha reportado que la sensibilidad y especificidad de esta metodología puede variar dependiendo del antígeno utilizado. Antígenos purificados pueden dar mayor especificidad, pero resultan menos sensibles (Villalba *et al*, 1999).

En el caso de la infección latente por *M. tuberculosis*, sólo se ha podido desarrollar una técnica de diagnóstico serológico para la infección latente, ésta es un *immunoblot* para el complejo antigénico A60. La capacidad de esta prueba para discernir entre pacientes con TB y personas sanas fue casi del 100%. Sin embargo, su uso no fue posible ya que la vacunación con BCG lleva a la formación de anticuerpos anti-A60, por lo que los individuos vacunados se vuelven positivos para la prueba (Rovatti *et al*, 1996).

Actualmente se han desarrollado diversos métodos de diagnóstico serológico para la TB activa. Son muy efectivos y resultan de mucha utilidad principalmente en los pacientes que no pueden dar muestras de expectoración, negativos en cultivo o en baciloscopía y en los que potencialmente presentan TB extrapulmonar (Chan *et al*, 2000). El principal inconveniente de las pruebas serológicas es la reactividad cruzada con el bacilo BCG u otras micobacterias.

Para los ensayos serológicos se han utilizado antígenos puros o mezclas (extractos glicolipídicos, sonicados, PPD) de antígenos de *M. tuberculosis*. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de la eficacia de algunos antígenos que se han utilizado para el diagnóstico serológico de la TB.

Tabla 1. Antígenos utilizados para el serodiagnóstico de tuberculosis.
(Daniel, 1996; Samanich *et al*, 1998; Lyaschenko *et al*, 1998; Samanich *et al*, 2000; Lodha y Kabra, 2004)

| Antígeno | Características | % Sensibilidad | % Especificidad |
|----------------------------|--|----------------|-----------------|
| Ag 60 | Complejo antigénico formado por lípidos, proteínas y polisacáridos | 71-100 | 71-95 |
| Kp90 | Proteína de secreción | 63 | 66 |
| Proteína de 38 kDa | Glicolipoproteína de secreción | 49-89 | 93-100 |
| Complejo Ag 85 | Proteínas de secreción | 62-78 | 78-90 |
| Proteína de 19 kDa | Lipoproteína asociada a pared celular | 8 | |
| Complejo antígeno 45-7 kDa | Proteína de secreción | 40 | 98 |
| factor cuerda | Glicolípido de pared | 81 | 96 |
| Lipoarabinomano | Glicolípido asociado a la pared | 26-81 | 71-95 |

La principal desventaja del serodiagnóstico es que el reconocimiento antigénico en la TB es amplio y variable, ya que depende de la fase de la infección/enfermedad del paciente (Pai *et al*, 2006). El tipo y el número de antígenos que reaccionan con el suero varía dependiendo de los individuos, ya que, en un suero dado, el nivel de anticuerpos específicos a un antígeno determinado es distinto con respecto a otros sueros. Además, *M. tuberculosis* expresa diferentes genes y proteínas durante las diferentes etapas de la enfermedad (Gennaro, 2000; Gennaro, 2005). Por ejemplo, las proteínas expresadas en la enfermedad latente pueden diferir de aquellas de la enfermedad activa. Incluso dentro la misma TB activa, las proteínas pueden variar dependiendo si el padecimiento lleva a la formación de cavidades pulmonares o no. Por lo tanto, cualquier prueba que detecte la

respuesta inmune humoral debe incluir antígenos que se expresen durante varias etapas en la progresión de la TB.

Sin embargo, se han desarrollado muchos ensayos que utilizan un solo antígeno que pudiera no ser reconocido en todas las etapas de la enfermedad. La heterogeneidad del reconocimiento antigénico de los anticuerpos en un paciente con TB es la causa de la falla del serodiagnóstico en un 30% de los estudios con antígenos puros. Por esto, se ha propuesto el uso de combinaciones de antígenos para mejorar las técnicas de diagnóstico (Lyaschenko *et al*, 1998; Lyaschenko *et al*, 2000 Gennaro, 2000; Houghton *et al*, 2002; Weldingh *et al*, 2005; Gennaro, 2005; Pai *et al*, 2006). Asimismo, se ha propuesto el uso de moléculas alternativas, naturales o sintéticas, como reactivos de diagnóstico (Kouzmitcheva *et al*, 2001; Valencia, 2004; Robles *et al*, 2005).

Uno de los antígenos más ampliamente estudiado como un potencial reactivo de diagnóstico serológico es la proteína de 38 kDa (Espitia *et al*, 1989; Espitia y Mancilla, 1989; Chan *et al*, 2000; Uma Devi *et al*, 2001; Senthil *et al*, 2002; Houghton *et al*, 2002; Andersen y Harboe, 1989; Bothamely y Rudd, 1994; Chang *et al*, 1994; Lyaschenko *et al*, 1998; Samanich *et al*, 2000; Demkow *et al*, 2002; Reed *et al*, 2003; Greenway *et al*, 2005; Beck *et al*, 2005) e incluso ha sido propuesto como el mejor antígeno para inmunodiagnóstico de tuberculosis (Daniel, 1996; Samanich *et al*, 2000).

I.3. Tratamiento de la tuberculosis

Se han desarrollado diversos medicamentos para el tratamiento de la TB. En 1952, Waksman descubrió el primer antibiótico eficaz contra el bacilo tuberculoso, la isoniazida. Sin embargo, a lo largo de la historia ha sido necesario el desarrollo de nuevos fármacos o la combinación de ellos para eliminar las nuevas cepas de *M. tuberculosis*, que se han vuelto resistentes a los medicamentos tradicionales (Young y Robertson, 1998).

El inicio del tratamiento se basa en sospechas clínicas. Este puede iniciarse aún cuando no se ha confirmado la infección mediante baciloscopía y/o cultivo. El tratamiento de pacientes con baciloscopía negativa depende de las condiciones clínicas mostradas en la Figura VI.

Se recomiendan cuatro regímenes para pacientes con TB no resistente a fármacos. A la mayoría de los pacientes con enfermos con TB activa se les trata inicialmente con isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante ocho semanas. La mayoría de ellos necesitan una fase de continuación de isoniazida y rifampicina durante 18 semanas más (Potter *et al*, 2005).

Existen tres grupos de pacientes que deben recibir terapia de continuación durante 31 semanas: a) los que presentan TB pulmonar con cavidades, susceptibles a medicamentos y con cultivo positivo de esputo al final de la primera fase; b) aquéllos cuya primera fase de medicamentos no incluyó pirazinamida; c) quienes hayan recibido un tratamiento de once semanas de isoniazida y rifampicina durante la fase de inicio y con cultivo positivo de esputo al final de la primera fase de tratamiento.

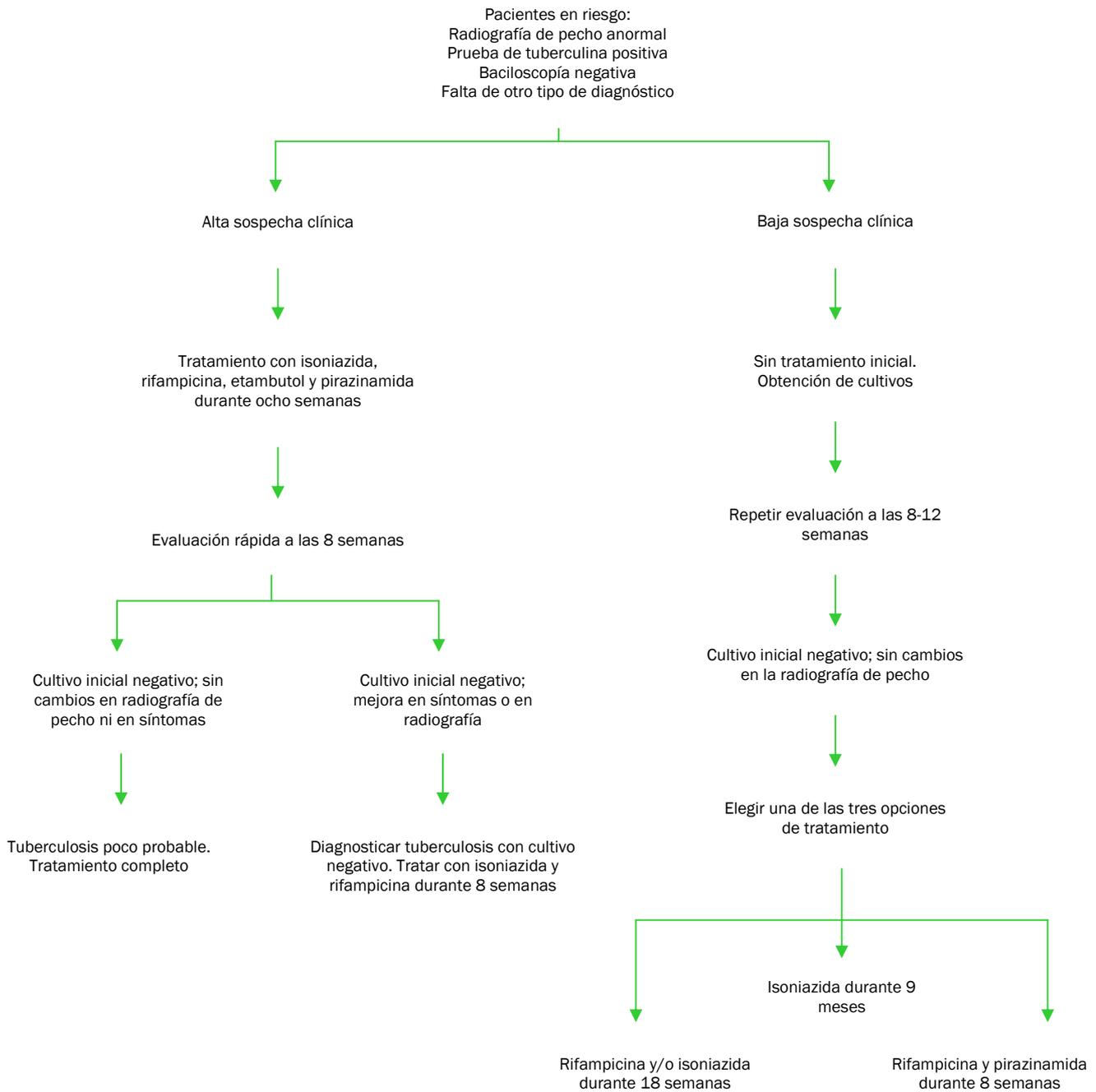


Figura VI. Tratamiento de pacientes con tuberculosis activa, baciloscopia-negativa y pasiva (Potter *et al*, 2005).

Durante la década de los noventa se definió como TB multi-resistente a fármacos (MDR) a aquel bacilo resistente al menos a isoniazida y rifampicina (Goyal *et al*, 1997; Young y Robertson, 1998). Actualmente se ha definido un nuevo tipo de bacilo, el XDR o

extremadamente resistente a los medicamentos. De acuerdo con la OMS, el tratamiento de la XDR debe ser con al menos cuatro fármacos diferentes (Wright *et al*, 2006).

La implementación de programas especiales para el control de la TB como el DOTS (por sus siglas en inglés, “Directly Observed Treatment Short-Course”) de la Organización Mundial de la Salud y el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) de la Secretaría de Salud de México han mejorado los resultados del tratamiento de la enfermedad y han reducido tanto la incidencia de la TB como la transmisión de las cepas MDR/XDR.

1.4. Vacunación

Desde hace cincuenta años se ha utilizado la vacunación con *Mycobacterium bovis* BCG como profilaxis para prevenir la TB clínica y reducir su severidad, especialmente en niños (Young y Robertson, 1998; Dannenberg *et al*, 2001). Sin embargo, actualmente la vacunación con BCG tiene una efectividad muy variable. Se ha propuesto que la variación geográfica en la eficacia de la vacunación con *Mycobacterium bovis* BCG se debe a la presencia de reacciones cruzadas con otras micobacterias y algunos helmintos, debidas a la presencia de antígenos en común (Yew y Leung, 2006).

Desde los 1950's se propuso la utilización de *Mycobacterium microti* para vacunación, y se demostró que era igualmente efectiva que la vacuna de BCG. Además, *M. microti* es una cepa mucho menos susceptible a mutaciones que *M. bovis* BCG (Dannenberg *et al*, 2001). Tanto *M. bovis* BCG como *M. microti* son cepas filogenéticamente cercanas a *M. tuberculosis* y se encuentran dentro de las cepas menos virulentas del género *Mycobacterium*. Aunque *M. microti* dejó de ser estudiada como potencial reactivo de vacunación por causar una reacción severa en la piel en algunas de las personas vacunadas, recientemente se han retomado los estudios de este microorganismo como potencial sustitución de la vacuna con *M. bovis* BCG (Manabe *et al*, 2002).

I.5. Proteína de 38 kDa (P38)

La proteína de 38 kDa, también conocida como antígeno 5, antígeno 78, PstS-1, pab o proteína antigénica b, es un antígeno inmunodominante importante del bacilo tuberculoso, involucrado en el metabolismo y transporte de fosfatos (Chang *et al*, 1997; Espitia y Mancilla, 1989). Es una de las proteínas más abundantes de *M. tuberculosis*. Es una glicolipoproteína, compuesta por proteína en un 74.3%, y por carbohidratos en el 25.7% restante. La proteína de 38 kDa contiene un segmento lipídico en los aminoácidos 21 al 26. Sin embargo, aún no hay una prueba química reportada que demuestre su naturaleza lipídica. El alto contenido de carbohidratos contribuye a su alta antigenicidad y a la estabilización de la conformación de los péptidos antigénicos (Espitia y Mancilla, 1989). La identificación de esta proteína como una lipoproteína indica que está unida a la membrana o a otras estructuras lipídicas en la superficie de la pared bacteriana (Harboe y Wiker, 1992). La P38 es secretada con alta eficiencia. Una porción de ella está anclada a la superficie de la pared micobacteriana mediante una cola lipídica, también responsable de la unión de los carbohidratos a la proteína (Harboe y Wiker, 1992; Lefèvre *et al*, 1997).

La P38 es un homodímero de 350 residuos de aminoácidos. Su estructura, obtenida por difracción de rayos X, se muestra en la Figura VII (Vyas *et al*, 2003). En la Figura VIIa se muestra la molécula monomérica y en la Figura VIIb se muestra el homodímero que forma a la proteína.

La proteína de 38 kDa es uno de los antígenos inmunodominantes más importantes de *M. tuberculosis* y fue la primera proteína que se demostró estar involucrada en el metabolismo del fosfato (Figuras VIIc y d) (Chang *et al*, 1994; Lefèvre *et al*, 1997; Torres *et al*, 2001; Houghthon *et al*, 2002). De hecho, el gen que codifica para la P38 presenta una homología del 30% con la proteína de unión a fosfatos PhoS (también conocida como PBP o PstS) de *Escherichia coli* (Andersen *et al*, 1990; Young y Garbe, 1991; Lefèvre *et al*, 1997). La síntesis de la proteína de 38 kDa aumenta cuando *M. tuberculosis* se cultiva en bajas concentraciones de fosfato (Espitia *et al*, 1992). Se ha propuesto que la P38 también puede estar involucrada en el transporte específico del fosfato en las micobacterias (Chang *et al*, 1994).

Por ser un antígeno inmunodominante, la P38 ha sido propuesta como una molécula potencial para el inmunodiagnóstico y la vacunación (Espitia y Mancilla, 1989; Pollock *et al*, 1995; Chan *et al*, 2000; Uma *et al*, 2001; Senthil *et al*, 2002; Houghton *et al*, 2002). Este antígeno tiene epítomos especie-específicos, lo que se refleja en una muy alta especificidad para la TB (Andersen y Hansen 1989; Houghton *et al*, 2002). Incluso, algunos autores consideran a la P38 como el antígeno con mayor potencial para el diagnóstico serológico de la TB y el más inmunogénico de *M. tuberculosis* (Espitia *et al*, 1992). Se ha demostrado que personas no infectadas con TB no responden a este antígeno. Sin embargo, también se ha reportado que no se detectan anticuerpos contra P38 en algunos pacientes (Espitia *et al*, 1989).

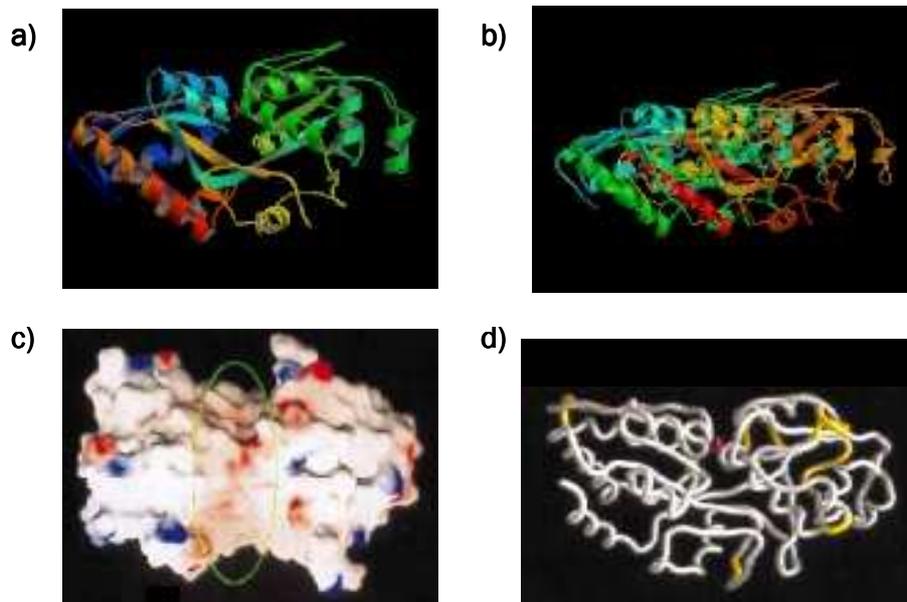


Figura VII. Representación esquemática de P38/PstS-1.

a) Estructura monomérica. b) Dímero. c) Representación gráfica del mapa de potencial electrostático (PE) de PstS-1. Las zonas de PE negativo en la superficie de la molécula se marcan en azul y en rojo las positivas. Se remarca la hendidura donde se une el fosfato con un círculo verde. d) Representación esquemática de la estructura del modelo molecular de PstS-1 de *M. tuberculosis*. El sitio de unión a fosfato de marca de color rojo.

Se han realizado diversos ensayos en diferentes poblaciones para detectar la presencia de este antígeno (Espitia *et al*, 1989; Andersen y Harboe, 1989; Bothamely y

Rudd, 1994; Chang *et al*, 1994; Lyaschenko *et al*, 1998; Samanich *et al*, 2000; Pottumarthy *et al*, 2000; Demkow *et al*, 2002; Reed *et al*, 2003; Greenway *et al*, 2005; Beck *et al*, 2005). En ellos se reporta que, mediante la técnica de ELISA para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, se ha observado mucha variabilidad de reacción con la P38 en función a las condiciones de la población evaluada. Su sensibilidad en las pruebas de serodiagnóstico varía desde 16% hasta 80% (Espitia *et al*, 1989; Andersen y Harboe, 1989; Lyashchenko *et al*, 1998; Harboe y Wiker; 1992; Sorensen *et al*, 1995; Uma Devi *et al*, 2001), dependiendo del estado del suero del paciente, del resultado de la baciloscopía y de factores poblacionales. En pacientes con TB activa se ha encontrado reactividad del 57% y especificidad del 96%. En otros estudios se ha reportado especificidad hasta del 100% (Uma Devi *et al*, 2001). La reactividad baja se encuentra asociada principalmente a individuos con tuberculosis pasiva o infectados con VIH (Houghton *et al*, 2002; Ramalingam *et al*, 2003). Dado lo anterior, algunos autores han propuesto el uso de la proteína de 38 kDa para el diagnóstico serológico de la TB en combinación con otros antígenos que aumenten su sensibilidad y no afecten su especificidad (Gennaro, 2000; Houghton *et al*, 2002; Weldingh *et al*, 2005).

Actualmente se utiliza a la proteína de 38 kDa como componente en dos diferentes paquetes comerciales de prueba inmunocromatográfica (ICT Tuberculosis AMRAD-ICT [Amrad, Sydney, Australia], RAPID test TB) y en cuatro paquetes comerciales de ELISA (PATHOZYME-TB complex, PATHOZYME-MYCO IgA, PATHOZYME-MYCO IgG y PATHOZYME-MYCO IgM) para el diagnóstico de la TB en pacientes con baciloscopía positiva y negativa (Pottumarthy *et al*, 2000; Perkins *et al*, 2003).

La proteína de 38kDa se ha propuesto como el reactivo más prometedor para las pruebas de inmunodiagnóstico de tuberculosis, sin embargo, su aplicación ha sido limitada debido a la falta de disponibilidad del antígeno purificado (Daniel, 1996). Además, se ha demostrado que la proteína de 38 kDa obtenida de manera recombinante pierde especificidad en los ensayos de ELISA (Samanich *et al*, 2000). Dado lo anterior, el uso de moléculas alternativas similares a la P38, como los mimótopos, permitiría la aplicación del antígeno en pruebas de diagnóstico y vacunación sin riesgo de exposición para el personal que los maneja.

I.6. Mimótopos

Un mimótopo es un péptido que imita (mimetiza) estructural y/o funcionalmente un sitio biológicamente activo y, por lo tanto, es capaz de interactuar con su ligando. Los mimótopos de regiones antigénicas pueden ser inmunogénicos o antigénicos, es decir, pueden desencadenar una respuesta inmune o reaccionar con anticuerpos generados por el antígeno original sin montar una respuesta inmune específica (Geysen *et al*, 1986).

Los mimótopos pueden ser utilizados como herramientas de diagnóstico y como subunidades de vacunación (Geysen *et al*, 1986). También permiten identificar nuevos receptores y ligandos naturales. Muchos de los receptores utilizados en la selección por afinidad y sus ligandos peptídicos son blancos para la elaboración de nuevos medicamentos. Se ha visto que al usar mimótopos para la inmunización de animales, algunos pueden servir para seleccionar nuevos anticuerpos que reaccionen de manera cruzada con el epítipo nativo (Smith y Petrenko, 1997). Además, se ha reportado que los mimótopos pueden servir como inmunomoduladores (Sharma *et al*, 2006).

Algunas ventajas de los mimótopos sobre los antígenos originales son: mayor capacidad inmunogénica, existe menor posibilidad de que ocurra una reacción inmunológica cruzada y permiten identificar epítopos lineales, conformacionales (no lineales), e inclusive no proteicos como fragmentos glicosídicos o lipídicos de una proteína (Luzzago *et al*, 1993; Sharma *et al*, 2006).

