



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
BCG MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
KAREN FLORES MORENO**



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

VOCAL: LUCIANO HERNÁNDEZ GOMEZ

SECRETARIO: YOLANDA LÓPEZ VIDAL

1ER. SUPLENTE: GONZALO CASTILLO ROJAS

2° SUPLENTE: MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: PROGRAMA DE INMUNOLOGÍA
MOLECULAR MICROBIANA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

SUPERVISOR TÉCNICO: cDRA. PATRICIA ORDUÑA ESTRADA

SUSTENTANTE: FLORES MORENO KAREN

AGRADECIMIENTOS

A mi segundo hogar, la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química, de la que me siento orgullosa de pertenecer; por todo lo recibido y la enorme riqueza que me brindo.

A la Dra. Yolanda López Vidal por abrirme las puertas de su laboratorio, darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su gran apoyo, asesoría, confianza y enseñanza a lo largo de este proyecto; mil gracias.

A la cDra. Patricia Orduña Estrada por su apoyo incondicional, asesoría técnica, paciencia durante la planeación y desarrollo experimental. Sobre todo por su gran amistad.

Al M. C. Erick Amador Gaytán por la asesoría en la parte de proteómica, por todo su apoyo, enseñanza, tiempo y gran paciencia; además de ser un maestro fue uno de mis mejores amigos, gracias.

Al ININ por permitir la irradiación de la cepas empleadas en este proyecto.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser del Departamento de Medicina Experimental, donde se realizó la inmunización y mantenimiento de los ratones.

Al Sr. Ricardo Hernández por su ayuda en el manejo de animales de laboratorio y su valiosa amistad.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández de Facultad de Medicina, por su gran colaboración en la identificación de las proteínas por espectrometría de masas.

A los miembros de Programa de Inmunología Molecular Microbiana, por su apoyo y compañerismo a lo largo del proyecto.

Beca del CONACyT, proyecto 60577M y el Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto "Enfermedades Infecciosas" de la línea de investigación ENFERMEDADES INFECCIOSAS 10SDEI.PTID.05.4.

DEDICATORIAS

A Dios por otorgarme la vida, salud y una familia maravillosa.

A mis padres por ser los pilares más importantes de mi vida, porque con sus enseñanzas me han formado y con su ejemplo de esfuerzo y logros me inspiran a superarme. Muchas gracias por su apoyo incondicional y confianza en mí, los cuales han sido fundamentales para llegar a esta meta. Los amo.

A mis hermanas Olivia, Samanta y Sarai, por escucharme aun sin entenderme, porque han estado conmigo en cualquier momento tratando de comprenderme y aconsejarme; chicas las quiero demasiado y mas que hermanas somos unas grandes amigas, muchas gracias.

A mi gran familia por su cariño. Y a mi prima Araceli por su apoyo y toda la comprensión que me dio.

A mi amiga Gabriela, gracias por brindarme tu amistad y sinceridad, por estar conmigo en los buenos y malos momentos; porque juntas el trayecto fue más liviano pero lo logramos; vales mil.

A Adriana, Alicia, Brenda, Erick, Jacqueline, Lulú, Maribel, Paty, Paco, Sebastian, Sr Ricardo, Stephanie, Viridiana, por su ayuda y todos los buenos momentos que pasamos. Por todo lo que he aprendido de cada uno de ustedes y más que compañeros los considero mis amigos. Los quiero mucho.

A todos mis compañeros a lo largo de mis estudios y en especial a Roxana, Gabriela Rubí y Carlos por su amistad y los buenos momentos dentro y fuera de la facultad.

A mis amigos Ubaldo, Alexis, Iván, Jesús, Karla y Victor Monsi, por estar conmigo, apoyándome y haciendo ameno cualquier momento.

ÍNDICE GENERAL

	Página
JURADO ASIGNADO	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
RESUMEN	viii
ABREVIATURAS	ix
ANTECEDENTES	1
Tuberculosis	1
Epidemiología	5
Control y prevención de la tuberculosis	7
Vacuna BCG	8
Vacunación con BCG en México	10
Eficacia protectora de la vacuna BCG	11
Subcepas BCG	14
Anticuerpos Monoclonales	19
Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
Objetivo general	
Objetivos particulares	
METODOLOGÍA	25

1 Desarrollo del inóculo	25
1.1 Precultivo de la cepa	25
1.1.1 Curva de crecimiento	25
1.2 Elaboración del inóculo	26
2 Inmunización	26
2.1 Análisis de sueros obtenidos de los ratones inmunizados con BCG México	27
3 Fusión, selección y clonación de hibridomas	28
3.1 Líneas celulares y fusión	28
3.1.1 Células de mieloma	28
3.1.2 Esplenocitos	28
3.1.3 Fusión	29
3.2 Selección y clonación de hibridomas	29
4 Caracterización de anticuerpos monoclonales	30
4.1 Reacción cruzada	30
4.2 Identificación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales contra BCG México	31
4.2.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque	31
4.2.2 Equilibrio y segunda dimensión	32
4.2.3 Fijación y tinción con plata	32
4.2.4 Western blot	33
RESULTADOS	35
1. Cultivo de la cepa BCG México	35
Identificación del cultivo	

Curva de crecimiento	
2. Análisis de sueros obtenidos de los ratones inmunizados con BCG México	36
3. Fusión, selección y clonación de hibridomas	39
4. Caracterización de anticuerpos monoclonales	41
Reacción cruzada	
Identificación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales contra BCG México	
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS	63
Anexo I: Técnicas	63
Anexo II: Preparación de medios y soluciones	65
Anexo III: Análisis de sueros del grupo control negativo	69
Anexo IV: Cepas empleadas en el ensayo de reactividad cruzada	71

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa crónica ocasionada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Actualmente la única vacuna aprobada por la OMS para la prevención de la tuberculosis es la vacuna del bacilo Calmette y Guérin (BCG) proveniente de una cepa atenuada de *M. bovis*. Vacuna que ha mostrado conferir una eficacia protectora que varía del 0% al 80%; atribuida, entre otros factores, a la heterogeneidad bioquímica y molecular de las diferentes subcepas de BCG. Por lo que es necesario identificar y caracterizar inmunógenos involucrados en las diferencias de la eficacia protectora conferida por las subcepas BCG; una forma, es a través de la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconozcan proteínas inmunógenas únicas de las subcepas BCG, por ello en el presente trabajo se realizó la producción y caracterización de AcMo contra la subcepa BCG México.

La producción de los AcMo se realizó con el desarrollo del inóculo de BCG México, éste se inmunizó a un grupo de ratones hembras BALB/c. Se seleccionó al ratón con mayor producción de anticuerpos y se extrajeron sus esplenocitos para su fusión con células de mieloma. Los hibridomas obtenidos fueron seleccionados, clonados y cosechados; se seleccionó el hibridoma con los anticuerpos con mayor reactividad a la cepa, éstos se caracterizaron a través de su reactividad cruzada con otras micobacterias e identificación de las proteínas reconocidas.

Los AcMo reconocieron tres proteínas de la subcepa BCG México con regiones conservadas entre sí, dos proteínas forman parte de procesos metabólicos y la otra es una proteína hipotética conservada. Presentaron reactividad cruzada con diferentes micobacterias, lo cual correlaciona con el resultado del análisis de las secuencias de las proteínas reconocidas, ya que son idénticas en el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Estos anticuerpos monoclonales son útiles para el diseño de nuevos estudios en la caracterización de la cepa BCG México.

