



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
Mycobacterium arupense AISLADA DE AGUAS DE
USO Y CONSUMO HUMANO

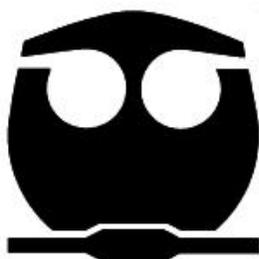
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN SEBASTIAN CELIS MENESES



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Enrique Moreno Saenz

Vocal: Profa. Norma Angélica Castellanos Chávez

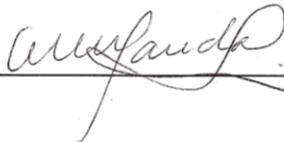
Secretario: Dra. Yolanda López Vidal

1er Suplente: Prof. Alejandro Camacho Cruz

2do Suplente: Profa. Antonia Isabel Castillo Rodal

Sitio donde se desarrolló el tema: Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el 4º piso del edificio de investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor: Dra. Yolanda López Vidal



Supervisor Técnico: cDr. Hugo Esquivel Solis



Sustentante: Juan Sebastian Celis Meneses



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por todo su apoyo y asesoría brindada para la realización de la tesis. Al cDr. Hugo Esquivel Solís por su asesoría técnica y apoyo durante todo este proyecto. A la M. en C. Jacqueline Larracilla Camacho por su orientación y paciencia en el área de proteómica.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al programa PRONABES por el apoyo brindado durante la licenciatura.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser. Facultad de Medicina. Departamento de Medicina Experimental en dónde se realizó la inmunización y mantenimiento de los ratones

Dra. Annie Pardo. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Bioquímica dónde se realizó la isotipificación de los anticuerpos.

El trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos: DGAPA-PAPIIT IN209708, “Estudio de la respuesta del macrófago activado por IFN-gamma a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*”; CONACyT 68729, “Caracterización genética, proteómica e inmunológica de la subcepa Bacilo de Calmette-Guerin BCG-México”; Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y escuelas del Macroproyecto: Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública SDEI.PTID.05.4

Opto por no ser un hombre común.

Es mi derecho ser un hombre diferente, si puedo.

Busco la oportunidad, no la seguridad.

Rechazaré ser un ciudadano cuidadoso, humilde y aburrido al hacer que mi estado y mi nación vean por mí.

Quiero soñar y construir, fracasar y triunfar, nunca ser un número entre aquellas almas tímidas y débiles que no han conocido ni la victoria ni el fracaso

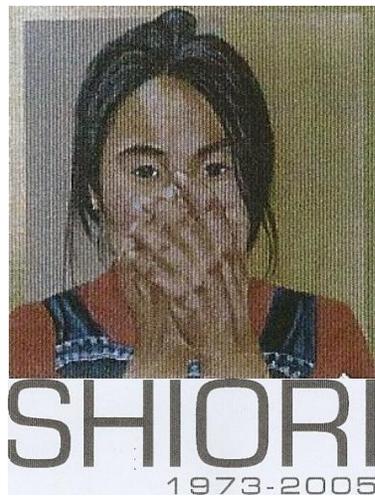
Sé que los llamados placeres momentáneos no pueden confundirme con un estado de felicidad.

Sé que puedo obtener una medida de satisfacción interna de cualquier trabajo si planeo de manera inteligente y lo ejecuto valientemente.

Sé que si pongo cada gota de fuerza que poseo – física, mental y espiritual- hacia el logro de una tarea valiosa, y si caigo extenuado por el camino, la “mano invisible” me alcanzará y me levantará.

Sí, quiero vivir peligrosamente, planear mi proceder con base en riesgos calculados, resolver los problemas de cada día para tener paz interior.

Sé que, si sé como hacer todo esto, sabré cómo vivir y, si sé cómo vivir, sabré cómo morir.



あなたの存在、神様に感謝しています。

あなたからたくさんのことを学んだ、ありがとうございます。

この世界であなたに会えた事が嬉しかった。

H. B. Zachry

DEDICATORIAS

A mis padres:

Gracias por todo el apoyo y enorme cariño que me han brindado, por todo lo que me han enseñado, por su optimismo, por sus regaños y sobretodo por ser un ejemplo de perseverancia. Gracias por confiar en mí, estar conmigo y brindarme lo mejor de ustedes.

A mis hermanas:

Mis dos amadas hermanas Ana Olivia y Mayra Mónica, por tolerarme, por estar cerca, por preocuparse, por enseñarme y escucharme. Estoy muy agradecido de compartir esta vida con ustedes.

A mi familia:

Ti@s, prim@s, sobrin@s porque sin su apoyo no estaría hoy aquí. Gracias por trabajar conmigo, escucharme, aconsejarme, reírse y disfrutar conmigo todo este trayecto. Saben que son muy importantes para mí.

A mis otros hermanos:

Yoshino, Sakura, Judith, Nehi, Hine, Heni, Tania, Aki y Hide, por hacer esta vida divertida, por preocuparse por mí y no permitir que me rindiera.

A mis amigos:

Luz, Ere, Raúl, Karla, Gaby, Karen, Alicia, Tania, Myrna, a toda la banda pesada, por hacer placentera esta estancia. Con cada uno viví momentos muy especiales y siempre se quedarán grabados en mi corazón

A l@s chic@s:

Karina, Tere, Paty, Rox, Adriana, Jacqueline, Martha, Iliana, Gustavo, Gaby, Alicia, Karen, Alma, Alex, Mauricio, Paco, Erick, Lulú, Melissa, Elizabeth, Xavier y Hugo por hacer esta estancia tan agradable, por todo su apoyo y asesoría.

A todos mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana por su apoyo incondicional y ayuda.

INDICE

	Página
Resumen	VII
Abreviaturas	VIII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Género <i>Mycobacterium</i>	1
1.2 Tuberculosis	2
1.3 Micobacterias No Tuberculosas	4
1.3.1 Generalidades	4
1.3.2 Pared celular	6
1.3.3 Identificación	8
1.3.4 Epidemiología	11
1.3.5 Micobacteriosis	12
1.4 <i>Mycobacterium arupense</i>	13
1.5 Anticuerpos Monoclonales	14
1.5.1 Respuesta humoral	14
1.5.2 Anticuerpos	15
1.5.3 Generación de Anticuerpos Monoclonales	17
1.5.4 Ventajas y desventajas	19
1.5.5 Aplicaciones de Anticuerpos Monoclonales	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
4. OBJETIVOS PARTICULARES	22
5. MÉTODOS	
5.1 Caracterización de <i>Mycobacterium arupense</i>	23
5.1.1. Características macroscópicas y microscópicas	23
5.1.2. Curva de crecimiento	23
5.1.3 Obtención de proteínas de extracto celular de <i>M. arupense</i> por sonicación	23
5.1.4. Proteoma de <i>M. arupense</i> por electroforesis 2D	24

5.2. Inmunización	26
5.3 Análisis del suero de los ratones inmunizados mediante ELISA	27
5.4. Fusión, Selección y Proliferación de Hibridomas	28
5.4.1 Células de mieloma	28
5.4.2 Esplenocitos	28
5.4.3 Fusión	28
5.4.4 Selección y Clonaje	29
5.4.5 Cosecha	29
5.4.6 Selección de hibridomas productores de anticuerpos por el método de ELISA por quimioluminiscencia	30
5.5 Caracterización de Hibridomas	30
5.5.1 Determinación de Isotipo	30
5.5.2 Reacción cruzada	31
6. RESULTADOS	32
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	49
9. PERSPECTIVAS	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO I	57
ANEXO II	59

RESUMEN

Antecedentes: Las micobacterias no tuberculosas están distribuidas ampliamente en diferentes ecosistemas. En los últimos años se ha observado un incremento en infecciones por MNT tanto en sujetos inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Hasta el momento no hay evidencia de la transmisión de MNT de persona a persona por lo cual se propone el agua como principal vehículo para la transmisión. Actualmente, se han descrito más de 138 especies de micobacterias y algunas de ellas, como *M. arupense*, se asocian con patologías por lo que su identificación, aislamiento y caracterización requieren de herramientas rápidas y sencillas. Actualmente, la única forma de diferenciar a *M. arupense* es por su secuencia de los genes: *16S DNA ribosomal*, *hsp65* y *rpoB*, por lo que la producción de anticuerpos monoclonales puede ser una herramienta útil para la identificación de esta especie o bien para determinar la presencia de cepas de MNT por compartir epitopes comunes.

Objetivo Producir y caracterizar anticuerpos monoclonales contra *M. arupense* aislada de agua para uso y consumo humano.

Metodología A partir de diferentes cepas de MNT inmunizadas en ratones hembras Balb/C se seleccionó la cepa y el ratón que produjo la mayor respuesta humoral para realizar la fusión de los esplenocitos con células de mieloma SP2/0. Los hibridomas fueron separados y seleccionados mediante la técnica de ELISA para su posterior expansión y caracterización. El proteoma de *M. arupense* se realizó como parte de la caracterización de la cepa estudiada.

Resultados Se seleccionaron seis hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer a *M. arupense*, siendo del isotipo IgG2; las clonas Ma2D10 y Ma1D7 fueron probada para determinar la reactividad cruzada con otras cepas de MNT, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. microti*, obteniéndose el mayor reconocimiento para *M. arupense* y una reactividad cruzada de 50, 20, 20 y 25%, respectivamente.

Conclusiones Se produjeron y caracterizaron anticuerpos monoclonales contra *M. arupense* y muestran reactividad cruzada contra otras micobacterias

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BAAR	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guèrin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzyme linked inmunosorbent assay
G	Gravedad
h	Hora
HAT	Hipoxantina-Aminopterina- Timidina
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HT	Hipoxantina-Aminopterina
Ig	Inmunoglobulina
IAA	Iodoacetamida
M	Molaridad
MAb	Anticuerpo monoclonal
MAC	Complejo <i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i>
MAIS	Complejo <i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i> - <i>M. scrofulaceum</i>
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MM	Masa Molecular
MTB	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
MNT	Micobacterias no tuberculosas
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros

PEG	Polietilen glicol
pI	Punto Isoeléctrico
OADC	Ácido oleico, Albúmina- Dextrosa-Catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPD	Derivado Proteico Purificado
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio
UV	Ultravioleta
V	Volts
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ZN	Tinción Ziehl-Neelsen
%	Porcentaje
µg	Microgramos (1×10^{-6} g)
µm	Micrómetro (1×10^{-6} m)
°C	Grados Celsius

1. Introducción

1.1 Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* se encuentra ubicado dentro del orden de los Actinomycetales y es el único género de la Familia *Mycobacteriaceae* (Figura 1). Las especies de este género tienen un elevado contenido de G+C (61 a 71%, excepto *M. leprae* que contiene 55%) que es una característica compartida con otros géneros relacionados que también contienen ácidos micólicos en la pared celular, como *Gordonia* (63-69 %mol), *Tsukamurella* (68-74 % mol), *Nocardia* (64-72 %mol) y *Rhodococcus* (63-73% mol) (1, 9).

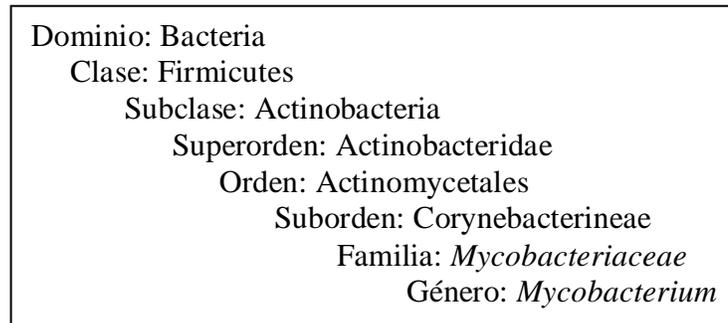


Figura 1: Ubicación taxonómica de *Mycobacterium*

Las micobacterias son microorganismos aeróbicos (con excepción de algunas especies que pueden crecer en atmósferas con oxígeno reducido), no esporuladas, sin movilidad, pleomórficas (curvas y/o rectas), miden de 0.2-0.8 μm de ancho por 2-7 μm de largo sin cápsula y no presentan una agrupación característica. (1, 2). Contienen una pared celular gruesa con un elevado contenido en lípidos lo que le confiere el 60% del peso seco.

La morfología colonial varía entre especies, de lisa a rugosa, con o sin pigmento (amarillas, naranjas o raramente rosas)

Dentro del género *Mycobacterium* están descritas más de 130 especies (3), las cuales se clasificaron en tres grupos de acuerdo a la función de la entidad clínica producida.

- i. Complejo *M. tuberculosis* (MTB) causante de la tuberculosis, lo constituyen las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum* y *M. microti*.
- ii. *M. leprae*, agente causal de la lepra
- iii. Micobacterias no tuberculosas que causan micobacteriosis

1.2 Tuberculosis

La tuberculosis se define como una enfermedad infecto-contagiosa que se identifica por la presencia de lesiones semejantes a tubérculos y necrosis caseosa. Afecta principalmente el pulmón y es causada por un grupo de micobacterias conocidas como “complejo *MTB*”, el cual consiste en micobacterias con un 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ARN ribosomal 16S, pero difieren en su hospedero, fenotipo y patogenicidad. De esta manera las especies *M. tuberculosis*, *M. canetti* y *M. africanum*, tienen como hospedero al humano; mientras que *M. pinnipedii* y *M. microti* infectan roedores; *M. caprae* cabras y *M. bovis* vacas (4).

M. tuberculosis es el principal agente causal de la tuberculosis humana, fue descubierto por Robert Koch en 1882, al aislar la bacteria de lesiones tuberculosas de animales infectados, por lo que también se le conoce como el ‘bacilo de Koch’.

M. tuberculosis se transmite de persona a persona por vía aérea, al toser o estornudar, ya que se generan aerosoles que se conforman de pequeñas gotas de saliva las cuales contienen abundantes bacilos (Figura 2). La tuberculosis se manifiesta generalmente en su forma pulmonar pero también afecta a otros órganos, como ganglios linfáticos, riñón, oviductos, epidídimo, esqueleto, meninges, intestino y otros sitios; asociada o no, al proceso pulmonar. En la infección secundaria se disemina por vía hematogena e infecta simultáneamente diversos órganos. En todos los sitios la contención

de la infección se da por la formación de una estructura organizada denominada “granuloma tuberculoso” (5, 6, 7).

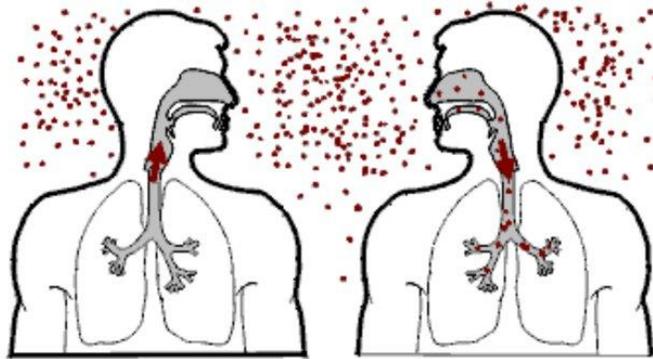


Figura 2. Vía de transmisión de la tuberculosis. La transmisión se realiza principalmente de persona a persona por la exposición a un paciente con tuberculosis pulmonar activa. Tomada de www.cpmc.columbia.

La tuberculosis representa un serio problema de salud a nivel mundial, ya que se estima que anualmente se infectan de 8 a 10 millones de personas y mueren de 2 a 3 millones (figura 3). Debido a que hace unos años hubo aumento en el número de casos de tuberculosis, en abril de 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de emergencia global contra la tuberculosis.

Un diagnóstico presuntivo se realiza con el Derivado Proteico Purificado (PPD por sus siglas en inglés), pero se han observado falsos positivos lo cual se debe a que el PPD contiene una mezcla de antígenos micobacterianos pobremente definidos; los cuales son compartidos con otras micobacterias por lo que una reacción falsa positiva podría ser ocasionada por antígenos compartidos con la vacuna de *M. bovis* BCG o por antígenos compartidos por micobacterias no tuberculosas (22, 23).