Ya se han obtenido mimótopos de epítopos peptídicos de *M. tuberculosis* (Valencia, 2004), aunque aún se encuentra en desarrollo su evaluación como potenciales reactivos de diagnóstico para esta enfermedad⁵. En diversos trabajos se han probado diferentes mimótopos como reactivos de inmunodiagnóstico,

⁵ Apéndice I.

obteniéndose resultados prometedores (Kouzmitcheva *et al*, 2001; Sompuram *et al*, 2002; Xu *et al*, 2003; Yu *et al*, 2005; Robles *et al*, 2005).

La tecnología más utilizada para la identificación de péptidos mimótopos es el despliegue en fagos.

I.7. Despliegue en fagos

El despliegue en fagos es una tecnología molecular que permite la expresión de proteínas grandes, fragmentos de anticuerpos o bibliotecas peptídicas en la superficie de un fago filamentoso (Smith, 1985). Una biblioteca peptídica es una mezcla heterogénea de clonas de fagos, en la que cada clona expresa un inserto de ADN exógeno diferente, por lo que, despliegan un péptido distinto en su superficie (Smith y Petrenko, 1997). Las bibliotecas de despliegue en fagos permiten la selección de péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos de alta afinidad y especificidad hacia casi cualquier blanco.

Esta metodología simple y funcional se utiliza para producir grandes cantidades de péptidos y proteínas diversas, estudiar las interacciones proteína-ligando, sitios de unión de antígeno y anticuerpo y el mejoramiento o modificación de la afinidad de proteínas hacia sus ligandos.

El despliegue en fagos es una metodología muy poderosa debido a que permite mantener un vínculo entre la proteína desplegada y la secuencia de ADN que codifica para ella, así como analizar bibliotecas que contienen miles de millones de péptidos y proteínas únicos de manera rápida y sencilla (Mullen *et al*, 2006).

La mayoría de los sistemas de despliegue en fagos utilizan como vector de expresión (vector en el que el inserto de ADN exógeno es expresado como una proteína) a los fagos M13 (Figura VIIIa), fd y f1. Éstos son virus filamentosos de aproximadamente una micra de longitud y 6nm de diámetro. El despliegue en fagos se basa en la fusión de las secuencias de ADN exógeno al genoma del fago, de manera

que las proteínas exógenas se expresen en fusión con otras proteínas de cubierta, propias del virus (Mullen *et al*, 2004). Los péptidos ajenos generalmente se fusionan con una de las tres proteínas de la cubierta: pIII, pVI y pVIII, ilustradas esquemáticamente en la Figura VIIIb. Aunque las cinco proteínas de cubierta han sido utilizadas para desplegar proteínas y péptidos, las más utilizadas han sido las del gen VIII (pVIII) y gen III (pIII) (Russel, 2004). En este trabajo se utilizan bibliotecas de fago M13 que expresa los insertos en el extremo N-terminal de su proteína pIII (Smith y Petrenko,1997).

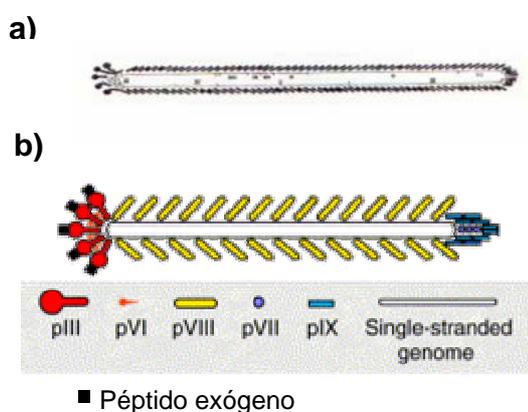


Figura VIII. Fago filamentoso M13.

a) Microfotografía. b)Componentes del fago M13 con péptido exógeno expresados en pIII.

Existen dos tipos de bibliotecas de despliegue en fagos: las naturales y las que son al azar (NPL's y RPL's respectivamente, por sus siglas en inglés). Las RPL's están compuestas por un repertorio de péptidos desplegados codificados por insertos oligonucleotídicos, sintéticos, al azar y degenerados, y son las que más se han utilizado para identificar epítomos antigénicos lineales. Las NPL's son construidas a partir de fragmentos de ADN obtenidos azarosamente de genomas de organismos determinados, como microbios patógenos. El tipo de construcciones de despliegue en fagos que más se utilizan son las bibliotecas peptídicas al azar.

Una de las principales ventajas del despliegue en fagos es que permite obtener mimótopos peptídicos de antígenos tanto proteicos como no proteicos. La posibilidad de seleccionar mimótopos peptídicos ha hecho posible su uso para ensayos de

diagnóstico en lugar de varios antígenos, particularmente no proteicos, como los lipopolisacáridos (Kouzmitcheva *et al*, 2001). Además, la técnica de despliegue en fagos tiene la ventaja de poder ser utilizada aún cuando la naturaleza del antígeno es desconocida. Esto es especialmente importante, ya que muchos determinantes antigénicos son conformacionales, es decir, que un patrón específico puede funcionar como determinante antigénico o inmunomodulador, y no como una estructura definida (Sharma *et al*, 2006).

La técnica de bioselección mediante afinidad hacia anticuerpos puede utilizarse para la identificación de péptidos mimótopos de regiones antigénicas en diversos estudios (Scott y Smith, 1990; Manoutcharian *et al*, 1999; Valencia, 2004; Mullen *et al*, 2006; Sharma *et al*, 2006). La metodología de bioselección, también llamada biopanning, de péptidos expresados por despliegue en fagos se muestra en la Figura IX.

II. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad responsable de millones de muertes en el mundo cada año. La mayoría de los casos de tuberculosis ocurren en países en desarrollo con recursos limitados. Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad depende principalmente de análisis radiográfico y examen clínico, confirmada por baciloscopía y cultivo bacteriano a partir de muestras de esputo. El cultivo no es útil como un medio de diagnóstico primario debido al largo tiempo de crecimiento del bacilo, por lo que la confirmación del diagnóstico se basa en la baciloscopía, una técnica con sensibilidad de tan solo 50-60% y la tasa de detección en niños y pacientes coinfectados con VIH es aún menor. Todo esto hace necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico rápidos, eficientes y económicos, que puedan distribuirse en todas las poblaciones.

Para hacer frente a los problemas de baja sensibilidad y especificidad, lentitud o requerimientos de infraestructura costosa inherentes a las técnicas tradicionales (baciloscopía y cultivo), se requiere el estudio de métodos alternativos de diagnóstico.

Con el fin de dar un tratamiento eficaz contra la TB, es necesario realizar un diagnóstico oportuno, rápido y acertado de la enfermedad. Las pruebas serológicas son un atractivo método de diagnóstico ya que son rápidas, fáciles de desarrollar, no invasivas y pueden implementarse en las condiciones comunes en los países en desarrollo, ya que no requieren de células vivas (Lyashchenko *et al*, 2000; Potter *et al*, 2005). Se ha observado que las glicoproteínas de algunos patógenos son antígenos inmunodominantes, por lo que tienen un importante potencial para el desarrollo de vacunas y métodos de inmunodiagnóstico (Espitia y Mancilla, 1987). En el caso concreto de la TB, la proteína de 38 kDa ha sido propuesta por diversos autores como un antígeno de gran potencial para el inmunodiagnóstico de la enfermedad (Espitia y Mancilla, 1989; Espitia *et al*, 1992; Samanich *et al*, 2000; Senthil, *et al*, 2002; Uma, *et al*, 2001, Houghton, *et al*, 2002) e incluso ha sido considerada el mejor antígeno para las pruebas de diagnóstico serológico (Daniel, 1996).

Sin embargo, la obtención de la P38 purificada para el inmunodiagnóstico es difícil y riesgosa. Además, se ha demostrado que la proteína de 38 kDa obtenida de manera

recombinante pierde especificidad en los ensayos de ELISA (Samanich *et al*, 2000). El trabajar con mimótopos es una herramienta muy útil y segura para la identificación de los epítomos más inmunogénicos de la proteína de 38 kDa útiles para diagnóstico serológico y, posiblemente, para vacunación.

III. HIPÓTESIS

Mediante el rastreo de bibliotecas peptídicas es posible la identificación de mimótopos de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, que posteriormente podrían ser utilizados como reactivos para el inmunodiagnóstico de la TB.

IV. OBJETIVOS GENERALES

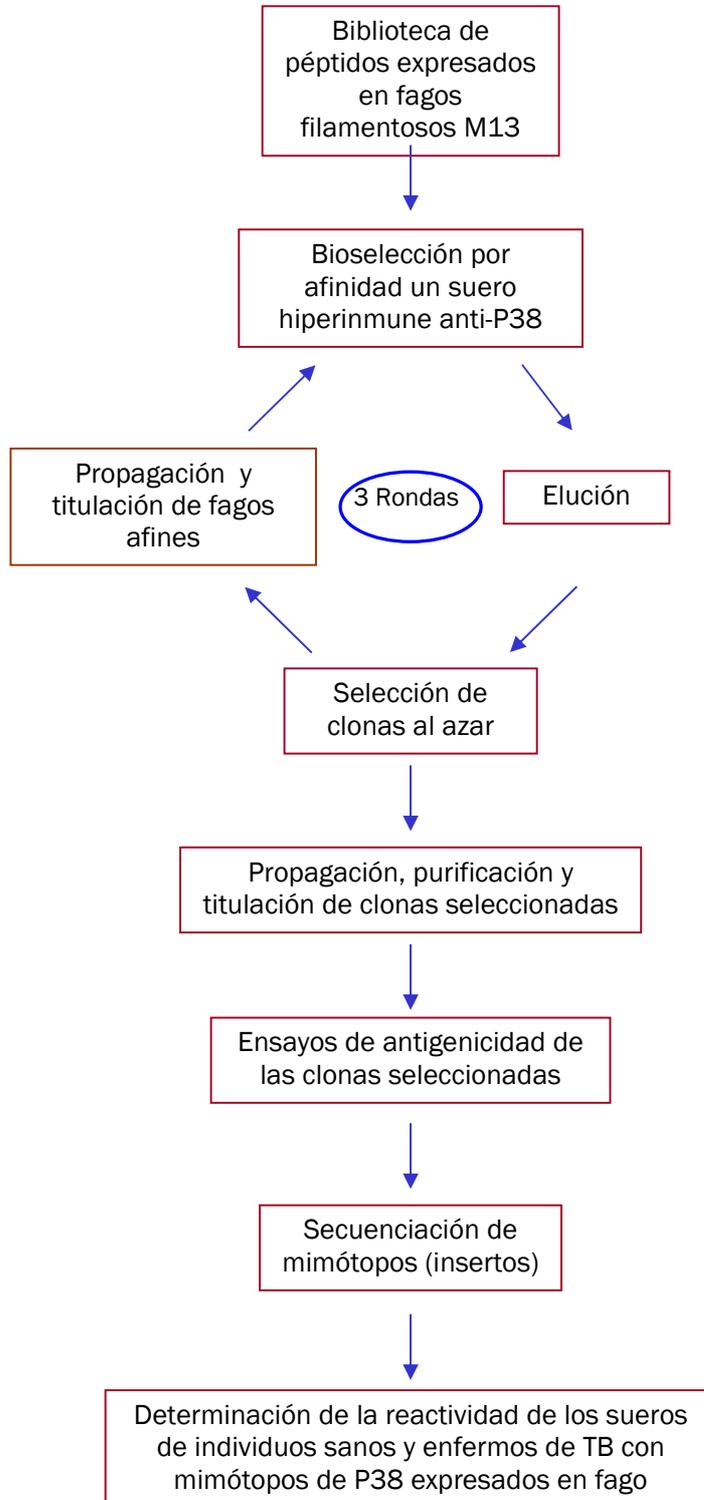
1. Identificar mimótopos de epítomos de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* mediante la técnica de bioselección de péptidos expresados por despliegue en fagos.
2. Evaluar la efectividad de mimótopos peptídicos de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* para el diagnóstico serológico de la TB.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una bioselección utilizando una biblioteca de péptidos expresados en fagos para identificar mimótopos de la P38 que sean reconocidos por un suero hiperinmune anti-P38.
- Seleccionar clonas de fagos que expresen péptidos mimótopos de la P38.
- Evaluar la reactividad de los mimótopos seleccionados con el suero hiperinmune de conejo anti-proteína de 38 kDa mediante ELISA.
- Determinar la reactividad de sueros de individuos con tuberculosis pulmonar activa y de controles sanos contra las clonas seleccionadas.
- Secuenciar las clonas seleccionadas y comparar con la secuencia de P38.

VI. MATERIAL Y METODOLOGÍA

VI.1. ESQUEMA METODOLÓGICO



VI.2. Proteína de 38 kDa y suero anti-P38

La P38 y el suero hiperinmune anti-P38 utilizados en este trabajo fueron generosamente donados por la Dra. Clara Espitia Pinzón. La proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* H37Rv utilizada se obtuvo de manera recombinante expresada en *Mycobacterium smegmatis*.

El antisuero utilizado para la bioselección fue obtenido mediante la inmunización de un conejo con la P38¹ recombinante de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis*.

VI.3. Muestras biológicas

Para la evaluación en sueros humanos se utilizaron muestras biológicas donadas por el Hospital de Infectología Manuel Méndez del Centro Médico Nacional “La Raza” y el Hospital General del I.M.S.S., en la Ciudad de México, de individuos enfermos con tuberculosis pulmonar activa diagnosticados por baciloscopía positiva².

Las muestras de sangre de individuos sanos utilizadas como control fueron donadas por personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

VI.4. Verificación de la reactividad del suero hiperinmune de conejo anti-P38 con la proteína de 38 kDa mediante la técnica de ELISA

Se sensibilizó una placa para ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con proteína de 38 kDa y como control se utilizó un extracto de proteínas totales de *M. tuberculosis*. Se depositó 1 µg de la proteína de 38 kDa/extracto de proteínas totales, diluido en 100 µl de buffer de carbonatos (por pozo) en una placa para ELISA, se incubó por 1 hora a 37 °C. Se lavó cuatro veces con 200 µl utilizando una solución de lavado de PBS 0.01

¹ Apéndice II.

² No se tiene ninguna clasificación de los sueros utilizados, tan solo el diagnóstico baciloscópico positivo de TB activa.

M-Tween 20 al 0.2%³. Se le agregó a cada pozo 200 µl de solución de bloqueo (PBS 0.01 M-BSA al 2%) incubándose una hora a 37 °C para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos. Se lavó nuevamente y se incubó con el suero policlonal de conejo anti-proteína de 38 kDa, diluido 1:100 (en PBS 0.01 M-BSA al 0.1%, Tween 20 al 0.1%) por 12 horas a 4 °C. Se lavó nuevamente, se incubó con 100 µl de anti-IgG de conejo conjugado a la fosfatasa (Sigma, St. Louis MO., E.U.A.), dilución 1:5000 (en PBS 0.01 M-BSA al 0.1%), por 1 hora a 37 °C. Se lavó y se adicionaron 100 µl de 4-nitrofenilfosfato diluido (1mg/ml en solución amortiguadora de dietanolamina) a 37 °C para revelar la reacción. Se incubó durante 15 minutos a 37 °C. La densidad óptica se leyó a 405nm (Crowther, 2001).

VI.5. Titulación del suero hiperinmune de conejo anti-P38 mediante la técnica de ELISA

Se sensibilizó una placa para ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark) con proteína de 38 kDa, depositando 1 µg de la proteína de 38 kDa diluido en 100 µl de buffer de carbonatos (por pozo) en una placa para ELISA. Se incubó por 1 hora a 37 °C. Se lavó cuatro veces con 200 µl. Se le agregó a cada pozo 200 µl de solución de bloqueo incubándose 1 hora a 37 °C para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos. Se lavó nuevamente y se incubó con el suero policlonal de conejo anti-proteína de 38 kDa, o con el suero preinmune, en diferentes diluciones (1:100, 1:200, 1:400,... 1:12 000) en PBS 0.01 M-BSA al 1% por 12 horas a 4 °C. Se lavó nuevamente, se incubó con 100 µl de anti-IgG de conejo conjugado a la fosfatasa (Sigma, St. Louis MO., E.U.A.), dilución 1:5000 (en PBS 0.01 M-BSA al 0.3%), por 1 hora a 37 °C. Se lavó y adicionaron 100 µl de 4-nitrofenilfosfato diluido (1mg/ml en solución amortiguadora de dietanolamina) a 37 °C. Se incubó al abrigo de la luz durante 15 minutos para obtener la reacción colorimétrica. La densidad óptica se leyó a 405 nm (Crowther, 2001) (Figura X).

³ Se utilizaron las mismas soluciones de lavado (PBS 0.01 M-Tween 20 al 0.2%) y de bloqueo (PBS 0.01 M-BSA al 2%) en todos los ensayos de ELISA y en la bioselección.

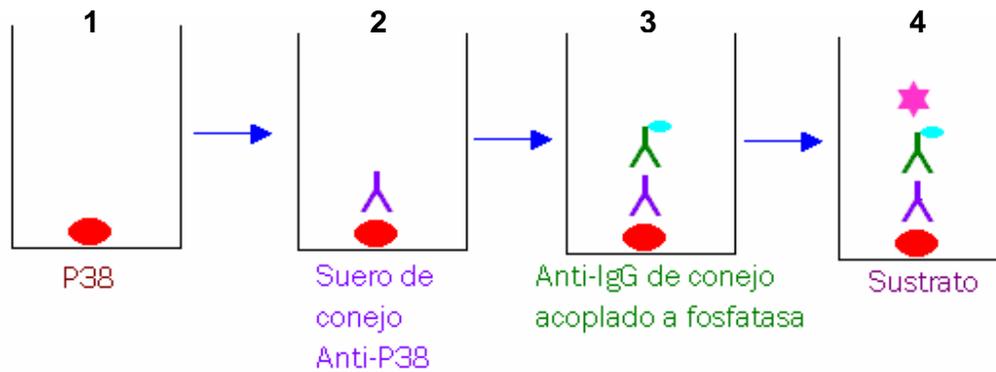


Figura X. ELISA para verificar la reactividad del suero hiperinmune de conejo con la P38.

1) Se sensibiliza la placa con proteína de 38 kDa. 2) Se añade el suero de conejo hiperinmune α -P38. 3) Se agrega anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa. 4) Se revela utilizando 4-nitrofenilfosfato en dietanolamina como sustrato.

VI.6. Bioselección

Para identificar los mimótopos de la proteína de 38 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizó una biblioteca comercial de péptidos (de doce aminoácidos de longitud, dodecapéptidos) expresados al azar en el extremo amino de la proteína pIII de la superficie del fago filamentoso M13 (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra).

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 100 μ l de una dilución 500 ng/ μ l de anti IgG de conejo H+L (Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.) en solución amortiguadora de carbonatos, y fue incubada una hora a 37 °C. Los pozos se lavaron cinco veces con 200 μ l de solución lavado. Posteriormente, se incubó con 200 μ l por pozo de una solución de bloqueo durante una hora a 37 °C para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos. Se hicieron cuatro lavados con 200 μ l de solución de lavado. Se agregaron 100 μ l por pozo de suero de conejo anti-P38 (1:100) en PBS 0.01 M-BSA al 1%, Tween 20 al 0.1%. Se incubó por una hora a 37 °C. Se lavó cuatro veces nuevamente. En 450 μ l de PBS 0.01 M-BSA al 0.1% con Tween 20 al 0.1% se diluyeron 10 μ l (correspondiente a 1×10^{11} /ml) de la biblioteca comercial de fagos (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra). De esta dilución fueron agregados 10 μ l por pozo y se incubó toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo se hicieron cinco lavados y posteriormente se realizaron cinco lavados más con PBS 0.01 M. Se

agregaron 100 µl por pozo de una solución de glicina-HCl (0.2 M, Apéndice IV). Se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y diez minutos a 37 °C. Se colectó el eluído de los pozos en un mismo tubo y se agregaron 200 µl de Tris base 0.2M (sin ajustar pH) para neutralizar, (según especificaciones del fabricante del kit 12-mer Phage Display Peptide Library Kit, (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra). A la reacción obtenida se le llamó “eluído de primera ronda”. Posteriormente se propagó y tituló el eluído.

Para continuar con la segunda ronda de la bioselección se repitió el mismo protocolo pero, en lugar de adicionar la biblioteca comercial, se añadieron los fagos obtenidos de la primera ronda (después de haber sido propagados hasta alcanzar el título necesario) para obtener el “eluído de segunda ronda”. Se continuó sucesivamente el número de rondas necesarias para terminar la bioselección (tres en este caso).

VI.7. Propagación de Fagos

Los fagos son propagados mediante la infección de células de *Escherichia coli* en el medio 2xYT⁴. Previo al experimento se cultivaron células de *E. coli* en medio líquido 2xYT, se incubaron en agitación durante cuatro horas a 37 °C. Para realizar la propagación, se colocaron 500 µl de bacterias en 50 ml de medio líquido 2xYT, se infectaron con 15 µl de la muestra con el fago de interés⁵. Se incubó durante 15 minutos a 37 °C sin agitación para facilitar la infección. Posteriormente, se incubó durante cuatro horas y media en agitación a 220 rpm a 37 °C, hasta alcanzar una densidad óptica de 600 nm. Una vez transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron durante diez minutos a 10000 rpm a 4 °C. A partir del sobrenadante se precipitaron los fagos con 1/6 del volumen de polietilenglicol (PEG⁶, USB Corp., Cleveland, OH) manteniéndose a 4 °C durante toda la noche. Se centrifugó durante diez minutos a 10 000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de fagos se resuspendió en un mililitro de TBS. Posteriormente, se transfirió la suspensión a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó por tres minutos a

⁴ Apéndice IV.

⁵ En el caso de la propagación del eluído obtenido al final de una ronda de bioselección, se infecta con todo el eluído.

⁶ Apéndice IV.

14 000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue transferido a otro tubo de microcentrífuga y se precipitó con 180µl de PEG. Se incubó a 4°C por una hora. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó por diez minutos a 14 000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 200 µl de TBS. Se centrifugó por cinco minutos a 14 000 rpm a 4°C, para eliminar bacterias residuales. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se obtuvo el eluído propagado.

VI.8. Titulación de Fagos

La titulación se lleva a cabo para determinar el número de pfu por mililitro. Se hicieron diluciones seriadas 1:1000 en medio de cultivo 2xYT (Invitrogen, E.U.A.), a partir de los fagos eluídos. Después de realizar una última dilución, se agregaron los fagos a 200 µl de bacterias *E. coli*. Se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente y se le agregaron 15 µl de XGal/IPTG. Esta mezcla se añadió a un tubo con 4 ml de medio Top agar fundido a 45°C, se mezcló y vació en una caja de Petri preparada con medio LB para dejarse incubando toda la noche. Al día siguiente se obtuvo el título contando las unidades formadoras de placas (según especificaciones del fabricante del kit 12-mer Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs, New England).