ABREVIATURAS

AC	Antes de Cristo
AcMo	Anticuerpos monoclonales
ATP	Adenosín trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BIRMEX	Biológicos y Reactivos de México
BSA	Albúmina sérica bovina
CBB G-250	Azul brillante de Coomassie G-250
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio] -1 propanosulfato
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Medio modificado Dulbecco Eagle
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EC	Clasificación de la enzima
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EPI	Programa ampliado de inmunización
<i>g</i>	Gravedades
g	Gramo
GLDC	Glicina deshidrogenasa
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora
HAT	Hipoxantina Aminopterina Timidina

HT	Hipoxantina Timidina
HGPRT	Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa
HRP	Peroxidasa de rábano
IAA	Iodoacetamida
IgG	Inmunoglobulina subclase G
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
IPG	Tiras de gradiente de pH inmóvil
IS	Secuencia de inserción
kGy	Kilo Gray
L	Litro
M	Concentración molar
min	Minuto
MM	Masa molecular
MNT	Complejo de micobacterias no tuberculosas
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mg	Miligramo
nm	Nanómetro
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrosa-catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PEG	Polietilenglicol

pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PPD	Derivado proteico purificado
PSA	Persulfato de amonio
PVC	Policloruro de vinilo
RD	Región de diferencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SSI	Solución salina isotónica
TAES	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
TB-MDR	Tuberculosis multidrogo resistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente drogo resistente
TK	Timidina cinasa
TS	Tiosulfato sulfotransferasa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UR	Unidades Relativas
USP	Proteínas de estrés universal
V	Volt
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
°C	Grados Celsius

ANTECEDENTES

1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad tan antigua como el hombre, ha afectado a la humanidad desde la prehistoria, siendo documentada desde hace 5,000; 3,300 y 2,300 años en Egipto, India y China, respectivamente; pero es en Grecia alrededor del 400 AC donde fue nombrada *tisis* (fundirse o derretirse, por los síntomas particulares que presentaban las personas enfermas). Hipócrates la consideró la enfermedad más extendida de los tiempos, además describió las características clínicas de la enfermedad, estableció un rango de edad entre 18 a 35 años como el más común para ésta y propuso que no era contagiosa, sino hereditaria ^{1, 2, 3}.

La epidemia de tuberculosis en Europa fue conocida como “La Gran Plaga Blanca” e inició a principios del siglo XVII y continuó por los siguientes 200 años, considerando inevitable la muerte por tuberculosis; fue la principal causa de muerte en 1965 ^{1, 3}.

A través de los años existieron muchas aportaciones científicas de la enfermedad como la de Jean-Antoine Villemin en 1865, quien estableció la naturaleza infecciosa y postuló la posibilidad de aislar al agente causal de ésta. Pero sin duda una de las aportaciones más relevante fue la de Robert Koch en 1882, quién aisló al agente etiológico nombrado “Bacilo de Koch” ó *Mycobacterium tuberculosis* y demostró la etiología de la enfermedad ^{1, 2, 3}.

En la actualidad se conoce que el complejo *Mycobacterium tuberculosis* es el causante de la tuberculosis en humanos y animales, se encuentra conformado por las especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. bovis* BCG ⁴.

La tuberculosis es una enfermedad de tipo infectocontagiosa, que se transmite principalmente por vía aérea (Figura 1) a través de la inhalación de pequeñas gotas de saliva de entre 1 y 5µm que contienen al bacilo y son expulsadas por pacientes infectados al toser, hablar o estornudar. Ocasionando una lesión inicial en pulmones (tuberculosis pulmonar), la cual es la forma más común de la enfermedad; pero también existen las formas extrapulmonares como la meníngea, miliar, etc ^{4,5}.

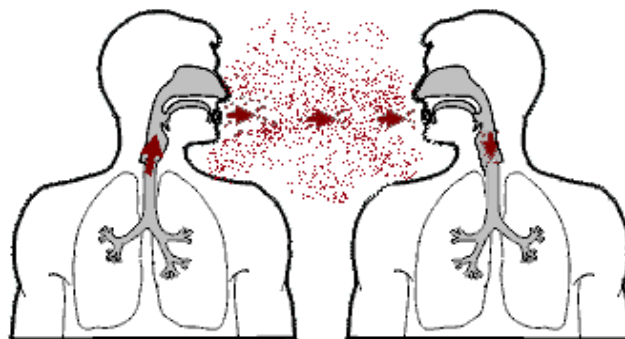


Figura 1. La principal vía de transmisión de la tuberculosis es por vía aérea.
Tomada de www.web.njcu.edu

La tuberculosis se divide en dos etapas: primaria (aguda) y post-primaria (crónica). En la tuberculosis primaria el individuo tiene el primer contacto con el bacilo, si éste alcanza al pulmón se establece una respuesta inmune para su eliminación; lo que origina la formación de un granuloma o tubérculo en el sitio de infección, compuesto por células del sistema inmune que tienen como función contener el

bacilo para prevenir su crecimiento y diseminación. En esta etapa, la infección suele ser asintomática y por lo tanto no es controlada, se estima que una persona infectada contagia aproximadamente de 10 a 15 personas por año ^{5,6}.

La tuberculosis post-primaria principalmente surge a partir de la reactivación de una infección inicial vía endógena, que ocurre principalmente en un estado inmunocomprometido del paciente, ó por una reinfección vía exógena (principal vía). Aproximadamente ocurre entre los 5 años posteriores a una infección primaria, con el surgimiento de lesiones que crecen formando cavidades pulmonares donde los bacilos se filtran y son descargados en la expectoración, si la lesión granulomatosa aumenta los bacilos llegan a la circulación resultando en una enfermedad miliar ^{5,6}.

La población más afectada son jóvenes y adultos que se encuentran en su mayoría establecidos en países en vías de desarrollo. Aunque toda la población es susceptible a la infección de tuberculosis, existen diferentes factores que predisponen a ésta, como la coinfección con otras enfermedades, por ejemplo los pacientes con SIDA ó VIH positivo tienen mayor probabilidad de adquirir una infección de tuberculosis ó tener una reactivación, siendo una importante causa de mortalidad entre la población VIH-positivo ^{5,7}.

El diagnóstico de la enfermedad se realiza por la detección del bacilo en expectoración y otros fluidos corporales, los “estándares de oro” para el diagnóstico de una tuberculosis pulmonar activa son la baciloscopia (tinción de

Ziehl-Neelsen) y cultivo microbiológico; pero en algunos casos como en la tuberculosis extrapulmonar el diagnóstico es difícil con éstos métodos convencionales, siendo los métodos de inmunodiagnóstico una opción efectiva y rápida, como pruebas serológicas y más recientemente la inducción *in vitro* de interferón gamma vía antígeno – específico en macrófagos alveolares o monocitos periféricos (QuantiFERON-TB) ^{1,8}.

El tratamiento para la tuberculosis es a base de antifímicos de primera línea como la rifampicina, etambutol e isoniazida; su duración es de periodos prolongados entre 6 a 12 meses, lo que provoca en muchos casos el abandono del tratamiento, principalmente en aquellas poblaciones de bajos recursos las cuales son las más susceptibles ⁵.

El abandono del tratamiento produce la resistencia a los fármacos de primera línea originándose cepas de *M. tuberculosis* multidrogo resistentes (TB-MDR), para estos pacientes existen tratamientos con fármacos de segunda línea que son más caros, con mayor periodo de tratamiento y efectos secundarios más graves ⁵. En la actualidad existen cepas de tuberculosis extremadamente drogo resistentes (TB-XDR) las cuales presentan resistencia a los fármacos de primera línea, a todos los tipos de fluoroquinolonas y por lo menos a uno de los tres medicamentos de la segunda línea ⁵.