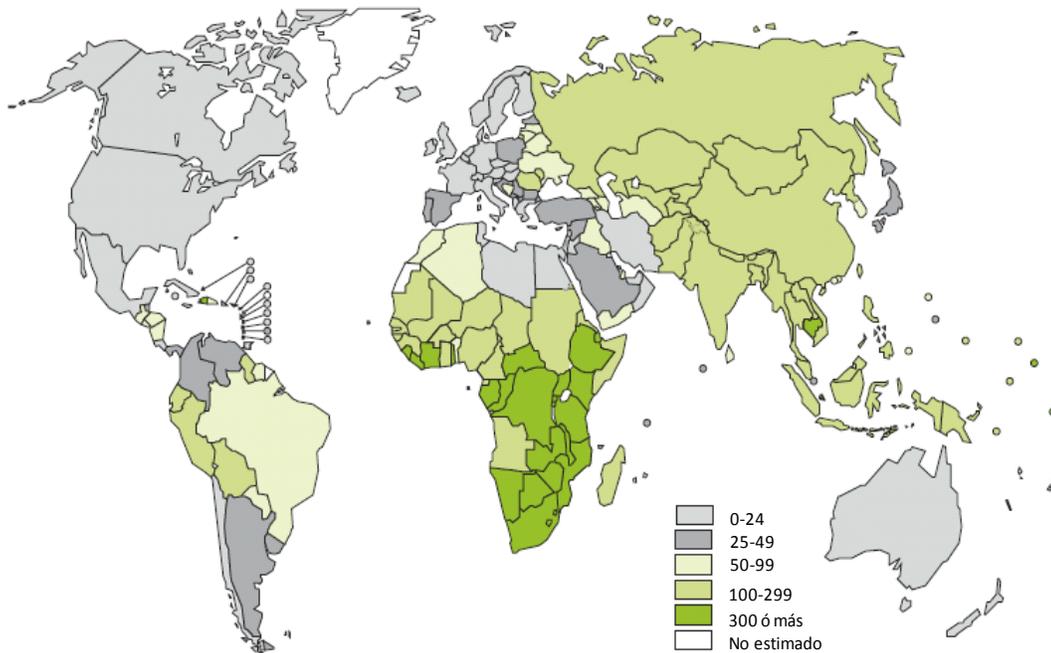


Figura 3: Distribución mundial de la tuberculosis. Casos de tuberculosis por 100 000 habitantes estimados para el año 2005. OMS, 2007.

1.3 Micobacterias No Tuberculosas

1.3.1 Generalidades

Las micobacterias no tuberculosas han sido denominadas de diferente forma a lo largo de los años, Pinner denominó a estos microorganismos como micobacterias atípicas por la creencia de que eran cepas de *M. tuberculosis* inusuales (8), otras denominaciones son: anónimas, no clasificadas, ambientales, oportunistas, micobacterias diferentes al bacilo de la tuberculosis (MOTT por sus siglas en inglés) y micobacterias no tuberculosas (MNT) que es el término acuñado por la Asociación Americana de Tórax (10).

Las MNT comprenden todas aquellas micobacterias que no forman parte del complejo MTB ni a la especie *M. leprae* distinguiéndose por ser patógenos no obligados y encontrarse en el ambiente como saprófitos, comensales y simbioses (11, 12). Están distribuidas en una gran variedad de ecosistemas en regiones templadas y tropicales; han sido aisladas de una amplia variedad de reservorios ambientales: agua, suelo, aire,

protozoarios, animales, humanos, plantas y alimentos (13, 14). Se sugiere que la transmisión es por ingestión, inhalación e inoculación de fuentes naturales y hasta el momento no se ha demostrado la transmisión de persona a persona (15).

Existen varios reportes que evidencian la presencia de micobacterias en agua para uso y consumo humano, en sistemas de agua de hospitales y clínicas, suministros de agua de hemodiálisis, sistemas industriales de agua caliente, máquinas de hielo, piscinas y construcciones para suministro de agua dañados. Las especies *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. xenopi*. fueron detectadas con mayor frecuencia (15, 16).

En los últimos 50 años se han propuesto diferentes clasificaciones para las micobacterias. La clasificación más común es la propuesta por Runyon en 1959 con base en su velocidad de crecimiento y en la capacidad de sintetizar pigmento no hidrosoluble (13). En base a su velocidad de crecimiento se clasifican como micobacterias de crecimiento rápido y lento. Las micobacterias de crecimiento rápido forman colonias en menos de 7 días y esto se debe a que contienen dos cistrones 16S rRNA (excepto *M. chelonae* y *M. abscessus* que sólo tienen un cistrón) por otra parte las micobacterias de lento crecimiento requieren 7 días o más para formar colonias y contiene un solo cistrón. La presencia de un solo cistrón también confiere resistencia innata a una amplia variedad de agentes antimicrobianos (12). La producción de pigmento está en relación con la exposición a la luz:

- a) Fotocromógenas si la producción depende de la luz
- b) Escotocromógenas si es independiente de la luz
- c) No cromógenas si no producen pigmento

De esta clasificación surgieron cuatro grupos de trascendencia clínica: Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas), Grupo III (no cromógenos) de crecimiento lento y Grupo IV (no cromógenas) de crecimiento rápido (Tabla 1). Aunque esta clasificación tiene cierta utilidad, actualmente, con la aparición de nuevas especies y las

diferentes características parece ser que se requiere un mejor método para su clasificación.

Tabla 1: Clasificación de Runyon de algunas especies de MNT

CLASIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS				
GRUPO RUNYON	DEFINICIÓN	ESPECIES	PATOGENICIDAD	FRECUENCIA DE AISLAMIENTO
I	Crecimiento lento y fotocromógenos: formación de pigmento amarillo si se pone a la luz	<i>M. kansasii</i>	Generalmente patógeno	Frecuente
		<i>M. marinum</i>		Raro
II	Crecimiento lento y escotocromógenos: Formación de pigmento amarillo, naranja a rojo, si se expone a la luz y también en la oscuridad	<i>M. gordonae</i>	Non patógenos	Frecuente
		<i>M. szulgai</i>	Generalmente patógeno	Raro
III	Crecimiento lento y no cromógenos: Pigmentación muy lenta o ausente	Complejo <i>M. avium-intracellulare*</i>	Patógeno	Frecuente
IV	Micobacterias de crecimiento rápido	<i>M. fortuitum**</i> <i>M. chelonae**</i>	A veces patógeno	Frecuente

*También se conoce como complejo MAIS: *M. avium-intracellulare-scrofulaceum*

**También se conoce como complejo *M. fortuitum-chelonae*

1.3.2 Pared celular

La pared celular peptidoglicana contiene ácido meso-diaminopimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa. Los ácidos micólicos con los lípidos libres en la capa más externa (como la trehalosa 6,6'-dimicolato o Factor Cordón), la cual le proporcionan una barrera impermeable hidrofóbica. Otros ácidos

grasos importantes son las ceras, fosfolípidos, ácidos micoseróicos y ácidos ftienoicos (1).

La envoltura celular del género *Mycobacterium* consta de cuatro capas (Figura 4): la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que da forma y rigidez a la bacteria. La segunda capa está constituida por arabinogalactanos que se encuentran unidos a ácidos micólicos de la tercera capa que está formada por ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) que son de importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como la trehalosa 6,6' dimicolato.

Los glucolípidos son un grupo de compuestos (sulfolípidos, micósidos, micolatos de trehalosa, etc.) que se encuentran asociados no covalentemente a los ácidos micólicos y se ubican en la periferia de la pared. Los micolatos de trehalosa y sulfolípidos se encuentran principalmente en las cepas de micobacterias más virulentas. El lipoarabinomanana (LAM) es una molécula anclada a la membrana citoplasmática y se le considera como el equivalente del lipopolisacárido de bacterias gramnegativas debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de micobacterias más virulentas el LAM está cubierto con residuos de manosa (manLAM) (18).

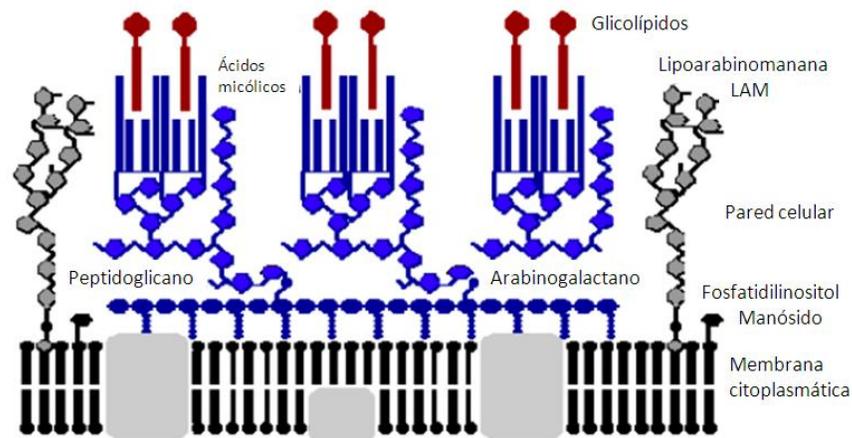


Figura 4. Esquema de la pared celular del género *Mycobacterium* (Infect Immun, 1996).

La composición de la pared celular de la micobacteria le confiere menor permeabilidad y es responsable, entre otras cosas, de la ineficiencia ante múltiples antimicrobianos, así como la característica de la ácido alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización.

1.3.3 Identificación

I. Identificación fenotípica

- a) Microscopía.- Una característica compartida por el género *Mycobacterium* es la ácido alcohol resistencia, la cual es la capacidad de resistir la decoloración con alcohol ácido. Además, existen algunas características microscópicas que orientan la identificación de algunas especies, por ejemplo el factor cordón para *Mycobacterium tuberculosis* (17).
- b) Velocidad de crecimiento. Se basa en los días de incubación que un cultivo en medio sólido necesita para la detección de colonias visibles macroscópicamente. Las micobacterias que tardan más de 7 días se clasifican como micobacterias de lento crecimiento, mientras las que lo hacen en menos de 7 días se les considera de crecimiento rápido. El inóculo para realizar el subcultivo es un factor crítico en el desarrollo de este análisis (1).
- c) Temperatura de crecimiento. En general las micobacterias crecen entre 35-37°C, sin embargo, algunas micobacterias como *M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. haemophilum* tienen mejor desarrollo a temperaturas bajas (30°C) mientras que, otras requieren de temperaturas elevadas, por ejemplo *M. xenopi* que crece a 45°C pero no a 28°C (17).
- d) Características de las colonias
 - i. Producción de pigmento. Se basa en la capacidad de producir pigmentos carotenoides que puede estar relacionado con la exposición a la luz.

- ii. Morfología colonial. Las características morfológicas se pueden observar en los medios a base de huevo o de agar (Lowenstein Jensen o Middlebrook 7H9, respectivamente).
- iii. Pruebas bioquímicas. En 1992 se establecieron las bases para la identificación bioquímica de las micobacterias de crecimiento lento, entre los que se encuentra un número limitado de pruebas bioquímicas que, junto con pruebas genéticas y moleculares, permiten la caracterización de las especies de este grupo de bacterias. En el caso de las micobacterias de crecimiento rápido tienen mucha variabilidad lo que hace que estas pruebas sean poco confiables para su caracterización fenotípica.

La identificación mediante pruebas bioquímicas requiere experiencia y el conocimiento de su fundamento, además requiere resultados coherentes de un conjunto de pruebas bioquímicas para llegar a la identificación específica de las especies de micobacterias (10, 19).

II. Identificación molecular

El análisis de la longitud de fragmentos obtenidos por enzimas de restricción en los productos de PCR de genes específicos es usado ampliamente para la identificación de especies de micobacterias. La secuenciación de genes conservados es un método sensible y preciso, pero con la desventaja de que se requiere experiencia y presupuesto. Recientemente, las pruebas de DNA son utilizadas debido a su disponibilidad en estuches comerciales, como el sistema AccuProbe Gen Probe, que son altamente específicos y sensibles con la desventaja de que se identifica un número limitado de especies.

Por otra parte, el desarrollo de la hibridación reversa de productos de PCR con sondas complementarias en tiras de nitrocelulosa o nylon, han permitido la detección e identificación simultánea de micobacterias (24); por ejemplo: la prueba de INNO-LiPA Micobacteria tiene como región blanco el espacio intergénico 16S-23S rDNA, el cual se sugirió como un blanco potencial dentro del genoma para encontrar información

filogenética. Trabajos previos sugieren el uso de esta región por el alto nivel de variación de secuencia espaciadora y la buena reproducibilidad de la secuenciación ITS (25, 26).

III. Identificación cromatográfica

Existen tres tipos de técnicas cromatográficas utilizadas en la identificación de especies de micobacterias basadas en los ácidos micólicos: Cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). La TLC y HPLC permiten un análisis directo de los ácidos micólicos, mientras que la GLC se basa en el análisis de la descomposición de éstos.

La TLC permite la diferenciación de ésteres de siete tipos de ácidos micólicos conocidos. Una vez que los ácidos micólicos son liberados, son extraídos como micolatos por medio de metil-esterificación. Posteriormente, se colocan sobre una lámina de silica gel (fase estacionaria) para separar por capilaridad con la elución de solventes (fase móvil). La identificación generalmente se realiza por comparación del patrón con cepas de referencia (17).

En el caso de la HPLC, los ácidos micólicos son liberados de las células completas por medio de saponificación y extracción con cloroformo, para transformarse a ésteres de bromofenacil absorbidos por UV. Los extractos se inyectan en una columna para eluirse por la fase móvil, un gradiente de metanol y cloruro de metileno. Las fracciones eluidas son cuantificadas por absorción UV con un detector da 254-260 nm. Recientemente, la sensibilidad del método se incrementó por el reemplazo de la detección por UV por absorción de fluorescencia (17, 20, 21).

En el análisis por HPLC, los ácidos micólicos son separados con base en su polaridad y la longitud de su cadena de carbonos, la más polar y la más corta eluye primero. La distribución de los picos más grandes en el cromatograma, la posición sobre la base de su tiempo de retención y el peso en comparación con los otros picos son los

parámetros utilizados para el análisis. Cada especie se identifica por la comparación visual con un patrón de número, posición y peso particular de los picos (17).

Con la GLC todos los componentes de la pared celular son analizados. Una vez extraídos los ácidos grasos como metil ésteres por medio de metanolisis, son sometidos a trifluoroacetilación, lo cual mejora la detección por alcohol. Posteriormente, son inyectados en el cromatógrafo de gases donde son transportados a través de una columna con temperatura controlada por un gas acarreador. La cuantificación de los productos se determina por el detector de ionización por flama. La identificación se realiza en base al tiempo de retención y se confirma por espectrometría de masas (17).

1.3.4 Epidemiología

Actualmente, se han identificado más de 138 especies de micobacterias no tuberculosas. De las especies conocidas de micobacterias, cerca de una tercera parte fueron asociadas con enfermedades en humanos. Las especies de MNT asociadas con enfermedad son:

M. avium, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. interjectum*, *M. xenopi*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. immunogenum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. bohemicum*, *M. haemophilun*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii*, *M. thermoresistible*, *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. palustre*, *M. elephantis*, *M. septicum* y *M. nonchromogenicum* (10, 29).

Recientemente, la frecuencia de asociación de micobacterias con enfermedades va en aumento, por ejemplo *Mycobacterium arupense* es asociado con infecciones en tendón y pulmón (27, 28).

A mediados de 1980 y principios de 1990 debido al advenimiento de la infección con VIH, la tuberculosis resurge con la aparición de cepas multifármaco resistentes. En años

recientes las micobacterias no tuberculosas reemergen como la principal causa de infecciones oportunistas en individuos con VIH/SIDA. Por otro lado, las enfermedades por MNT en individuos inmunocompetentes son principalmente pulmonares, mientras que en los pacientes con VIH/SIDA e individuos inmunodeficientes, las enfermedades por MNT afectan otros órganos o son diseminadas (30).

1.3.5 Micobacteriosis

Las enfermedades causadas por MNT tienen diversas manifestaciones y fueron agrupadas de manera general como micobacteriosis. Se ha reportado que son las causantes de enfermedades localizadas y diseminadas dependiendo de la predisposición local y/o el grado del déficit de la respuesta inmune (10, 31).

Un incremento en las infecciones por MNT se ha observado en pacientes inmunosuprimidos, aunque cada vez se diagnostica mayor número de infecciones micobacterianas en sujetos inmunocompetentes (29, 31), por ejemplo enfermedad pulmonar localizada, adenitis, infecciones de tejido blando, infecciones de articulaciones/hueso, úlceras de piel; las enfermedades generalizadas se presentan con mayor frecuencia en individuos inmunodeficientes como pacientes trasplantados o con leucemia. A continuación se mencionan enfermedades asociadas a MNT:

- ❖ Infecciones pulmonares debidas a MNT.- Las principales especies causantes de estas infecciones son las del complejo MAC, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. malmoense* y *M. kansasii*, estas se relacionan principalmente a bronquitis crónica, bronquiectasias y enfermedad obstructiva crónica (10, 29).
- ❖ Ganglios linfáticos.- Los aislamientos del complejo MAC así como de *M. scrofulaceum* fueron reportados como causantes de linfadenitis. Otras especies causantes de linfadenitis cervical en países del oeste e india son *M. bohemicum*, *M. szulgai* y *M. interjectum* (10, 29).

- ❖ Huesos y articulaciones.- Aislados del complejo MAC, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. non-chromogenicum* y *M. kansasii* fueron reportados como causa de infecciones en hueso y en articulaciones. Recientemente, *M. arupense* se identificó como causante de infección en articulaciones (10, 29, 32, 33, 34).
- ❖ Infecciones cutáneas.- *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. vaccae* fueron reportados como causantes de infecciones en la piel. *M. marinum* se ha reconocido como organismo causante de lesión granulomatosa, adquirida en piscinas y tanques de peces. Las lesiones papulares causadas, pueden confundirse con esporotricosis (10).
- ❖ Enfermedades intestinales crónicas. El agente causal de la enfermedad de Crohn es *M. avium sp paratuberculosis*: miembros de esta especie se han reportado como agentes causales de enteritis en el ganado vacuno, cabras y ovejas (10, 12).
- ❖ Enfermedad diseminada en individuos inmunocomprometidos.- Las principales especies de MNT que causan esta enfermedad son: MAC, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* y *M. simiae*.