VI.9. Determinación de la reactividad de sueros de conejo con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Se realizaron ensayos de antigenicidad de las clonas con el suero hiperinmune anti-P38 utilizado en la bioselección, según Santamaría *et al*, 2001. Para esto, 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.), 5ng/ml (1:200) en PBS 0.01 M, se incubó por 1 hora a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con 400 µl solución de lavado, se incubó con 200 µl de una solución bloqueadora, por 1 hora a 37 °C. Se realizaron cuatro lavados y se incubó la mitad de la placa con 100 µl de suero preinmune y la otra mitad con el suero anti-P38 en dilución 1:100 (en PBS 0.01 M-BSA al 1%, Tween 20 al 0.1%). Se realizaron cuatro lavados y se agregó a cada pozo (por duplicado, para ambos sueros) 100 µl de los fagos diluidos en PBS 0.01 M-BSA al 1%, Tween 20 al 0.1%, partiendo de una concentración de 5×10^{10} pfu/ml teniendo por pozo 5×10^9 pfu), se incubó durante toda la noche a 37 °C. Se realizaron cuatro lavados y se incubó la placa con 100 µl 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 y se agregó 100 µl por pozo de ABTS como sustrato para la peroxidasa (Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.) y se dejó incubar por 15 minutos a 37 °C. Se midió la absorbancia en un lector de placas automático a 405 nm. (Figura XI)

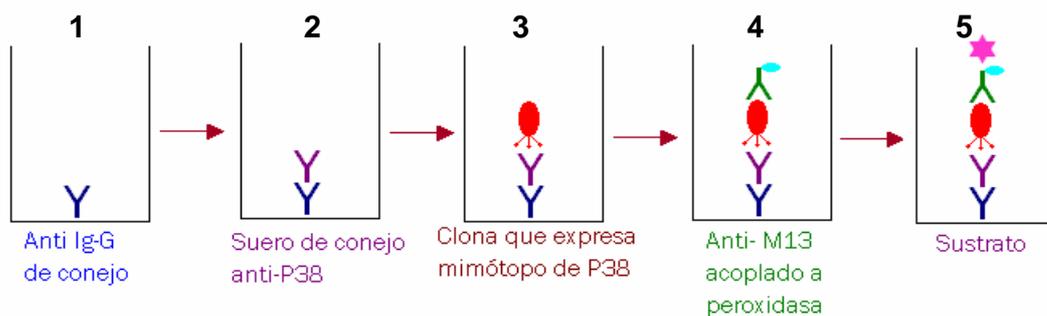


Figura XI. ELISA para determinar la reactividad de las clonas que expresan mimótopos de la P38 con suero hiperinmune anti-P38 mediante la técnica de ELISA.

1) Se sensibiliza la placa con anticuerpo anti-IgG de conejo. 2) Se añade el suero de conejo hiperinmune α -P38. 3) Se agrega la clona que expresa al péptido mimótopo de la proteína de 38 kDa. 4) Se añade anticuerpo anti-M13 acoplado a peroxidasa. 5) Se revela utilizando ABTS como sustrato.

VI.10. Determinación de la reactividad de sueros humanos con P38 mediante la técnica de ELISA

Se realizó este ensayo de ELISA para evaluar la reactividad de los sueros humanos (tanto de individuos sanos como de pacientes con TB pulmonar) con la proteína de 38 kDa.

Se depositaron 100 μ l/pozo de una solución de 1 μ g/ml de proteína de 38 kDa diluida en buffer de carbonatos sobre placas Maxisorp (Nunc), y se incubó toda la noche a 4°C. Después de cuatro lavados se agregaron en cada pozo 200 μ l de solución bloqueadora y se incubó durante dos horas a 37° C o cuatro horas a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados, se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS 0.01 M/BSA 1%, Tween 0.1% y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se lavó cuatro veces y se añadió IgG humano conjugado a fosfatasa (100 μ l/pozo de una dilución de 1:10 000) en PBS 0.01 M-BSA 1% Tween 20, 0.1%. Se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente se realizaron cuatro lavados. Se agregaron 100 μ l de 4-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina en cada pozo para revelar. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y se leyó a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas. (Figura XII)

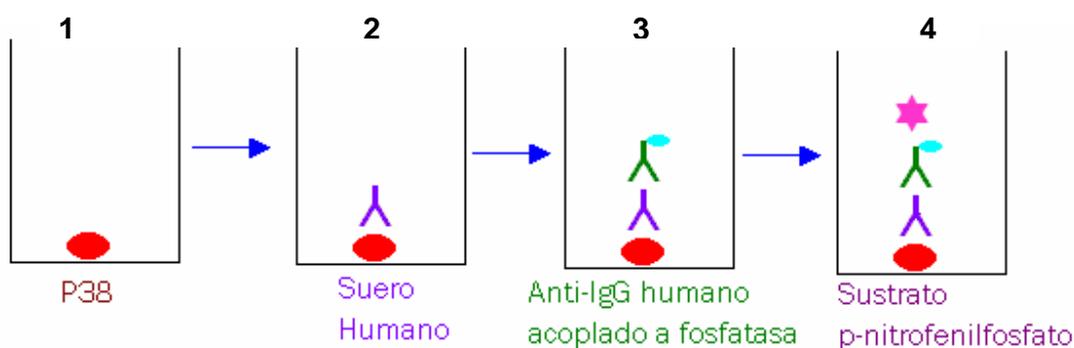


Figura XII. ELISA para determinar la reactividad de suero humano con péptidos expresados en fagos.

1) Se sensibiliza la placa con proteína de 38 kDa. 2) Se añade el suero humano (de individuo sano o enfermo). 3) Se agrega conjugado de anti-IgG humano acoplado a fosfatasa. 4) Se revela utilizando 4-nitrofenilfosfato en dietanolamina como sustrato.

VI.11. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Este ensayo de ELISA se llevó a cabo para evaluar la reactividad de los anticuerpos humanos contra los péptidos que mimetizan a la proteína de 38 kDa. Se utilizaron como controles negativos al fago M13 silvestre, que no expresa ninguna proteína, y al fago APP 12-3.1, un fago no relacionado.

Se depositaron 100 µl/pozo de una solución de 1 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech, U.K. Limited), en buffer de carbonatos sobre placas Maxisorp (Nunc), y se incubó toda la noche a 4°C. Después de cuatro lavados, se agregaron en cada pozo 200 µl de solución de bloqueo y se incubó durante una hora a 37° C. Las partículas de fagos se resuspendieron en PBS 0.01 M/BSA 0.1%, Tween 20 al 0.1% y se añadieron 100 µl de esta suspensión a cada pozo (10^{10} ufp/pozo). Después de cuatro lavados, se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS 0.01 M/BSA 1%, Tween 20 al 0.1% y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron cuatro lavados y se añadió IgG humano conjugado a fosfatasa (100 µl/pozo de una dilución de 1:5 000) en PBS 0.01 M/BSA 1%, Tween 20 al 0.1%. Se incubó durante 1 hora a 37° C y posteriormente se realizaron cuatro lavados. Se agregaron 100 µl de 4-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina en cada pozo para revelar la reacción. Se incubó a 37° C durante 15 minutos leyendo a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas. (Figura XIII)

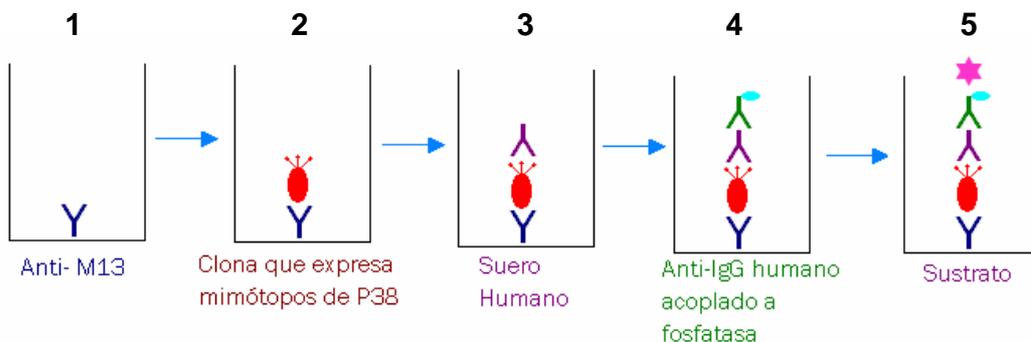


Figura XIII. ELISA para determinar la reactividad de suero humano con péptidos expresados en fagos.

1) Se sensibiliza la placa con anticuerpo anti-M13. 2) Se añade la clona que expresa un péptido mimótopo de la proteína de 38 kDa. 3) Se agrega el suero humano. 4) Se agrega el conjugado de anti-IgG humano acoplado a fosfatasa. 5) Se revela utilizando 4-nitrofenilfosfato en dietanolamina como sustrato.

VI.12. Purificación de ADN de cadena sencilla

Para la purificación de ADN de cadena sencilla de las clonas seleccionadas al azar, se añadieron 400 µl de PEG/NaCl a 1 ml de sobrenadante obtenido en la primera centrifugación del proceso de propagación de cada clona seleccionada, incubando toda la noche a 4 °C para la precipitación de los fagos. Se centrifugó durante diez minutos a 14 000 rpm, se desechó el sobrenadante y se centrifugó 30 segundos más. Después de desechar el nuevo sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 200 µl de buffer de yodo. Posteriormente se agregaron 500 µl de etanol absoluto, se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó la solución durante 10 minutos a 14 000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol al 70%. Después de centrifugar un minuto a velocidad máxima, se tiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 15.5µl de agua bidestilada (según especificaciones del fabricante del kit 12-mer Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs).

Para verificar la integridad del ADN obtenido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X y bromuro de etidio al 0.2%. Se cargaron 2 µl de ADN de cadena sencilla de cada una de las clonas en una mezcla de 1 µl de buffer de carga 5X y 1 µl de agua MilliQ estéril. El gel se corrió aproximadamente durante 90 minutos a un voltaje constante de 100V⁷.

VI.13. Secuenciación de ADN de cadena sencilla

La secuenciación del ADN de cada clona se realizó mediante el uso del kit de secuenciación "Sequenase Quik-Denature Plasmid Sequencing Kit" (Amershan Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA) y dATP α -³⁵S como se describe a continuación. La reacción de *annealing* se preparó en una mezcla de 12.5 µl de templado (ADN de cadena sencilla), 2.0 µl de buffer de reacción y 1.5 µl de primer de -28pb (sequencing primer -28), que se incubó a 37 °C durante 10 minutos y, posteriormente, 10 minutos en hielo.

⁷ Apéndice IV.

A cada tubo con la mezcla de annealing se le añadió (reacción de *labeling*) 1 µl de DTT (dithiotreitol) 0.1 M, 2 µl de mezcla *labeling mix* 1:10 (dNTPs de G, T, C; 7.5mMc/u), 0.3 µl de marca dATP α -³⁵S35 (adenina marcada), y 1 µl de enzima (4 unidades de polimerasa, sequenase versión 2.0 DNA polymerase), dejándose incubar 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, 4.5 µl de la mezcla annealing-labeling se añadieron a cuatro tubos por reacción, precalentados a 37 °C, que contenían 2.5 µl de cada uno de los nucleótidos análogos de terminación: G, A, T, C (ddNTPs 80 µM). Esta mezcla se incubó durante cinco minutos a 37 °C. Finalmente, se añadieron 4 µl de la solución de paro (Stop Mix) y se incubó durante tres minutos a 75 °C. Se cargaron 7 µl en los carriles correspondientes de un gel de poliacrilamida al 8%. El gel se corrió a 1500 volts durante 30 minutos y durante 4.5 horas a 1800 Volts.

Al término de este tiempo se recuperó el gel mediante papel filtro y se colocó en el secador de geles (Bio-Rad, USA) durante 90 minutos a 80 °C. Transcurrido el tiempo de secado del gel, se colocó en un cassette de exposición con una placa de rayos X (Kodak, X.O mat), se guardó a temperatura ambiente y se reveló después de 72 horas. Se llevó a cabo la lectura manual de la placa 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).

VI.14. Análisis de similitud de secuencias

La similitud de las regiones de aminoácidos entre los insertos de péptidos de las clonas seleccionadas y las secuencias de la proteína de 38 kDa se compararon usando los programas de computadora BioEdit, ClustalW y BLAST.

VII. RESULTADOS

Teniendo como objetivo identificar mimótopos de uno de los antígenos más prometedores para el diagnóstico de TB, la proteína de 38 kDa, se procedió a bioseleccionar fagos M13 recombinantes mediante el rastreo por afinidad a anticuerpos anti-P38, en una biblioteca comercial de dodecapéptidos lineales expresados en fagos M13.

El antisuero utilizado fue generosamente donado por la Dra. Clara I. Espitia Pinzón del I.I.B.M., obtenido a partir de la inmunización de un conejo con P38 recombinante de *M. tuberculosis* expresada en *Mycobacterium smegmatis*¹. El uso de éste permitió la identificación de mimótopos de toda una variedad de epítomos de la P38.

Como primer paso se realizaron ensayos que nos permitieron verificar la reactividad del suero anti-P38 con el antígeno nativo de 38 kDa y determinar si el título del mismo permitía realizar la bioselección de fagos.

VII.1. Verificación de la reactividad del suero hiperinmune de conejo anti-P38 con la proteína de 38 kDa mediante la técnica de ELISA

Para verificar la reactividad del suero hiperinmune anti-proteína de 38 kDa se sensibilizó una placa de ELISA con la P38 y con un extracto de proteínas totales como control. Se probaron los sueros preinmune e hiperinmune anti-P38, un suero anti-proteínas totales de *M. tuberculosis* como control positivo y un suero no relacionado (anti-antígeno lipídico de la micobacteria) como control negativo.

Los resultados (Figura 1) muestran que, al sensibilizar la placa utilizando como antígeno a la proteína de 38 kDa, el suero anti-proteínas totales sí presenta cierta reactividad. Esto se debe a que el extracto de proteínas totales contiene a la P38, por

¹ Apéndice II.

lo que, es congruente encontrar reacción entre este suero y la proteína. Sin embargo, tanto el suero no relacionado como el preinmune no presentan reactividad con la P38, como se esperaba, debido a que en ninguno de los casos deberían existir anticuerpos contra el antígeno de interés.

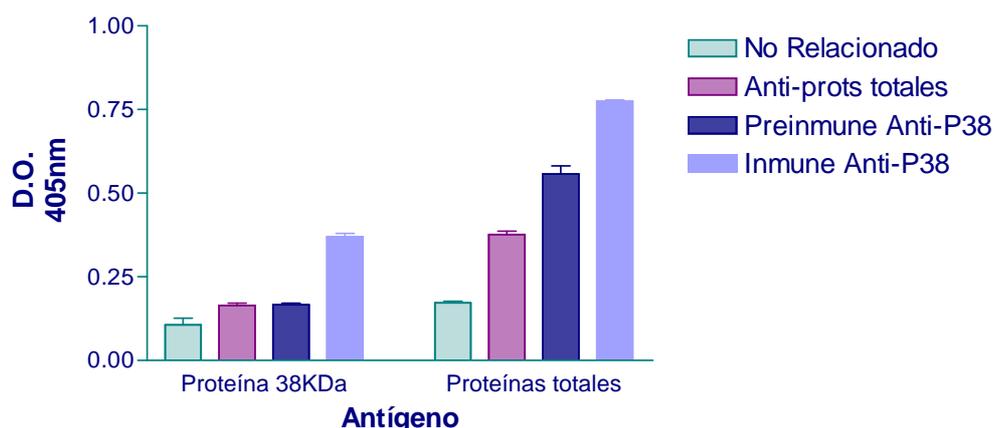


Figura 1. Reactividad de diferentes sueros contra la proteína de 38 kDa y proteínas totales de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las últimas dos barra muestran la alta reactividad entre los sueros pre- e hiperinmune anti-P38 y las proteínas totales. Ésta puede explicarse de dos formas: la primera, el extracto de las proteínas totales contiene a la proteína de 38 kDa, por lo que el suero hiperinmune debe de reaccionar con ella. La segunda es porque los conejos que se utilizan en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, a partir de los cuales se obtuvieron estos antisueros, provienen de granjas y no están 100% libres de patógenos. Dado lo anterior, el suero preinmune ya contenía anticuerpos reactivos contra proteínas diversas, incluso de *M. tuberculosis*, posiblemente como resultado de reacciones cruzadas o de previa exposición del animal a micobacterias del medio ambiente, sobre los cuales no se tiene control alguno.

Dado lo anterior, es posible que algunos de los péptidos obtenidos de la bioselección usando suero anti-P38 no sean mimótopos de la proteína de 38 kDa. Si esto ocurre, una vez que se obtengan las secuencias de los péptidos se corroborará

cuáles de ellos tienen similitud con el antígeno nativo de 38 kDa o con otros antígenos de *M. tuberculosis*. Además, los ensayos de antigenicidad con el suero hiperinmune anti-P38 permitirá confirmar la presencia de mimótopos de la P38.

VII.2. Titulación del suero hiperinmune de conejo anti-P38 mediante la técnica de ELISA

A fin de caracterizar el suero que sería utilizado para la identificación de mimótopos de la P38 se realizó la titulación de los sueros preinmune e hiperinmune mediante la técnica de ELISA antes de realizar la bioselección (Figura 2). Según trabajos previos, sueros con títulos de 1:5 600 o superiores pueden ser utilizados como blanco para seleccionar fagos mediante la metodología usual (trabajando con el suero en dilución 1:200).

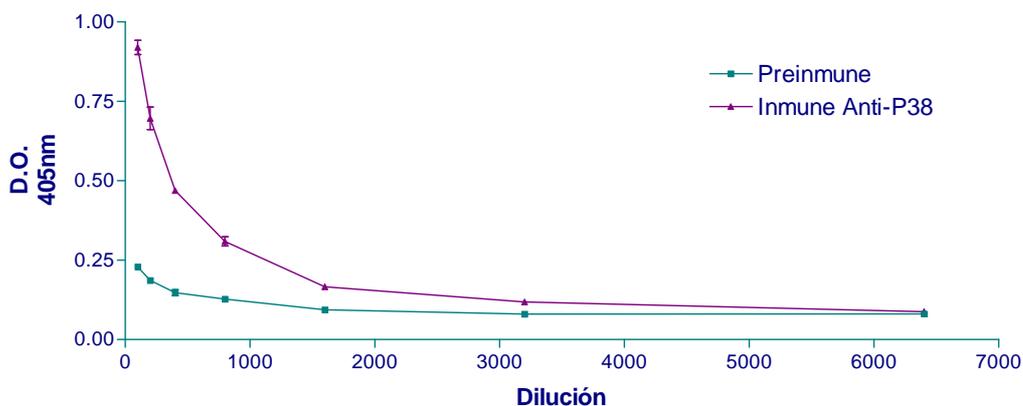


Figura 2. Titulación del suero hiperinmune de conejo anti-proteína de 38 kDa mediante ELISA. Lectura observada a los 15 minutos.

En este caso, la diferencia de 0.2 D.O. entre los sueros pre- e hiperinmune se encontró por debajo del título 1:800, por lo que se decidió utilizar el suero hiperinmune de conejo en dilución 1:100, siendo suficiente para la realización de la bioselección.

VII.3. Bioselección, propagación y titulación de fagos

Una vez titulado el suero hiperinmune anti-P38, se realizaron tres rondas de bioselección a partir de una biblioteca comercial de dodecapéptidos lineales expresados en fago M13, utilizando anticuerpos anti-proteína de 38 kDa. Al terminar la 1ª y 2ª ronda, se propagó y tituló el eluido obteniendo títulos de 10^4 y 10^6 respectivamente. Al finalizar la tercera ronda, solamente se tituló el eluido obteniendo una concentración de 10^8 pfu/ml. Posteriormente se amplificó hasta alcanzar un título de 10^{13} para la realización de los inmunoensayos.

Tabla 2. Rendimiento de la bioselección.

| Ronda | #pfu/ml Entrada | #pfu/ml Salida |
|-------|--------------------|-------------------|
| 1ª | 10^{13} | 10^4 |
| 2ª | 10^{13} | 10^6 |
| 3ª | 10^{13} | 10^8 |

El aumento del título de los fagos eluidos en cada ronda de bioselección muestra el enriquecimiento del número de fagos afines a los anticuerpos anti-P38 obtenidos en el eluido (Tabla 2).

A partir del eluido de tercera ronda se seleccionaron 21 clonas al azar y cada una, a su vez, se propagó en *E. coli* y se tituló obteniendo una concentración de 10^{13} pfu/ml para todas las clonas. Estas clonas fueron evaluadas con los anticuerpos anti-P38 para confirmar el mimetismo antigénico de los insertos de cada una.

VII.4. Determinación del mimetismo antigénico de péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Para saber si los péptidos seleccionados son mimótopos de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, se realizaron ensayos de antigenicidad con las clonas elegidas, evaluando su reactividad con los sueros preinmune e hiperinmune anti-P38 mediante ELISA. En este caso se emplearon como controles negativos al fago silvestre M13 (que no expresa inserto alguno en sus proteínas pIII) y un fago que expresa un péptido no

relacionado (epítipo relacionado con el péptido β -amiloide de la enfermedad de Alzheimer), usando una concentración de 10^{10} fagos por pozo en cada caso.

El ensayo se realizó tres veces, probando cada muestra por duplicado. En la Figura 3 se presenta el promedio de los resultados obtenidos en los tres experimentos. Se observa que todas las clonas seleccionadas fueron reconocidas por el suero anti-P38, pero no las clonas utilizadas como controles negativos. Estos resultados indican que los péptidos seleccionados corresponden a mimótopos antigénicos de la P38.

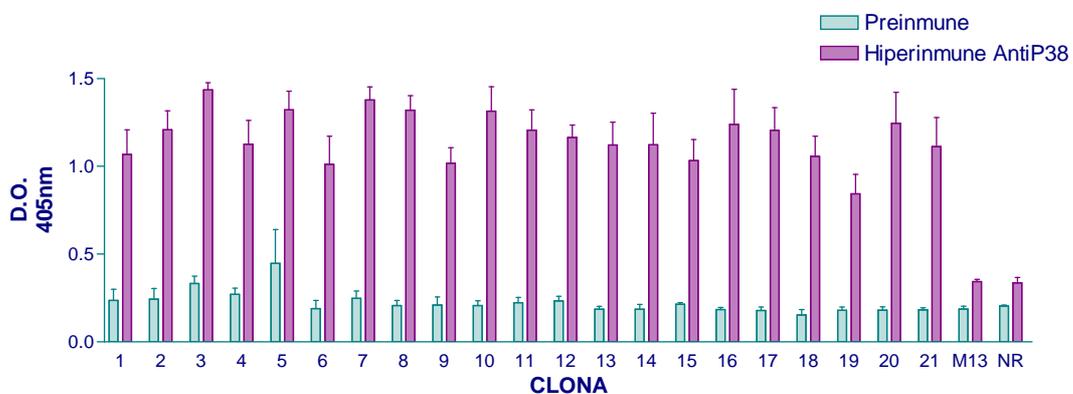


Figura 3. Reactividad de sueros preimmune e hiperimmune anti-P38 con las clonas seleccionadas y con los controles negativos.