1.1 Epidemiología

En el mundo se estima que cada segundo se produce una nueva infección por el bacilo causante de la tuberculosis y que un tercio de la población mundial se encuentra infectada, lo equivalente a más de 2 billones de personas ⁹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su reporte de control global de tuberculosis del 2009, reportó 9.27 millones de casos nuevos de tuberculosis en el 2007 (Figura 2), incluyendo pacientes VIH positivos. A nivel mundial, Asia es el continente que presenta los países con mayor número de casos nuevos de tuberculosis, siendo India, China e Indonesia los países más afectados ^{5,9}.

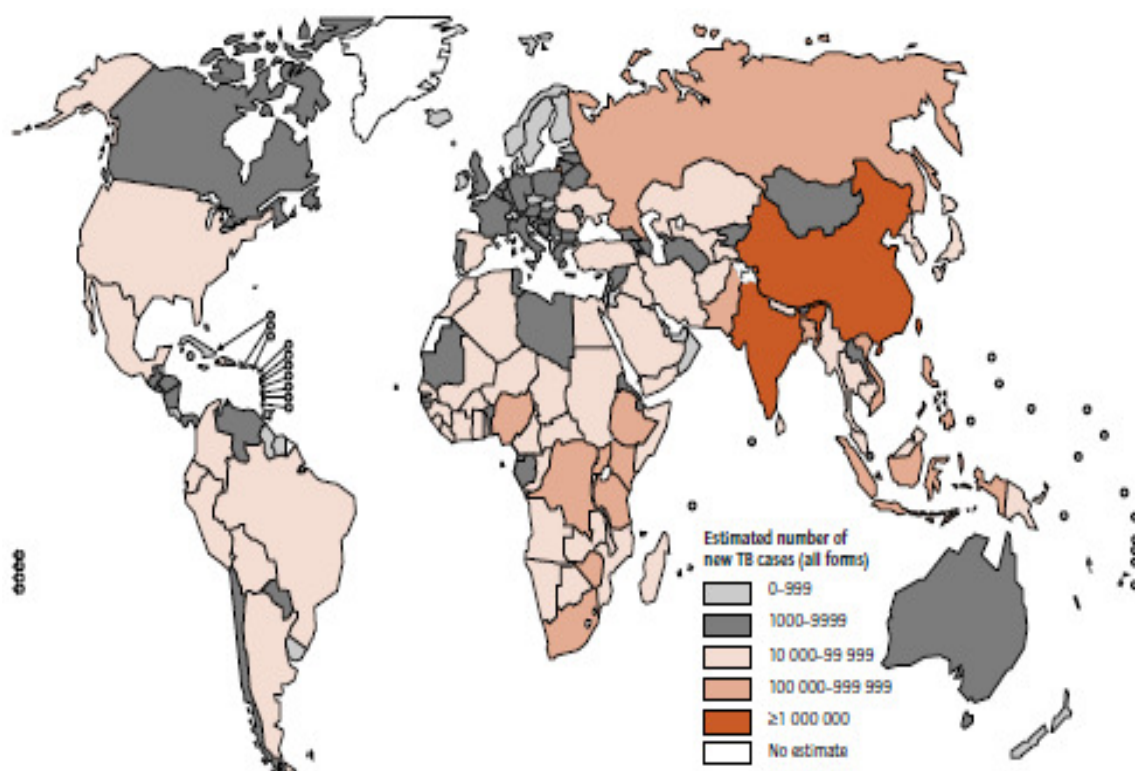


Figura 2. Distribución mundial de la tuberculosis. Número estimado de casos nuevos de tuberculosis por cada 100 000 habitantes estimados en el 2007. OMS, 2009 ⁹.

De los pacientes VIH positivo se estima que al menos un tercio se encuentra infectado de tuberculosis, ésta coinfección predomina en África y es la principal causa de muerte en estos pacientes ¹⁰. En el 2007 se registraron 1.37 millones de personas con tuberculosis y VIH positivo, lo que equivale al 14.8% en el registro de casos nuevos con tuberculosis.

La mortalidad registrada para la tuberculosis en el 2007 fue de 1.32 millones de muertes en personas VIH-negativo y 456 000 muertes en personas VIH-positivo a nivel mundial ¹⁰.

En México fueron registrados 18,210 casos nuevos en el 2008, de los cuales el 82.5% corresponde a la forma pulmonar. En el mismo año la tasa nacional de morbilidad para las formas pulmonares fue de 14.1 por cada 100 000 habitantes (Figura 3) ¹¹, siendo los estados de Baja California, Guerrero y Tamaulipas los que presentan mayor incidencia. En cuanto a la mortalidad la tasa fue de 1.7 por cada 100 mil habitantes.

La razón hombre:mujer fue de 1.5:1 y aunque varía de un estado a otro sigue siendo más frecuente en hombres en edad productiva. Las enfermedades más frecuentemente asociadas a la tuberculosis además de VIH son: diabetes mellitus (21.4%), desnutrición (15.6%), alcoholismo (6.8%) y SIDA (6%) ¹¹.

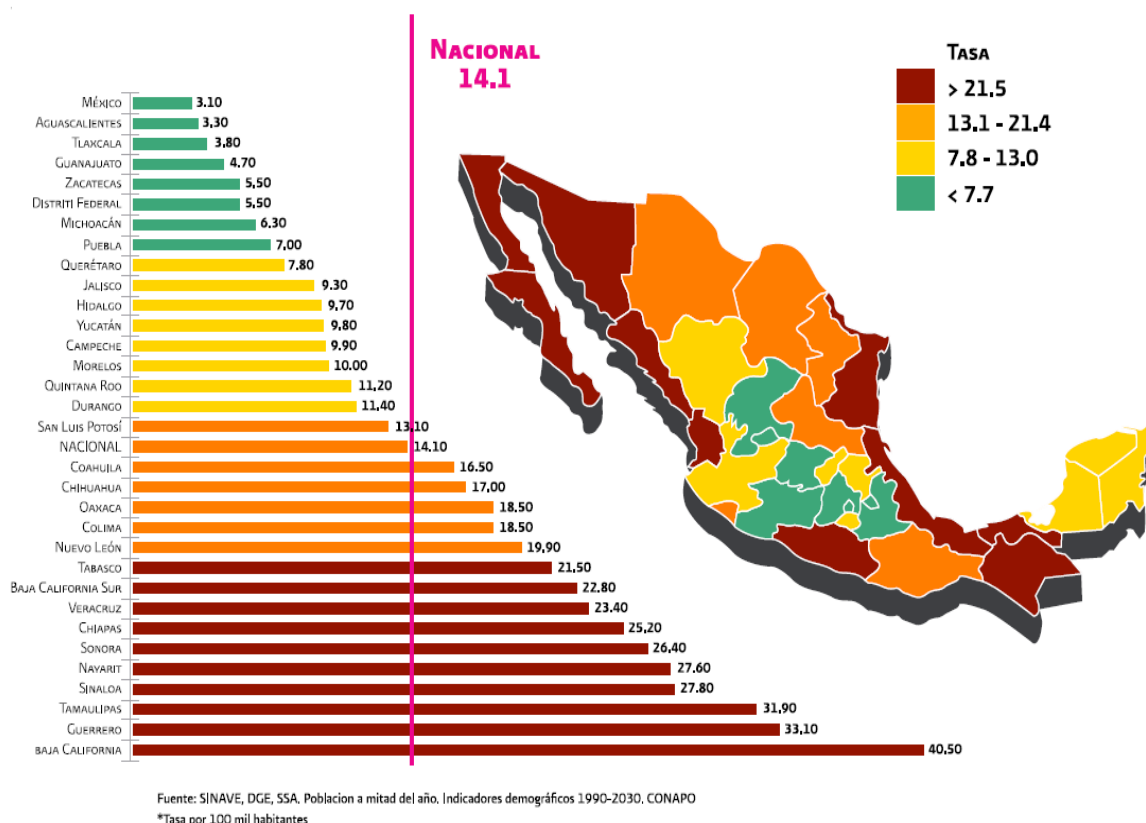


Figura 3. Morbilidad por tuberculosis pulmonar en México, 2008. La tasa nacional de morbilidad para las formas pulmonares fue de 14.1 por cada 100 mil habitantes. Tomada de SINAVE, DGE, SSA¹¹.