1.4 *Mycobacterium arupense*

M. arupense es un microorganismo identificado en el 2006 mediante secuenciación genética por 16S *rRNA*, *hsp65* y *rpoB*. Esta nueva micobacteria fue aislada de esputo, tendones, lavado bronquial, tendovaginitis purulenta y de una herida en un dedo por lo cuál se sugirió que *Mycobacterium arupense* es un microorganismo de importancia clínica. De acuerdo a los estudios realizados se considera a *M. arupense* como una micobacteria perteneciente al complejo de *Mycobacterium terrae* (27, 28).

Las colonias de esta bacteria son no cromógenas, de rápido crecimiento en medio Lowenstein-Jensen a 30°C (5-7 días) y de lento crecimiento (10-12 días) a 37°C, no crece a

42°C. El patrón de ácidos micólicos por FL-HPLC es indistinguible del obtenido por *M. nonchromogenicum*. En la Tabla 2 se muestran algunas características de este nuevo microorganismo (28).

Tabla 2. Características diferenciales con micobacterias estrechamente relacionadas

Característica	<i>M. arupense</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. hiberniae</i>
Microscopía Cadenas	Largas	cortas	largas	Cortas
Reducción de nitrato (37°C 22h)	-	(+)	-	+
Arylsufatasa (3 días)	-	-	-	-
B-Galactosidasa	+	+	+	+
Fosfatasa ácida (37°C 20 h)	+	+	+	+
Leucin arilamidasa	+/-	-	-	+
Cistin arilamidasa	-	-	-	-
α-Glucosidasa	-	-	+	-
β- Glucosidasa	-	-	+	-
Crecimiento a 42 °C	-	-	+	-
Tolerancia a NaCl 5%	-	-	-	-

+, positivo; (+) débilmente positivo; +/-, variable; -, negativo

1.5 Anticuerpos Monoclonales

1.5.1 Respuesta humoral

La respuesta inmune humoral es mediada principalmente por las inmunoglobulinas; esto sucede una vez que los linfocitos B han sido activados y diferenciados a células plasmáticas, las cuales son capaces de producir anticuerpos. La producción de estas células ocurre en la médula ósea donde maduran, y posteriormente migran a los órganos

linfoides secundarios o periféricos para que se realicen las etapas de reconocimiento y activación (35, 38, 39).

1.5.2 Anticuerpos

Las inmunoglobulinas son un amplio grupo de proteínas presentes en el suero, principalmente en forma soluble conocidas como anticuerpos o anclados a membranas de linfocito B formando el receptor para antígeno de estas células (BCR) (36, 37, 38, 39).

Las moléculas de los anticuerpos comparten características estructurales y fisicoquímicas semejantes. Cada molécula está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de las cuales son de 55-77 kDa (cadenas pesadas) y las dos restantes de 25 kDa (cadenas ligeras). Estas cadenas se encuentran unidas por puentes disulfuro conformando una estructura en forma de Y. Las cadenas pesadas y ligeras tienen una región variable y otra conservada. La región variable de los anticuerpos se conoce como fracción de unión al antígeno (Fab) mientras que la región constante se conoce como fracción cristalizable (Fc), ver Figura 5 (38, 40).

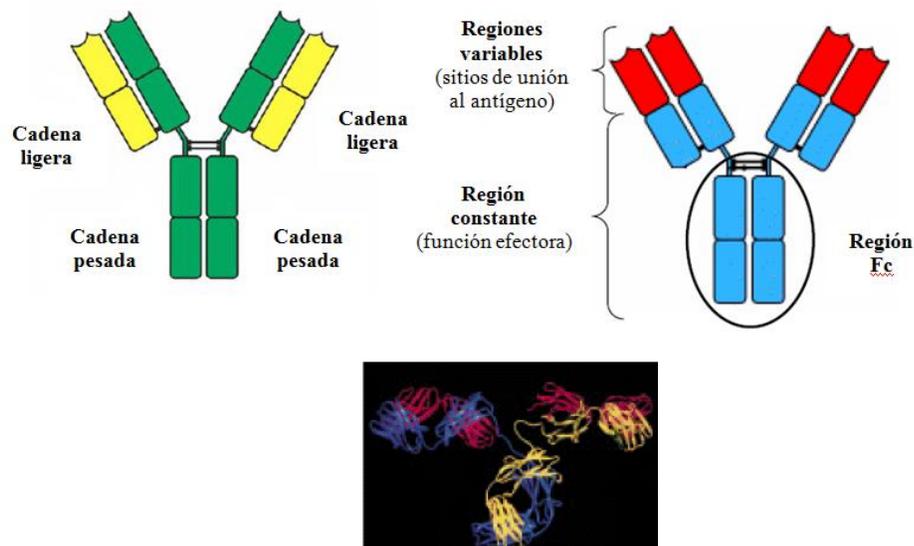


Figura 5. Estructura de los anticuerpos. Cada anticuerpo se compone de dos cadenas ligeras y de dos cadenas pesadas.

Cinco isotipos principales se conocen y están compuesto de cadenas pesadas (μ , δ , γ , α y ϵ) y dos cadenas ligeras (κ y λ). Las inmunoglobulinas formadas por cada uno de esos tipos de cadena pesada se conocen como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente y contienen cualquiera de los isotipos de cadena ligera (Figura 6) (38, 39).

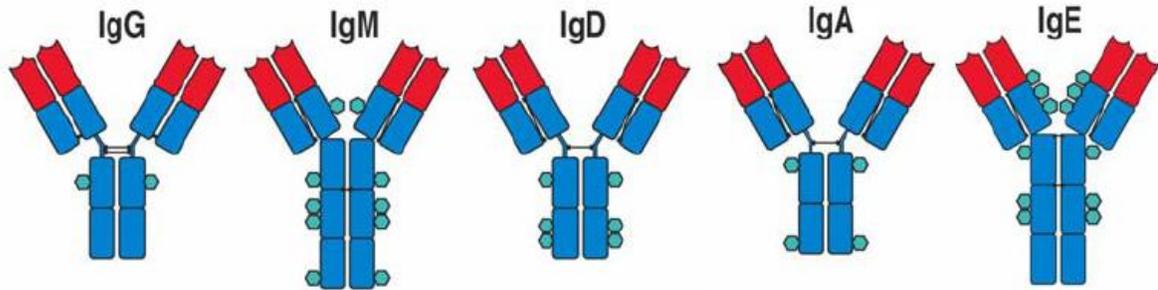


Figura 6. Representación de isotipos de anticuerpos

Las clases más abundantes son IgG (75% de las Ig totales) e IgM (aproximadamente 10%). Las moléculas de anticuerpos se dividen en distintas clases y subclases basada en la estructura de sus regiones de la cadena pesada por esto mismo en los humanos, los IgG se subdividen en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Cuando son secretadas las IgM e IgA se polimerizan de tal manera que se encuentra en el plasma a las IgM de forma pentamérica y en las secreciones de mucosas a las IgA en forma de dímeros. Esta formación de polímeros se debe a la asociación de la proteína J la cual mantiene unida la estructura polimérica por puentes disulfuro con los extremos carboxilo terminal de la cadena pesada.

La función principal de los anticuerpos es unirse de forma específica a un determinado antígeno, debido a que las moléculas antigénicas son mayores que su región de unión con el anticuerpo, este se une a ciertas regiones denominadas epitopos o determinantes antigénicos (38, 39, 40, 41). Una vez que el anticuerpo se une al antígeno surgen diferentes consecuencias, las cuales dependerán de la estructura, la localización anatómica y el isotipo del anticuerpo (42). Las principales actividades biológicas de los anticuerpos se muestran en la Tabla 3 (43).

Tabla 3: Actividades Biológicas de los Anticuerpos

Unión a antígenos	Transporte	Desgranulación de células
Bloqueo a la invasividad de los virus	Activación del complemento	Bloqueo o estimulación de receptores
Neutralización de toxinas	Opsonización	Modulación
Limpieza inmunológica	Colaboración en citolisis	

1.5.3 Generación de anticuerpos monoclonales

En 1975 George Köhler y Cesar Milstein desarrollaron la técnica que consiste en fusionar células de bazo de un ratón inmunizado con células de mieloma, lo cual permitía desarrollar poblaciones homogéneas de células productoras de anticuerpos específicos, por la capacidad de estas células de proliferar indefinidamente y secretar anticuerpos específicos contra el antígeno usado para la inmunización.

Los linfocitos provenientes del bazo aportan la capacidad de sintetizar el anticuerpo deseado y el mieloma la capacidad de proliferar (44-45). Para lograr la unión de las células se usa un agente fusógeno, el cual originalmente fue el virus Sendai inactivado y actualmente se usan fusógenos químicos como el polietilenglicol.

Una vez que las células se fusionaron se cultivan en el medio Hipoxantina, Aminopterina y Timidina (HAT), donde la aminopterina inhibe la síntesis de ácidos nucleicos. Como las células de mieloma carecen de las enzimas necesarias (HPGRT o TK) para reciclar los ácidos nucleicos mueren por la falta de purinas (Figura 7). A diferencia de las células de mieloma, los esplenocitos contienen estas enzimas, sin embargo, carecen de la capacidad de proliferar indefinidamente, por lo cual al cabo de unas semanas, las clonas observadas son aquellas que realizaron un re-arreglo exitoso de los cromosomas de los esplenocitos con las células de mieloma, es decir, son células inmortales y resistentes a la aminopterina (Figura 8) (44, 45, 46).

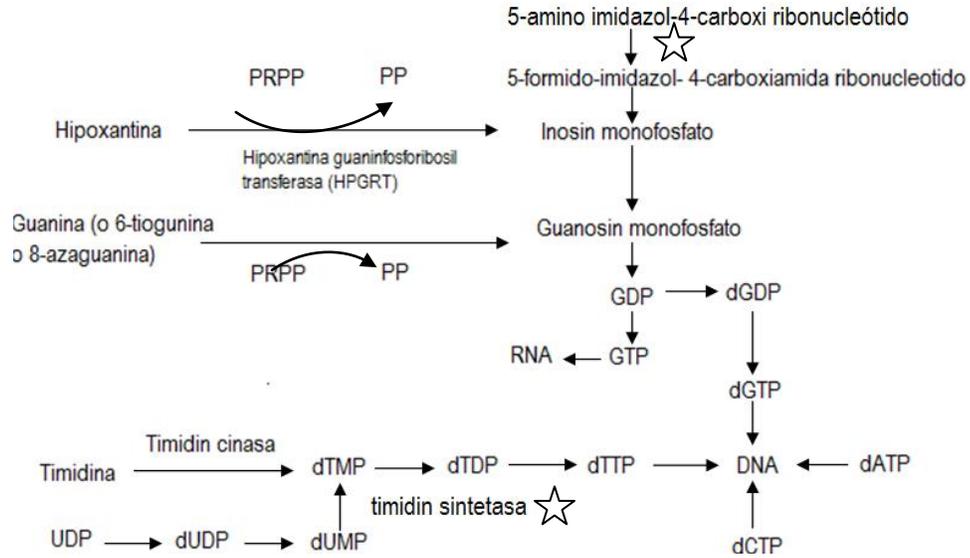


Figura 7. Rutas metabólicas de importancia en la selección de híbridos en un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Cuando la ruta es bloqueada con aminopterina (estrella), la célula depende de la ruta de salvamento usando las enzimas HPGRT y timidin cinasa.

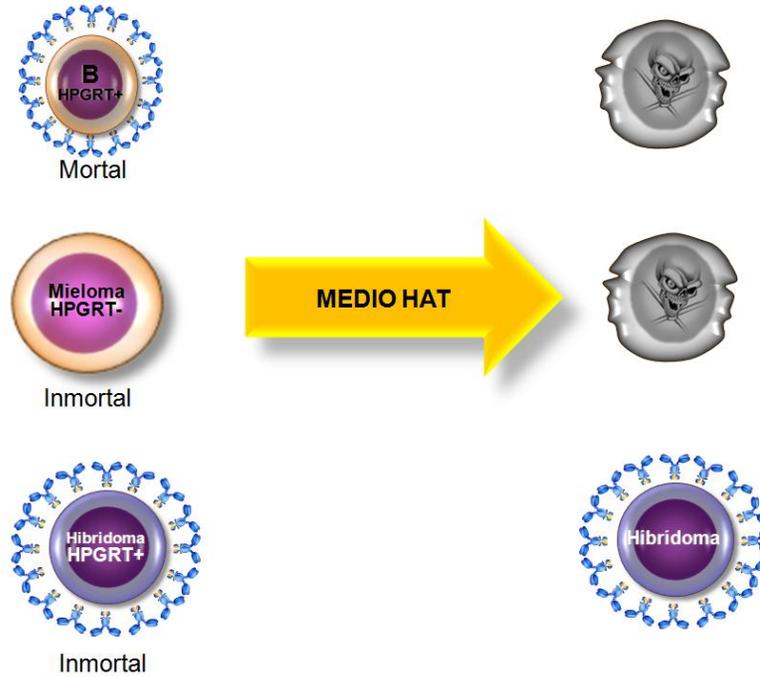


Figura 8. Selección de hibridomas considerando las características de las células de mieloma y de los esplenocitos.

1.5.4 Ventajas y desventajas

La producción de anticuerpos depende del número de linfocitos B, su velocidad de síntesis y su persistencia posterior a su producción. Esta última es dependiente del isotipo debido a que cada uno tiene un tiempo de vida media diferente y funciones biológicas diferentes por lo cuál los sitios de acceso varían entre cada isotipo. Las características más importantes de una respuesta mediada por anticuerpos son el isotipo, la especificidad y la afinidad.

La especificidad determina la capacidad del anticuerpo de distinguir al antígeno de otras proteínas.

La afinidad se refiere a la fuerza de unión del anticuerpo con su antígeno si se considera al primero con un solo sitio de unión y al antígeno monovalente, por lo tanto, a mayor afinidad, menor anticuerpo se requiere para detectar el antígeno. La fuerza total de unión de una molécula con más de un sitio de unión se denomina avidéz.

Para monitorear la respuesta inmune se analiza el suero, debido a que es rico en anticuerpos específicos de naturaleza policlonal contra el antígeno con que se inmunizó, sin embargo su aplicación tiene varias desventajas:

- ❖ Cada antisuero es distinto de otro aunque se haga en animales genéticamente iguales con los mismos protocolos.
- ❖ La afinidad varía de acuerdo al estado en que se encuentra el animal al momento de tomar la sangre.
- ❖ Los volúmenes de producción son limitados por lo cual su aplicación en pruebas clínicas y experimentos se restringe.
- ❖ A pesar de realizar una purificación cromatográfica pequeñas poblaciones de anticuerpos interactúan inespecíficamente y se confunde el análisis de resultados.
- ❖ Tienen la capacidad de formar complejos inmunes con el antígeno, lo cual permite precipitar proteínas o aglutinar células.

Una manera de resolver estos problemas es mediante la producción de anticuerpos monoclonales, sin embargo, su producción es costosa y requiere de experiencia, por lo cuál es importante considerar los objetivos para elegir la mejor opción (38, 39, 46, 47).

1.5.5 Aplicaciones de anticuerpos monoclonales.

Identificación y estudio de moléculas

Permiten la detección de antígenos en muestras complejas, determinar sitios de producción, expresión, deposición y actividad de moléculas en células o tejidos, también permiten definir antígenos de diferenciación celular o definir poblaciones celulares.

Diagnóstico

Para determinar componentes de la sangre como marcadores de enfermedad, por ejemplo, diagnóstico de enfermedades parasitarias, bacterianas, o virales por medio de la detección de antígenos, niveles altos de complejos inmunes, proteínas en fase aguda, marcadores de cáncer, endocrinopatías, factores de crecimiento, etc.

Purificación de moléculas y células.

Cromatografía de afinidad, con anticuerpos para purificar su antígeno; también se usan para el marcaje fluorescente de células para su separación por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).

Aplicaciones terapéuticas.

Se usan en la inducción de inmunosupresión a fin de tratar enfermedades autoinmunes o para neutralizar toxinas, o incluso para dirigirlos contra antígenos de células tumorales que permitan visualizarlos e inducir citotoxicidad (38, 39, 47, 48).

Por lo descrito anteriormente, una manera eficiente de identificar las diferentes especies de micobacterias es empleando anticuerpos monoclonales capaces de diferenciarlas.

2. Justificación

En los últimos años el incremento de los reportes de infecciones por MNT tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes, así como los reportes de aislamientos ambientales, han llevado al desarrollo de técnicas rápidas y específicas que permitan la identificación de cepas ambientales y/o clínicas.

3. Objetivo

- ❖ Producir y caracterizar anticuerpos monoclonales contra *M. arupense* aislada de agua para uso y consumo humano.