Las clonas seleccionadas (1-21) son reconocidas por el suero hiperimmune anti-P38, a diferencia de las clonas control (M13 y NR).

Se obtuvo el índice de reactividad de cada clona para determinar el nivel de calidad de su reactividad en contraste con los controles. El índice se determinó dividiendo el valor obtenido con el suero hiperimmune entre el obtenido con el suero preimmune en todos los casos (utilizando los mismos valores que para la Figura 3). A mayor índice, mejor reactividad. En la Figura 4 se muestran los índices obtenidos para cada clona en comparación con los controles. Con los resultados anteriores se observa que todas las clonas tienen un índice de reactividad mucho mayor que los controles negativos (Tabla 3).

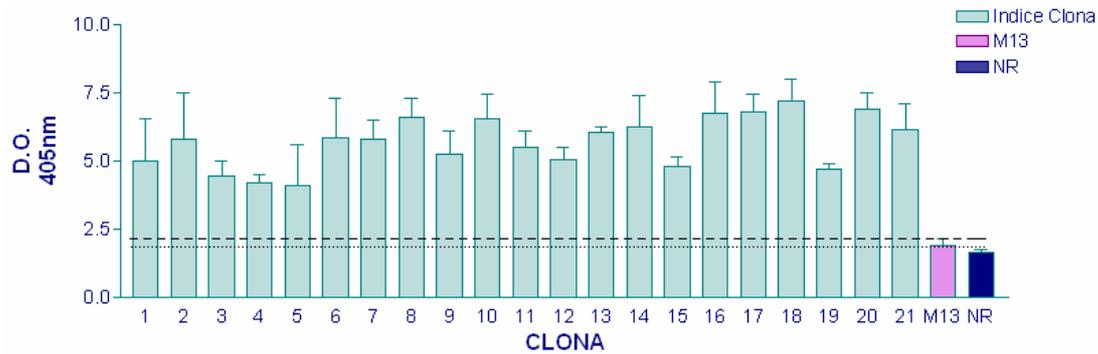


Figura 4. Índices de reactividad de las clonas obtenidas (1-21) mediante la bioselección con suero anti-P38 en contraste con los controles (M13 y NR).

Tabla 3. Porcentaje de bondad de cada clona con respecto a los controles negativos M13 y no relacionado (NR). El porcentaje se calculó dividiendo el promedio de los índices de reactividad (obtenidos en los tres experimentos) de cada clona entre el índice de reactividad del control. Las clonas se presentan en orden descendiente comenzando por la de mayor bondad.

| Clona | % de Bondad | |
|-------|-------------|--------|
| | Con M13 | Con NR |
| 18 | 599.1 | 647.3 |
| 20 | 594.3 | 642.1 |
| 17 | 581.3 | 628.1 |
| 16 | 562.5 | 607.8 |
| 8 | 553.4 | 597.8 |
| 14 | 531.6 | 574.3 |
| 10 | 529.6 | 572.2 |
| 21 | 515.0 | 556.4 |
| 13 | 509.0 | 549.9 |
| 7 | 491.9 | 531.4 |
| 6 | 462.6 | 499.8 |
| 11 | 453.7 | 490.1 |
| 2 | 444.1 | 479.8 |
| 9 | 429.8 | 464.3 |
| 12 | 425.8 | 460.0 |
| 15 | 405.6 | 438.2 |
| 1 | 405.6 | 438.2 |
| 19 | 404.0 | 436.5 |
| 3 | 394.4 | 426.1 |
| 4 | 371.1 | 400.9 |
| 5 | 297.4 | 321.3 |

VII.5. Determinación de la reactividad de sueros humanos con P38 mediante la técnica de ELISA

Previo a la realización de las pruebas preliminares para evaluar la reactividad de los sueros humanos con los péptidos mimótopos expresados en fagos, fue necesario identificar sueros reactivos a la proteína de 38 kDa, a partir de una colección de sueros existente en el laboratorio. Se realizaron ensayos de ELISA (tres veces, tomando cada muestra por duplicado) para seleccionar una muestra de *al menos*, siendo diez de individuos sanos y diez de pacientes con tuberculosis activa.

Si bien es cierto que la capacidad de los mimótopos antigénicos para funcionar como reactivos de diagnóstico podría ser, en algunos casos, superior al antígeno recombinante, decidimos utilizar suero con reactividad confirmada hacia el antígeno completo para fines de una evaluación preliminar. Dado lo anterior, se probó la reactividad de 13 sueros de individuos sanos y 26 sueros de enfermos con la proteína de 38 kDa y a partir de estos ensayos se eligieron diez de cada lote para proceder con una evaluación preliminar de las clonas como antígenos sustitutos de diagnóstico.

Para seleccionar los sueros se utilizaron dos criterios. Primero, se tomaron los diez sueros de individuos sanos menos reactivos y los diez sueros de pacientes enfermos más reactivos. El segundo criterio que se consideró fue el uso de un intervalo de aceptación estadística, basado en el teorema de la desigualdad de Chebyshev para distribuciones no conocidas²:

$$P(\mu - k\sigma \leq X \leq \mu + k\sigma) \geq 1 - 1/k^2$$

En donde, μ es la media de la reactividad de los sueros sanos seleccionados bajo el primer criterio, medida en unidades de densidad óptica, σ es la desviación estándar, k es el número de desviaciones estándar consideradas y X es la reactividad obtenida experimentalmente.

² No se conoce la distribución de las poblaciones de sueros, por lo que no se puede considerar una distribución normal.

Por ejemplo, al considerar tres desviaciones estándar, $k=3$, $\mu=0.435$ (media de la reactividad de los sueros sanos, obtenida experimentalmente) y $\sigma=0.123$ (desviación estándar de la reactividad de los sueros sanos, obtenida experimentalmente), la probabilidad de que la reactividad se encuentre en el intervalo considerado es:

$$P(0.435 - 3(0.123) \leq X \leq 0.435 + 3(0.123)) \geq 1 - 1/9$$

$$P \geq 0.9 \rightarrow \text{mayor del 90\%}$$

Para efectos de determinación de la calidad del experimento, definimos un índice del 63.3%. Es decir, consideramos que la reactividad de los sueros de los individuos probados corresponde a un individuo sano si y solo si el valor obtenido se encuentra por debajo del valor de corte (VC) definido por $\mu+k\sigma$, donde $k=2.24$. Dada la desigualdad de Chebyshev, la probabilidad de certidumbre para este índice es del 90%³. Cualquier observación que quede por encima del valor de corte corresponde a un individuo enfermo con una probabilidad del 90% de certeza.

En la Figura 5 se muestra la reactividad de los sueros evaluados con la proteína de 38 kDa. A partir de este resultado, se seleccionaron los diez sueros sanos y diez sueros enfermos que se utilizaron posteriormente para la evaluación de las clonas obtenidas en la bioselección (Figura 6).

³ Hacemos notar que la desigualdad de Chebyshev nos otorga el límite inferior de la población, es decir, la probabilidad de encontrarnos en el intervalo es *mayor o igual* al 90%. Esto se debe a que no estamos haciendo ninguna suposición con respecto a la distribución. Si consideráramos una distribución normal, la probabilidad de estar en este intervalo sería del 97.5%.

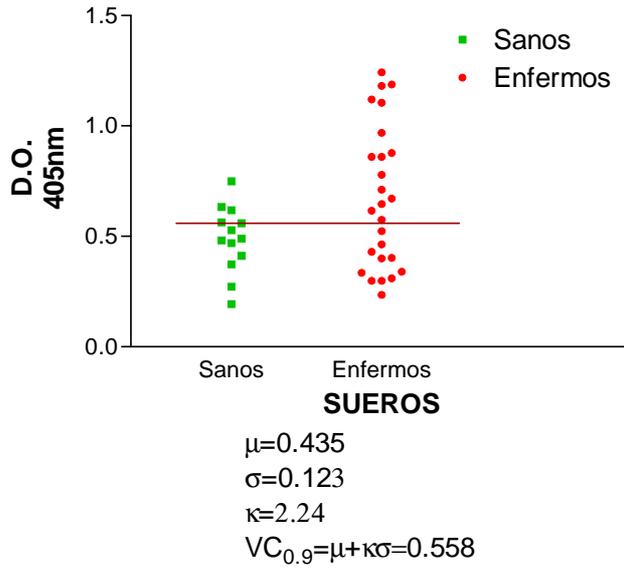


Figura 5. Reactividad de sueros humanos sanos y enfermos de tuberculosis con la proteína de 38 kDa.

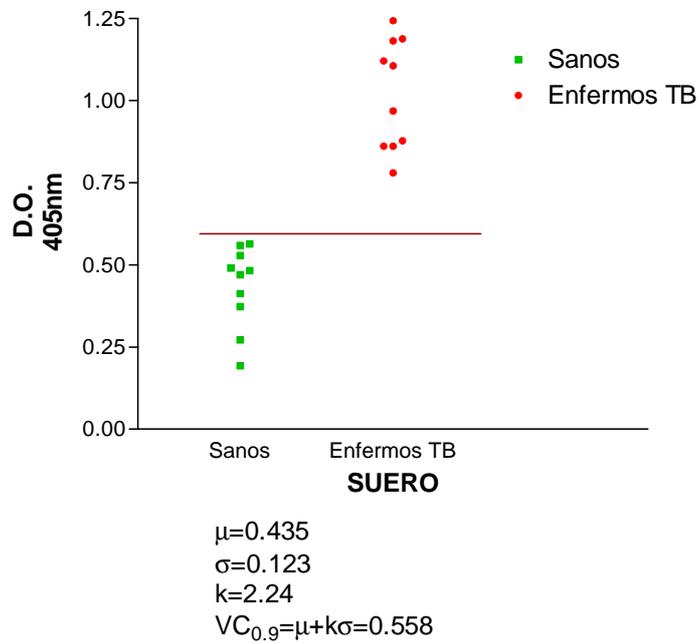


Figura 6. Sueros seleccionados para la evaluación de las clonas obtenidas en la bioselección con suero anti-P38.

El mismo criterio estadístico ($\mu+2.24\sigma$) fue utilizado a lo largo de este trabajo. Consideramos que el índice definido es suficientemente significativo dado el tamaño

de la muestra ($n=10$ para cada caso). Además, nos garantiza (con probabilidad del 0.9) que nuestras conclusiones son estadísticamente válidas.

VII.6. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Para examinar la serorreactividad de las clonas obtenidas en la bioselección se llevó a cabo un ensayo inmunoenzimático para cada clona. Se consideró como control negativo a M13. Se evaluaron dos diferentes fagos no relacionados (que expresan epítomos relacionados con el péptido β -amiloide de la enfermedad de Alzheimer): APP12-3.7 y APP12-3.12, referidos en las gráficas como NR1 y NR2, respectivamente.

Los resultados obtenidos con cada una de las clonas se muestran en las Figuras 7 a 27, y con los controles negativos en las Figuras 28 a 30. Las gráficas que se presentan corresponden a la lectura efectuada transcurridos aproximadamente 45 minutos de reacción colorimétrica.

Para determinar la calidad de la reactividad de los sueros enfermos con cada clona en contraste con la de los sanos, se consideró un valor de corte de $VC_9=\mu+2.24\sigma$, donde μ es la media de reactividad de los sueros sanos y σ es la desviación estándar de la misma, de acuerdo con el teorema de la desigualdad de Chebyshev (ver inciso VII.5). Cualquier valor de reactividad que cayera por debajo del valor de corte fue calificado como no reactor. Para considerar a un suero significativamente reactor contra la clona evaluada, su reactividad debió caer por encima del VC considerado.

En todos los casos, incluyendo a los controles negativos, la mayoría de los sueros sanos no presentaron reactividad alguna. Tan solo con las clonas 9, 12 y 13 (Figuras 15, 18 y 19) un suero sano reaccionó de manera significativa, siendo uno para la clona 9 y otro diferente para las clonas 12 y 13, es decir, se comportan como falsos positivos. Los sueros enfermos no presentaron reactividad alguna con los fagos

no relacionados NR1 ni NR2. Con las clonas obtenidas por bioselección, la reactividad de la mayoría de los sueros cayó por debajo del VC. La Tabla 4 presenta el número de sueros enfermos que reaccionaron de manera significativa con cada clona.

Tabla 4. Número de sueros enfermos reactivos con cada clona.

| % de sueros enfermos reactivos | Clona |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 10 | 12, 13, 15, 19 |
| 20 | 6, 7, 9, 14, 16, 17, 18, 20, 21 |
| 30 | 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11 |
| 40 | 5 |

La reactividad observada en la mayoría de las clonas (~67%), así como de los controles negativos, se encontró en un promedio de 1 a 1.5 unidades de densidad óptica. La clona que dio la menor reactividad fue la clona 8, por debajo de 0.5 unidades de densidad óptica. Sin embargo, estas diferencias no afectaron el comportamiento de los sueros.

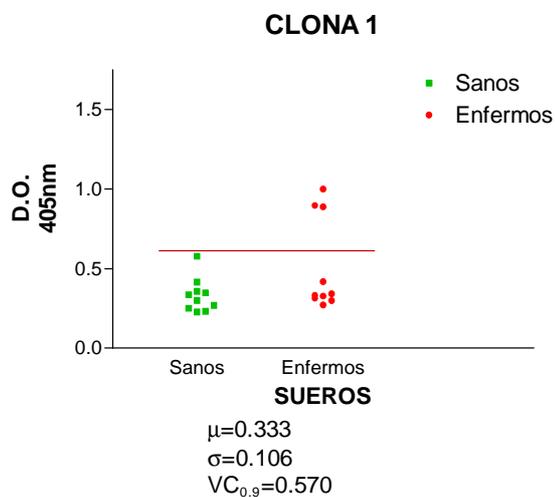


Figura 7. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 1.

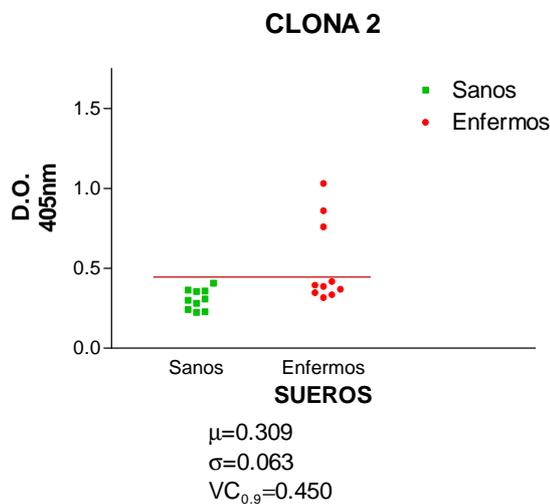


Figura 8. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 2.

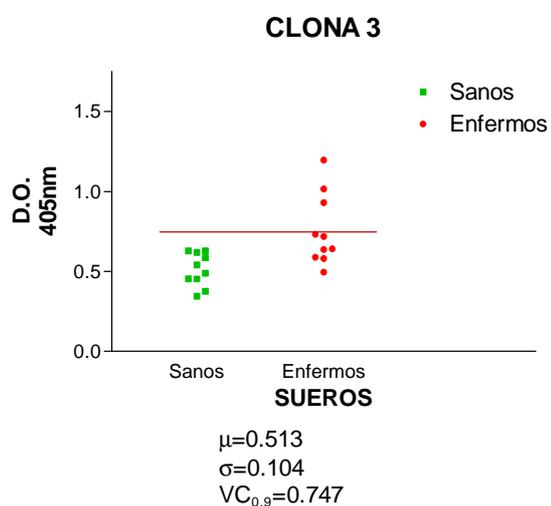


Figura 9. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 3.

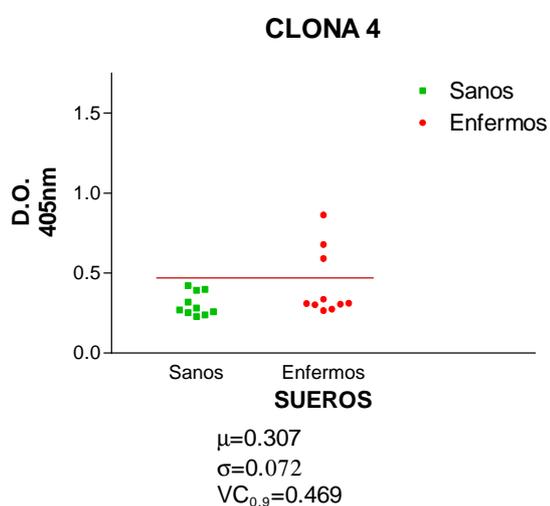


Figura 10. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 4.

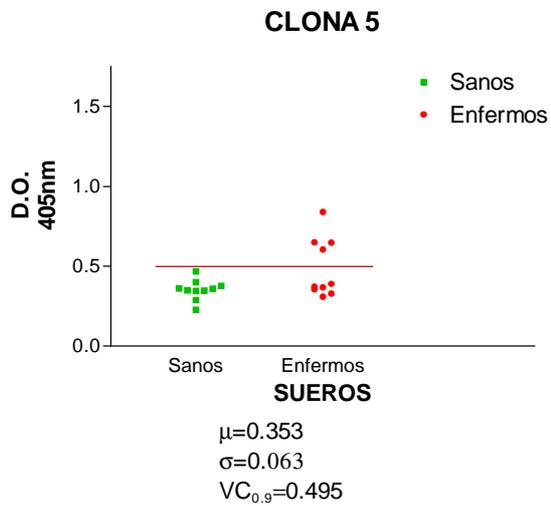


Figura 11. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 5.

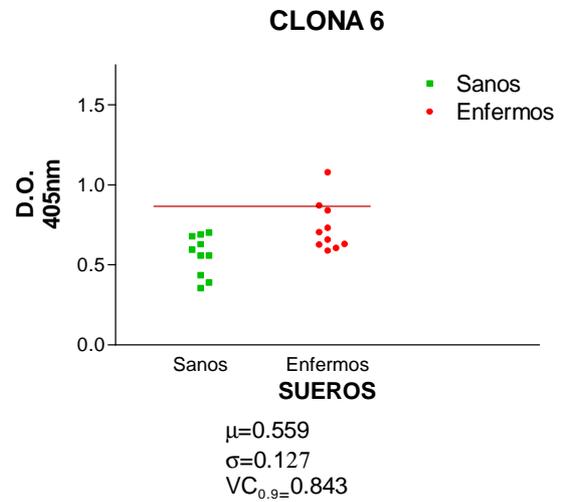


Figura 12. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 6.

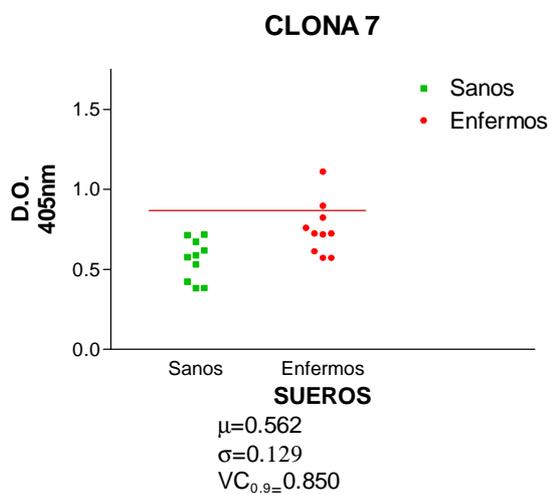


Figura 13. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 7.

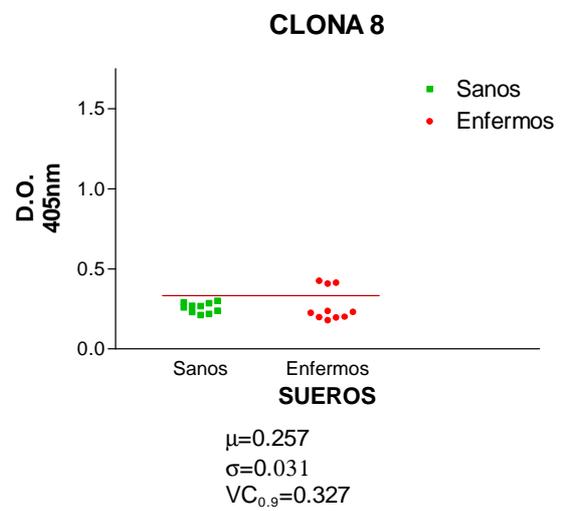


Figura 14. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 8.

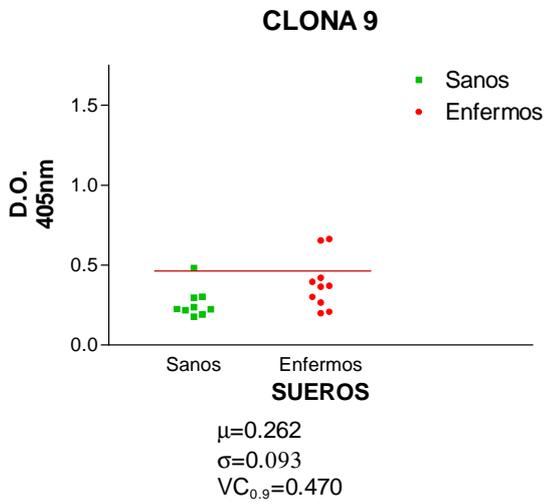


Figura 15. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 9.

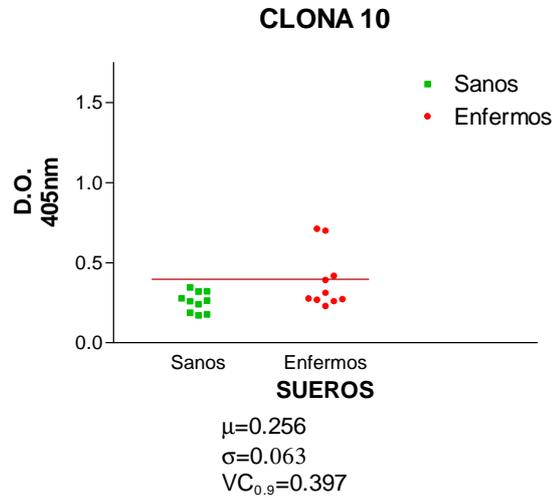


Figura 16. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 10.

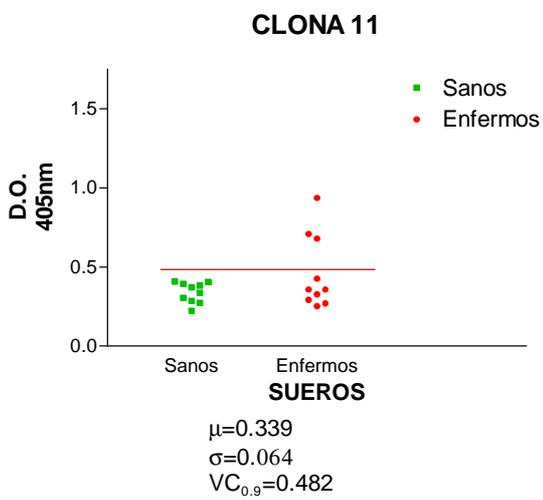


Figura 17. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 11.