1.2 Control y prevención de la tuberculosis

En 1993 la OMS declaró a la tuberculosis como una enfermedad emergente¹², la cual se vio favorecida por la coinfección con VIH, el incremento de cepas resistentes y la migración¹³. Como parte de una resolución para el control de la tuberculosis, la OMS propuso una estrategia recomendada internacionalmente denominada TAES (tratamiento acortado estrictamente supervisado)¹³, que tiene como finalidad reducir marcadamente la población mundial infectada de tuberculosis para el año 2015¹³. Aunque en países como la India esto no será posible, por la elevada población de personas infectadas.

Los principales componentes del TAES incluyen: el compromiso del gobierno, la detección de casos mediante pruebas bacteriológicas de calidad, tratamiento normalizado con supervisión y apoyo al paciente, un sistema de suministro regular de medicamentos, y un sistema de vigilancia para la supervisión y evaluación del programa ¹³. Las metas establecidas para ésta estrategia son:

- En el 2005 detectar al menos el 75% de los casos de tuberculosis infecciosa y curar al menos el 85% de estos.
- En el 2015 reducir la prevalencia de la tuberculosis y la mortalidad en un 50% respecto a 1990.
- En el 2030 eliminar la tuberculosis como problema de salud pública (1 caso por 1 millón de habitantes).

Mientras que para la prevención de la tuberculosis desde hace casi un siglo se realiza la vacunación con el bacilo vivo atenuado de Calmette y Guérin ó vacuna BCG.

1.3 Vacuna BCG

La única vacuna que se tiene para la prevención de la tuberculosis es el bacilo vivo atenuado de Calmette y Guérin ó BCG. Esta vacuna fue desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur de Lille, Francia entre 1908–1921, a partir de una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* obtenida de leche procedente de una vaca con mastitis tuberculosa ^{14, 15, 16}.

La cepa virulenta fue subcultivada por periodos de 3 semanas durante 13 años en medio de papa glicerinada adicionado con bilis de buey, durante este tiempo se observaron modificaciones en su morfología colonial y se realizaron experimentos en diferentes modelos animales como conejillos de india, conejos, perros, vacas, caballos, gallinas y primates no humanos; al administrar la cepa a diferentes dosis y por diferentes vías, ésta fue bien tolerada, sin producir lesiones tuberculosas y generó protección contra las cepas virulentas ^{16, 17}.

La primera vacunación en humanos con la BCG se realizó en 1921 en Paris; por vía oral a un infante cuya madre había fallecido por tuberculosis poco después del parto, el infante no desarrolló la enfermedad y tuvo buena tolerancia a la vacuna. Durante el periodo de 1921–1924 fueron vacunados más de 300 niños en Europa, estableciéndose la seguridad y eficacia de la vacuna ^{16, 18}.

En el Instituto Pasteur se conservó el cultivo de la cepa vacunal BCG, hasta que en 1924 se distribuyeron subcultivos de ésta cepa a diferentes países para el uso y preparación local de la vacuna, éstos subcultivos fueron llamados con el nombre del instituto, investigador ó país que los recibió; surgiendo así las “subcepas BCG”¹⁵.

En 1974 la vacuna BCG fue introducida en el programa amplio de inmunización de la OMS (EPI por sus siglas en inglés), donde se recomendó la administración de una dosis única antes del primer año de edad ¹⁴. Actualmente la vacuna BCG es obligatoria en 64 países y oficialmente recomendada en otros 118 países y

territorios ¹⁴. La OMS estima que en la actualidad más de 3 mil millones de personas han sido vacunadas con BCG, con una cobertura de vacunación del 80% al nacimiento en el 2009 (Figura 4) ¹⁵.

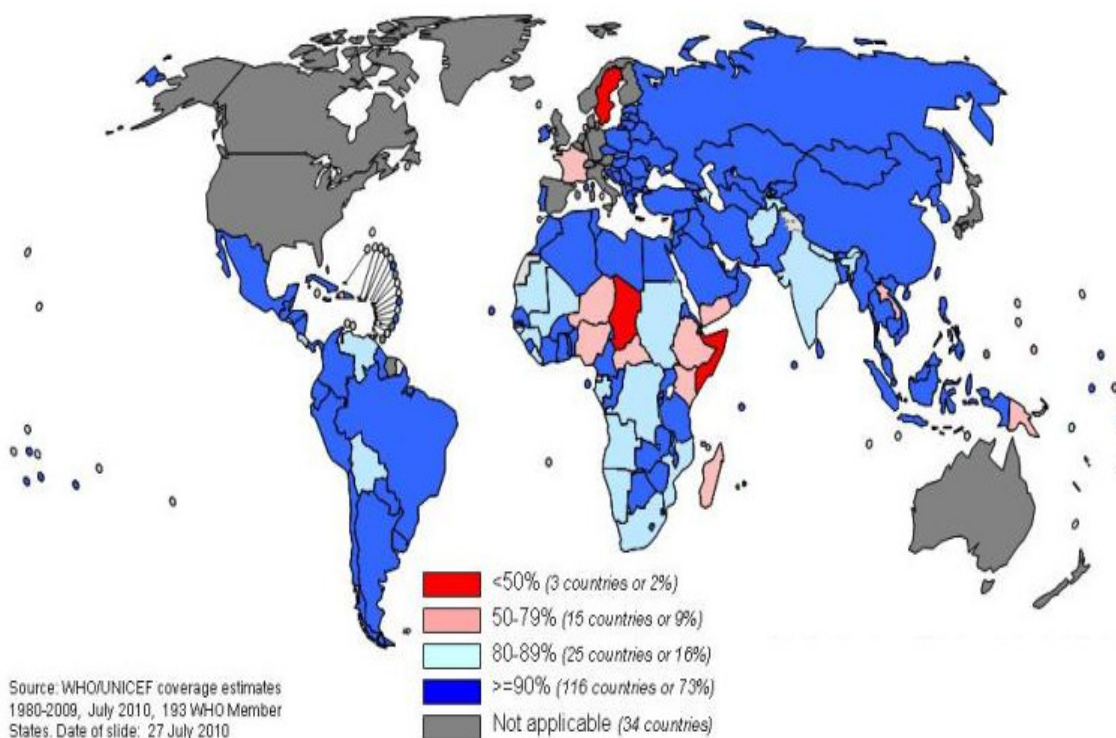


Figura 4. Cobertura mundial de vacunación con BCG al nacimiento, en el 2009. Se observa que el 60% de los países a nivel mundial tienen una cobertura de vacunación con BCG al nacimiento mayor o igual al 90%. OMS 2009 ¹⁵

1.3.1 Vacunación con BCG en México

En México el Instituto Nacional de Higiene reporta que la vacuna BCG comenzó a aplicarse en 1925 ¹⁹. El Instituto de BCG se inauguró en 1949, el cual fue encargado de la preparación, distribución, aplicación y control de la vacuna BCG durante 16 años. La vacuna que se producía en este instituto además de ser aprobada fue estudiada por la división de control de productos biológicos de la OMS, a partir de un estudio comparativo con la vacuna patrón elaborada en el

Staten Serum Institut, Dinamarca; y mostró ser tan aceptable como ésta. Por ello en 1950 esta vacuna fue distribuida a todo el territorio nacional y a diversos países de Sudamérica^{20, 21}.