4. Objetivos particulares

- ❖ Inmunizar ratones Balb-C con micobacterias y elegir la cepa con la mayor respuesta humoral.
- ❖ Titulación de los sueros de ratones inmunizados contra micobacterias.
- ❖ Caracterización de anticuerpos monoclonales contra *Mycobacterium arupense*.
- ❖ Obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra *Mycobacterium arupense*.
- ❖ Obtener el proteoma del extracto celular de *Mycobacterium arupense*.

5. Métodos

5.1 Caracterización de *Mycobacterium arupense*

5.1.1 Características Macroscópicas y Microscópicas

A partir del aislamiento realizado previamente en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana se recuperó a cepa de *M. arupense* en medio 7H10, se realizó la observación macroscópica de las colonias y se determinaron las características microscópicas de la cepa mediante una Tinción de Ziehl-Neelsen y Auramina-Rodamina (ver anexo I).

5.1.2 Curva De Crecimiento

- 1) Una vez recuperada la cepa *Mycobacterium arupense* en medio 7H10, se realizó un subcultivo en medio líquido 7H9 en un volumen de 50 mL a 37° C en agitación constante.
- 2) Se tomaron 500µL del cultivo líquido y se adicionaron a 125 mL de medio 7H9 fresco, se determinó la DO a partir de este momento. Se usó como blanco medio 7H9 sin inocular. Se realizó por duplicado.
- 3) Se determinó la DO cada 24 horas.
- 4) Se estableció la fase media logarítmica de crecimiento.

5.1.3 Obtención de Proteínas de Extracto Celular de *M. arupense* por Sonicación

- 1) A partir de dos cultivos independientes de *Mycobacterium arupense* en fase media logarítmica, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 5000 RCF por 10 minutos.
- 2) Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en H₂O_d estéril. Se centrifugaron a 5000 RCF por 10 minutos (Por duplicado).
- 3) Se decantó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo del paquete bacteriano.
- 4) Se ajustó el paquete a 300 mg/mL.

- 5) A la suspensión de bacterias se le aplicaron 15 pulsos de 60 segundos con sonicador.
- 6) Cada 5 pulsos se agregó inhibidor proteasas de tal manera que obtuvimos una concentración final de 1 µg/mL.
- 7) Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford.

5.1.4 Proteoma de *M. arupense* Por Electroforesis de Doble Dimensión (49-52)

5.1.4.1 Rehidratación de tiras gradiente inmóvil de pH (IPG)

- 1) Se determinó el volumen necesario de muestra para contener 100 µg de proteína en 180 µL de solución amortiguadora de rehidratación. Se mantuvo la muestra a 4°C.
- 2) Se pesaron las cantidades correspondientes para mezclar la solución amortiguadora de rehidratación con la muestra

Urea	75.6 mg
Tiourea	27.4 mg
CHAPS	7.2 mg
DTT	27.7 mg

- 3) Preparación de la mezcla en el siguiente orden:
 - a. La Urea se Rehidrtó con la muestra de proteínas y se mezcló.
 - b. Se agregó la tiourea y posteriormente se mezcló.
 - c. Se adicionó el CHAPS y se agitó hasta obtener la solución.
 - d. EL DTT se agregó justo en el momento de usarse.
 - e. Se agregó a la mezcla 2µL de solución de azul de bromofenol al 1%.
 - f. Se mezcló bien y se midió el volumen final. De ser necesario se agregó H₂Od.
 - g. Finalmente se transfirieron 180 µL de mezcla de rehidratación en un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 2 µL de anfolinas.
- 4) Se niveló la bandeja de rehidratación.
- 5) Se cargaron 180 µL de la mezcla en el centro del carril.

- 6) Se tomó una tira IPG y se retiró la cubierta de plástico más delgada con un movimiento continuo.
- 7) Se colocó la tira IPG en el carril donde está la muestra con la parte del gel hacia abajo asegurándose de que no queden burbujas.
- 8) Se cubrió el carril con aceite mineral.
- 9) Se colocó la tapa de la bandeja de rehidratación y se dejó sin moverse de 10 a 16 horas.

5.1.4.2 Isoelectroenfoque de proteínas en tiras IPG

- 1) Se retiraron las tiras IPG de la bandeja de rehidratación y se escurrió el exceso de aceite.
- 2) Se ajustó el sistema de enfriamiento (Multitemp III) a 17°C.
- 3) Se colocaron las tiras sobre el alineador, con el lado de la tira que tiene el gel y la muestra hacia arriba y con el extremo ácido (+) hacia el ánodo.
- 4) Se cortaron dos tiras de papel para electrodos (Amersham) y se humedecieron con H₂O. Se retiró el exceso de agua y se colocaron sobre las tiras IPG de manera que cubrían sólo 2 mm del gel de la tira de IPG.
- 5) Los electrodos se colocaron sobre las tiras.
- 6) Se vertió aceite mineral al centro del alineador hasta cubrir las tiras IPG.
- 7) Se colocó la tapa del Multiphor II y se conectaron los electrodos del equipo a la fuente de poder.
- 8) La corrida se realizó de la siguiente manera:
 - a. 30 min a 500V
 - b. 30 min a 1000V
 - c. 30 min a 1500 V
 - d. 30 min a 2000 V
 - e. 24 horas continuas a 2500 V para que completen 52,000 VH.

5.1.4.3 Equilibrio y 2ª Dimensión

- 1) Se preparó DTT [15 mg/mL] en un tubo con 5 mL de buffer de equilibrio e IAA [37.5 mg/mL] en 5 mL de buffer de equilibrio.
- 2) Al terminar el isoelectroenfoco se retiró la tira IPG de la cámara.
- 3) Se colocó la tira en la solución con DTT en agitación por 15 min.
- 4) La tira se colocó en la solución con IAA en agitación por 15 min.
 - a. Se retiró el isopropanol de la parte superior del gel y se lavó con solución amortiguadora de corrida (ver anexo II). Al final del lavado se llenó con buffer de corrida.
 - b. Se impregnó un pequeño trozo de papel filtro con 5 μ L de marcador de masa molecular.
 - c. Se eliminó el exceso de solución amortiguadora de equilibrio de la tira. La tira se colocó en la parte superior del gel.
 - d. Posteriormente se colocó el papel filtro impregnado con el marcador de masa molecular.

La corrida se programó a 50 V y posteriormente se ajustó a 100 V 2h y posteriormente se ajustó a 150V.

5.1.4.4 Fijación y Tinción con Plata de Geles de Poliacrilamida con Proteínas

- 1) Al finalizar la corrida electroforética se agregó solución de impregnación y se agitó por 20 min.
- 2) Se agregó 10 mL de la solución de revelado.
- 3) Posteriormente se eliminó la solución de revelado.
- 4) Se agregó solución de paro, se capturó la imagen del gel y se realizó el análisis.

5.2. Inmunización

La micobacteria irradiada en solución salina isotónica se ajustó a una DO de 0.8. Se utilizaron 5 ratones hembras Balb/c entre 6-8 semanas de edad por cada cepa de

micobacterias seleccionada del cepario del Programa de Inmunología Molecular Microbiana. Facultad de medicina, UNAM.

Antes de realizar la inmunización se tomó una muestra de sangre por punción en la vena del plexo maxilar del ratón y posteriormente se inyectó la suspensión por vía intraperitoneal en un volumen no mayor a 200 μ L. El esquema de inmunización fue el siguiente:

Tiempo	T0	T1	T2	T3	T4
Día	0	14	33	73	90

A partir del segundo T2 se eligió la cepa para continuar con las inmunizaciones para seleccionar al ratón con mejor respuesta para realizar la fusión celular.

5.3 Análisis Del Suero De Los Ratones Inmunizados mediante la técnica de ELISA

1. Se adicionaron 100 μ L de una solución amortiguadora de bicarbonatos que contenía 5 μ g/mL de proteína para recubrir la pared de la microplaca, se incubó toda la noche a 4°C.
2. Se lavó la placa con 250 μ L de PBS durante un minuto a temperatura ambiente con agitación constante. Los excesos de PBS se eliminaron invirtiendo la placa y golpeándola contra una gasa.
3. La placa se bloqueó con 150 μ L de PBS-albúmina 1% durante 1h a 37°C
4. Se realizaron 3 lavados con 250 μ L de PBS-Tween 20 durante 1 minuto a temperatura ambiente con agitación constante, posteriormente se eliminaron los excesos de PBS-Tween 20 de la microplaca.
5. Se realizaron diluciones seriadas de 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125, 1:15625 por duplicado utilizando PBS como diluyente PBS. Se incubó 1 h a 37°C.
6. Se lavó la microplaca con 250 μ L de PBS-Tween 20 durante 1 minuto. Este punto se realizó por triplicado y al terminar se eliminaron los excesos.
7. El anticuerpo conjugado (AP Rabbit anti Mouse IgG1, ZYMED® laboratories) se utilizó con una dilución 1:1000. Se incubó 1h a 37 °C.

8. Se agregó 100 μL de solución reveladora y se dejó revelando por 20 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz, transcurrido este tiempo se agregaron 50 μL de NaOH 3M.

5.4 Fusión, Selección Y Proliferación De Hibridomas

Este método se realizó con el kit ClonaCell-HY de la empresa StemCell (53, 54, 55).

5.4.1 Células De Mieloma (Sp2/0)

- 1) La densidad celular se ajustó a 2×10^5 células viables/mL, en un volumen final de 100ml.
- 2) Se centrifugaron las células en un tubo de 50 ml a 1100 rpm a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con 30 ml de Medio B. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 25 ml de medio B.
- 3) Las células se contaron con azul de tripano (la viabilidad debe ser mayor al 95%).
- 4) Se ajustó el volumen para tener 2×10^7 células.

5.4.2 Esplenocitos

- 1) El bazo se disgregó en una suspensión celular, posteriormente se lavaron los esplenocitos 3 veces con medio B centrifugando a 1350 rpm a temperatura ambiente por 10 min y removiendo el sobrenadante con pipeta. Después del lavado final se resuspendieron las células en 25 ml de medio B.
- 2) Las células se contaron con una solución de ácido acético 3% y azul de metileno y se calculó un volumen para tener en 25 ml de medio B 1×10^8 células. Las células se colocaron a 37 °C.

5.4.3 Fusión

- 1) Se adicionaron las células de mieloma (2×10^7) y los esplenocitos viables (1×10^8), en un tubo de 50 ml y se centrifugó por 10 min a 1350 rpm a temperatura ambiente.

- 2) Se disgregó el paquete celular suavemente y se adicionó lentamente 750 μL de PEG gota a gota por 1 min sin agitación.
- 3) Se agregaron 3 ml del medio B a la mezcla de fusión, por un periodo de 4 minutos.
- 4) Se adicionaron lentamente 5 ml del medio B a las células y se incubaron por 15 min en el baño a 37°C.
- 5) Se agregaron lentamente 15 ml de medio A y se centrifugaron las células a 1350 rpm por 7 min.
- 6) El paquete celular se resuspendió lentamente en 10 ml de Medio C. La suspensión se transfirió a un frasco de cultivo de 75 cm^2 con 40 ml de Medio C y se incubó de 16 a 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 .

5.4.4 Selección y Clonaje

1. La suspensión de células fusionadas se transfirió en un tubo de 50 ml y se centrifugó por 10 min a 1350 rpm a temperatura ambiente desechando el sobrenadante. Se resuspendieron las células en Medio C en un volumen final de 5 ml.
2. Se transfirió la suspensión celular en 45 ml de Medio D y se mezcló por inversión. Se mantuvo en reposo durante 15 min a temperatura ambiente.
3. Finalmente se colocaron 9.5 ml de la suspensión celular con ayuda de una aguja del #16 dentro de cada caja de petri de 100 mm y se incubaron las placas de 10 a 14 días.

5.4.5 Cosecha

1. Después de los 10 o 14 días se observaron colonias las cuales se removieron con una pipeta de 10 μl en una caja de 96 pozos que contenía 200 μl de Medio E. Se incubaron las placas de 1 a 4 días.
2. Se transfirieron 150 μl del sobrenadante de cada hibridoma a un pozo de una caja de 96 pozos nueva y se analizó por ELISA.
3. Al alcanzar una densidad de 4×10^5 células se congelaron en SFB + 10% DMSO mientras que las clonas seleccionadas fueron expandidas en medio E.

5.4.6 Selección De Hibridomas Productores De Anticuerpos Por El Método De ELISA Por Quimioluminiscencia.

El primer tamizaje de las clonas productoras de anticuerpos se realizó con la metodología descrita en el apartado 5.3 y posteriormente se realizó la selección de las clonas candidatas para la caracterización mediante el método de ELISA por quimioluminiscencia.

1. Se adicionaron 100 μ L de una solución amortiguadora de bicarbonatos que contenía 5 μ g/mL de proteína para recubrir la pared de la microplaca de poliestireno blanco, posteriormente se incubó toda la noche a 4°C.
2. La placa se bloqueó con 150 μ L de PBS-albúmina 1% durante 1h a 37°C.
3. Se realizaron diluciones seriadas de concentrado, 1:5, 1:25, 1:125, utilizando como diluyente PBS. Se adicionaron 100 μ L por pozo y cada dilución se realizó por duplicado. La placa se incubó 1 h a 37°C.
4. El anticuerpo conjugado (AP Rabbit anti Mouse IgG1, ZYMED® laboratorios, HRP Rabbit anti mouse IgG2a, ZYMED® laboratorios) se utilizó con una dilución 1:1000 La placa se incubó 1h a 37 °C.
5. Se agregaron 100 μ L de solución reveladora de AP (MILLIPORE®) por 5 min. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura en el equipo GENios Plus.
6. Se agregaron 100 μ L de solución reveladora de HRP (MILLIPORE®) por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizó la lectura en el equipo GENios Plus.

5.5. Caracterización de Hibridomas

5.5.1. Determinación de Isotipo

1. Se humedeció el filtro con 25 μ l de Beadlyte Cytokine Assay Buffer por pozo y se aspiró.
2. Se adicionaron 50 μ l de la muestra en cada pozo.
3. Las esferas se sonicaron 15 segundos en un baño de sonicación y se mezcló vigorosamente con pipeta. Se adicionaron 25 μ l de esta solución por pozo.

4. La placa se cubrió y se mezcló con vortex a baja velocidad. Se incubó 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Se aspiró para retirar el líquido y se resuspendió en 50 μ l de Beadlyte Cytokine Assay Buffer, mezclando con vortex. Se repitió este paso por duplicado. Y se resuspendieron las esferas en 75 μ l de Beadlyte Cytokine Assay Buffer. Se colocó la placa sobre papel secante y se mezcló con vortex a baja velocidad. No sobre secar.
6. Se diluyó Beadlyte anti-mouse k Light Chain, PE 1:100 en Beadlyte Cytokine Assay Buffer.
7. La suspensión se mezcló vigorosamente por pipeteo y se agregaron 25 μ l de la solución de revelado al pozo.
8. Se cubrió y se mezcló con vortex a baja velocidad. Se incubó 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente en el agitador de placas.
9. La lectura se realizó en el equipo Luminex 100 .

5.5.2. Reacción cruzada.

Se siguió el método 5.4.6 usando las cepas de la Tabla 4 para sensibilizar la placa y el sobrenadante de las dos clonas con mayor título de anticuerpos como anticuerpo primario en una dilución 1:11.

Tabla 4. Cepas elegidas para realizar las pruebas de reacción cruzada.

MNT	MTC	BCG
<i>M. arupense</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. bovis</i> BCG Japón
<i>M. abscesus</i>	<i>M. tuberculosis</i> manila	BCG México
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	<i>M. microti</i>	BCG Danesa
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II		BCG Tice
<i>M. peregrinum</i>		BCG Phipps
<i>M. avium</i> ambiental		
<i>M. avium</i> clínica		

6. Resultados

6.1 Caracterización de *Mycobacterium arupense*

6.1.1 Características Macroscópicas y Microscópicas

La evaluación macroscópica se realizó mediante el examen visual del desarrollo de las colonias en la superficie de placas de agar Middlebrook 7H10. Las colonias se caracterizaron de acuerdo a tamaño, forma, borde, color, consistencia, elevación y velocidad de crecimiento.

Tabla 5. Características de la cepa *Mycobacterium arupense*

Morfología colonial	Morfología microscópica	Clasificación de Runyon
Colonias de 1-2 mm de diámetro, circulares, margen ondulado, rugosas, color blanco mate, cremosas	Bacilos cortos ácido alcohol resistentes, delgados que forman grupos.	Rápido crecimiento

La morfología microbiana mostró bacilos cortos y delgados ácido alcohol resistentes que forman agrupaciones, que da la apariencia de bacilos largos (Figura 9 y 10).

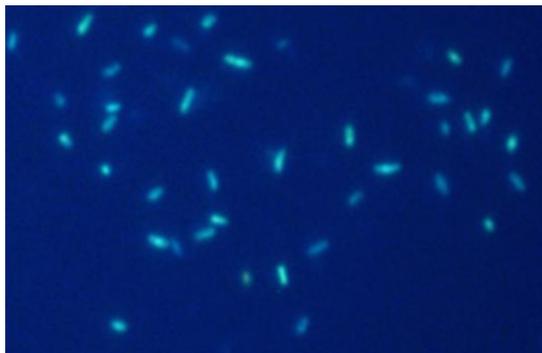


Figura 9. Tinción con Auramina Rodamina. Se observa en color verde los bacilos cortos.