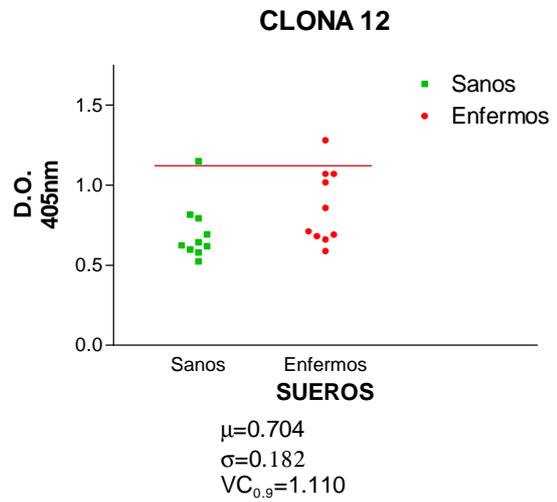


Figura 18. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 12.

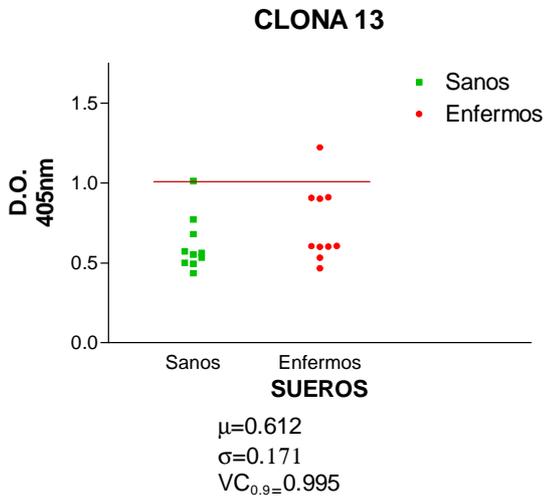


Figura 19. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 13.

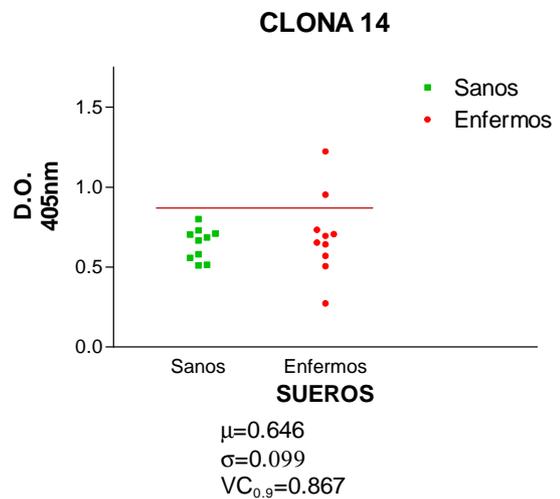


Figura 20. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 14.

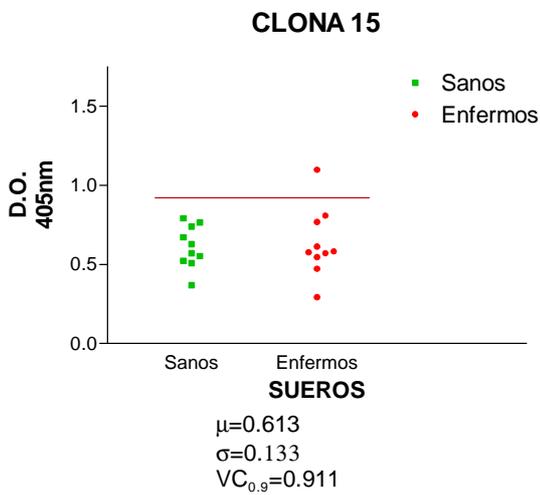


Figura 21. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 15.

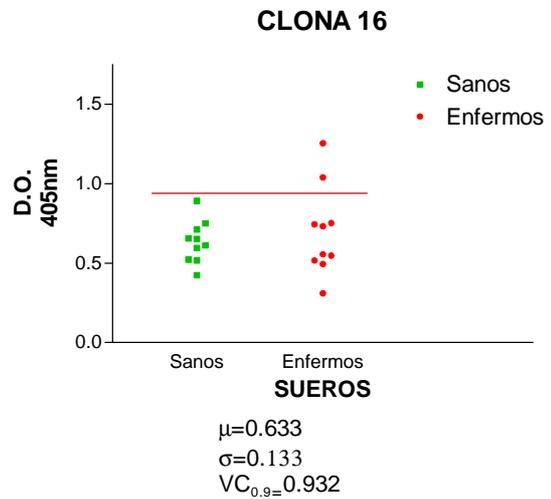


Figura 22. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 16.

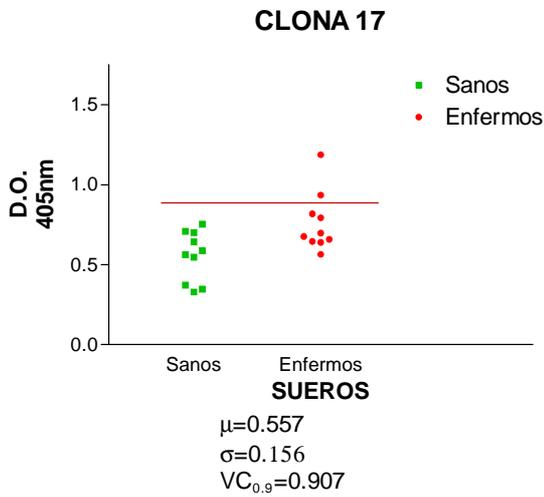


Figura 23. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 17.

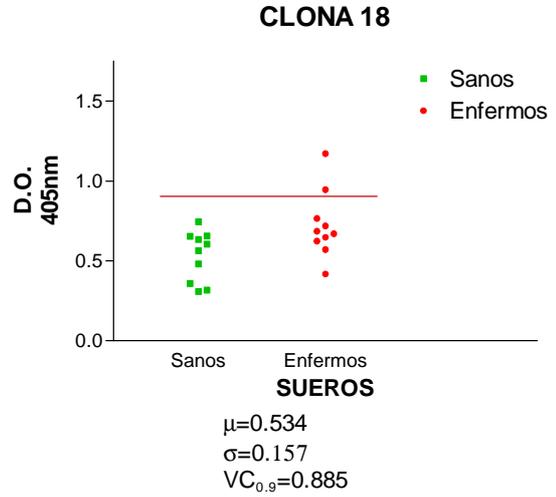


Figura 24. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 18.

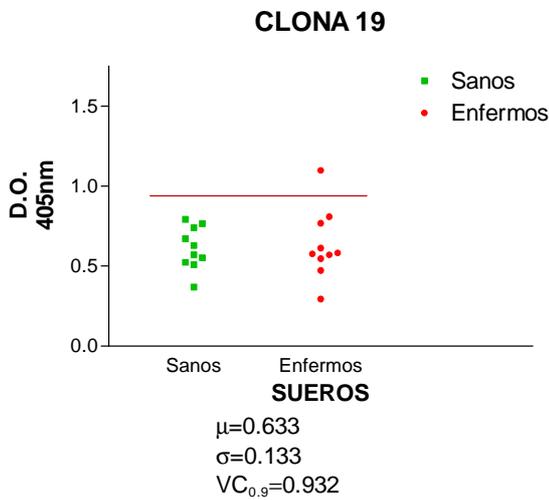


Figura 25. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 19.

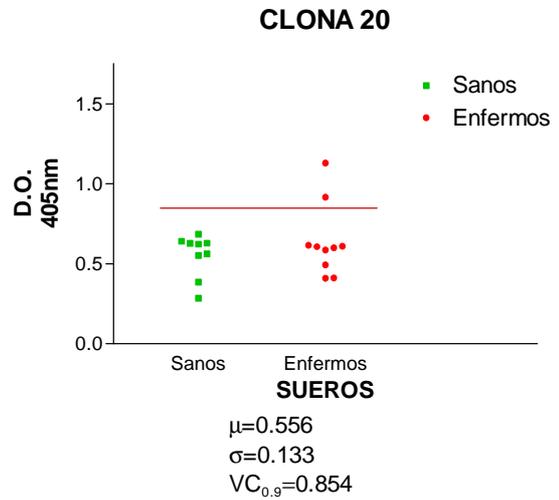


Figura 26. Reactividad de los sueros evaluados con la Clona 20.

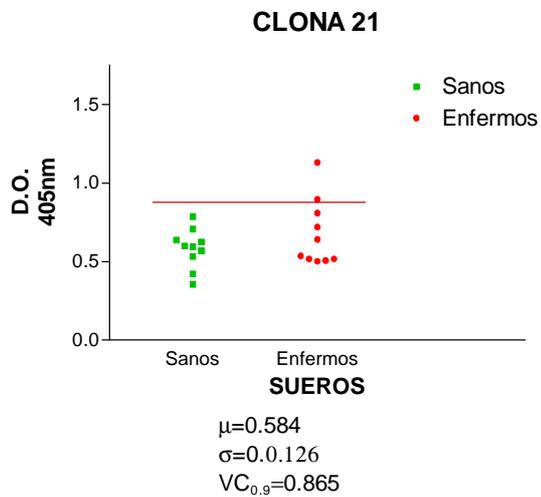


Figura 27. Reactividad de los sueros evaluados con la clona 21.

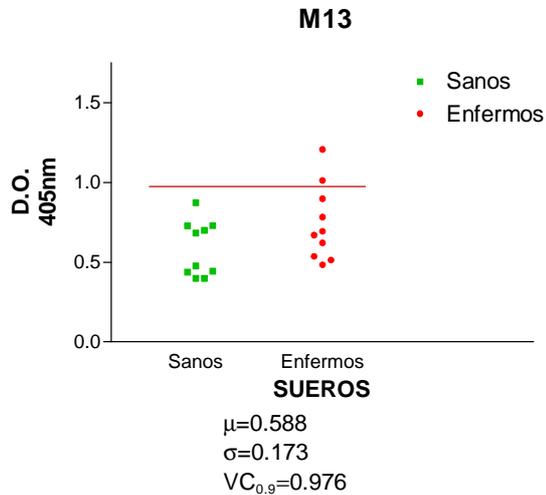


Figura 28. Reactividad de los sueros evaluados con el control negativo M13.

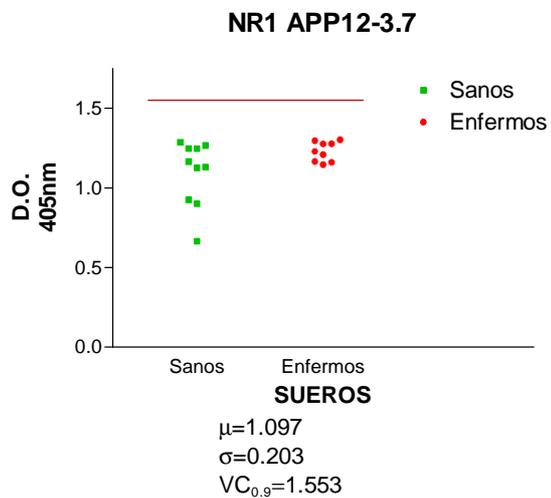


Figura 29. Reactividad de los sueros evaluados con el control negativo NR1.

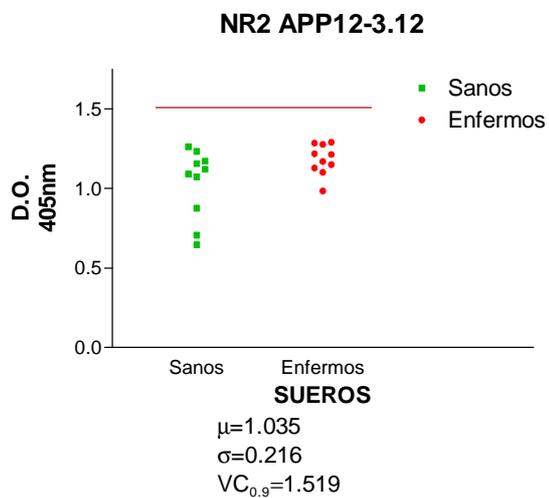


Figura 30. Reactividad de los sueros evaluados con el control negativo NR2.

VII.7. Purificación de ADN de cadena sencilla

A partir de las clonas se purificó ADN de cadena sencilla para secuenciarlo posteriormente. A través de un gel de agarosa al 1% en TBE 1X con bromuro de etidio se verificó la presencia y calidad del ADN purificado de las 21 clonas individuales (Figura 31). Se colocó ADN de una clona en su carril correspondiente.

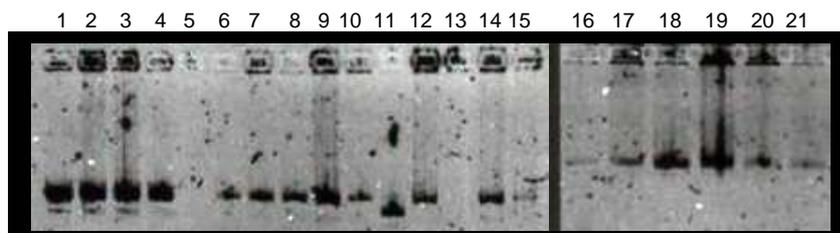


Figura 31. Muestras de ADN de cadena sencilla obtenidas a partir de las clonas que expresan mimótopos de la P38 en gel de agarosa al 1%.

Las bandas oscuras muestran la presencia del ácido nucleico. En los carriles 5 y 13 (clonas 5 y 13) no se ven bandas, lo que significa que no había ADN. En estos casos, se repitió la purificación y verificación de la presencia de ADN en gel de agarosa para proceder con la secuenciación .

VII.8. Secuenciación de ADN de cadena sencilla

Se secuenciaron las 21 clonas seleccionadas, ya que todas resultaron reactivas con los anticuerpos anti-P38 (ver Figura 4). Utilizando el método de Sanger se determinaron las secuencias de las 21 clonas en un gel de poliacrilamida 8% con un primer de -28pb. A través de la lectura del gel en dirección 5'→3' se sacó la secuencia de nucleótidos y a partir de la cadena complementaria 3'→5', se dedujo la secuencia de 12 aminoácidos expresados en los insertos de cada clona (Tabla 5). No se encontró ninguna secuencia compartida entre las clonas.

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de las clonas seleccionadas.

| Clona | Secuencia de Aminoácidos |
|-------|--------------------------|
| 1 | V A L S S A A S A E Y A |
| 2 | F S F Y T L I S R L N E |
| 3 | S L A S V W S L Y S * V |
| 4 | F * S S V A L * S A V F |
| 5 | V * V D * Y S A S D Y Y |
| 6 | S Y S V * A W A A * * Y |
| 7 | F A * Y L A D S * * S A |
| 8 | A C L I G G V I I M R C |
| 9 | V F A W V M L V D * S * |
| 10 | S V Y A * Y * G E S S V |
| 11 | S V S V G M K P S P R P |
| 12 | V Y S A G A S V S * A * |
| 13 | F Y V N D L G I V G I R |
| 14 | D V Y G F S G S F I * R |
| 15 | L G S * V S S * I L Y F |
| 16 | S G I I S T N Y G C C V |
| 17 | L G Q G R V V E R V L E |
| 18 | H P L D D H F V A S A R |
| 19 | A H K T A P T A P I P L |
| 20 | D R Y W D H E P R N P T |
| 21 | N F M E S L P R L G M H |

Los asteriscos (*) denotan sitios donde, en la secuencia nucleotídica⁴, se encuentra un codón de paro. Estos codones no afectan la expresión del péptido completo. La expresión de secuencias de ADN con codones de paro es un evento

⁴ La secuencia nucleotídica completa se presenta en el Apéndice III.

común, así como el cambio de marco de lectura y las “fallas” de los ribosomas (intercambio de aminoácidos u omisión de codones de paro) como mecanismos de regulación de expresión génica (Cárcamo *et al*, 1998). Se conoce que la cepa TG1 del fago M13 es supresora, es decir, que es capaz de ignorar el codón de término UAG. Por ello, la presencia de este codón no afecta la traducción de la proteína completa en el contexto del fago. Por otro lado, se ha reportado que el codón de paro UGA es el menos eficiente para la terminación de la síntesis de proteínas. La inserción un triptofano (W) en donde se encuentra UGA, e incluso en UAA, es frecuente (MacBeath y Kast, 1998). También se ha observado que los insertos que expresan los codones de término UGA y UAA se expresan de manera eficiente en *E. coli* (Cárcamo *et al*, 1998; Manoutcharian *et al*, 2003). Otra evidencia de que las clonas seleccionadas expresan correctamente el péptido (inserto) es que todas ellas reaccionaron de manera eficiente con los anticuerpos anti-P38 (Figura 3), lo que no hubiera ocurrido si el péptido estuviera incompleto.

VII.9. Análisis de similitud de secuencias

Las secuencias obtenidas se compararon con la proteína de 38 kDa haciendo un alineamiento múltiple utilizando los programas de computación BioEdit y ClustalW. Para realizar el alineamiento, se sustituyeron los codones de término UAA y UGA con un triptofano (W). Se encontró que todas las clonas tienen al menos cuatro aminoácidos de similitud con la proteína de 38 kDa. En la Tabla 6 se muestra la región de la proteína con la que tiene mayor similitud cada clona, así como el porcentaje de identidad de cada clona con la P38.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* se presenta a continuación:

```

      10      20      30      40      50
.....|.....|.....|.....|.....|
MKIRLHTLLA VLTAAPLLLA AAGCGSKPPS GSPETGAGAG TVATTPASSP
.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
VTLAETGSTL LYPLFNLWGP AFHERYPNVT ITAQGTGSGA GIAQAAAGTV
.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
NIGASDAYLS EGDMAAHKGL MNIALAISAQ QVNYNLPGVS EHLKLNKVL
.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
AAMYQGTIKT WDDPQIAALN PGVNLPGTAV VPLHRSDGSG DTFLLFTQYLS
.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
KQDEEGWGKS PGFGTTVDFP AVPGALGENG NGGMVTGCAE TPGCVAYIGI
.....|.....|.....|.....|.....|
     260     270     280     290     300
SFLDQASORG LGEAQLGNSS GNFLLPDAQS IQAAAAGFAS KTPANQAISM
.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350
IDGPAPDGYF IINYEYAIVN NRQKDAATAQ TLQAFLHWAI TDGNKASFLD
.....|.....|.....|.....|.....|
     360     370     380     390     400
QVHFQPLPPA VVKLSDALIA TISS

```

Tabla 6. Alineamientos de las clonas obtenidas con la proteína de 38 kDa y porcentajes de similitud. Los aminoácidos iguales se presentan sombreados y los intercambiables marcados con un recuadro. El número en la parte superior indica el sitio de P38 con el que se está comparando (Bordo y Argos, 1991). Para calcular los porcentajes se consideró como 100% a los 11 ó 12 aminoácidos del péptido (tomando en cuenta que el sistema se salta al codón de paro UAG, por lo que algunas clonas tienen tan solo 11 aminoácidos).

| Alineamiento | % de similitud |
|---|----------------|
| <p>CLONA 1 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** 0 120 130 140 150 ----- ----- ----- ----- MAIS- SAASABKA- ----- ----- ----- ----- 3EEDMAAAHKGLMNDATAAFSAQQQVMNLPGVSEHLKLNKVI </pre> | 58.3 |
| <p>CLONA 2 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** 50 60 70 80 ----- ----- ----- ----- FSPFHLIS-RLN- ----- ----- ----- ----- TPASSPVTLAETGSTLLYELFNLMGPAFHRYPNVTTITAAQG </pre> | 33.3 |
| <p>CLONA 3 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** 50 60 70 80 ----- ----- ----- ----- MAS- VNSLYS- VV- ----- ----- ----- ----- TPASSPVTLAETGSTLLYELFNLMGPAFHRYPNVTTITAAQG </pre> | 58.3 |
| <p>CLONA 4 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** 50 60 70 80 90 ----- ----- ----- ----- SSVALWSAVE- ----- ----- ----- ----- PVTTLAETGSTLLYELFNLMGPAFHRYPNVTTITAAQGTGSGA </pre> | 36.4 |
| <p>CLONA 5 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** ***** 50 70 80 90 100 110 ----- ----- ----- ----- ----- VVD- W- YS- AS- Y- ----- ----- ----- ----- LLYELFNLMGPAFHRYPNVTTITAAQGTGSGAGIAQAAAGTVNIGASLALISEG </pre> | 63.7 |
| <p>CLONA 6 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** 50 60 70 80 90 ----- ----- ----- ----- SSVM- ASSAMM- ----- ----- ----- ----- PVTTLAETGSTLLYELFNLMGPAFHRYPNVTTITAAQGTGSGA </pre> | 66.7 |
| <p>CLONA 7 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** ***** 190 200 210 220 ----- ----- ----- ----- EEM- LLA- DSW- RA- ----- ----- ----- ----- ASDGSQDTEFTCYLSKQDEEYKSPFSTTVDFPAVPG </pre> | 66.7 |
| <p>CLONA 8 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** ***** 220 230 240 250 ----- ----- ----- ----- LQ- L- G- VILMR- ----- ----- ----- ----- PTVDFEIVPGALGNGNGEMVFG- ABTPGCVAYIGISFLD </pre> | 58.3 |
| <p>CLONA 9 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** 50 160 170 180 190 200 ----- ----- ----- ----- ----- VLA- VMLVDS- ----- ----- ----- ----- LAAMVQGTIKTDDFQIAALNPGVNLPGTAVVFLHRSQDGTFLFTQLLSKQDEPG </pre> | 33.3 |
| <p>CLONA 10 P38</p> <pre> ***** ***** ***** ***** ***** ***** 60 70 80 90 ----- ----- ----- ----- SVI- AV- GSS- ----- ----- ----- ----- TGSTLLYELFNLMGPAFHRYPNVTTITAAQGTGSGAGLAQA </pre> | 63.7 |

Tabla 6. Continuación.

| Alineamiento | % de similitud |
|--|----------------|
| <pre> 20 30 40 50 Clona 11-----S V S V G M P-----S E R----- P38 A P L L L A A G C G S E P S G S E T G A G A G T V A T T E A S S P V T L A I </pre> | 58.3 |
| <pre> 10 50 60 70 CLONA 12-----V K S A G A S V S M----- P38 S T V A T T P A S S P V T L A E T G S E L L Y E L F N L M G P A F H E R Y P N V I </pre> | 58.3 |
| <pre> 110 120 130 140 CLONA 13-----P M V N-----L-----G V L----- P38 S D A M L S E C G M A A H R G M T A L A I S A Q Q V N Y N L P G V S E H L K L </pre> | 58.3 |
| <pre> 140 150 160 170 CLONA 14-----D V Y G-----P S G S P-----I N R----- P38 N L P G V S E H L R L N G K V L A A M Y Q C T I K T D D P Q I A A L N P G V N </pre> | 50 |
| <pre> 160 170 180 190 200 CLONA 15-----L S E-----S S E-----L Y E----- P38 Q S T L K M L D D P Q I A A L N P G V N L P G T A V V P L H R S D G S G D T F L E T Q Y L S </pre> | 72.7 |
| <pre> 20 230 240 250 260 CLONA 16-----S G I-----S T N-----Y G----- P38 P A V P G A L G E N G N G G M V T G A E T P G C V A Y I G I S F L D Q A S Q R G </pre> | 58.3 |
| <pre> 20 230 240 250 260 Clona 17-----G G-----G R V-----E R V L----- P38 P A V P G A L G E N G N G G M T G C A E T P G C V A Y I G I S F L D Q A S Q R G </pre> | 50 |
| <pre> 340 350 360 370 Clona 18-----H E-----D H F----- P38 F L H W A I T D G N K A S F L D Q V H F Q E P P A V V K L S L A L L A I S E </pre> | 50 |
| <pre> 30 40 50 60 Clona 19-----A H R T A E T-----R E T----- P38 S S K P P S G S P E T G A G A G T V A T T E A S S P V T L A E T G S T L L Y P L P </pre> | 58.3 |
| <pre> 200 210 220 230 Clona 20-----D R Y-----W D H E E-----R N E T----- P38 D T F L F T C Y L S R Q D P E G W K S E G F G T T V D F P A V P G A L G E N G </pre> | 33.3 |
| <pre> 210 220 230 240 Clona 21-----M E-----M E S L E-----R-----G M H----- P38 S G W G K S P S E G T T V D F P A V P G A L G E N G N G G M V T G C A E T P G C </pre> | 58.3 |

La mayoría de las clonas muestran una similitud del 58.3% (9 de las 21) con respecto a la P38. Los resultados (Tabla 6) confirman que la bioselección fue exitosa, debido a que se obtuvieron 21 clonas reactivas con el suero anti-P38 y, 17 de ellas expresan mimótopos con similitudes iguales o mayores al 50% con relación a regiones del antígeno original. La clona 15 alcanza una similitud hasta del 72.7%. Muchos dodecapéptidos pueden ser alineados con la proteína y mostrar similitud. Sin embargo, en algunos casos, como la Clona 15, la similitud es tan clara con ciertos motivos que sugiere mimetismo de la región.