La producción de la vacuna BCG en México se detuvo en 1965 y fue reanudada cinco años más tarde, con un cambio de lote semilla en el método de producción, a partir de la subcepa BCG Danesa; hasta 1998 que finalizó la producción por problemas de estabilidad, anaquel y la privatización del Staten Serum Institut, Dinamarca. Actualmente la vacuna se compra a diferentes proveedores, siendo BIRMEX el responsable de la conservación y control de calidad de la vacuna adquirida por México²¹.

1.3.2 Eficacia protectora de la vacuna BCG

La BCG es una vacuna segura con bajos efectos adversos; sin embargo, existen muchos estudios y meta-análisis que cuestionan su eficacia protectora, ya que provee una eficacia protectora en niños mayor al 80% contra la formas graves de la tuberculosis como la miliar y meníngea; pero en adultos y adolescentes confiere una eficacia protectora del 0–80% en la tuberculosis pulmonar, la cual es la forma más común de la enfermedad (Figura 5)^{13, 14, 22, 23, 24}.

En adultos esta variabilidad en la eficacia protectora de la vacuna contra la enfermedad pulmonar fue atribuida a diferentes factores entre los que destacan:

- Micobacterias ambientales. La previa exposición a micobacterias ambientales ha demostrado que provee de una respuesta inmunitaria a antígenos comunes entre éstas, lo cual enmascara o bloquea la respuesta de la vacuna BCG ^{12, 25, 26}.
- Factores genéticos: Existen evidencias que varios genes controlan los mecanismos de inmunidad celular que influyen en la susceptibilidad a la tuberculosis y otras infecciones por micobacterias, por lo que las diferencias genéticas entre poblaciones podrían explicar las diferencias en protección de la BCG ^{12, 27}.
- Diferencias en la virulencia de algunas subcepas de *M. tuberculosis*. Los distintos niveles de virulencia proporcionados por las diferentes cepas de *M. tuberculosis* modifican la respuesta dada por la vacuna BCG ^{12, 27}.
- Diferencias entre subcepas BCG. El tipo de preparación así como la subcepa BCG empleada en la vacunación ha demostrado conferir diferentes niveles de protección (Figura 5) ^{23, 24, 27, 28}.

Éstos y mas factores han mostrado que individualmente ó combinados interfirieren en la eficacia protectora conferida por la vacuna BCG, son ampliamente estudiados para establecer una mayor eficacia protectora contra la tuberculosis.

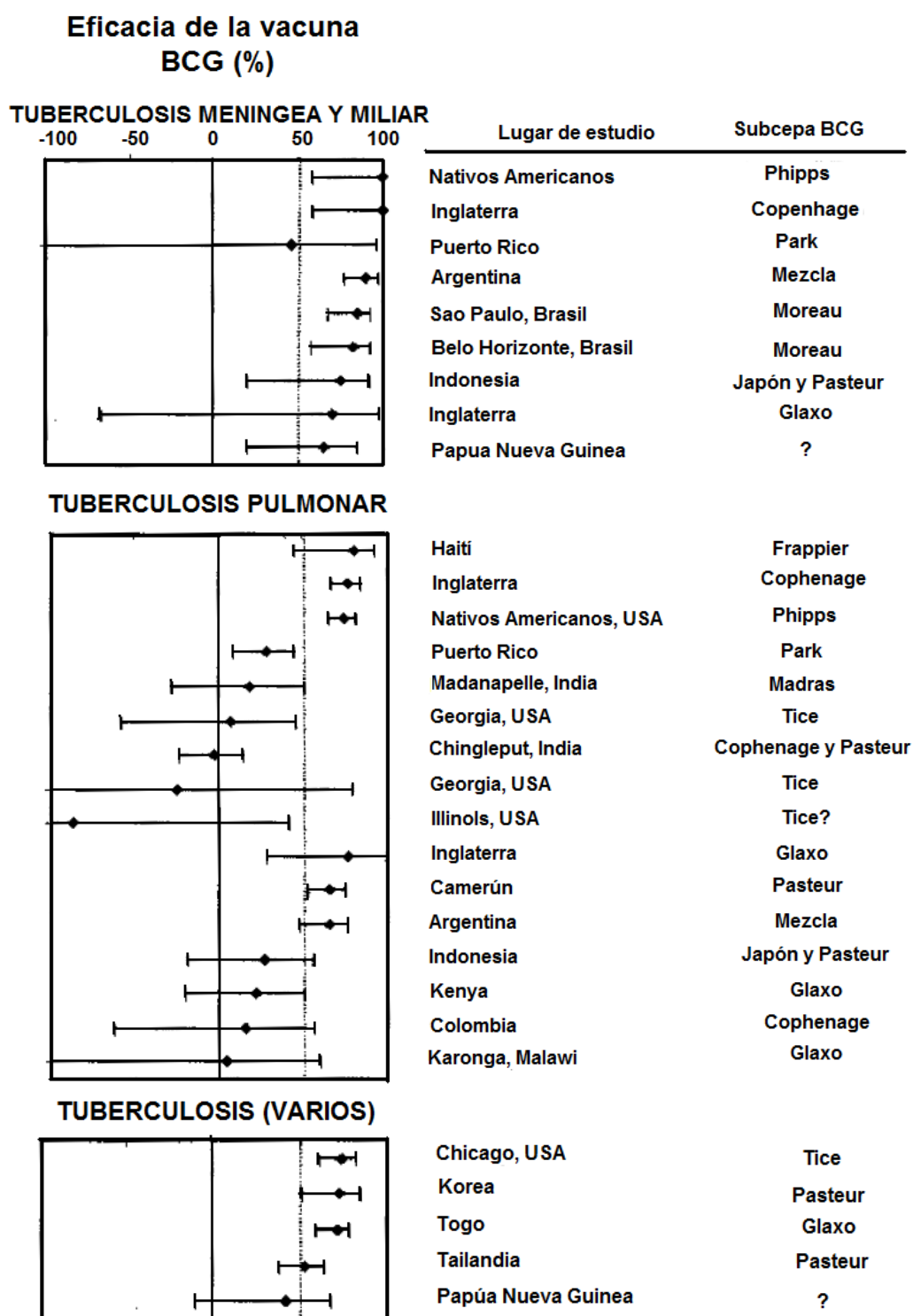


Figura 5. Meta-análisis de la eficacia protectora estimada entre diferentes vacunas BCG contra diferentes formas de tuberculosis. En la tuberculosis meníngea, miliar y varias formas, la eficacia protectora promedio es mayor al 50%; mientras que en la tuberculosis pulmonar varía entre el 0 - 80% la eficacia protectora. Con un intervalo de confianza del 95%. Modificado de Fine, 1999¹²

1.3.3 Subcepas BCG

La distribución mundial de la cepa vacunal BCG en 1924, ocasionó que los métodos de propagación variaran entre países lo que ocasiono que la cepa continuara una atenuación diferente en cada subcepa. En la década de 1950 varios productores de la vacuna reconocieron la aparición de subcepas BCG con distintas características morfológicas, bioquímicas e inmunológicas ^{13, 16, 17, 29}.