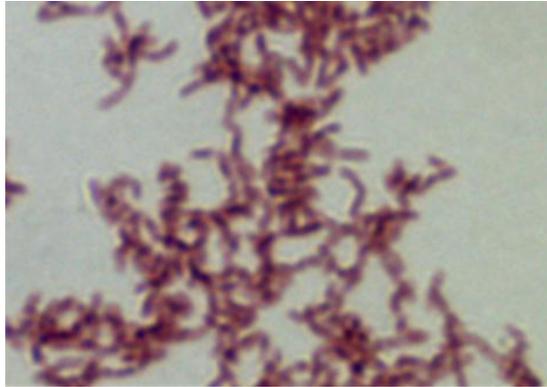
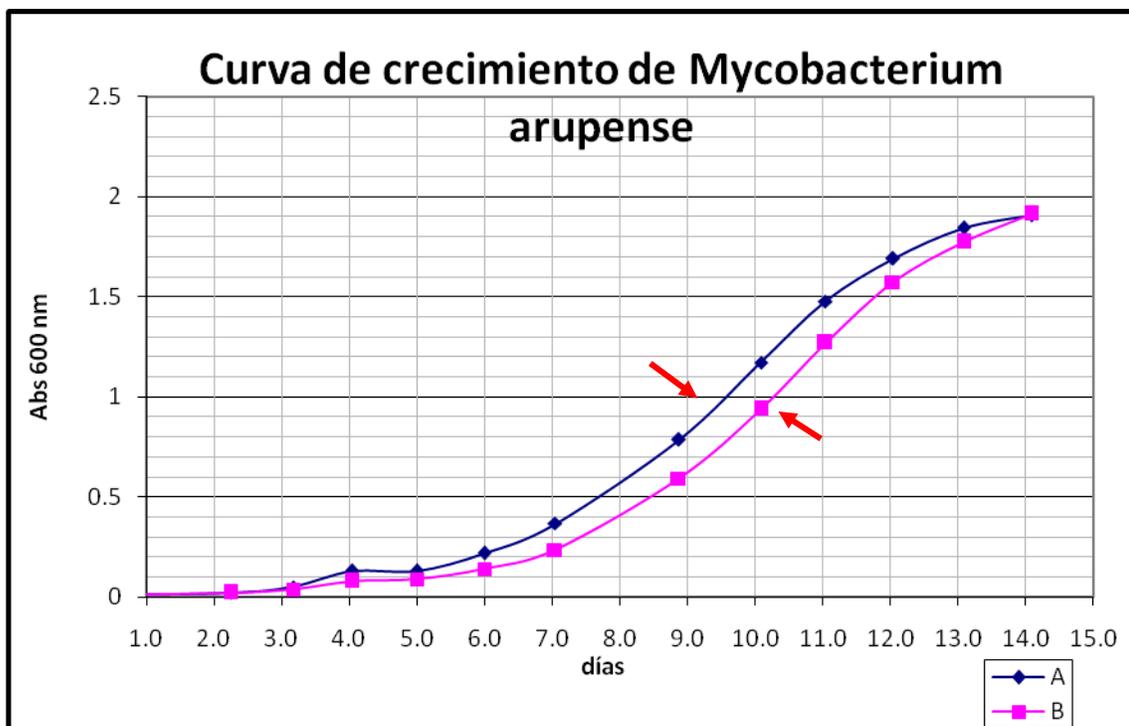


Figura 10. Tinción de Ziehl Neelsen. Los bacilos cortos se observan en grupos.

6.1.2 Curva De Crecimiento

En la gráfica 1 se muestra la curva de crecimiento realizada en 2 cultivos independientes en medio líquido Middlebrook 7H9 con agitación constante; en esta gráfica se determinó que la fase media logarítmica se encuentra a una DO de 0.9 a una longitud de onda de 600 nm (señalada con flechas), la cual se alcanza entre el 9º y 10º día.



Gráfica 1: Curva de crecimiento de la cepa *Mycobacterium arupense*

6.1.3 Proteoma de *Mycobacterium arupense*

A partir de dos cultivos independientes en fase media logarítmica cultivados en medio Midlebrook 7H9, el lisado de las micobacterias se efectuó por sonicación para realizar el proteoma de *Mycobacterium arupense* (Figura 11) con tiras de IPG con un gradiente de 4-7.

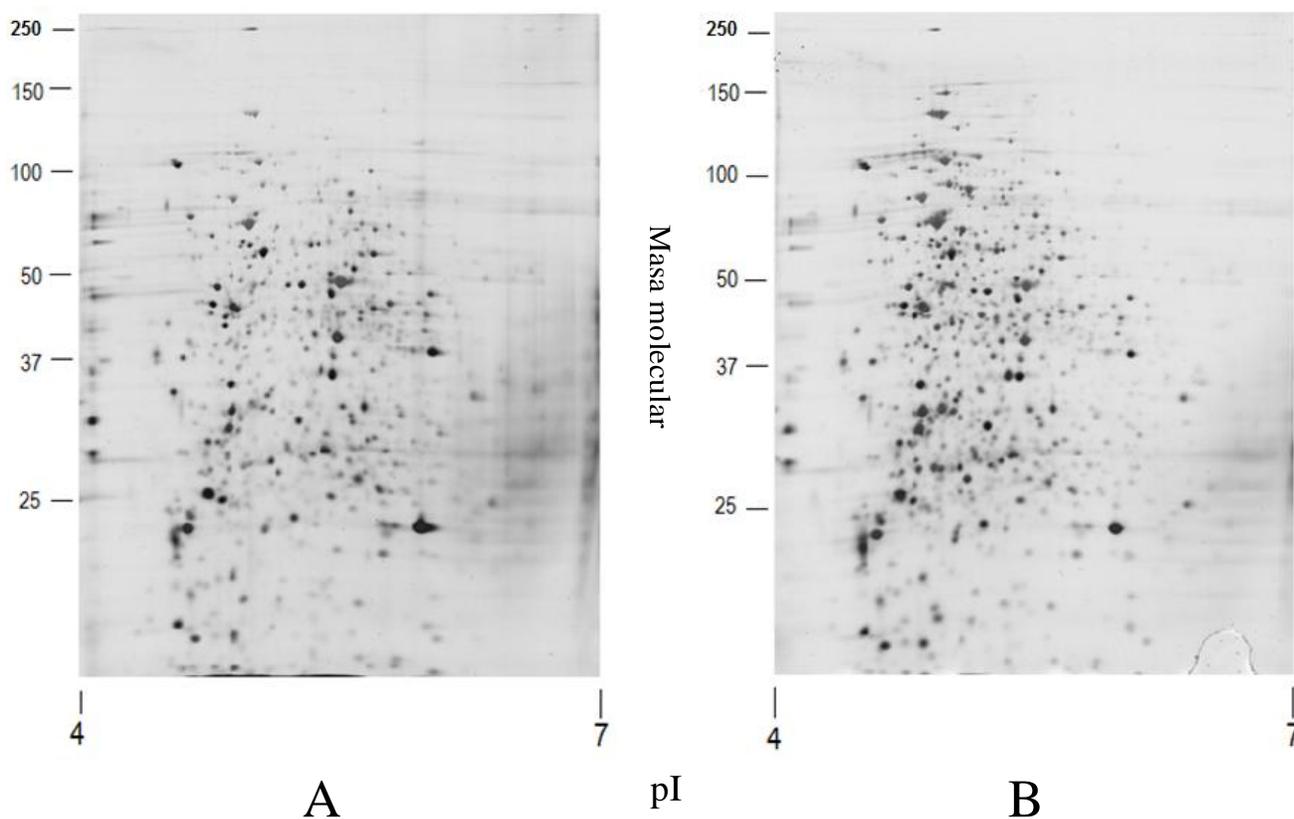


Figura 11. Imagen representativa de los geles obtenidos por 2D-PAGE al 12% del extracto celular de *Mycobacterium arupense* teñidos con nitrato de plata.

Tabla 6. Parámetros evaluados para la normalización de los geles 2D-PAGE

Parámetro	Experimento		Prom	Des. Est	CV
	1	2			
Cuenta Total Pixel	4565392	4518146	4541769	33407.97	0.74
Puntos válidos	23250.6	18519.8	20885.2	3345.18	16.02
Puntos totales	876	733	804.5	101.12	12.57
Densidad total	32489	32680	32584.5	135.06	0.41

Las imágenes de estos geles 2D-PAGE se analizaron con el software PD-QUEST seleccionando los puntos que representan proteínas; posteriormente, se construyó un gel maestro (Figura 12) el cual es la suma de ambas imágenes de los 2D-PAGE. A partir del gel maestro se identificaron un total de 876 puntos, a los cuales se les asignó un pI y MM de acuerdo a su distribución en el gel con relación a los marcadores de masa molecular y al gradiente de pH de la tira IPG. A partir de estos datos se realizó el análisis de la distribución y frecuencia de las proteínas de acuerdo a su pI y MM (gráficas 2, 3 y 4).

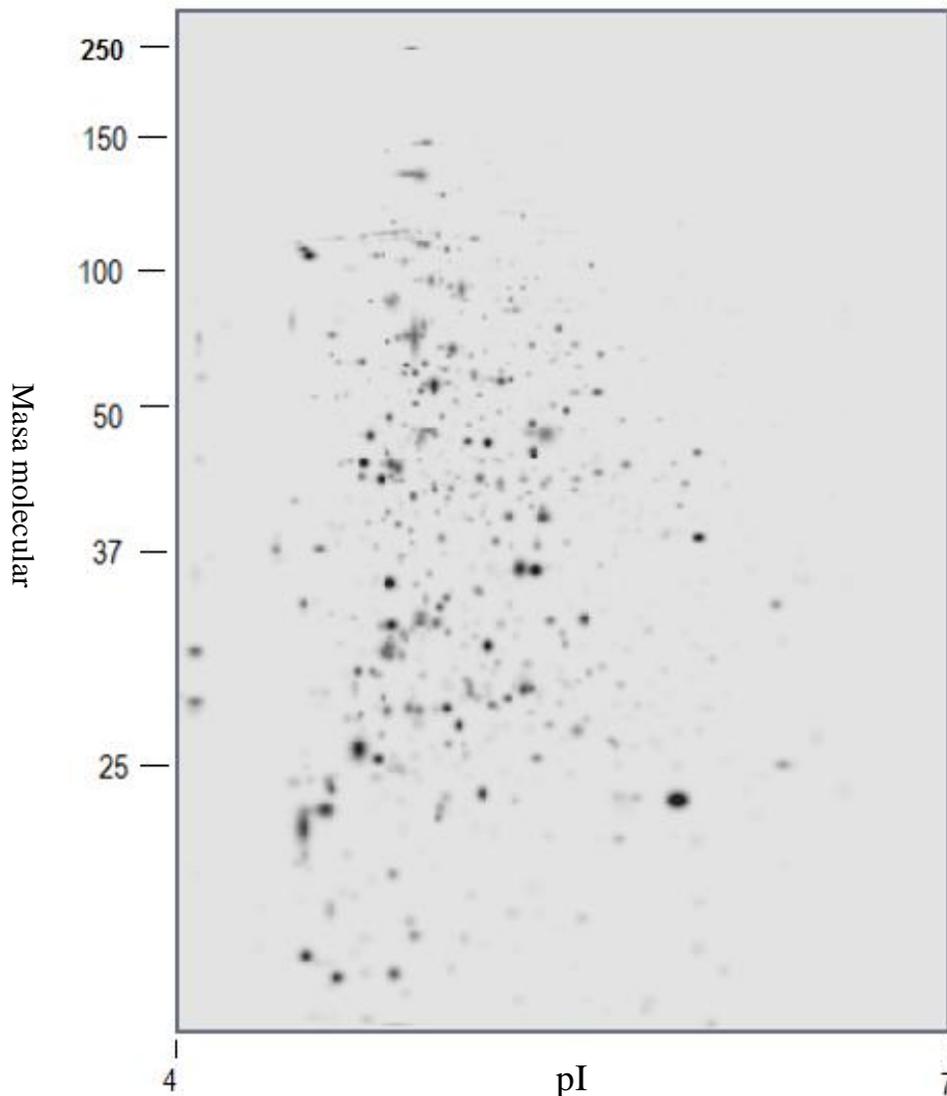
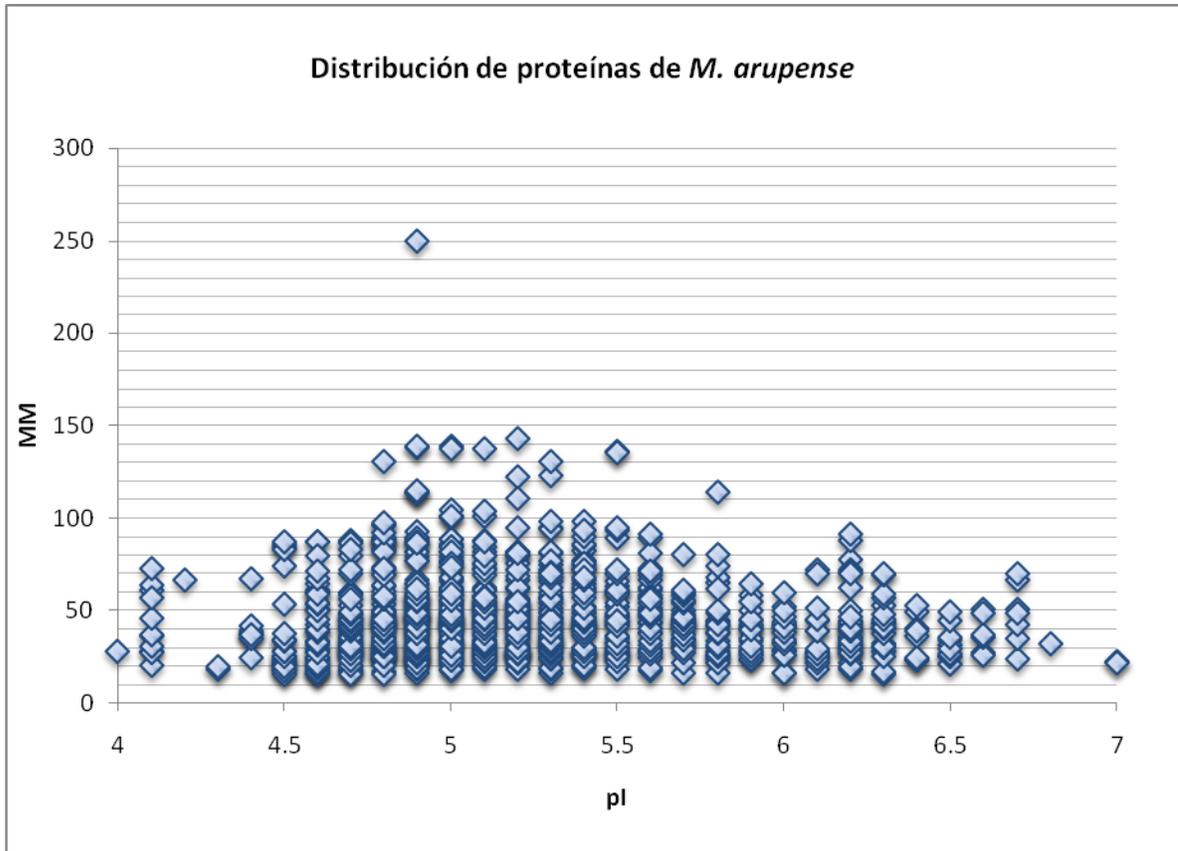
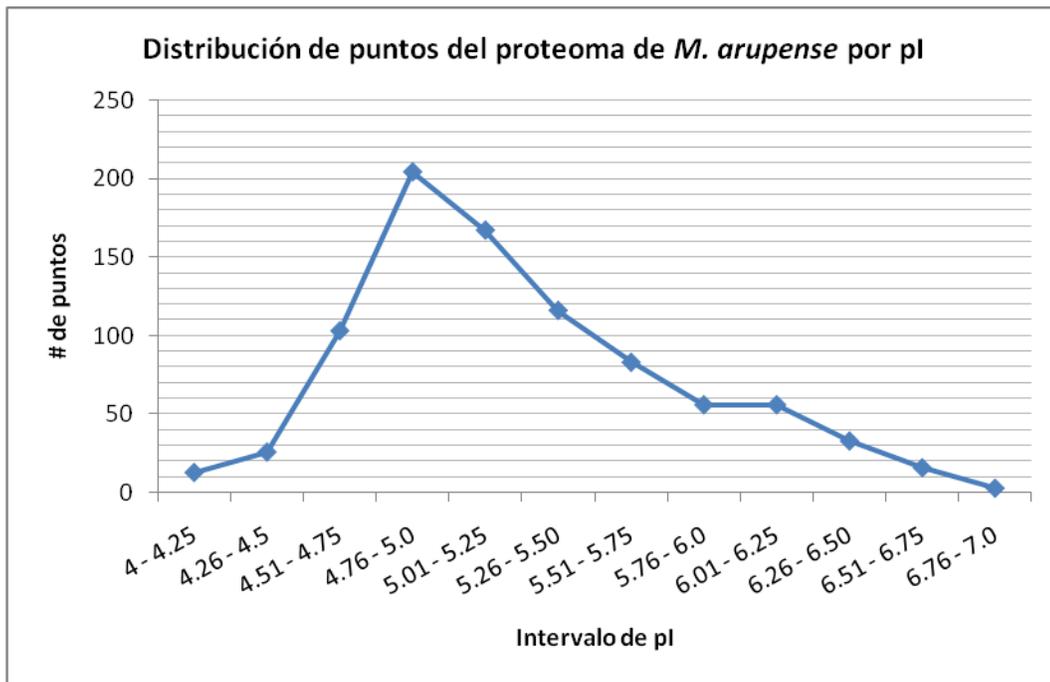