Se puede observar que varios de los péptidos obtenidos mimetizan a una misma región o a regiones cercanas. Al comparar los sitios de la P38 en los que se alinean los mimótopos, resaltan las regiones del aminoácido 50-76, 193-200, 218-229 y 232-240 (Figura 32). La presencia de mimótopos que se sobrelapan en estas regiones sugiere que son sitios altamente antigénicos, puesto que el antisuero con el que se llevó a cabo la bioselección contenía muchos anticuerpos contra ellos y, por lo tanto, favoreció la selección de los mimótopos de estas zonas.

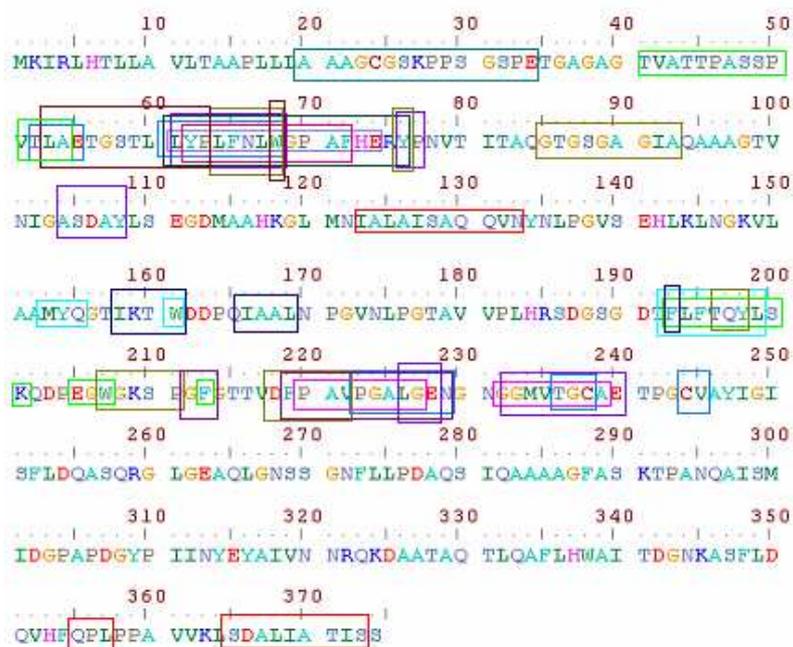


Figura 32. Regiones de la P38 mimetizadas por los 21 mimótopos seleccionados. Se encuadran de diferentes colores las regiones correspondientes a cada mimótopos

Los resultados de los ensayos de serorreactividad, muestran que no existe una relación evidente entre el porcentaje de similitud de los mimótopos con la P38 y su reactividad con los sueros enfermos. Asimismo, los alineamientos de los péptidos no relacionados utilizados como controles negativos en los inmunoensayos NR1 y NR2 con la P38 (datos no presentados) muestran cierta similitud. Sin embargo, ninguno de ellos reaccionó con los sueros de pacientes enfermos de TB.

Al realizar un alineamiento múltiple considerando todas las clonas con el software Clustal W se encontraron aminoácidos en común entre algunas de ellas (Tabla 7) y se obtuvo un árbol agrupándolas por similitud de secuencias (33). Sin embargo, aún cuando algunas clonas pertenecen al mismo grupo y/o comparten secuencias de aminoácidos, no mimetizan a la misma región de la P38. Por otra parte, es evidente que las clonas agrupadas en los mismos conjuntos no muestran ninguna relación en cuanto a su serorreactividad (Tabla 4).

Tabla 7. Alineamiento de secuencias obtenido con el programa Clustal W. Los aminoácidos iguales se presentan resaltados. Las clonas se presentan ordenadas de acuerdo a la similitud encontrada. El inicio para dar las posiciones de los aminoácidos se asignó arbitrariamente.

| Grupo | Clona | Secuencia | | |
|----------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | posición -1 01.....10.....15 | | |
| A | | | | |
| | AI | CLONA 4 | ---- FSSVALWSAVF -- | |
| | | CLONA 3 | -- SLASVWSLYSWV -- | |
| | | CLONA 2 | ---- FSFYTLISRLNE -- | |
| | | CLONA 15 | ---- LGSWVSSILYF -- | |
| | AII | CLONA 6 | SYSVWAWAAWVY ----- | |
| | | CLONA 10 | -- SVYAWYGE SSV----- | |
| | | CLONA 5 | --- VVDWYSASDYY ---- | |
| | | CLONA 7 | ---- FAWYLADSW -WSA | |
| | | CLONA 9 | --- VFAWVMLVDWSW -- | |
| | | CLONA 12 | --- VYSAGASVSWAW -- | |
| | | CLONA 14 | -- DVYGFSGSFIWR ---- | |
| | | B | | |
| | | | BI | CLONA 21 |
| CLONA 20 | | | | -- DRYWDHEPRNPT ---- |
| CLONA 13 | --- FYVNDLGIVGIR -- | | | |
| BII | CLONA 1 | ---- VALSSAASA EYA -- | | |
| | CLONA 18 | -- HPLDDHFVASAR ---- | | |
| | CLONA 11 | --- SVSVGMKPSPRP -- | | |
| | CLONA 19 | -- AHKTAPTAPIPL ---- | | |
| | CLONA 17 | ---- LGQGRVVERVLE -- | | |
| | CLONA 8 | -- ACLIGGVIIMRC ---- | | |
| | CLONA 16 | --- SGIISTNYGCCV -- | | |

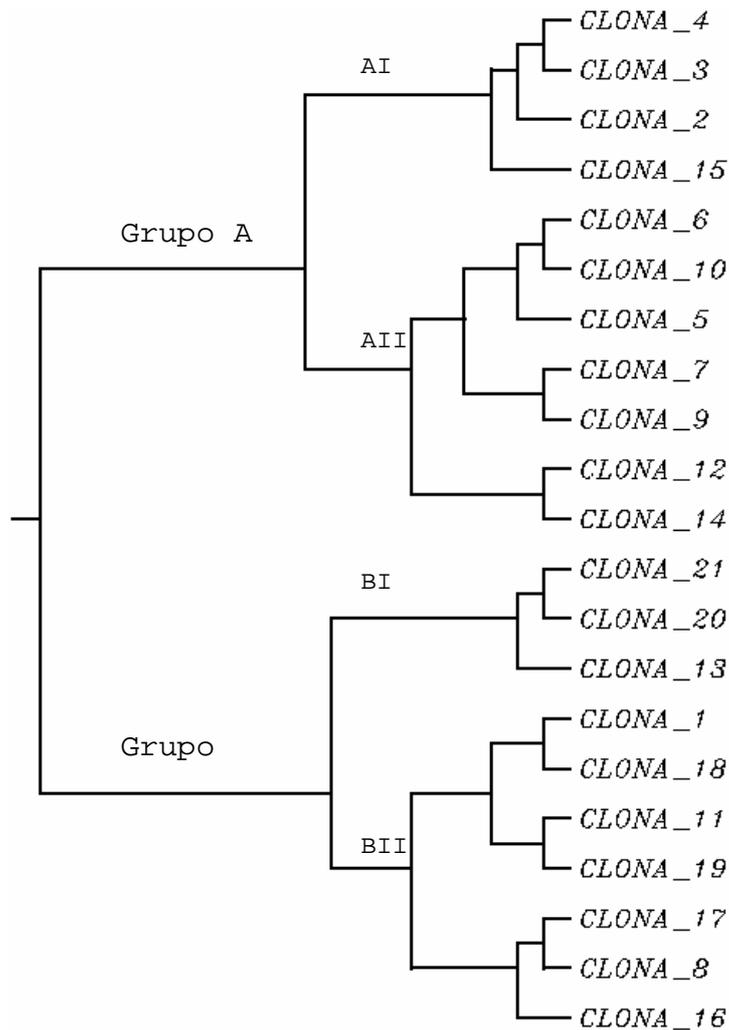


Figura 33. Árbol obtenido a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de las clonas obtenidas por afinidad a anticuerpos anti-P38.

Se encontraron dos grandes grupos, llamados A y B de manera arbitraria, y cada uno se subdivide, a su vez, considerando a detalle solamente a los primeros subgrupos: AI, AII, BI y BII. Se pueden observar secuencias de aminoácidos comunes entre algunas clonas dentro de los mismos grupos o subgrupos (Tabla 7). Sin embargo, se encontró que en 11 de las 21 clonas se encuentra un aminoácido aromático en la tercera posición, seguido por un aminoácido hidroxilado (S/T/A, intercambiables también con G) (Bordo y Argos, 1991).

El grupo A incluye once clonas. Es interesante notar que en el grupo A1, todas las clonas presentan una serina en la cuarta posición y el mismo aminoácido intercambiable (A/S/T) en la séptima. En el caso de las clonas 2, 3 y 4, se encuentran dos aminoácidos compartidos, resultando en una secuencia común de: S X X [AST] L X S. En el grupo A1, seis de las clonas presentan una valina en la segunda posición, seguida por un aminoácido aromático y uno hidroxilado. A partir de las clonas 5, 6, 7, 9, 10, 12 y 14 se puede mostrar la siguiente secuencia análoga: V [WYF] [ASG] [YX] X X X WXW. Las clonas de este grupo, además, incluyen muchos aminoácidos aromáticos, lo que podría estar relacionado con el mimetismo de la parte glicosilada de P38 (Jain *et al*, 2000; Monzavi-Karbassi *et al*, 2002).

El grupo B incluye las 10 clonas restantes. En los subgrupos de B se encuentra menos similitud entre las clonas que en el grupo A. En BI se observa que en la posición cuatro hay fenilalanina y tirosina, aminoácidos aromáticos intercambiables. Entre las clonas 20 y 21, además, se encuentran compartidos P y R en las posiciones siete y ocho. En el caso del subgrupo BII se encontró que cinco de las clonas comparten un aminoácido intercambiable, valina o serina, en la cuarta posición. Se encuentran algunos otros aminoácidos compartidos por algunas de las clonas de este subgrupo.

VIII. DISCUSIÓN

Se llevó a cabo la bioselección de péptidos expresados en fago según su afinidad con anticuerpos anti-proteína de 38 kDa. Se aislaron 21 clonas de fagos al azar, se realizaron ensayos de antigenicidad de estas clonas con el suero anti-P38 y se observó que todas ellas fueron reactivas, a diferencia de los controles negativos utilizados. Es importante mencionar que el suero policlonal anti-P38 fue obtenido en conejo, a partir de la inmunización con proteína de 38 kDa recombinante de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis*. Al probar la reactividad del suero anti-P38 con un extracto de proteínas totales de *M. tuberculosis*, éste presentó una alta reactividad (Figura 1) posiblemente como resultado de reacciones cruzadas o de previa exposición del animal a micobacterias del medio ambiente.

Al realizar las pruebas de mimetismo antigénico de las clonas (ensayos de antigenicidad), se observó que todas ellas son reconocidas por el suero anti-P38. No se encontró reactividad de los controles negativos (fago silvestre y péptido no relacionado expresado en fago). Estos resultados indican que los péptidos seleccionados corresponden a mimótopos antigénicos de la proteína de 38 kDa (Figuras 3 y 4).

Habiendo confirmado el mimetismo de los péptidos seleccionados, se procedió a realizar las pruebas de serorreactividad (Figuras 7 a 27). El estudio de la reactividad serológica con los mimótopos identificados en humanos fue restringido a individuos reactivos a la P38, por lo que se eligieron diez sueros sanos no reactivos y diez sueros enfermos de tuberculosis pulmonar activa reactivos con la proteína de 38 kDa (Figura 6). Es importante considerar que los sueros no necesariamente se deben comportar de la misma forma con la proteína original que con un péptido expresado en fago pero, para la realización de los ensayos preliminares, fue necesario delimitar un lote de trabajo. Utilizando el mismo lote de sueros, también se evaluó la serorreactividad de tres controles negativos: el fago silvestre M13 y dos fagos que expresan péptidos no relacionados.

En la mayoría de los casos (Tabla 4), el método mostró un 20% de sensibilidad, es decir, tan solo dos de los sueros de pacientes enfermos fueron reactivos. Del total de

los experimentos se obtuvo un intervalo de sensibilidad del 0 al 40%, dependiendo de la clona evaluada. La más eficiente fue la Clona 5, que reaccionó con cuatro sueros de enfermos (Figura 11). Solamente uno de los sueros enfermos reaccionó con todas las clonas incluyendo M13, pero no con los péptidos no relacionados. La falta de reactividad con las clonas no relacionadas permite descartar una reactividad inespecífica de dicho suero con el resto de las clonas.

La falta de reactividad de los sueros de individuos enfermos con TB podría deberse a una anergia del paciente hacia el epítipo mimetizado por el inserto. El suero hiperinmune anti-P38 utilizado para la bioselección fue obtenido en conejo, por lo tanto, aún cuando una clona haya resultado positiva en los ensayos de antigenicidad con anticuerpos anti-P38 (Figuras 3 y 4), se debe considerar que los anticuerpos humanos no necesariamente responderán de la misma forma.

Es muy importante considerar que los sueros de pacientes enfermos de TB utilizados para la evaluación de los mimótopos solamente están clasificados como de individuos con infección activa por baciloscopia positiva. Sin embargo, no se conoce la fase de la enfermedad, el sexo o edad del paciente, la presencia de otros padecimientos como infección por VIH y otros factores que podrían influir en su reactividad.

La obtención de una sensibilidad de hasta 40% de reactividad con el método evaluado resulta un valor considerablemente alto (la sensibilidad de la baciloscopia es del 50%), aunque no es posible dar un resultado concluyente con la muestra analizada ($n=20$).

En los ensayos realizados con los controles negativos los resultados no muestran reactividad de los sueros de enfermos de TB con los péptidos no relacionados, pero sí con el fago silvestre M13. En el ensayo con M13 (Figura 28) se encontró que dos sueros de pacientes con TB dieron una respuesta positiva. Esta se debe a que el fago es un parásito de *E. coli* y esta bacteria, a su vez, es un parásito intestinal del humano. La presencia de anticuerpos anti-M13 naturales en los humanos

explica la reactividad de los pacientes con este control negativo (Tafi *et al*, 1997). Por otro lado, los sueros de enfermos no reaccionaron con los fagos que expresan péptidos no relacionados, NR1 y NR2 (Figuras 29 y 30) lo que significa una respuesta específica de los sueros reactivos con las clonas que expresan a los mimótopos de la P38.

Se obtuvieron las secuencias de los péptidos (insertos) de las 21 clonas seleccionadas y se encontró que una de ellas (Clona 15) tiene similitud de hasta el ~73% con la proteína de 38 kDa (Tabla 6). Es importante considerar que la falta de similitud entre las secuencias del péptido y la P38 no excluye la posibilidad de mimetismo, es decir, que los insertos expresados podrían ser mimótopos de epítomos no proteicos (glicosídicos, por ejemplo) de la proteína de 38 kDa. La presencia de aminoácidos aromáticos en algunas clonas (Grupo All, Figura 33) podría estar relacionada con el mimetismo de la región glicosilada de la P38.

En algunos casos se puede proponer cuales son los epítomos mimetizados debido a la gran similitud con motivos lineales, como con las clonas 6 y 15. Por otra parte, en la Figura 32 se muestran sitios de la proteína de 38 kDa que podrían estar mimetizados por varios de los péptidos identificados. Lo anterior sugiere que dichas regiones son epítomos B, ya que fueron seleccionados preferencialmente por el antisuero anti-P38. Se han identificado muy pocos epítomos T de la P38 en *Mycobacterium bovis* (Haslov *et al*, 1990; Pollock *et al*, 1995). Ninguno de los epítomos propuestos ha sido reportado en la literatura.

Al obtener las secuencias de los péptidos mimótopos seleccionados y analizarlas junto con los resultados de los ensayos de serorreactividad (Tablas 4 y 6), se observó que no existe una relación evidente entre la similitud del péptido con la proteína original y su reactividad con los sueros enfermos. La clona que presentó mayor similitud con la proteína de 38 kDa fue la Clona 15, de casi un 73%. Sin embargo, es de las menos reactivas. La Clona 5 reaccionó con 40% de los sueros, sin embargo, presenta un 66.4% de similitud con la P38. Lo anterior demuestra la falta de relación entre la serorreactividad de las clonas y su similitud con la secuencia de la proteína de 38 kDa.

Asimismo, al alinear las clonas que expresan péptidos no relacionados con la P38, se encontró similitud pero no reaccionaron con los sueros de pacientes enfermos de TB.

Por otra parte, al realizar el alineamiento múltiple entre las secuencias de las clonas se obtuvo un árbol en el que se agruparon por similitud (Figura 33). Las clonas agrupadas en los mismos conjuntos no presentan ninguna relación en cuanto a su serorreactividad.

Los resultados obtenidos indican que, si bien los insertos son mimótopos antigénicos de la P38, el entorno del fago que los expresa y/o la metodología utilizada aún no permite proponerlos como reactivos de diagnóstico específicos. Sin embargo, estos resultados no pueden ser considerados como definitivos dado el número de la muestra y la falta de una mejor clasificación de los sueros. Es necesario corroborar los resultados preliminares con un número mayor de sueros. Asimismo, es interesante evaluar si al incluir una preadsorción de anticuerpos anti-M13 se mejora la eficacia del método, así como analizar el potencial de los mimótopos libres de fago (sintéticos) como reactivos de diagnóstico para la TB. Independientemente, es posible identificar y evaluar otras clonas ya que el pool de fagos derivado de la tercera ronda de bioselección a partir del suero policlonal anti-P38 representa una vasta fuente de péptidos mimótopos de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*.

IX. CONCLUSIONES

A partir de una biblioteca comercial de dodecapéptidos expresados en fagos, se obtuvieron satisfactoriamente por bioselección 21 clonas reactivas con el suero blanco hiperinmune anti-proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*.

Se comprobó la especificidad de los anticuerpos anti-P38 contra las 21 clonas obtenidas, lo que indica que los péptidos seleccionados corresponden a mimótopos/epítomos antigénicos de la P38.

En las pruebas preliminares de serorreactividad se observó que los mimótopos expresados en fagos presentan un intervalo de sensibilidad del 10 al 40% con los sueros probados. Estos resultados sugieren que el uso de mimótopos expresados en fago para inmunodiagnóstico presenta problemas de sensibilidad con la metodología evaluada. Alternativamente se sugiere la realización de una preadsorción de anticuerpos anti-M13 para limpiar el fondo del fago silvestre y evaluar los mimótopos libres de fago para mejorar la eficacia del método. Sin embargo, es necesario corroborar los resultados con un lote mayor de sueros.

Se secuenciaron los insertos de las clonas seleccionadas y realizaron análisis de similitud con la proteína de 38 kDa, obteniendo porcentajes de hasta el ~73% de identidad. Sin embargo, los resultados de los ensayos de serorreactividad para evaluar las clonas y dos controles negativos, mostraron que no existe ninguna relación entre el porcentaje de similitud de secuencia de la clona con P38 con la reactividad de los sueros de pacientes enfermos de TB.

Al realizar el alineamiento de los 21 mimótopos en la secuencia completa de la P38 se observó que varios de ellos se sobrelapan en cuatro regiones diferentes. Esto podría indicar que dichos sitios son epítomos B, los cuales no han sido previamente descritos.

X. PERSPECTIVAS

En este trabajo se obtuvieron 21 mimótopos de la proteína de 38 kDa y se realizaron pruebas preliminares utilizándolos como potenciales reactivos de inmunodiagnóstico. Con base en los resultados encontrados, resulta interesante desarrollar los siguientes aspectos:

1. Corroborar los resultados de las pruebas de serorreactividad utilizando una muestra mayor de sueros.
2. Evaluar si la preadsorción de anticuerpos anti-M13 permite mejorar la eficacia de la metodología.
3. Evaluar el potencial de los péptidos mimótopos libres de fago (sintéticos) como antígenos para el inmunodiagnóstico de la TB.
4. Explorar la capacidad de los mimótopos identificados expresados en fago o libres de éste como inmunógenos protectores contra la TB.
5. Corroborar que las regiones propuestas como motivos mimetizados son epítomos B de la proteína de 38 kDA.

XI. APÉNDICES

APÉNDICE I.

EVALUACIÓN DE MIMÓTOPOS ANTIGÉNICOS DEL ANTÍGENO 85 DE *M. tuberculosis* COMO REACTIVOS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO PARA LA TUBERCULOSIS

A.I. INTRODUCCIÓN

A.I.1.El Complejo Antígeno 85

Los antígenos de *M. tuberculosis* incluyen proteínas, carbohidratos y lípidos. Esto permite la existencia de un enorme número de antígenos y epítopes contra el cual puede responder el sistema inmune. Un componente importante del bacilo es un complejo formado por tres proteínas altamente inmunogénicas, de entre 30 y 32KDa. Estas proteínas participan en la transferencia de ácidos micólicos, componentes importantes de la pared celular del bacilo. A este complejo se le conoce como antígeno 85 (Kremer, *et al*, 2002).