Para detener el proceso de evolución *in vitro* de las subcepas BCG, en 1966 la OMS introduce del sistema de lote semilla (seed-lot system) para la producción de la vacuna y su preservación por el método de liofilización ^{12, 14, 30}.

Estas diferencias han sido y son estudiadas para identificar si son responsables de la variabilidad de la eficacia protectora que confieren las subcepas BCG contra la tuberculosis; las principales diferencias son:

- Genéticas. Se han analizado variantes genéticas entre las subcepas BCG comparándolas con *M.tuberculosis* y *M. bovis* y se encontró en todas las subcepas BCG la supresión de la región de diferencia 1 (RD1), la cual ha sido un acontecimiento crítico para la atenuación de la cepa *M. bovis* (Figura 6). En 1999, Behr y col. identificaron dos variantes genéticas bien definidas entre las subcepas BCG, una variante fue dada en la secuencia de inserción (IS)6110, de la cual se tienen dos copias de esta región en aquellas subcepas obtenidas del Instituto Pasteur antes de 1926

(posteriormente denominadas subcepas BCG tempranas, Figura 6), mientras que las obtenidas después de 1931 (posteriormente denominadas subcepas BCG tardías, Figura 6) tienen solo una copia de ésta región; la otra variante genética fue dada por el gen para la proteína antigénica MPT64, la cual es expresada en *M. tuberculosis*, *M. bovis* y en las subcepas tempranas, pero es ausente en las subcepas tardías por lo que estas subcepas no producen los ácidos metoxi-micólicos, y ocasiona la reducción en la supervivencia de la bacteria en el macrófago ^{17, 18, 28, 29, 31}.

En un estudio comparativo del transcriptoma entre subcepas BCG tempranas y tardías (BCG Japón y BCG Pasteur, respetivamente) realizado en el 2007, por Brosh y col. revelaron una extensiva variación en la expresión de genes entre las subcepas BCG tempranas y tardías, lo que conduce a una excesiva o insuficiente producción de proteínas de superficie, antígenos proteicos inmunodominantes, factores de virulencia y enzimas; los cuales inducen respuesta protectora. Esta variabilidad genética resulta en diferencias fenotípicas, que contribuyen a la variabilidad de la eficacia protectora entre las subcepas BCG ^{17, 18, 28, 29, 31}.

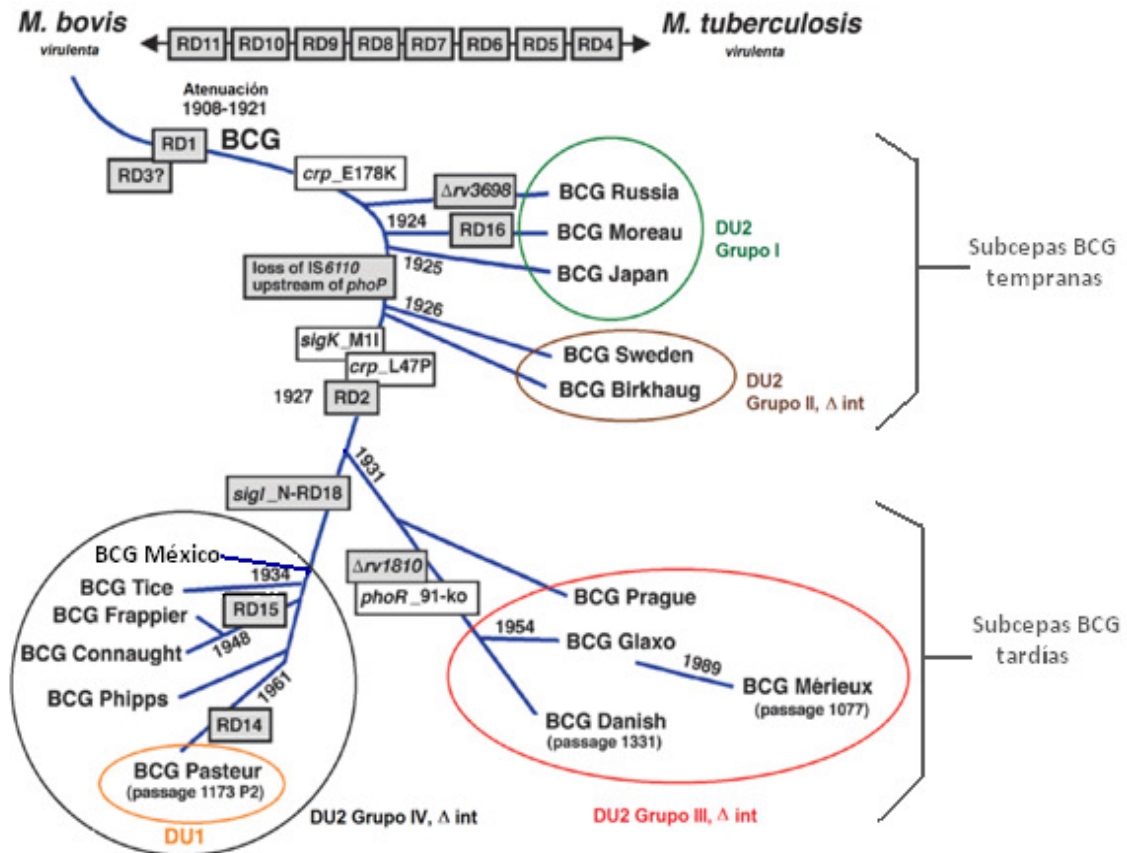


Figura 6. Genealogía de las subcepas BCG. En esta imagen se muestran las diferencias genéticas que han sufrido diferentes subcepas BCG a partir de cepa virulenta *M. bovis*, como las regiones de diferencia, marcada en rectángulos; así como el grupo de las subcepas BCG tempranas y de las subcepas BCG tardías. Modificado de Brosh, 2009²⁸.

- Inmunológicas.** Existen estudios en animales y humanos que muestran que hay diferencias significativas entre la respuesta inmune inducida por las diferentes subcepas BCG (Figura 5). En el 2006, Castillo-Rodal y col. evaluaron el nivel de protección de 10 diferentes subcepas BCG (incluyendo a la cepa BCG México) en un modelo murino con tuberculosis pulmonar progresiva, determinaron UFC en pulmón, respuesta de hipersensibilidad de tipo tardía, daño tisular y perfil de citocinas; demostraron que existe una amplia variedad en la protección conferida

entre las subcepas BCG, también que éstas protegen contra la progresión de la enfermedad, pero ninguna previene la infección. La subcepa BCG Phipps fue identificada como la subcepa que confirió el menor daño tisular y mayor nivel de protección en los ratones inmunizados seguida por BCG Dinamarca^{31, 32, 33}.