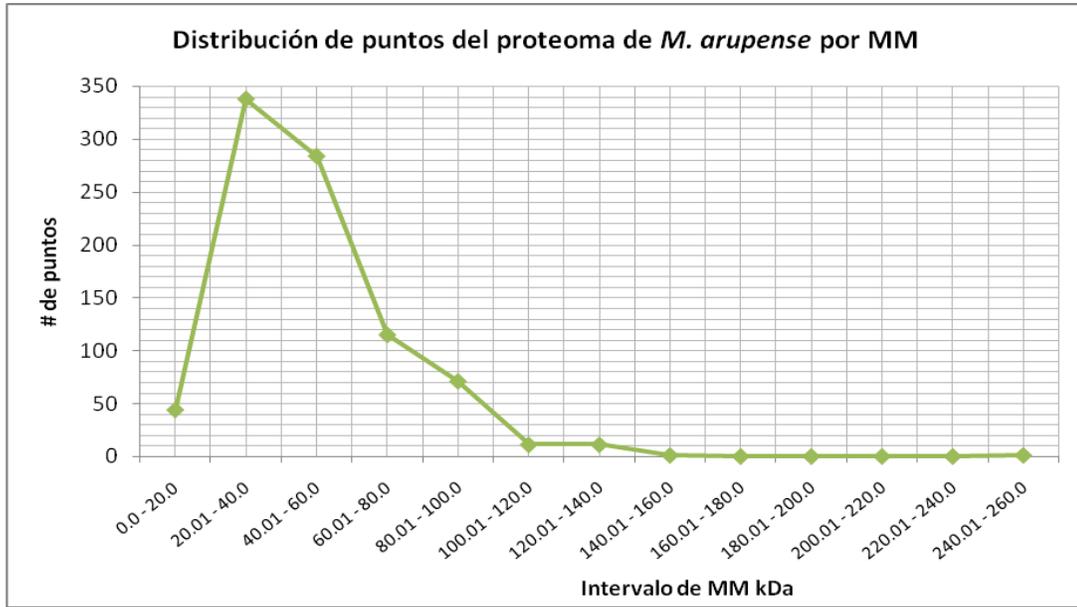
Figura 12. Gel maestro del extracto celular de *Mycobacterium arupense*. Del lado izquierdo se muestra la escala de masa molecular y en la parte inferior el intervalo de pH.



Gráfica 2. Distribución de proteínas de acuerdo al punto isoeléctrico y masa molecular.



Gráfica 3. Histograma de frecuencias de proteínas de acuerdo al punto isoeléctrico



Gráfica 4. Histograma de frecuencias de proteínas conforme a la masa molecular

En las graficas 2 a 4 se observaron que la mayoría de las proteína se localizaron entre los 20 al los 100 kDa de MM, mientras que para el pl fue entre el intervalo de pH de 4.5 y 6.

6.2. Inmunización.

A partir del cepario del programa se seleccionaron 6 micobacterias de importancia ambiental y una subcepa de *M. bovis* BCG (Tabla 7) para realizar la inmunización de los ratones con el objetivo de obtener anticuerpos monoclonales.

Tabla 7. Micobacterias seleccionadas a partir del cepario del Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Facultad de medicina, UNAM.

Micobacterias inoculadas

Mycobacterium chelonae

Mycobacterium peregrinum

Mycobacterium arupense

M. nonchromogenicum tipo I

M. nonchromogenicum tipo II

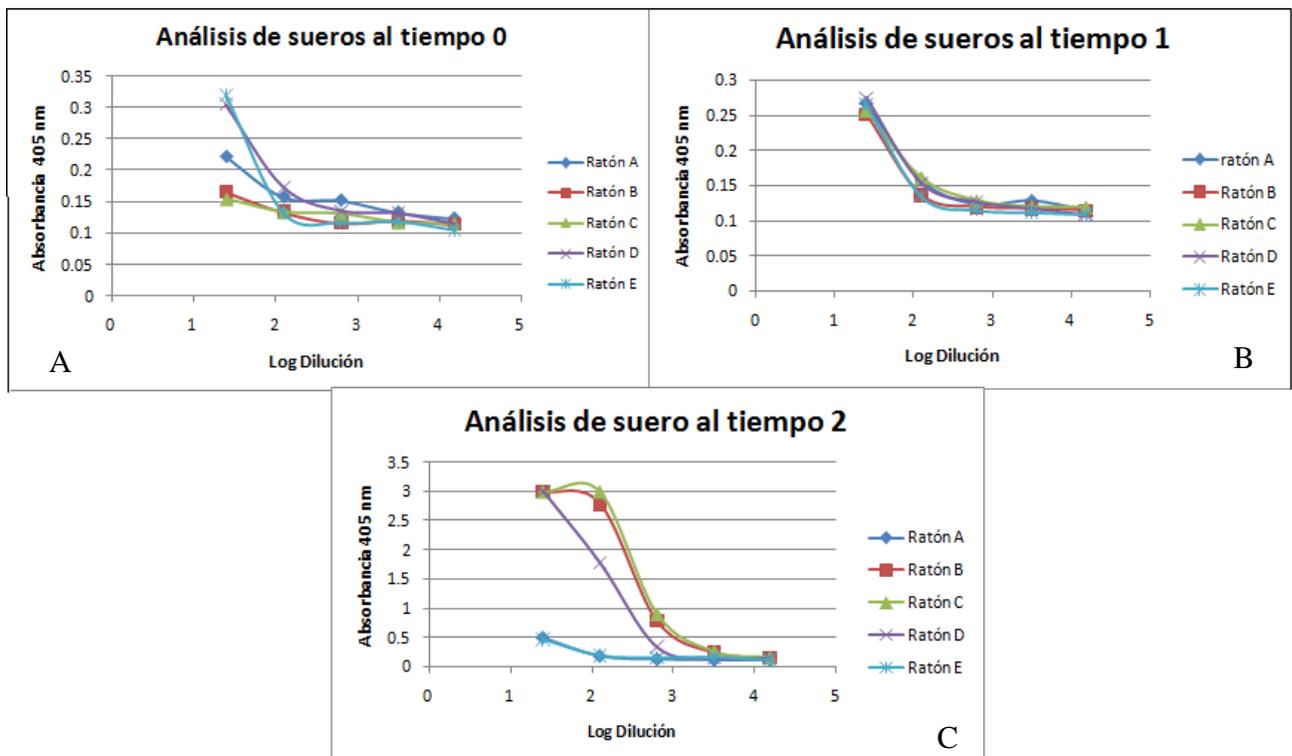
M. gordonae

M. bovis BCG Danesa

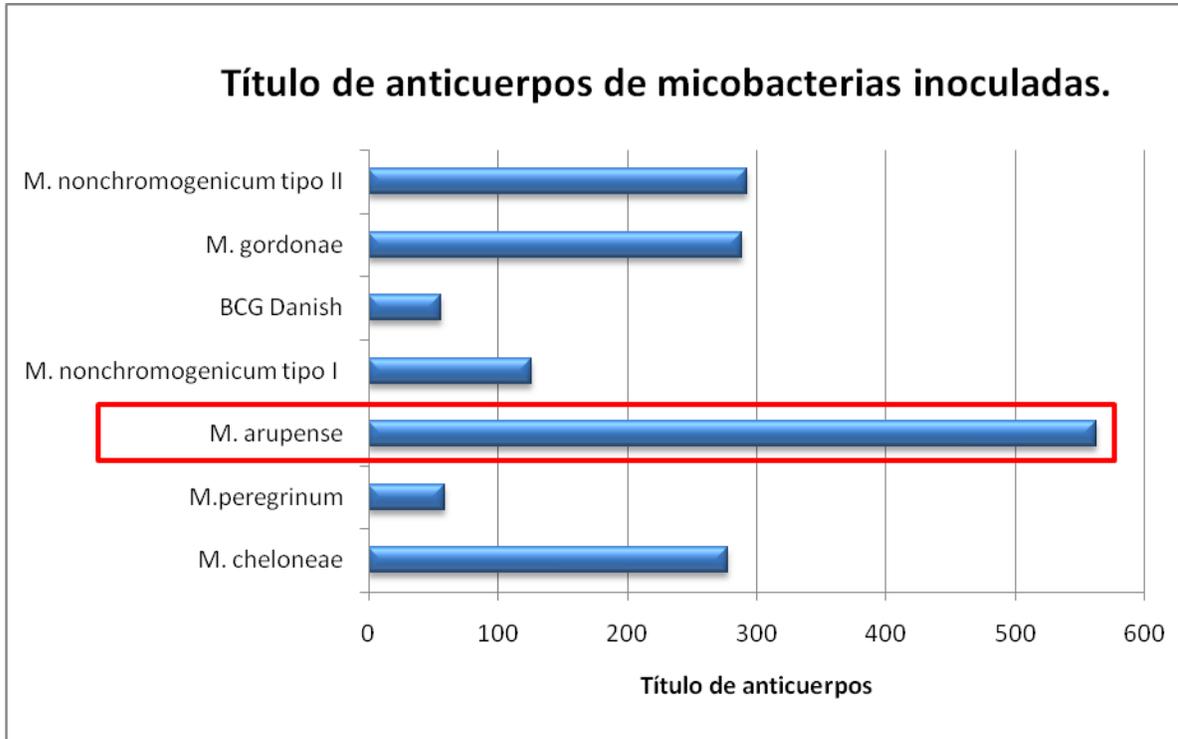
6.3 Análisis Del Suero De Los Ratones Inmunizados.

A partir del suero de los 5 ratones inmunizados para cada tiempo y cada cepa de micobacterias se realizó la titulación del isotipo IgG1 por el método de ELISA para observar el incremento en la respuesta inmune humoral y determinar con esto la cepa y el ratón candidato para realizar la fusión celular.

En la gráfica 5 se observa el título sérico de los ratones de la cepa *Mycobacterium arupense* y en la gráfica 6 se observa el título de anticuerpos del ratón con mayor título al tiempo 2 de cada una de las cepas, *Mycobacterium arupense* (recuadro rojo) fue la micobacteria que mostró el mayor título en la respuesta humoral.



Gráfica 5. Titulación sérica de los ratones inmunizados con las diferentes micobacterias. En esta imagen se muestran los resultados obtenidos de la cepa *Mycobacterium arupense* en tres diferentes tiempos (A, B, C).



Gráfica 6. Comparación del título de anticuerpos al T2 obtenido a partir del ratón con mayor título para cada cepa

Como se observa en la tabla 8 el ratón que obtuvo mayor título en la respuesta humoral de la cepa *M. arupense* es el ratón C, por lo cual se seleccionó para realizar la esplenotomía y realizar la fusión celular para la obtención de anticuerpos monoclonales.

Tabla 8. Título de anticuerpos de los ratones correspondientes a la cepa *M. arupense* al tiempo 3.

Ratón	Título
A	1:631
B	1:1479
C	1:1585
D	1:1380
E	1:120

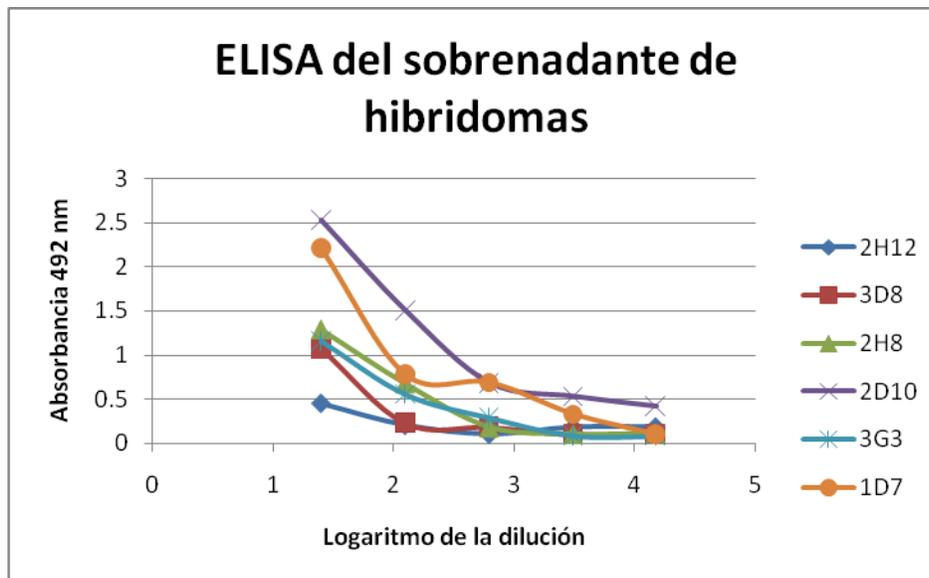
6.4 Fusión, Selección y Proliferación De Hibridomas

A partir de la fusión celular se obtuvo un total 297 clonas, la selección de 11 clonas (Tabla 9) se determinó con base en los valores de absorbancia más altos que se determinaron por ELISA por su respuesta contra *M arupense* para su posterior expansión y caracterización.

Tabla 9. Hibridomas positivos contra la cepa *Mycobacterium arupense*

Clona	Clona	Clona	Clona
1D7	2H8	3E1	3G3
2D10	2H12	3E2	3G5
2E7	3D8	3G2	

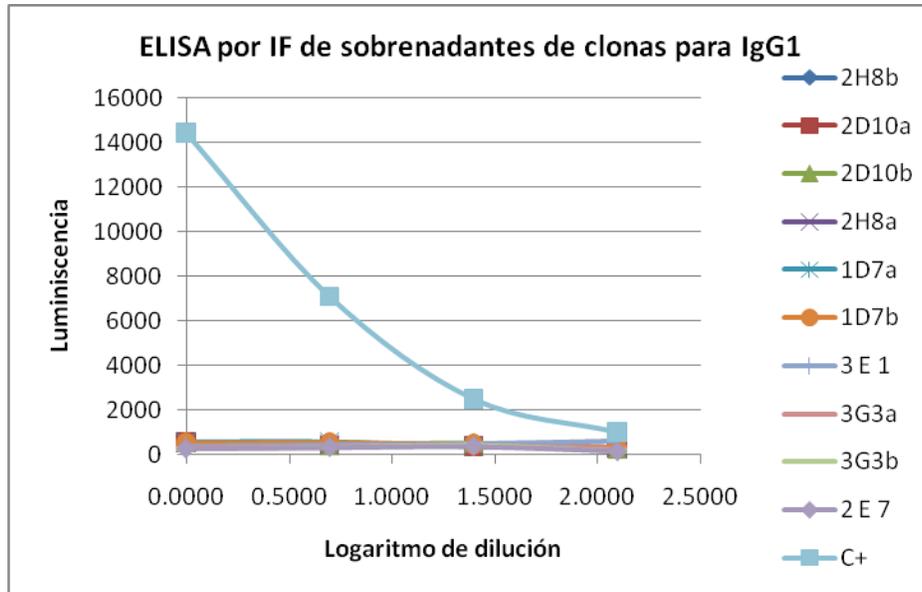
Posteriormente se eligieron sólo las clonas que mostraron mayor respuesta contra la bacteria para su posterior expansión y caracterización.



Gráfica 7. Gráfica representativa de la selección de las clonas productoras de anticuerpos mediante ELISA de los sobrenadantes de las clonas seleccionadas

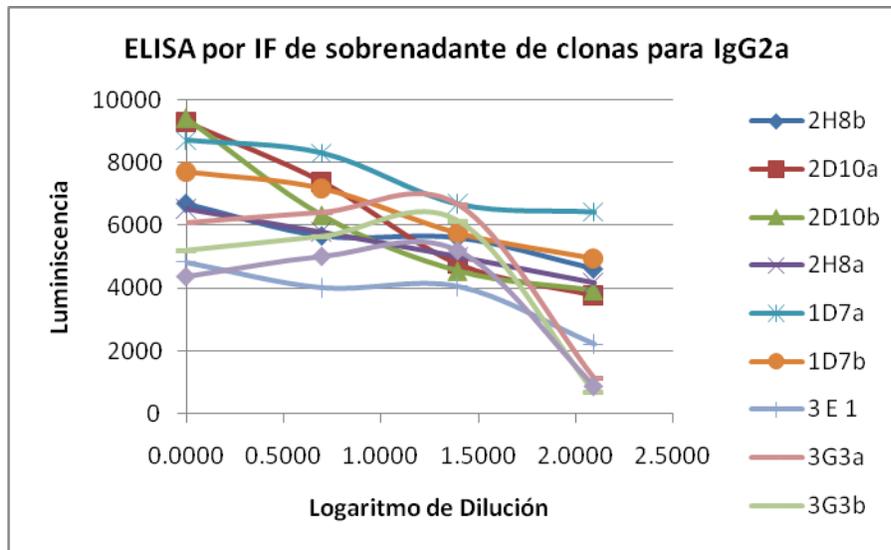
Como parte del escrutinio para determinar el isotipo de anticuerpos monoclonales se analizaron los sobrenadantes de las clonas mediante la técnica de ELISA por

inmunofluorescencia. En la gráfica 8 se muestra los resultados para el ensayo para determinar la presencia del isotipo IgG1, mismo que resultó negativo.