El complejo del antígeno 85 (Ag85) se encuentra principalmente en la capa externa junto con lípidos y polisacáridos, además de ser secretado por el bacilo hacia fuera del fagosoma. Existen evidencias de que el Ag85 ayuda a la micobacteria a infectar a los macrófagos del hospedero por la vía del receptor de fibronectina, lo que lo hace un candidato ideal para blanco de nuevas medicinas.

Este complejo también es conocido como el antígeno preponderante del bacilo tuberculoso, ya que se ha encontrado respuesta humoral en la mayor parte de los enfermos con tuberculosis activa. El complejo antígeno 85 es el mayor inductor de respuesta celular protectora (Th1) contra la micobacteria.

El Ag85 ha sido propuesto como uno de los reactivos más prometedores para el inmunodiagnóstico de la TB ya que se ha reportado que tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 95%, por lo que sería una subunidad de vacunación y un reactivo de diagnóstico eficaz (Samanich, 1998; Daffé, 2000).

A.I.2. Mimótopos disponibles

Se utilizaron las clonas de fago M13 7-2.11, 7-3.3, 7-3.6, 9-2.4, 9-3.10, 12-2.2, 12-2.6, 12-2.21, que expresan péptidos mimótopos del Ag85 obtenidas por Jorge Moisés Valencia Delgadillo y Erika Segura en el Laboratorio de la Dra. Luz Ma. López Marín en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, mediante la metodología de despliegue en fagos (Valencia, 2004).

A.II. HIPÓTESIS

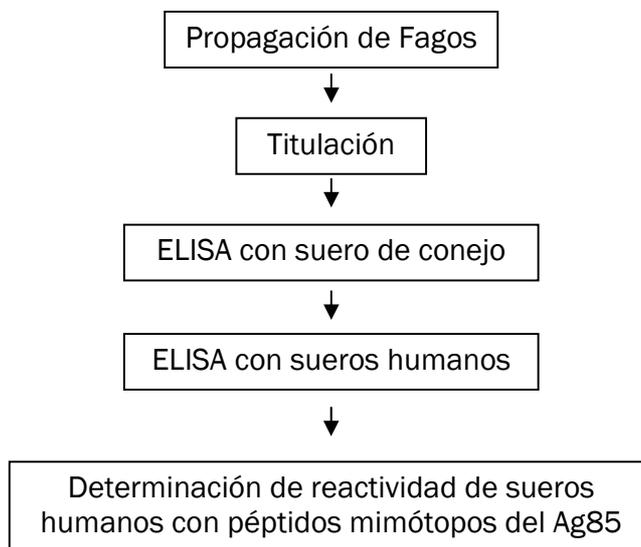
Péptidos que mimetizan al complejo Antígeno 85 de *M. tuberculosis* pueden ser utilizados como reactivos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

A.III. OBJETIVO

Evaluar la efectividad de los mimótopos del antígeno 85 para el diagnóstico serológico de la tuberculosis.

A.IV. METODOLOGÍA

A.IV.1. Esquema Metodológico



A.IV.2. Muestras Biológicas

El suero policlonal de conejo fue obtenido por Jorge Moisés Valencia Delgadillo y Erika Segura en el Laboratorio de la Dra. Luz Ma. López Marín en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Las muestras biológicas de sangre fueron donadas por el Hospital de Infectología Manuel Méndez del Centro Médico Nacional “La Raza” del I.M.S.S. en la Ciudad de México, de individuos enfermos con tuberculosis pulmonar activa, y de individuos sanos: PPD+, PPD- y vacunados. Los sueros sanos provienen del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A.IV.2. Propagación de Fagos

Ver inciso VI.7.

A.IV.3. Titulación de Fagos

Ver inciso VI.8.

A.IV.4. Determinación de la reactividad de sueros de conejo con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Ver inciso VI.9.

A.IV.5. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Ver inciso V.11.

A.V. RESULTADOS

A.V.1. Propagación

Se aislaron y propagaron mediante la infección de *E. coli* todas las clonas¹ que se utilizarán en este trabajo, así como los controles (M13 y APP 12-3.1) necesarios para la realización de los ensayos de ELISA. Se obtuvo como volumen final 1ml de cada una.

A.V.2. Titulación de Fagos

Se obtuvo un título de 10^{13} fagos/ml para cada una de las clonas, así como de los fagos control, mediante el conteo de unidades formadoras de placas.

A.V.3. Verificación de la reactividad de sueros de conejo con péptidos expresados en fagos mediante la técnica de ELISA

Se realizaron dos ensayos para la verificación de la reactividad del suero hiperinmune de conejo anti-antígeno 85 con los mimótopos expresados en los fagos. En el primero, Figura A1a, se observa que el suero preinmune resultó más reactivo ante las clonas que los sueros del animal inmunizado con antígeno 85 a diferentes tiempos post-inmunización para todas las clonas. Además, los controles negativos (fago silvestre sin inserto M13 y fago no relacionado APP) respondieron de la misma manera que las clonas probadas, lo que nulifica por completo el resultado del ensayo.

¹ Se le asignó, de manera arbitraria, un número a cada clona (1-7) para facilitar su manipulación.

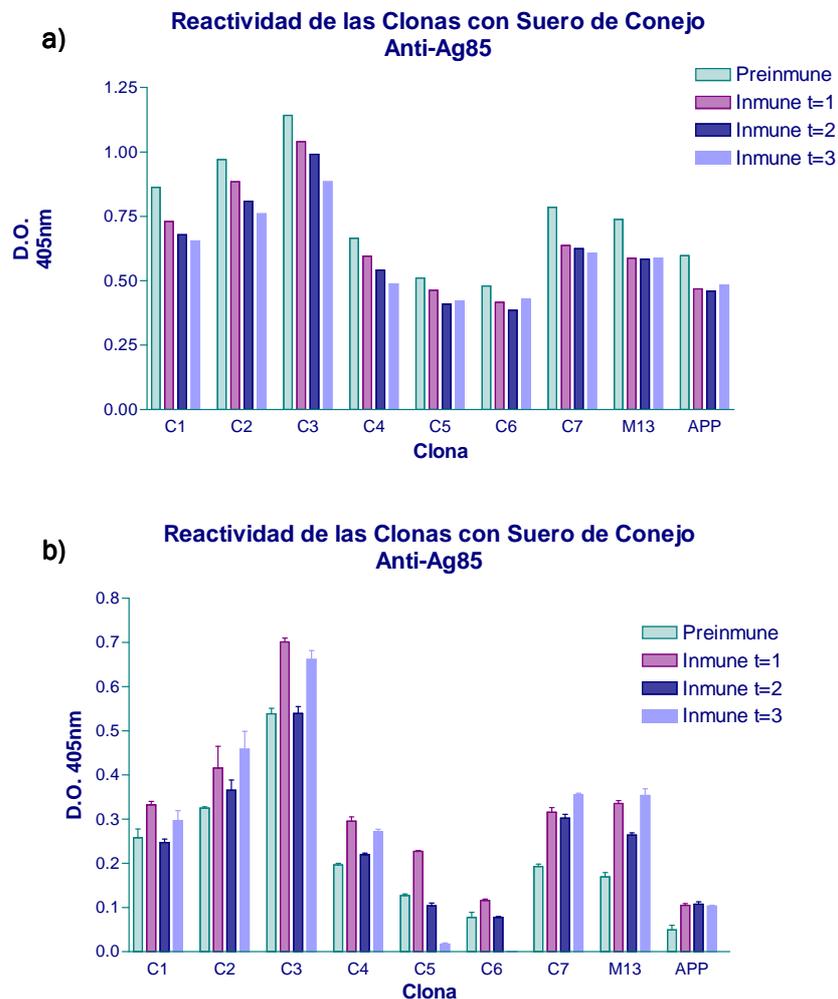


Figura A1. Resultados de los ensayos de ELISA realizados para evaluar la reactividad de las clonas con suero de conejo anti-Ag85.

Al repetir el ensayo se encontró que las clonas sí presentaron mayor reactividad ante los sueros hiperinmunes con diferentes tiempos de post-infección que con el suero preimmune. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre las reactividades de los sueros preimmune e hiperinmunes anti-Ag85. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura A1b.

Posteriormente, se realizó un ensayo en el que se utilizaron dos sueros como controles negativos: un suero anti-proteínas totales de *M. tuberculosis* y un suero no relacionado. Los resultados, mostrados en la Figura A2, muestran que

las clonas reaccionan tanto con sueros anti-Ag85 como con sueros de proteínas totales y suero no relacionado. De hecho, en todos los casos se encuentra una reactividad muy alta de las clonas con el suero no relacionado.

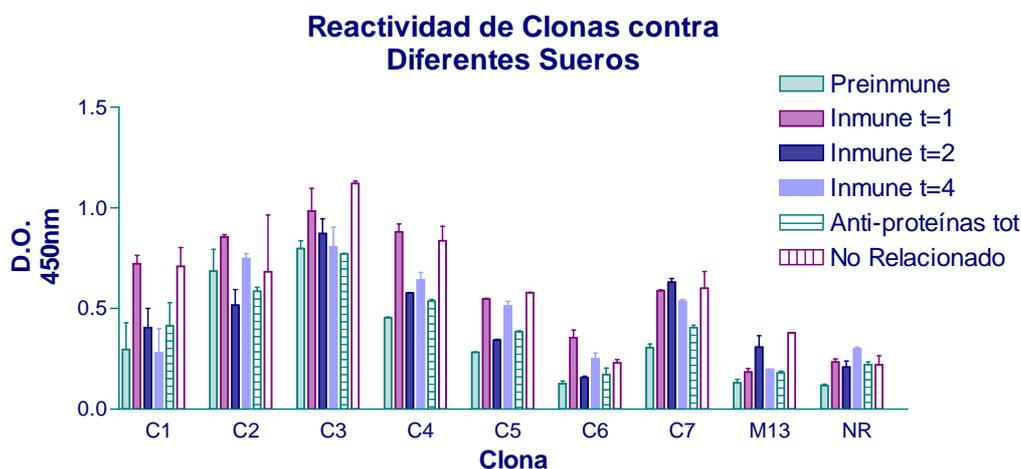


Figura A2. Resultados del ensayo realizado para evaluar la reactividad de las clonas con suero de conejo anti-Ag85, suero anti-proteínas totales de *Mycobacterium tuberculosis* y suero no relacionado.

Dados los resultados negativos en estos ensayos, se consideró la posibilidad de que los sueros hiperinmunes hayan sido afectados por el paso del tiempo (obtenidos en el 2004). Por esto, se realizó un ensayo de ELISA en el que se probaron los sueros con dos fracciones diferentes del antígeno 85 recombinante (Ag85r)², a falta de antígeno nativo. Se sensibilizó la placa con el Ag85r y con proteínas totales para probar diferentes sueros. Como control negativo se utilizó un suero preimmune no relacionado y el suero preimmune anti-Ag85 recombinante. Los controles positivos utilizados fueron el suero anti-proteínas totales de *M. tuberculosis* y un suero hiperimmune anti-Ag85 recombinante.

Al sensibilizar la placa con el Ag85r fracción A (Figura A3) se encontró que tanto el suero preimmune como los sueros hiperinmunes anti-Ag85 reaccionaron

² Las fracciones del Ag85, así como los sueros preimmune e hiperimmune correspondientes, fueron donadas por el laboratorio de la Dra. Clara Espitia Pinzón en el I.I.B.M. de la U.N.A.M.

de la misma manera, mientras que con las proteínas totales sí se nota una diferencia considerable. El suero anti-proteínas totales reacciona tanto con su blanco como con la proteína recombinante debido a que éste es similar al antígeno nativo, cuyos anticuerpos están presentes en el suero probado. El suero no relacionado no presenta reactividad con ninguno de los antígenos, por lo que sí fue un buen control negativo. Sin embargo, no se puede observar una diferencia significativa entre los sueros preinmune e hiperinmune anti-Ag85r.

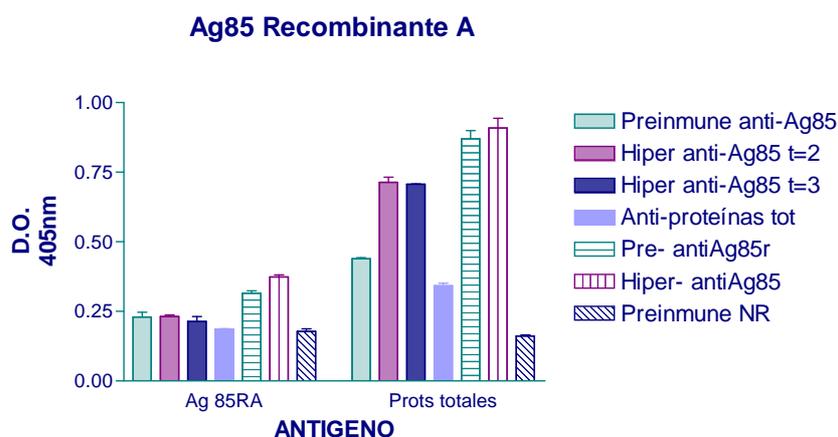


Figura A3. Prueba de diferentes sueros contra la fracción A del antígeno 85 recombinante.

Utilizando el Ag85r fracción B (Figura A4) para sensibilizar la placa se encontró que el suero preinmune reaccionó más que los sueros hiperinmunes anti-Ag85 contra el antígeno recombinante. Sin embargo, con las proteínas totales sí se nota una diferencia considerable entre el comportamiento de estos sueros. El suero anti-proteínas totales reaccionó con la proteína recombinante y con las proteínas totales, debido a que la fracción B del Ag85r es parecida al antígeno nativo, contra el cual hay anticuerpos presentes en el suero probado. El suero no relacionado no presentó reactividad con ninguno de los antígenos, igual que en el caso anterior. En este caso tampoco se puede observar una diferencia significativa entre los sueros preinmune e hiperinmune anti-Ag85r.

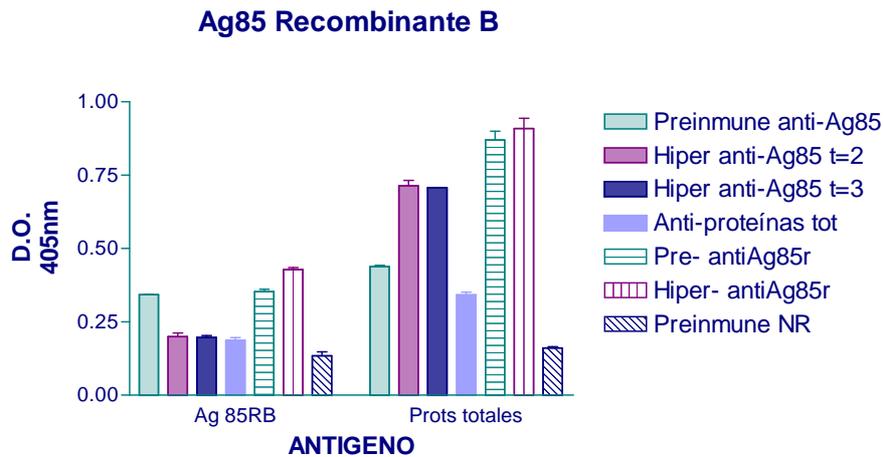


Figura A4. Prueba de diferentes sueros contra la fracción B del antígeno 85 recombinante.

La falta de diferencias entre las reactividades de los sueros preimmune e hiperimmune anti-Ag85r tanto para la fracción A como para la B descartó la posibilidad de utilizarlos para verificar el mimetismo de los péptidos expresados en las clonas de interés. Además, los resultados mostrados por los sueros preimmune e hiperinmunes anti-Ag85 nativo tampoco presentan reactividad considerable contra el antígeno recombinante, por lo que no se puede confirmar el estado de los sueros y confirmar que las clonas obtenidas previamente mimetizan al Ag85.

Debido a los resultados obtenidos, la falta de antígeno 85 nativo para la verificación de los sueros disponibles y la no disponibilidad del suero utilizado para obtener las clonas por bioselección, no ha sido posible confirmar que los péptidos previamente seleccionados sean mimótopos antigénicos del complejo antígeno 85 de *M. tuberculosis*.

A.VI. DISCUSION

Los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA (Figura A1) muestran que no hay la reactividad esperada de las clonas hacia el suero de conejo. Estos resultados no nos permiten corroborar el mimetismo antigénico para los péptidos seleccionados como mimótopos del antígeno 85 de *M. tuberculosis*. Obtener

nuevamente muestras del suero policlonal de conejo implicaría un trabajo arduo y exigiría de mucho tiempo. Por otro lado, es posible conseguir anticuerpos monoclonales anti-Ag85. Sin embargo, estos no permitirían evaluar la capacidad de mimetizar epítomos diversos.

Dado lo anterior, no ha sido posible concluir esta parte del proyecto hasta ahora. Sin embargo, se propuso alternativamente utilizar el suero policlonal anti-glicoproteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, producido por el laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia Pinzón para obtener los mimótopos de esta proteína y evaluar su potencial uso en el inmunodiagnóstico en proyectos futuros, así como obtener nuevamente fagos que expresen péptidos mimótopos del antígeno 85, para continuar con su evaluación.

A.VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En la literatura se ha reportado que los mimótopos son moléculas con gran potencial para el inmunodiagnóstico y para la elaboración de vacunas. En este trabajo se vio que los antígenos peptídicos de *M. tuberculosis* son blancos importantes para la elaboración mimótopos, que a su vez podrían ser utilizados para el diagnóstico de la TB. La verificación de la reactividad de los mimótopos del Antígeno 85 del bacilo de Koch con sueros de pacientes enfermos de tuberculosis, permitirá que se realice un nuevo método de diagnóstico eficiente, rápido, barato y seguro. Esta metodología puede ser distribuida a nivel nacional para ayudar a controlar de manera más eficiente a esta enfermedad responsable de millones de muertes en México y el mundo.

APÉNDICE II

OBTENCIÓN DE PROTEÍNA DE 38 kDa Y SUERO ANTI-P38

La proteína de 38 kDa y suero hiperinmune anti-proteína de 38 kDa utilizados en este trabajo fueron obtenidos en el laboratorio de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

I. Obtención de la proteína de 38 kDa

Se cultivó la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en medio líquido Sauton. Después de semanas de cultivo se filtró el medio de cultivo en membranas de 0.22µm y se aisló la proteína de 38 kDa. Esta proteína fue clonada en un vector de expresión y se incorporó en *M. smegmatis*.

Se recuperó la masa celular de *Mycobacterium smegmatis* recombinante y se pesó resuspendiendo en PBS 0.01 M 1X, 1g/ml. Se sonicó durante 15 minutos en frío. Se centrifugó durante 15 minutos a 10 000rpm en frío y se recuperó el sobrenadante. Se precipitó en frío con sulfato de amonio (NH₂SO₄) al 90% en agitación. Se centrifugó durante diez minutos a 10 000rpm. Se dializó contra agua durante toda la noche. Posteriormente, se dializó contra solución amortiguadora de acetatos pH 5 durante toda la noche. Se centrifugó durante diez minutos a 10 000rpm y se recuperó. El sobrenadante fue precipitado en etanol absoluto al 70% en agitación y en frío. Se centrifugó durante diez minutos a 10 000rpm. Se dializó con agua nuevamente durante toda la noche. Se concentró a la mitad del volumen.

Posteriormente, se corrió un gel de acrilamida para confirmar la presencia de la proteína. Se purificó por cromatografía de intercambio aniónico con columna HiTrap™ (utilizando el equipo ÄKTA™ prime de Amersham Pharmacia Biotech).

II. Obtención del suero anti-P38

Para obtener el suero anti-P38, se inmunizó subcutáneamente un conejo Nueva Zelanda hembra albina de 2.5kg con 100µg de proteína de 38 kDa en 500µl PBS 0.01 M + 500µl de adyuvante incompleto de Freund. Se le administró un refuerzo a la 3ª semana, con 200µg de proteína de 38 kDa en 500µl PBS 0.01 M + 500µl de adyuvante incompleto de Freund. Dos refuerzos idénticos fueron administrados a la 6ª y a la 10ª semana. Al término de la semana número 12 se sacrificó y el suero obtenido fue almacenado a -20 °C (Dillon *et al.*, 1999).

APÉNDICE III

SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LAS CLONAS SELECCIONADAS

| Clona | Secuencia de Nucleótidos |
|-------|---|
| 1 | GUC GCC UUA UCC UCG GCA GCC UCG GCA GAA UAC GCG |
| 2 | UUU UCA UUC UAC ACU CUU AUU AGU AGG CUG AAU GAG |
| 3 | UCC UUA GCA UCC GUA UGG UCC UUA UAC UCU UAA GUA |
| 4 | UUU UAG UCC UCA GUG GCC UUA UAA UCC GCU GUG UUC |
| 5 | GUU UAG GUC GAC UGA UAU UCC GCA UCA GAC UAC UAU |
| 6 | UCU UAC UCG GUU UGA GCA UGG GCC GCG UAA UGA UAU |
| 7 | UUU GCA UAA UAC UUA GCC GAU UCA UAA UGA UCU GCU |
| 8 | GCU UGU CUG AUA GGG GGC GUA AUA AUU AUG AGG UGC |
| 9 | GUC UUU GCG UGG GUA AUG UUA GUA GAU UGA UCU UGA |
| 10 | UCU GUA UAC GCU UGA UAC UAG GGU GAG UCU UCA GUA |
| 11 | UCU GUU UCU GUG GGU AUG AAG CCG AGU CCU AGG CCU |
| 12 | GUA UAC UCA GCA GGU GCU UCU GUA AGU UAA GCU UGA |
| 13 | UUC UAC GUC AAU GAC UUG GGC AUA GUU GGA AUC CGA |
| 14 | GAC GUA UAU GGC UUU UCG GGC UCA UUC AUU UGA CGA |
| 15 | UUG GGC UCC UAA GUU UCC UCG UAG AUC CUA UAU UUU |
| 16 | UCC GGG AUC AUU AGC ACG AAU UAU GGG UGC UGU GUA |
| 17 | UUG GGU CAG GGU CGG GUG GUU GAG CGG GUG CUG GAG |
| 18 | CAU CCU CUU GAU GAU CAU UUU GUG GCG UCU GCU AGG |
| 19 | GCG CAU AAG ACG GCU CCG ACG GCU CCU AUU CCG CUG |
| 20 | GAU CGG UAU UGG GAU CAU GAG CCG CGU AAU CCG ACG |
| 21 | AAU UUU AUG GAG UCU CUU CCU CGG CUG GGU AUG CAU |

APÉNDICE IV

REACTIVOS UTILIZADOS

Medio de cultivo Sauton enriquecido

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Citrato de hierro y amonio | 0.05g |
| Sulfato de magnesio | 0.5g |
| Fosfato monopotásico | 0.5g |
| Ácido cítrico | 2g |
| Asparagina | 4g |
| Glicerol | 60g ($\delta=1.2584$) = 47.7ml |
| H ₂ O cbp | 1000ml |

Ajustar pH a 7.3 utilizando NH₄OH. Esterilizar 30 minutos a 120°C y enriquecer en esterilidad con ácido pirúvico 0.5% y glucosa 0.5% (w/v)

Medio LB (Luria Beltrani)

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

Esterilizar por 25 minutos, almacenar a temperatura ambiente.