Existe otro estudio realizado en el 2009, por Hayashi y col. donde reportaron las diferencias en la actividad de inmunoestimulación conferida por las subcepas BCG en líneas celulares de ratón y humano; y demostraron que las subcepas BCG tempranas proveen de un mayor efecto sinergista en la producción de óxido nítrico y en la inducción de citocinas inflamatorias, comparadas con las subcepas BCG tardías; se sugiere que las subcepas BCG tempranas tienen una mayor capacidad de inmunoestimulación que las subcepas BCG tardías; lo cual se atribuye parcialmente a la producción de ácidos metoxi-micólicos por las subcepas tempranas^{31,32,33}.

Ambos estudios fueron realizados en modelos experimentales diferentes *in vivo* e *in vitro* y evaluaron diferentes patrones de respuesta inmune, por lo que una comparación sería arriesgada e imprecisa; pero se observa que la respuesta inmune conferida por las subcepas BCG es diferente entre éstas y depende de varios factores. Por ello es necesario evaluar los diferentes patrones de respuesta para la mejor elección de la subcepa BCG que confiera la mayor eficacia protectora^{31, 32, 33}.

- Proteicas: Existen diferencias a nivel de expresión de proteínas y de antígenos proteicos inmunodominantes entre las subcepas BCG que podrían producir variaciones en las respuestas protectora; en el 2009, Rodríguez-Álvarez y col. compararon los proteomas de las subcepas BCG Phipps y BCG Dinamarca, subcepas seleccionadas en base a la respuesta inmunológica contra tuberculosis en un modelo murino ³². Estos proteomas fueron similares en cuanto al número de proteínas, punto isoeléctrico y masa molecular; pero encontraron diferencias en el número de proteínas únicas y cambios en la expresión de ciertas proteínas compartidas.

BCG Phipps tuvo mayor expresión de proteínas compartidas relacionadas con el metabolismo y con la supervivencia en el estrés oxidativo en comparación con BCG Dinamarca; estas proteínas podrían representar una ventaja para BCG Phipps en la adaptación a medios adversos y en los cambios metabólicos del sustrato. La importancia de la expresión de proteínas entre las subcepas BCG hace que éstas sean determinantes en la patogénesis y en los escenarios de la respuesta inmune ^{32, 34}.

La eficacia protectora conferida entre las subcepas BCG es variable, debido a las diferencias a nivel genómico, inmune y proteico que presentan entre éstas. Por ello es necesario identificar y caracterizar las subcepas BCG, ya que un cambio en el uso de la cepa vacunal BCG podría asociarse a un mayor grado de protección, el cual tendría un gran impacto en la población. Como parte de la caracterización

de las subcepas BCG, se propone la identificación de proteínas inmunogénicas de éstas a través de la producción de anticuerpos monoclonales.

2 Anticuerpos monoclonales

En 1975 George Köhler y Cesar Milstein desarrollaron una técnica para la obtención de una línea de células híbridas inmortales (hibridomas) capaces de producir anticuerpos homólogos y específicos hacia a un antígeno de interés. La obtención de los hibridomas se realiza a través de la fusión entre células de mieloma con linfocitos B productores de anticuerpos contra el antígeno de interés (Figura 7) ^{35, 36, 37, 38}.

El uso de las células de mieloma se debe a que éstas son sensibles a medios selectivos por una mutación que las hace deficientes de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT⁻), inactivando la vía de recuperación de síntesis de nucleótidos. Además poseen capacidad de propagación indefinida *in vitro* y no secretan anticuerpos. Las líneas celulares más utilizadas son derivadas del ratón ^{36, 37, 39, 40}.

Los linfocitos B productores de anticuerpos contra un antígeno de interés son obtenidos principalmente del bazo de un animal previamente inmunizado con el antígeno deseado. Los modelos animales más utilizados para la producción de hibridomas son ratón, rata y conejo; siendo el ratón más comúnmente usado por la disponibilidad de las líneas de mieloma de ratón. Los animales son inmunizados

vía subcutánea o peritoneal en varias ocasiones para la división y diferenciación de las células B. y así incrementar la posibilidad de obtener un híbrido relevante ^{40, 41}.

La fusión se realiza en presencia de un agente fusógeno que disminuye el potencial de superficie entre membranas y a su vez decrece la repulsión entre célula-célula, además de desestabilizar la estructura de bicapa lipídica. Inicialmente se utilizó el virus Sendai inactivado, pero este ha sido sustituido por agentes químicos como el polietilenglicol ^{41, 42, 43}.

La selección de las clonas fusionadas se realiza con un medio de cultivo como el HAT (Hipoxantina, Aminopterina y Timidina) que bloquea la vía de novo con la aminopterina y al mismo tiempo proporciona los sustratos hipoxantina y timidina, para que solo aquellas células híbridas sobrevivan por la vía de recuperación (derivada de los linfocitos B). De esta forma aquellas fusiones obtenidas entre células de mieloma no proliferará debido al bloqueo de su única vía de síntesis de nucleótidos y la fusión entre linfocitos no sobrevivirá debido a que el cultivo de éstos *in vitro* es muy inestable ^{44, 45, 46}.

Para garantizar la monoclonalidad de la clona híbrida y reducir el riesgo de sobrecrecimiento de clonas irrelevantes, existen diferentes métodos de clonación como dilución limitante, crecimiento en agar semisólido, dilución de pequeños volúmenes en placas de 96 pozos, entre otros ^{40, 41, 44}.