Gráfica 8. Respuesta de los sobrenadantes al anticuerpo contra IgG1.

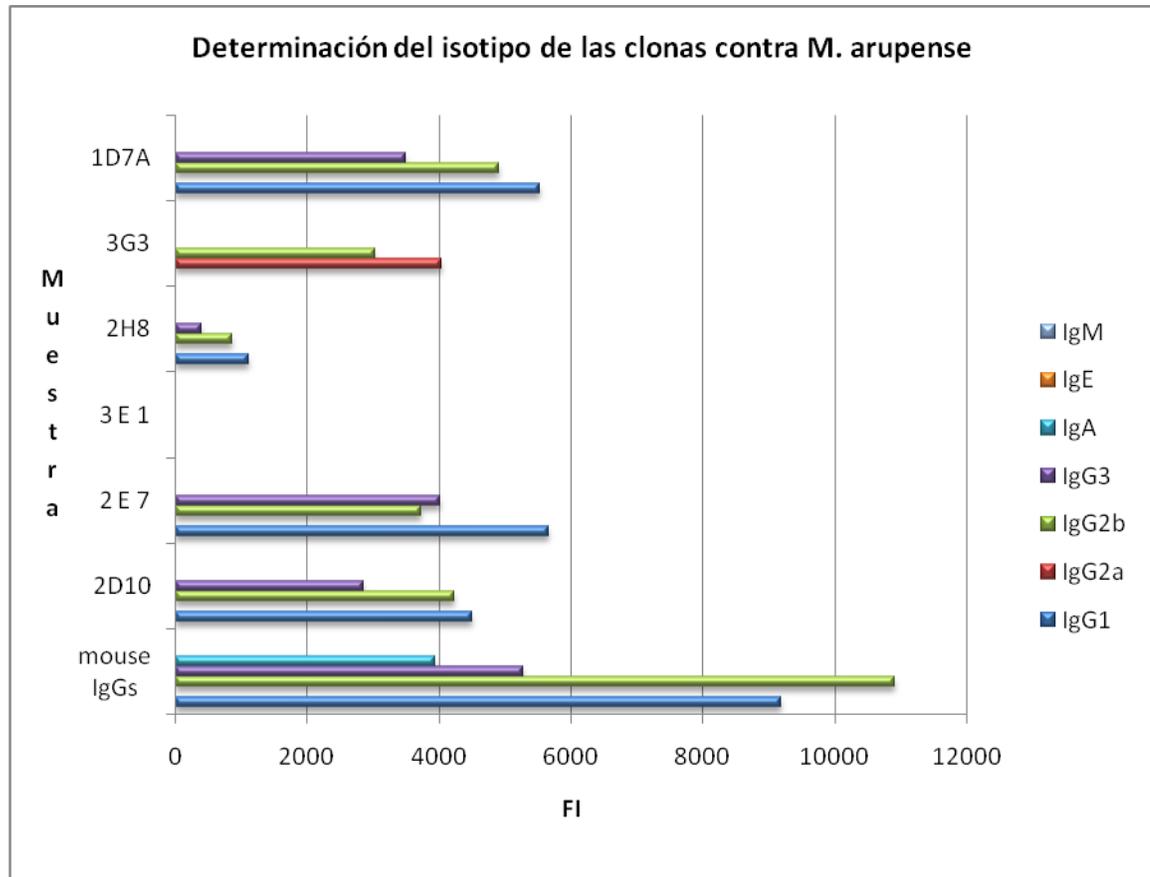
En el ensayo para determinar el isotipo IgG2 (Gráfica 9) se determinó que las clonas mostraron una reacción positiva.



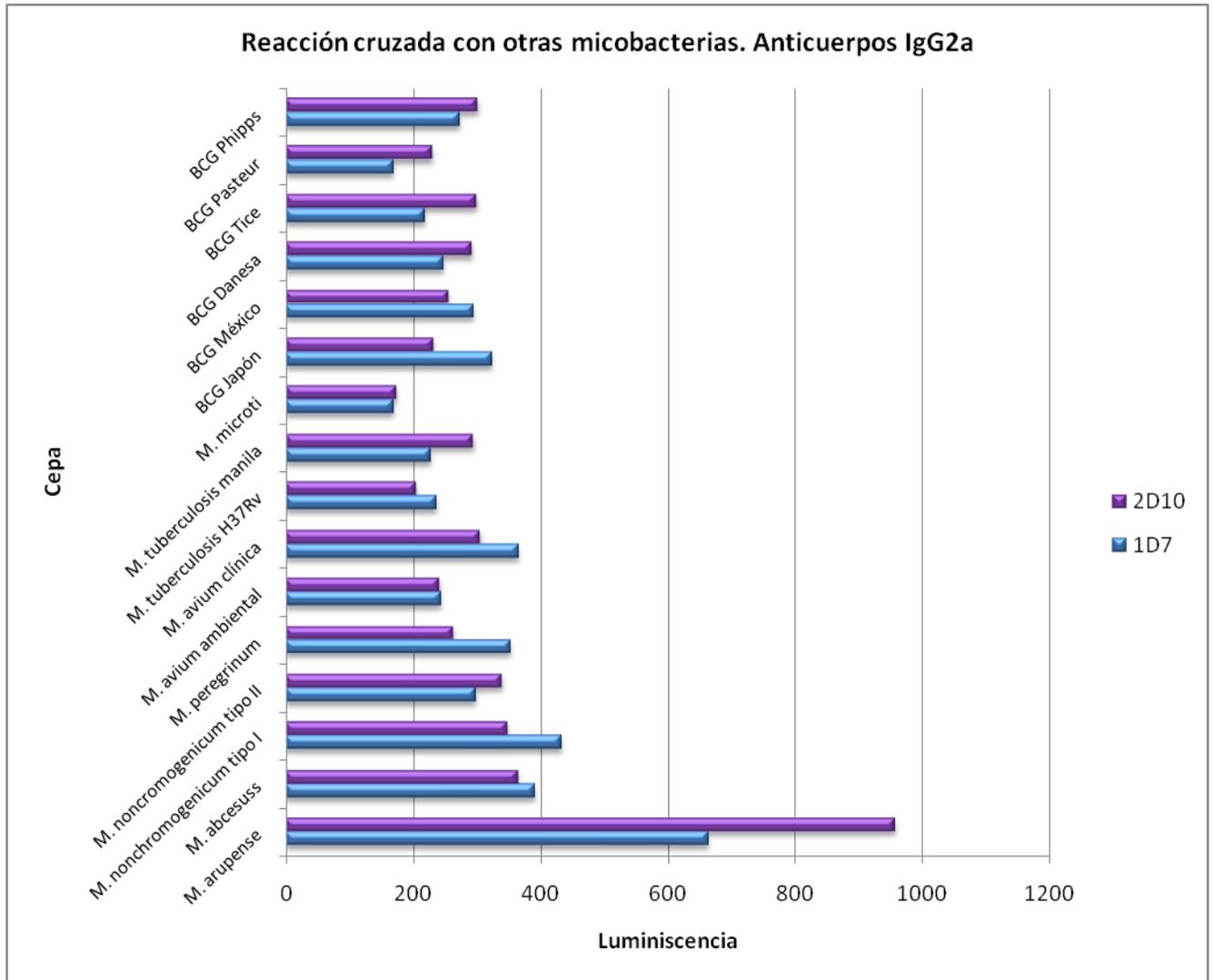
Gráfica 9. Respuesta de los sobrenadantes al anticuerpo contra IgG2a.

6.5. Caracterización de Hibridomas

A partir de los sobrenadantes de las clonas se realizó la isotipificación de los anticuerpos con el ensayo MULTIPLEX, los resultados de este ensayo (Gráfica 10) mostraron la presencia mayoritaria de un isotipo.



Gráfica 10. Determinación de isotipo de las clonas contra *M. arupense* el isotipo mayoritario correspondió a IgG2.



Gráfica 11. Evaluación de reactividad cruzada entre el anticuerpo monoclonal Ma2D10 y Ma 1D7 contra otras micobacterias

El mayor reconocimiento se observó para la cepa homóloga, seguida de las otras micobacterias no tuberculosas, las cepas del complejo MTB, las subcepas BCG y la de menor reactividad fue para *M. microti*

7. Discusión.

La identificación de micobacterias no tuberculosas ha tomado gran importancia por la asociación a patologías, falsos positivos en el diagnóstico por el PPD y la disminución de la eficacia protectora de la vacunación con BCG (56). Estas micobacterias están ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas donde el agua es considerado como el principal vehículo, por lo cual, diferentes autores realizaron estudios para identificar las especies de micobacterias presentes en agua con el fin de dilucidar cuáles son las especies con las que estamos en contacto frecuente (10-16).

En la ciudad de México el grupo del Programa de Inmunología Molecular Microbiana aisló diferentes especies de micobacterias no tuberculosas a partir de muestras provenientes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, a partir de estos estudios: las cepas de micobacterias con mayor prevalencia y/o de importancia clínica se seleccionaron, entre las que se encontraba la cepa *Mycobacterium arupense*. La caracterización de esta cepa es de importancia debido a que existen pocos reportes sobre esta especie de MNT y por su asociación con patologías, lo cual está probablemente relacionado a la baja especificidad de sus pruebas bioquímicas, y a la identificación ineficaz mediante el patrón de ácidos micólicos por HPLC. Cabe mencionar que Castillo-Rodal y López-Vidal (manuscrito enviado, Appl Environ Microbiol 2009) reportaron el aislamiento de *Mycobacterium arupense* de agua para uso y consumo humano.

Mycobacterium arupense es un bacilo corto que suele formar grupos dando la apariencia de bacilos largos. El crecimiento en fase media logarítmica se alcanza a una densidad óptica de 0.9 el cual se logra entre el 9° y 10° día; en esta fase la bacteria se encuentra metabólicamente activa expresando una gran cantidad de proteínas lo que incrementó la probabilidad de encontrar proteínas de baja expresión para la obtención del proteoma de esta cepa. Además, al existir una mayor cantidad de proteínas, esperábamos que se formara una respuesta inmune humoral en contra de la mayor cantidad de epítopes y con esto aumentar la posibilidad de obtener un ratón con una respuesta inmune eficiente contra alguna proteína específica de la especie para realizar la fusión celular.

La proteómica combina la separación de proteínas a gran escala y la sensibilidad de la identificación de estas por lo que es ampliamente usada en estudios de geles de segunda dimensión para estudios de distribución de proteínas, expresión diferencial, interacciones entre éstas y las posibles modificaciones post-traduccionales. A pesar de estas ventajas las réplicas de los proteomas tienen diferencias, las cuales no se atribuyen a un factor único, más bien, es una mezcla de factores como la diferencia en la regulación de expresión génica, procesos diferentes de modificación post-traduccionales, mutaciones puntuales y diferencias génicas aún no descritas, por esto, es necesario realizar una plantilla integral, en el cual se incorporan las imágenes de cada réplica para formar una imagen que reúna el mayor número de proteínas con el fin de tener un mapa representativo de todas las proteínas que expresa la muestra en un momento definido (57-58).

Para este proteoma se utilizó un gradiente de pH de 4-10 debido a que en ensayos previos y en otras publicaciones de geles de 2D-PAGE de otras micobacterias se ha observado que las proteínas se concentran en este intervalo (59-60); para comparar los proteomas independientes y construir el gel maestro se evaluó el coeficiente de variación de diferentes parámetros que son proporcionados por el programa PD Quest (ver tabla 6) el cuál para ser válido debe de permanecer siempre inferior a un coeficiente de variación del 30%. En la figura 12 se localizaron 876 proteínas que se distribuyeron en tiras de inmobilinas con gradiente de pH inmóvil encontrándose la mayor cantidad en un intervalo de 4.51 a 5.75 (Gráfica 3), además, la mayor cantidad de estas oscila entre 20 a 80 kDa lo cual nos indica que hay la mayor parte de estas son de bajo peso molecular (Gráfica 4).

En los geles que se presentan no se puede realizar un estudio comparativo de abundancia de proteínas, debido a que la técnica empleada para la tinción con nitrato de plata no permite realizar esta comparación, sin embargo, al realizar una tinción con azul de Coomassie en la cual la intensidad del punto está relacionada con la abundancia de la proteína este análisis sería factible (61).

Actualmente, éste es el primer reporte del proteoma de esta micobacteria, por lo que al conocer la distribución de proteínas se podrían realizar análisis comparativos con los proteomas de otras micobacterias, tanto tuberculosas como no tuberculosas con el fin de identificar proteínas únicas para cada especie de micobacteria, así como realizar estudios comparativos entre la expresión de proteínas de *Mycobacterium arupense* proveniente de aislamientos clínicos como de aislamientos ambientales.

Las cepas seleccionadas para la inmunización se irradiaron en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares debido a que se desconoce el riesgo patogénico, así como limitar la secreción de proteínas para que la respuesta montada sea contra componentes de la membrana y de sustancias intracelulares. Como se puede observar en la tabla 7, la mayor parte de las micobacterias pertenecen al grupo de MNT excepto *Mycobacterium bovis* BCG Danesa, la cual se seleccionó porque es una de las vacunas que se emplearon en México y en la etapa inicial del proyecto se deseaba comparar la respuesta humoral causada por la vacuna contra la causada por MNT.

La sangría de los ratones se realizó mediante punción en la vena del plexo maxilar; esta técnica es fácil y no es tan invasiva ni traumática como lo es la toma de muestra de la comisura externa de los párpados en el seno venoso con un capilar, además, se obtiene suficiente sangre para evaluar la respuesta humoral montada por los ratones después de cada inmunización. El análisis del suero de los ratones se evaluó para cada cepa a partir de la cual se eligió el ratón con mayor respuesta en el tiempo 2 (Gráfica 6) por lo que se seleccionó a la micobacteria con una mayor respuesta, siendo *M. arupense* para realizar la fusión celular. En esta misma gráfica podemos observar que la micobacteria que causó menor respuesta fue *Mycobacterium bovis* BCG Danesa esto podría deberse a que esta micobacteria causa principalmente una respuesta de tipo TH1 lo cual explicaría el título de anticuerpos observado.

Al inmunizar los ratones se monta una respuesta inmune para eliminar al antígeno; al inmunizar varias veces los ratones con el mismo antígeno, se propicia el incremento de la respuesta inmune adquirida lo cual provoca que aumenten los linfocitos B con memoria,

que al diferenciarse a células plasmáticas se incrementa la cantidad de anticuerpos capaces de reconocer al antígeno.

Al realizar la fusión de las células de mieloma con los esplenocitos, sólo los hibridomas estables son capaces de sobrevivir en el medio HAT (Figura 7 y 8), además de esto, el medio del kit empleado contiene metilcelulosa, otorgándole una consistencia semisólida con la cuál se pueden dispersar los hibridomas para facilitar su separación, por otra parte, esta característica del medio les permite tener nutrientes y crecer en forma de colonias, por lo cual, al tomar las colonias se espera que éstas sean hibridomas productores de un mismo tipo de anticuerpo, es decir, anticuerpos monoclonales. Al finalizar la fusión se aislaron 297 colonias de hibridomas que se colocaron en placas de 96 pozos. De estos pozos se tomó el sobrenadante para seleccionar únicamente las clonas productoras de anticuerpos que reconocieran al antígeno inmunizado. Finalmente se seleccionaron sólo 11 colonias capaces de reconocer a la cepa *M. arupense* usando como control positivo suero de ratón inmunizado que por su naturaleza policlonal reconoce varios epítopes del antígeno dando como resultado una mayor señal con el anticuerpo secundario (anti IgG1). Sólo el 1.4% de los hibridomas se seleccionó para su proliferación por tener la mejor señal con el anticuerpo secundario. Una explicación es que durante la fusión no sólo existe la unión linfocito B-mieloma, sino que también puede existir la unión de otros esplenocitos con las células de mieloma, estas uniones podrían ser estables, pero no producirían anticuerpos. Otra opción es que los anticuerpos producidos no monten una respuesta suficiente por lo cual no se consideraron para su proliferación.

Debido a que la producción de anticuerpos monoclonales tiene costos muy elevados se realizó otro tamizaje para seleccionar las clonas con el mayor título de anticuerpos respuesta mediante análisis con ELISA con el anticuerpo secundario de conejo anti IgG1 de ratón, por lo cual sólo se seleccionaron 6 clonas para su proliferación (Gráfica 7).