Top Agar

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Bacto Tryptone | 10g |
| Extracto de levadura | 5g |
| NaCl | 5g |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 19 |
| Agarosa | 7g |

Esterilizar por 25 minutos, almacenar a temperatura ambiente.

Medio 2xYT

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

Esterilizar por 25 minutos, almacenar a temperatura ambiente.

Solución amortiguadora de carbonatos 0.5M, pH 9.6

Solución Na_2CO_3 0.05M 31.8mg
Aforar a 200ml

Solución NaHCO_3 0.05M 21mg

Aforar a 500ml. Mezclar ambas soluciones hasta obtener pH de 9.6.

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

Dietanolamina 100ml

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 102mg

NaN_3 0.40g

Ajustar el pH hasta 9.8 con HCl. Aforar a un litro. Conservar al abrigo de la luz.

PEG/NaCl (8000)

NaCl 2.5M

Polietilenglicol (PEG 8000) 20% (p/v)

Esterilizar por 30 minutos, almacenar a temperatura ambiente.

TBS

Tris-HCl (pH 7.5) 50mM

NaCl 150mM

Esterilizar por 25 minutos, almacenar a temperatura ambiente.

Solución amortiguadora de Yodo

Tris-HCl (pH 8.0) 10mM

EDTA 1mM

NaCl 4M

Trietilamina 100mM

Trietilamina 13.85 μ l

H_2O 1ml

X-Gal/IPTG

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

Almacenar a -20°C .

TBE

| | |
|--------------|-------|
| Tris-HCl | 54g |
| Ácido bórico | 27.5g |
| EDTA | 20ml |

Gel de Agarosa 1%

| | |
|-------------------|-------------------|
| TBE | 100ml |
| Agarosa | 1g |
| Bromuro de etidio | 0.5 μl |

PBS 0.01 M

| | |
|---------------------------|--------|
| KH_2PO_4 | 0.01M |
| Na_2HPO_4 | 0.1M |
| NaCl | 1.37M |
| KCl | 0.027M |

GLOSARIO

Antígeno. Cualquier molécula que puede unirse específicamente a un anticuerpo. Su nombre procede de su capacidad de generar anticuerpos. Sin embargo, algunos antígenos no generan anticuerpos por si mismos; aquellos que pueden inducir su producción se denominan inmunógenos (Janeway *et al*, 2003).

Inmunógeno. Antígeno que induce una respuesta inmunitaria. No todos los antígenos son inmunógenos (Abbas y Lichtman, 2004).

Epítopo. Porción específica de un antígeno macromolecular a la que se une un anticuerpo (Abbas y Lichtman, 2004).

Mimótopo. Péptido que imita (mimetiza) estructural y/o funcionalmente una región (Geysen *et al*, 1986).

Granuloma. Acumulaciones de macrófagos activados que rodean las partículas antigénicas, que producen nódulos de tejido inflamatorio (Abbas y Lichtman, 2004).

XII. REFERENCIAS

1. Abbas A.K. y Lichtman A.H. 2004. Inmunología celular y molecular. Quinta edición. Editorial Elsevier España, S.A. Madrid.
2. American Thoracic Society. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**: 1376-1395.
3. Andersen A.B., Hansen E.B. 1989. Structure and characterization of antigenic domains of protein antigen b, a 38 000-molecular-weight protein of *M. tuberculosis*. *Infection and immunity.* **57(8)**: 2481-2488
4. Andersen A.B., Ljungqvist L., Olsen M. 2000. Evidence that protein antigen b of *M. tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J. Gen . Microbiol.* **136**: 477-478.
5. Azzazy H.M.E. y Highsmith W.E. 2002. Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry.* **35**: 425-445.
6. Beck S.T., Leite O.M., Arruda R.S., Ferreira A.W. 2005. Humoral response to low molecular weight antigens of *M. tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38(4)**:587-96
7. Bloom B.R. 1994. Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control. American Society for Microbiology. Washington, E.U.A. 637pp.
8. Bordo D. y Argos P. 1991. Suggestions for "safe" residue substitutions in site-directed mutagenesis. *J. Biol. Mol.* **217(4)**: 721-729.
9. Bothamley G.H., Beck J.S., Schreuder G.M., D'Amaro J., de Vries R.R., Kardjito T., Ivanyi J. 1989. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis* specific antibody levels with HLA. *J. Infect. Dis.* **159**: 549-555.
10. Bothamely G.H. y Rudd R.M. 1994. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of *M. tuberculosis*. *Eur. Respir. J.* **7**:240-246.
11. Brock I., Weldingh K., Lillebaek L., Follmann F., Andersen P. 2004. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**: 288-295.

12. Bruman W.J., Stone B.L., Reves R.R., Wilson M.L., Yang Z., el-Hajj H., Bates J.H., Cave M.D. 1997. The incidence of false-positive cultures for *M. tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**: 321-326.
13. Camus J.C., Pryor M., Médigue C., Cole S.T. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* **148**: 2967-2973.
14. Cárcamo J., Ravera M.W., Brissette R., Dedova O., Beasley J.R., Alam-Moghé A., Wan C., Blume A., Mandecky W. 1998. Unexpected frameshifts form gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 11146-11151.
15. Chan J. y Kaufmann S.H.E. 1994. *Immune mechanisms of protection*. ASM Press. E.U.A.
16. Chan E.D., Heifets L., Iseman M.D. 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tubercle and Lung Disease.* **80(3)**: 131-140.
17. Chang Z., Choudhary A., Lathigra R., Quioco F.A. 1994. The immunodominant 38-KDa lipoprotein antigen of *M. tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry.* **369 (3)**: 1956-1958.
18. Chiang, I.H., Suo J., Bai K.J., Lin T.P., Luh K.T., Yu C.J., Yang P.C. 1997. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**: 906-911.
19. Cole, S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry III C.E., Tekaia F., Badcock F., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrel B.G. 1998. Deciphering the biology of *M. tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**:537-393.
20. Colston M.J. 1997. The Immune Response to Tuberculosis. *J. Pharm. Pharmacol.* **49** (Suppl. 1): 37-41.
21. Crowther J.R. 2001. The ELISA Guidebook. Humana Press. EUA. 421 pp.

22. Crubézy E., Ludes B., Poveda J.D., Clayton J., Crouau-Roy B., Montagnon B. 1998. Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *Académie des sciences*. **321**: 941-95.
23. Daffé M. 2000. The mycobacterial antigen 85 complex-from structure to function and beyond. *Trends Microbiol.* **8(10)**:438-440.
24. Daniel T.M. y Debanne S.M. 1987. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**: 1137-1151.
25. Daniel T.M. 1996. Immunodiagnosis of tuberculosis. En: Rom W.N. y Garay S.M. (Eds.), Tuberculosis. Little, Brown & Company. EUA. Pp. 223.
26. Dannenberg Jr. A.M., Bishai W.R., Parrish N., Ruiz R., Johnson W., Zook B.C., Boles J.W., Pitt L.M. 2001. Efficacies of BCG and vole bacillus (*Mycobacterium microti*) vaccines in preventing clinically apparent pulmonary tuberculosis in rabbits,: preliminary report. *Vaccine* **19**: 796-800.
27. Demissie A., Abebe M., Aseffa A., Rook G., Fletcher H., Zumla A., Weldingh K., Brock I., Andersen P., Doherty T.M. 2004. Healthy individuals that control a latent infection with *M. tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4 delta 2. *J. Immunol.* **172(11)**: 6938-6943.
28. Demkow U., Ziolkowski J., Filewska M., Bialas-Chromiec B., Zielonka T. Michalowska-Titczuk D., Kus J., Augustynowicz E., Zwolska Z., Skopinska-Rozewska E., Rowinska-Zakrzewska E. 2004. Diagnostic value of different serological tests for tuberculosis in Poland. *J. Physiol. Pharmacol.* **55** (Suppl 3): 57-66.
29. Dillon D.C., Alderson M.R., Day C.H., Lewinsohn D.M., Coler R., Bement T., Campos-Neto A., Skeiky Y.A., Orme I.M., Roberts A., Steen S., Dalemans W., Badaro R., Reed S.G. 1999. Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel *M. tuberculosis* mTB39 gene family. *Infect. Immun.* **67(6)**: 2941-50.
30. Espita C., Cervera I., González R., Mancilla R. 1989. A 38-kD *M. tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin. Exp. Immunol.* **77**: 373-377.

31. Espitia C. y Mancilla, R. 1989. Identification, isolation and partial characterization of *M. tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin. Exp. Immunol* **77**: 378-383.
32. Espitia C., Elinos M., Hernández-Pando R., Mancilla R. 1992. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *M. tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infection and immunity*. **60 (7)**: 2998-3001.
33. Flynn J.A. y Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 93-129.
34. Gennaro M.L. 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **30** (Suppl. 3): S243-246.
35. Geysen H.M., Rodda S.J., Mason T.J. 1986. A priori delineation of peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Molecular Immunology*. **23 (7)**: 709-715.
36. Glickman M.S., Jacobs Jr. W.R. 2001. Microbial pathogenesis of *M. tuberculosis*. *Cell*. **23;104(4)**: 477-485.
37. Goyal M., Shaw R., Banerjee D., Coker R., Robertson D., Young D. 1997. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eu. Respir. J.* **10**: 1120-1124.
38. Greenway C., Lienhardt C., Adegbola R., Brusasca P., McAdam I K., Menzies D. 2005. Humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **(10)**: 1112-1119.
39. Harboe M. y Wiker H.G. 1992. The 38-kDa Protein of *M. tuberculosis*: a review. *The Journal of Infectious Diseases*. **166**: 874-884.
40. Houghton R.L., Lodes M.J., Dillon C.D., Reynolds L.D., Day C.H., McNeill P.D., Hendrickson R.C., Skeiky Y.A., Sampaio D.P., Badaro R., Lyashchenko K.P., Reed S.G. 2002. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. **9**: 883-891.
41. Jain D., Kaur K., Sundaravadivel B., Salunke D.M. 2000. Structural and functional consequences of peptide-carbohydrate mimicry. Crystal structure of a carbohydrate-mimicking peptide bound to concanavalin A. *J. Biol. Chem.* **275**: 16098-16102.

42. Janeway Jr. CA., Travers P., Walport M., Schomchik M.J. 2003. Inmunobiología. Segunda edición. Editorial Masson. México. 731 pp.
43. Kauffman S.H.E. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis. *Nature*. **Vol. 1**: 20-30.
44. Kaufmann S.H.E. y McMichael A.J. 2005. Annuling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine Supplement*. **11**(4): 33-44.
45. Katoch V.M. 2004. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* **120**: 418-428.
46. Kochi A. 2004. Gobal challenge of tuberculosis. *Lancet*. **344**: 608-609.
47. Kouzmitcheva G.A., Petrenko V.A., Smith G.P. 2001. Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**:150-160.
48. Kremer L, Maughan W.N., Wilson R.A., Dover L.G., Besra G.S. 2002. The *M. tuberculosis* antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Letters in Applied Microbiology*. **34**: 233-237.
49. Lefèvre P., Braibant W., De Wit L., Kalai M., Roeper D., Grötzinger j., Delville J.P., Peirs P., Ooms J., Huygen K., Content J. 1997. Tree different putative phosphate transport receptors are encoded by the *M. tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology*. **179** (9): 2900-2906.
50. Lodha R. Y Kabra S.K. 2004. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. *Indian J. Pediatr.* **71**(3): 221-227.
51. Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A., Cortese R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene*. **128**(1): 51-57.
52. Lyashchenko K., Colangeli R., Houde M., Al Jahdali H., Menzie, D., Gennaro M.L. 1998. Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. *Infection and Immunity*. **Vol. 6, No. 8**: 3936-3940.

53. Lyashchenko K.P., Singh M., Colangeli R., Gennaro M.L. 2000. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *Journal of Immunological Methods* **(242)**: 91-100.
54. MacBeath G. y Kast P. 1998. UGA read-through artifacts-when popular gene expression systems need a pATCH. *BioTechniques*. **24**: 789-794.
55. Manabe Y.C., Scott C.P., Bishai W. R. 2002. Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity*. **70(3)**: 1566-1570.
56. Manoutcharian K., Sotelo J., García E., Cano G., Gevorkian G. 1999. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocisticercosis using phage display peptide library. *Clin. Immunol.* **91**: 117-121.
57. Manoutcharian K., Acero G., Munguia M.E., Montero J.A., Govezensky T., Cao C., Ugen K., Gevorkian G. 2003. Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library. *Journal of Neuroimmunology* **145**: 12-17.
58. Menzies R., Vissandjee B., Rocher I., St. Germain Y. 1994. The booster effect in two-step tuberculin testing among young adults in Montreal. *Ann. Intern. Med.* **120**: 190-198.
59. Monzavi-Karbassi B., Cunto-Amesty G., Luo P., Kieber-Emmons T. 2002. Peptide mimótopos as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. *Trends Biotechnology*. **20**: 207-214.
60. Mullen L.M., Nair S.P., Ward J.M., Rycraft A.N., Henderson B. 2006. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends in Microbiology*. **14 (3)**: 141-147.
61. Mustafa A.S. 2002. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Molecular Immunology*. **39**: 113-119.
62. Noordhoek G.T., Van Embden J.D.A., Kolk A.H.J. 1993. Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *M. tuberculosis*. *N. Eng. J. Med.* **329**: 2036.

63. Pai M., Kalantri S., Dheda K. 2006. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **6**(3): 423-432.
64. Perkins M.D., Conde M.B., Martins M., Morris A.J. 2000. Serologic diagnosis using a simple commercial multiantigen assay. *Chest.* **123**: 107-112.
65. Pollock J.M., Douglas A.J., Mackie D.P., Neill S.D. 1995. Peptide mapping of bovine T-cell epitopes for the 38 kDa tuberculosis antigen. *Scand. J. Immunol.* **41**: 85-93.
66. Potter B., Rindfleisch K., Kraus C.K. 2005. Management of active tuberculosis. *American Family Physician.* **72**(11): 2225-2232.
67. Pottumarthy S., Wells V.C., Morris A.J. 2000. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 393-397.
68. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research.* **120**: 213-232.
69. Ramalingam B., Uma Devi K.R., Raja A. 2003. Isotype-specific anti-38 and 27 KDa (mpt 51) response in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. *Sacnd. J. Infect. Dis.* **35**: 234-239.
70. Reed S.G., Alderson M.R., Dalemans W., Lobet Y., Skeiky Y.A.W. 2003. Prospects for a better vaccine against tuberculosis. *Tuberculosis.* **(83)**: 213-219.
71. Ringold Sara. 2005. Tuberculosis. *The Journal of the American Medical Association.* **293**(22): 2820.
72. Robles Y., González E., Govezensky T., Mungia M.E., Acero G., Bobes R.J., Gevorkian G., Manoutcharian K. 2005. Isolation of *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocisticercosis. *Clinical Immunology.* **116**: 265-270.
73. Rose N.R. 1998. Immunodiagnosis. En: Gorgach, S.L., J.G. Bartlett, N.R. Blacklow (Eds.), *Infectious diseases.* W.B. Saunders. EUA. Pp. 145.
74. Rovatti E., Corradi M.P., Amicostante M. 1996. Evaluation of a western blot serum test for diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *Eur. Respir. J.* **6**: 288-292.
75. Russell D.C. 2001. *M. tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* **Vol. 2**: 1-9.

76. Russel M. 2004. Introduction to phage display and phage biology. En: Clackson, T. y H. Lowman. (eds.) *Phage Display: A practical approach*. Pp. 1-26. Oxford University Press.
77. Salo W.L., Aufderheide A.C., Buikstra J., Holcomb T.A. 1994. Identification of *M. tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:2091-2094.
78. Samanich K.M., Belisle J.T., Sonnenberg M.G., Keen M.A., Zolla-Pazner S., Laal S. 1998. Delineation of Human Antibody Responses to Culture Filtrate Antigens of *M. tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*. **178**: 1534-8.
79. Samanich K.M., Keen M.A., Vissa V.D., Harder J.D., Spencer J.S., Belisle J.T., Zolla-Pazner S., Laal S. 2000. Serodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of *M. tuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **7(4)**: 662-668.
80. Santamaría H., Manoutcharian K., Rocha L., González E., Acero G., Govezensky G., Uribe L.I., Olguin A., Paniagua J., Gevorkian G. 2001. Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus – infected patients using phage display libraries. *Clinical Immunology*. **101(3)**: 296-302.
81. Senthil Kumar K.S., Uma Devi K.R., Alamelu R. 2002. Isolation and evaluation of diagnostic value of two major secreted proteins of *M. tuberculosis*. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* **44(4)**: 225-232.
82. Scholssberg D. 1999. Tuberculosis and nontuberculosis mycobacterial infections. 4a edición. 422pp.
83. Sharma A., Saha A., Bhattacharjee S., Majumdar S., Das Gupta S.K. 2006. Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. *Clin. Vaccine Immunol.* Published online ahead of print on August 19, 2006.
84. Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. **228**:1315-1316.
85. Smith G.P. y Petrenko V.A. 1997. Phage Display. *Chem. Rev.* **97**: 391-410.
86. Sompuram S.R., Kodela V., Ramanathan H., Wescott C., Radcliffe G., Bogen S.A. 2002. Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial

- libraries as a immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. *Clin. Chem.* **48**(3): 410-429.
87. Sorensen A.L., Nagai S., Houen G., Andersen P., Andersen A.B. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.* **63**: 1710-1717.
88. Tafi R., Bandi R., Prezzi C., Mondelli M.U., Cortes, R., Monaci P., Nicosia A. 1997. Identification of HCV core mimotopes: improved methods for the selection and use of disease-related phage displayed peptides. *Biol. Chem.* **378**: 495-502.
89. Thomas M.D. y Debanne M.S. 1987. The serodiagnosis of Tuberculosis and other mycobacterial diseases by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Am. Respir. Dis.* **135**: 1137-1151.
90. Torres A., Juárez M.D., Cervantes R., Espitia C. 2001. Molecular analysis of *M. tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microbial Pathogenesis.* **30**: 289-297.
91. Torres C., Mujica O.J. 2004. Health, equity, and the Millennium Development Goals. *Rev. Panam. Salud Pública.* **15**(6): 430-439.
92. Uma Devi K.R., Ramalingam B., Brennan P.J., Narayanan P.R., Raja, A. 2001. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *M. tuberculosis* 38 kDa antigen in tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* **81**(3): 249-253.
93. Valencia Delgadillo, J.M. 2004. *Identificación de mimótopos del antígeno 85 de M. tuberculosis*. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
94. Villalba J., Valdespino J.L., Anzaldo G., Balandrano S., Bobadilla M., García A.E., Gacía M.L., Mancilla R., Martínez J., Olivera H., Olvera R., Palacios M., Quiroz G., Sada E., Santos J.I., Sifuentes J., Vaca M.A., Yáñez L.B. 1999. Tuberculosis. En: De la Fuente J.R., Sepúlveda S.J. (eds.) *Diez problemas relevantes de la salud pública en México*. pp 59-87. Fondo de Cultura Económica. México.
95. Vyas N.K., Vyas M.N., Quijcho F.A. 2003. Crystal structure of M tuberculosis ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure v11*. pp.765-774.

96. Warren J.R., Bhattacharya M., De Almeida K.N., Trakas K., Peterson L.R. 2000. A minimum 5.0ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for *M. tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. **161**:1559-1562.
97. Weldingh K., Rosenkrands I., Okkels L.M., Doherty T.M., Andersen P. 2005. Assessing the Serodiagnostic potential of 35 *M. tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *Journal of Clinical Microbiology*. **43(1)**: 57-65.
98. Wright A., Bai G., Barrera L., Gilpin C., Drobniewsky F., Havelková M., Martín-Casabona N., Lepe R., Lumb R., Metchock B., PortaLes F., Rodrigues M., Rüscher-Gerdes S., Van Deun A., Vincent V., Leimane V., Riekstina V., Skenders G., Holtz T., Pratt R., Laserson K., Cegielski P., Shah N.S. 2006. Emergence of *M. tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2002-2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **55(11)**: 301-305.
99. Xu L, Jin B.Q., Fan D.M. 2003. Selection and identification of mimic epitopes for gastric cancer-associated antigen MG7. *Ag. Mol. Cancer Therap*. **2(3)**:301-306.
100. Yew W.W. y Leung C.C. 2006. Update in tuberculosis 2005. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **173**. 491-498.
101. Young D.B. y Garbe T.R. 1991. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol*. **142**: 55-65.
102. Young D.B. y Robertson B.D. 1998. Approaches to combat tuberculosis. *Current opinion y biotechnology*. **9**:650-652.
103. Yu M, Than K, Colegate S., Shiell B, Michalski W.P., Prowse S., Wang L.F. 2005. Peptide mimotopes of phomopsins: identification, characterization and application in an immunoassay. *Mol. Divers*. **9(1-3)**:233-240.
104. WHO, Global Report, Tuberculosis. Publicado el 22 de marzo de 2006 por la Organización Mundial de la Salud.
105. Manuales del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: SUIVE, SUAVE, SEED. EPI-TB, DGE/SSA. Datos preliminares reportados a la semana 5 de 2006.

XIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- a. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. Cuarta edición. Garland Science. E.U.A. 1463 pp.
- b. Anderson R.M. 1998. Tuberculosis: old problems and new approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 13352-54.
- c. Bloom BR. y Murray C.J.L. 1992. Tuberculosis: a commentary on a reemergent killer. *Science*. **257**:1055-1064.
- d. Bohinsky, R.C. 1998. Bioquímica. Quinta edición. Editorial Addison Wesley Iberoamericana. México. 739pp.
- e. Glickman M.S. y Jacobs Jr. W.R. 2001. Microbial pathogenesis of *M. tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell*. **104**: 477-485.
- f. Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press y Cell Press. E.U.A. 990 pp.
- g. Nelson D.L. y Cox M.M. 2003. Lehninger principles of biochemistry. Tercera edición. Worth Publishers. E.U.A. 1152 pp.
- h. Madigan M.T., Martinko J.M, y Parker J. Brock. 2006. Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Educación, S.A. Madrid. 1011 pp.
- i. Rom W.N. y Garay S.M. (eds) 1996. Tuberculosis. Little, Brown & Company. E.U.A. 1002 pp.