Posteriormente, se realizó la titulación por el método de ELISA de las clonas con el mayor crecimiento mediante ELISA por inmunofluorescencia para evaluar la presencia de un isotipo de anticuerpo. En estos resultados observamos que al revelar con el anticuerpo

anti-IgG1 tenían la misma tendencia al compararse con el suero hiperinmune; (Gráfica 8) esta señal corresponde a reactividad inespecífica. Al observar los resultados obtenidos usando un anticuerpo anti-IgG2 (Gráfica 9) la respuesta fue mayoritaria para este isotipo.

Estos sobrenadantes se analizaron con la tecnología multiplex, la cual ofrece la ventaja de analizar varios isotipos en la misma muestra con una pequeña cantidad de ésta, en la gráfica 10 se determinó que hay señal mayoritariamente para el un isotipo IgG2, esto nos indica que el ensayo mostro inespecificidad quizás debida a una deficiente eliminación de excesos de reactivos o de la muestra. El isotipo IgG2 esta relacionado principalmente a procesos de neutralización (38,39,40).

A los dos sobrenadantes con mayor título de anticuerpos contra *M. arupense* (Ma2D10 y Ma1D7) se les determinó la reactividad cruzada contra diferentes cepas de micobacterias (ver Tabla 4) con el propósito de determinar la especificidad. En la gráfica 11 se observa que ambos sobrenadantes reconocen principalmente a la cepa *M. arupense* destacándose el sobrenadante de la clona Ma2D10 por reconocer 60% más a esta cepa, por otra parte, observamos que el anticuerpo secretado por este hibridoma fue capaz de reconocer un epítoto común de las cepas estudiadas. En la misma gráfica se observa que el anticuerpo Ma2D10 no mostró el mismo reconocimiento por las cepas de *M. nonchromogenicum* a pesar de ser la especie más cercana y con la cual se esperaría compartiera una gran homología proteica.

El estudio contribuye a la identificación de proteínas y representa la primera parte para la producción de anticuerpos monoclonales contra micobacterias no tuberculosas para identificar las proteínas más inmunogénicas que ayuden a diferenciar a las especies de Micobacterias No Tuberculosas.

8. Conclusiones.

- ❖ *Mycobacterium arupense* generó la mayor respuesta inmune humoral.
- ❖ Seis hibridomas contra *M. arupense* fueron seleccionados para su propagación y caracterización.
- ❖ Los hibridomas secretan anticuerpos del isotipo IgG2 dada la vía de inoculación utilizada.
- ❖ Las proteínas de extracto celular de *Mycobacterium arupense* se distribuyen principalmente en un pl ácido y MM menor a 100 kDa.

9. Perspectivas.

A partir del proteoma de *Mycobacterium arupense* será posible realizar análisis comparativos con otras micobacterias no tuberculosas con el fin de determinar las proteínas compartidas entre MNT que podrían ser usadas como marcadores de exposición a MNT.

Al obtener los anticuerpos monoclonales se obtendrá un inmunoproteoma para determinar la proteína que reconoce cada hibridoma y determinar su uso para la identificación clínica y/o ambiental de *Mycobacterium arupense*

10. Bibliografía

1. **Pfyffer, E. G., A. B. Brown-Elliott, and R. J. Wallace.** 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 535-552. In P.R. Murray, E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R. H.Yolken(ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, vol. 1. ASM Press, Washongton, D. C.
2. **Fernández de Vega, A. F, M. J. Esteban, M.J. González, and G.J. Palácios.** 2005. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
3. **Euzéby, J. P.** 15 de Septiembre de 2008 1997, posting date. List of Bacteria Names with Standing in Nomenclature. [Online] <http://www.bacterio.cict.fr/m>
4. **Mostowy, S., and M. A. Behr.** 2005. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Chest Med* **26**: 207-16, v-vi.
5. **García-Sancho, M.** 2001. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura, p. 114-128, *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, vol. 14
6. **North, R. J., and Y. J. Jung.** 2004. Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **22**:599–623.
7. **Raja, A.** 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* **120**:213-232.
8. **Pinner, M.** 1933. IV. Atypical Acid Fast Organisms: II. Some Observations on Filtration Experiments. *J Bacteriol* **25**: 576-9
9. **Wayne, L. G., G. P. Kubica, P. A. Sneath, N.S. Mair, and S. M. E.** 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, p. 1436-1457. In G.M. Garrity, D.R. Boone, and R. W. Castenholz (ed.), 2nd ed. Baltimore.
10. **Katoch, V, M.** 2004. Infections due non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* **120**: 290-304
11. **Marsollier, L., T. Stinear, J. Aubri, J. P. Saint Andre, R. Robert, P. Legras, A. L. Manceaue, C. Audrain, C. Bourdons, H. Kouakou, and B. Carbonnelle.** 2004. Aquatic plants stimulate the growht of an biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in environment. *Appl Environ. Microbiol.* **70**:1097-103

12. **Primm, T. P., C. A. Lucero, and J. O. Falkinham, 3rd.** 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**: 98-106
13. **Collins, C. H., J. M. Grange, and M. D. Yates.** 1984. Mycobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol* **57**:193-211
14. **Philipps, M. S., and C. F. Von Reyn.** 2001. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis.* **33**: 1363-74
15. **Vaerewijck, M. J., G. Huys, J. C. Palomino, J. Swings, and F Portaels.** 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 911-34
16. **Bland, C. S., J. M. Ireland, E. Lozano, M. E. Alvarez, and T. P. Primm.** 2005. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5718-27.
17. **Tortoli, E.** 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* **16**, 319-354.
18. **Fenton M. J., and M. W. Vermeulen.** 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* **64**: 683-90
19. **Vincent V., A. B. Brown-Elliot, K. C. Jost, Jr., and E. J. Wallace.** 2003 *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, p. 560-584. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
20. **Butler, W. R., K. C. Jost., and J. O. Kilburn.** 1991. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* **29**:2468-2472.
21. **Butler, W. R., and J. O Kilburn.** 1988. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. *J Clin Microbiol.* **26**:50-3
22. **Fine P. E., J. Bruce, J. M. Ponnighaus, P. Nkhosa, A Harawara, and E. Vynnycky.** 1999. Tuberculin sensitivity: conversions and reversions in rural African population. *Int J Tuberc Lung Dis* **3**:962-75
23. **Floyd, S., J. M. Ponnighaus, L. Bliss, P. Nkhosa, L Sichali, G. Msiska and P. E. Fine.** 2002. Kinetics of delayed-type hypersensitivity to tuberculin induced by bacilli Calmette-Guérin vaccination in northern Malawi. *J Infect Dis* **186**: 807-14

24. **Makinen, J., A. Sarkola, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, and H. Soini.** 2002. Evaluation of genotype and LiPA MYCOBACTERIA assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. *J Clin Microbiol* **40**:3478-81
25. **Suffys, P. N., A. da Silvia Rocha, M. de Oliveira, C. E. Campos, A. M. Barreto, F. Portaels, L. Rigouts, G. Wouters, G. Jannes, G. van Reybroek, W. Mijs, and B. Vanderborght.** 2001. Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO- LiPA *Mycobacteria*, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol* **39**: 4477-82
26. **Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch.** 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* **36**:139-147
27. **Masaki, T., K. Ohkusu, H. Hata, N. Fujiwara, H. Iihara, M. Yamada-Noda, P. H. Nhung, M. Hayashi, Y. Asano, Y. Kawamura, and T. Ezaki.** 2006. *Mycobacterium kumamotoense* Sp. Nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of *Mycobacterium arupense* in Japan: Novel slowly growing nonchromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium terrae* complex. *Microbiol Immunol* **50**:889-897
28. **Cloud, J. L., J. J. Meyer, J. I. Pounder, K. C. Jost, Jr., A. Sweeney, K. C. Carroll, and G. L. Woods.** 2006. *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:1413-8
29. **Petrini, B.** 2006. Non-tuberculous mycobacterial infections. *Scan J Infec Dis*. **38**:246-55
30. **Falkinham, J. O., 3rd.** 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **9**:177-215
31. **Falkinham, J. O., 3rd.** 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **9**:763-7
32. **Brown-Elliott, B. A., and R. J. Wallace, Jr.** 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **15**:716-46
33. **Durnez, L., M. Eddyani, G. F. Mgode, A. Katakweba, C. R. Katholi, R. R. Machang'u, R. R. Kazwala, F. Portaels, and H. Leirs.** 2008. First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Appl Environ Microbiol* **74**: 768-73

34. **Tsai, T. F., C. C. Lai, I. C. Tsai, C. H. Chang, C. H. Hsiao, and P. R. Hsueh.** 2008. Tenosynovitis caused by *Mycobacterium arupense* in a patient with diabetes mellitus. Clin Infect Dis **47**: 861-3
35. **DeFranco, A. L.** 1987. Molecular aspects of B-lymphocyte activation. Annu Rev Cell Biol **3**:143-78.
36. **Clark, E. A., and J. A. Ledbetter.** 1994. How B and T cells talk to each other. Nature **367**:425-8
37. **Hess, J., A. Werner, T. Wirth, F. Melchers, H. M. Jack, and T. H. Winkler.** 2001. Induction of pre-B cell proliferation after the novo synthesis of the pre-B cell receptor. Proc Natl Acad Sci USA **98**:1745-50
38. **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik.** 2001. Immunobiology, 5th ed, vol. 1. Garland Publishing, New York
39. **Abbas, A. K., and A. L. Lichtman.** 2004. Inmunología celular y molecular, 5th ed, vol. 1. ELSEVIER, Madrid.
40. **Padlan, E. A.** 1994. Anatomy of the antibody molecule. Mol Immunol **31**:169-217.
41. **Manz, R. E., E. Hauser, Falk Hiepe, and Andreas Radbruch.** 2005. Maintenance of serum antibody levels. Annual Review of Immunology. **23**:367-386
42. **Manz, R. A., S. Arce, G. Cassese, A. E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch.** 2002. Humoral immunity and long lived plasma cells. Curr Opin Immunol **14**:517-21
43. **García, T. F.** 1997. Fundamentos de Inmunobiología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
44. **Köhler, G., and C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. **256**:495-7
45. **Köhler, G.** 1985. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. EMBO J **4**:1359-65.
46. **Nelson, P. N., G. M. Reynolds, E. E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos, and P. G. Murray.** 2000. Monoclonal antibodies. Mol Pathol **53**:111-7
47. **Goding, J. W.** 1986. Monoclonal antibodies: Principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology. 2nd ed. Academic Press. United States of America.

48. **Nissim, A., and Y. Chernajovsky.** 2008, Historical development of monoclonal antibody therapeutics, *Handb Exp Pharmacol.* **181:** 3-18
49. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72:** 248-54
50. **Zor, T., and Z Selinger.** 1996. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases its Sensitivity: Theoretical and Experimental studies. *Anal Biochem* **236:**302-8
51. **Berkelman, T., and T. Stenedt.** 1998. 2-D Electrophoresis. Principles and methods. Amersham Biosciences, UK
52. **Görg, A., A. Klaus, C. Lück, F. Weiland, and W. Weiss.** 2007. Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A LABORATORY MANUAL. Technische Universität München, Germany.
53. **Yokoyama, W. M., M. Christensen, G. D. Santos, and D. Miller.** 2006. Production of monoclonal antibodies. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 2:** Unit 2.5
54. **Manual.** 2003. ClonaCell HY Information, vol. 1. StemCell Technologies Inc
55. **Strober, W.** 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 3:**3B
56. **Andersen, P., and T. M. Doherty.** 2005. The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* **3:**656-62
57. **Cho, W. C.** 2007. Proteomics Technologies and Challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **5:**77-85
58. **Garfin, D. E.** 2003. Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *Trens in Analytical Chemistry.* **22:**263-272
59. **Junblut, P. R., U. E. Schaible, H. J. Mollenkopf, U. Zimny-Arndt, B. Raupach, J. Mattow, P. Halada, S. Lamer, K. Hagens, and S. H. Kaufmann.** 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* **33:**1103-17
60. **Rosenkrands, I., A. King, K. Weldingh, M. Moniatte, E. Moertz, and P. Andersen.** 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis* **21:**3740-56

ANEXO 1

Tinción de Ziehl-Neelsen

Después de realizar el frotis, se cubre el portaobjetos con fucsina fenicada y se calienta a emisión de vapores durante 5 min. Se lava con agua y se decolora con alcohol ácido durante 1 min. Posteriormente realizar otro lavado con agua y cubrir el portaobjetos con solución de azul de metileno por 1 min. Finalmente se lava con agua y se deja secar al aire.

Preparación de reactivos

❖ Carbol fucsina

Fucsina básica	0.3 g
Alcohol etílico 95%	10 mL
Fenol (cristales derretidos)	5 g
Agua destilada	90 mL

❖ Alcohol ácido

Alcohol etílico	97 mL
Ácido clorhídrico concentrado	3 mL

❖ Azul de metileno

Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	100 mL

Tinción de Auramina-Rodamina

Después de realizar el frotis, se fija la laminilla a 65 °C y a se cubre el portaobjetos con la solución de auramina-rodamina durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lava con agua y se decolora con alcohol ácido 0.5% durante 2 min. Posteriormente realizar otro lavado con agua y cubrir el portaobjetos con solución de contraste por 2 a 4 minutos. Finalmente se lava con agua y se deja secar al aire. Las muestras se examinan en un microscopio de fluorescencia.

Preparación de reactivos:

❖ Auramina rodamina

Solución A

Auramina O	1.5 g
Rodamina B	0.75 mL
Glicerol	75 mL

Solución B

Fenol	10 mL
H ₂ O	50 mL

Se combinan ambas soluciones y se agitan durante 24 horas, posteriormente filtrar y almacenar a 4°C cubriendo de la luz

❖ Alcohol ácido

Alcohol etílico 70%	100 mL
Ácido clorhídrico concentrado	0.5 mL

❖ Solución de contraste

Permanganato de potasio	0.5 g
H ₂ O	100 mL

ANEXO II PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Reactivo de bradford (50 mL)

CBB G-250	50 mg
Alcohol etílico absoluto	25 mL
Ácido fosfórico	50 ml
H ₂ Od	cbp 500 mL
Almacenar a 4°C y cubrir de la luz	

Buffer de equilibrio

Urea	6M
Glicerol	30% v/v
Tris pH 8.8	50 mM
SDS	2% w/v
Azul de bromofenol	0.002%

Acrilamida/bis-acrilamida 30.1%

Acrilamida (para electroforesis)	29.1 g
Bis- acrilamida	0.9 g
H ₂ Od	cbp 100 mL
Desgasificar 30 minutos al vacío y filtrar con papel Whatman #1. Conservar a 4°C y cubrir de la luz	

Tris 1.5 M pH 8.8

Tris base (para electroforesis)	25 g
H ₂ Od	cbp 150 mL
Ajustar a pH 8.8 y filtrar con papel Whatman #1. Conservar a 4°C y cubrir de la luz	

Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%

SDS	10g
H ₂ Od	Cbp 100mL
Filtrar cpm Whatman #1 y conservar a temperatura ambiente	

Persulfato de amonio (APS) 10%

APS	0.75 g
H ₂ O _d	7.5 mL
Congelar a -70°C	

Agarosa para sellar

Agarosa	0.5% w/v
Buffer de corrida 5X	10 mL
Azul de bromofenol	0.002% w/v
H ₂ O _d	40 mL

Buffer de corrida 5X

Glicina	192 mM
Tris base	25 mM
SDS	0.1%
H ₂ O _d	cbp 1L
Filtrar con papel Whatman #1 y almacenar a 4°C	

Solución de fijación

Etanol	40%
Ácido acético	10%

Solución de lavado

Alcohol etílico	30 %
-----------------	------

Solución de pre-tratamiento.

Tiosulfato de sodio pentahidratado	0.2 g/L
------------------------------------	---------

Solución de impregnación

Nitrato de plata	2 g/L
Formaldehído 37%	0.75 mL
H ₂ O _d	cbp 1 L

Solución de revelado

Carbonato de sodio	60 g/L
Formaldehído 37%	0.5 mL
Tiosulfato de sodio pentahidratado	4 mg/L
H ₂ Od	cbp 1L

Solución de paro

Ácido acético	5%
---------------	----

Buffer de transferencia

Alcohol metílico	20 %
Tris	48 mM
Glicina	39 mM

Solución amortiguadora de fosfatos

NaH ₂ PO ₄ anhidro	0.23 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	1.15 g
NaCl	9.00 g
H ₂ Od	cbp 1L
Ajustar el pH a 7.2-7.4	

Solución amortiguadora de bicarbonato

Carbonato de sodio	0.159 g
Bicarbonato de sodio	0.293 g
H ₂ Od	cbp 100 mL
Ajustar el pH a 9.6	

Solución amortiguadora de citratos

Ácido cítrico	0.730 g
Fosfato ácido de sodio	1.180 g
H ₂ Od	cbp 100 mL
Ajustar el pH a 5.5. Conservar a 4 °C	

61. Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P. G. Righetti. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. **25**:1327-33