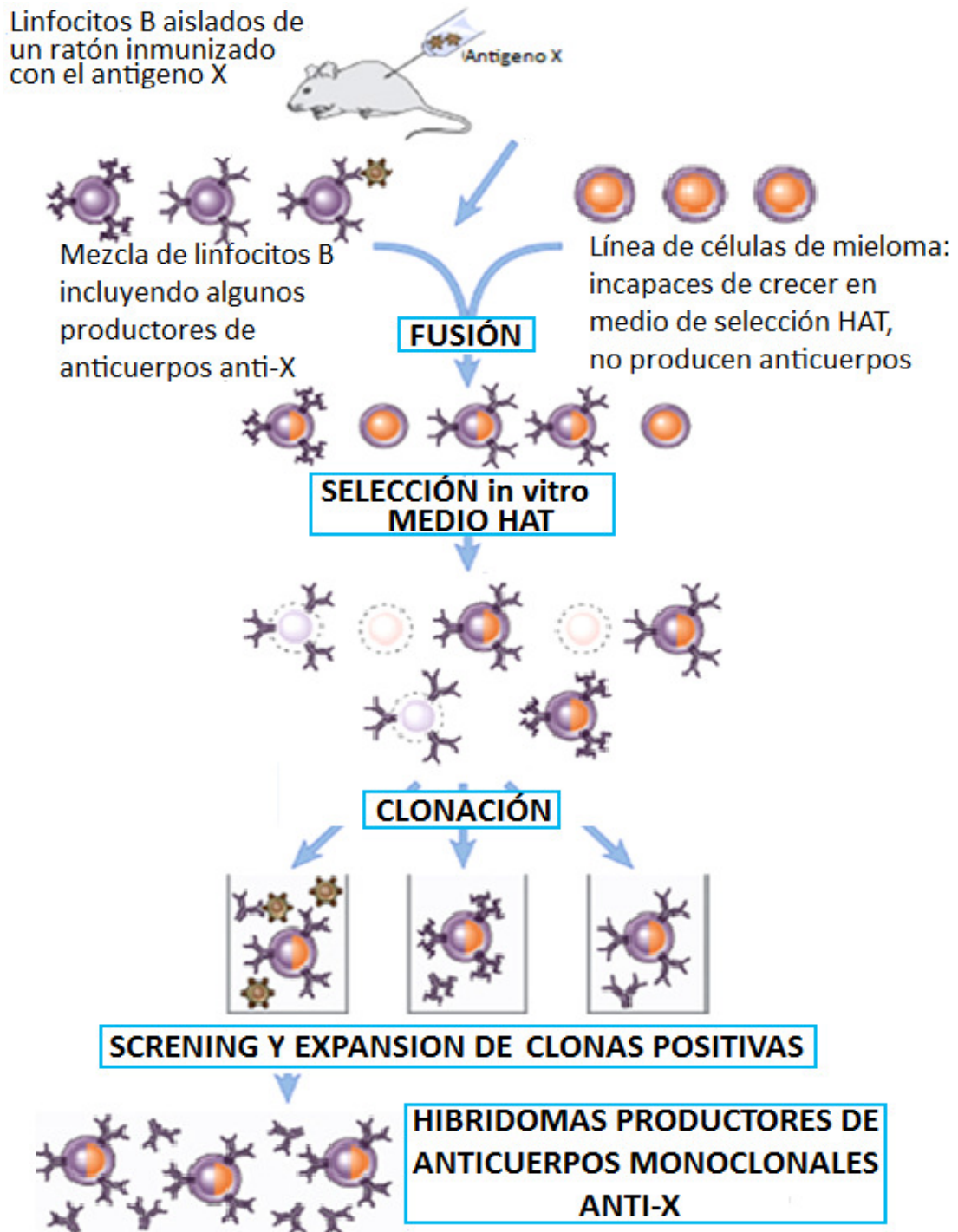


Figura 7. Metodología para la obtención de anticuerpos monoclonales. Como se observa en el esquema se inicia con la inmunización del modelo animal a usar con el antígeno, seguido por la obtención de los linfocitos B productores de anticuerpos. Estos linfocitos son fusionados con la línea celular de mieloma; obteniendo células fusionadas viables y no viables en medio HAT, aquellas que sobrevivan son clonadas y seleccionadas para solo quedar con las células productora de anticuerpos contra el antígeno ó hibridomas.

Modificado de Abbas, 2008⁴⁶.

2.1 Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales

Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales son diversas, entre los principales usos para estos son ^{46, 47, 48}:

- **Inmunodiagnóstico.** En inmunoensayos para la detección de antígenos o anticuerpos en sangre ó tejidos para el diagnóstico de algunas enfermedades.
- **Inmunoensayos en investigación.** Se utilizan en la investigación en diferentes ensayos como Western blot, ELISA; inmunofluorescencia y otros; para la detección de una molécula específica.
- **Purificación de proteínas.** Empleados en ensayos de inmunoprecipitación y cromatografía de afinidad.
- **Identificación de marcadores fenotípicos únicos en un tipo particular de células.** Por ejemplo, en la identificación de marcadores CD en linfocitos y leucocitos, para su clasificación.
- **Análisis funcional de la superficie celular ó de moléculas secretadas.** En la investigación inmunológica se unen a éstas moléculas estimulando ó inhibiendo funciones celulares, por ejemplo en cáncer o enfermedades autoinmunes.

JUSTIFICACIÓN

La vacuna BCG presenta una gran variabilidad en la protección conferida contra la tuberculosis pulmonar en adultos, lo cual es atribuido a diversos factores. Uno de los más estudiados son las diferencias a nivel genético, proteico e inmunológico entre las subcepas BCG.

La producción de anticuerpos monoclonales contra la subcepa BCG México ayudará a identificar si sus proteínas inmunógenicas son únicas en BCG México y/o si están relacionadas con la inmunidad conferida contra la tuberculosis. Además de ser útiles para la identificación específica de la cepa y el diseño de nuevos ensayos para su caracterización.

HIPÓTESIS

La fusión de células de mieloma con linfocitos B productores de anticuerpos contra BCG México permitirá obtener anticuerpos monoclonales contra proteínas únicas de la cepa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra BCG México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producir una respuesta humoral en ratones contra BCG México.
2. Obtener y seleccionar hibridomas productores de anticuerpos IgG2a contra BCG México.
3. Caracterizar los anticuerpos producidos a través de la reactividad con otras cepas de micobacterias e identificación de las proteínas reconocidas en BCG México.

METODOLOGÍA

La metodología fue dividida en cuatro principales fases:

1 Desarrollo del inóculo

1.1 Precultivo de la cepa

Se realizó un cultivo de la cepa BCG México en medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con OADC (medios de cultivo en Anexo II), incubándolo a 37°C y 5% de CO₂ durante un periodo de 12 a 15 días aproximadamente. Para la elaboración del precultivo se cultivó una colonia por duplicado en 50mL de medio líquido Sauton, los cultivos se incubaron en agitación constante bajo las condiciones descritas anteriormente; además se realizó un frotis del cultivo y se tiñó por Ziehl- Neelsen para verificar su pureza; a partir de estos precultivos se determinó la curva de crecimiento de la cepa.

1.1.1 Curva de crecimiento

De cada precultivo de BCG México se tomó 1mL del cultivo y se inoculó en 120mL de medio Sauton. La DO_{600nm} fue tomada cada 24 horas durante un periodo de 30 días, estableciendo la curva de crecimiento e identificando sus fases.

1.2 Elaboración del inóculo

Del precultivo se tomó 1mL y se transfirió a 125mL de medio Sauton por duplicado, incubando a las mismas condiciones del precultivo hasta su fase media logarítmica. Éstos cultivos de BCG México se cosecharon por centrifugación a 3000rpm por 10 min; al final las micobacterias fueron resuspendidas en SSI, alicuotadas y almacenadas a -70°C. Para inactivar al inóculo, las micobacterias fueron irradiadas con rayos gamma en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), a la dosis de 12kGy.

2 Inmunización

La inmunización se realizó en un grupo de 10 ratones hembras BALB/c de entre 6-8 semanas de vida, los cuales fueron identificados por perforación en la oreja derecha. Previo a cada inmunización se obtuvo una muestra de sangre de la vena maxilar, de la cual se recuperó el suero; la inmunización se realizó por vía intraperitoneal a 5 ratones con 0.2mL del inóculo y 5 ratones con 0.2mL de SSI estéril, grupo control negativo. Los ratones fueron reinmunizados en 4 ocasiones con intervalos de 15 días entre cada inmunización y los sueros fueron almacenados a -70°C hasta su análisis.

2.1 Análisis de sueros obtenidos de los ratones inmunizados con BCG

México

Para evaluar la respuesta humoral en los ratones conforme se incrementaban las inmunizaciones, se realizó el análisis de los sueros obtenidos previo a cada inmunización con la técnica de ELISA. Se sensibilizaron placas de 96 pozos de PVC blancas con 5µg/mL de proteína de la cepa BCG México, obtenida por sonicación y cuantificada por el método de Bradford (Anexo I), en solución amortiguadora de carbonatos (soluciones en Anexo II) a 4°C durante toda una noche.

Las placas se bloquearon con una solución de PBS-albúmina al 1%, incubando a 37°C por 1h 30 min. Al término, se adicionó como anticuerpo primario los sueros de cada ratón a diferentes tiempos de inmunización, a las diluciones 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125 en PBS-Tween por duplicado, incubando a 37°C por 1h.

Se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón IgG2a de conejo HRP (INVITROGEN) a una dilución 1:2000 en PBS, incubando a 37°C por 1h. Para el revelado de las placas se empleó el sustrato HRP Quimioluminiscente (Millipore) incubando por 5 min y protegiendo las placas de la luz; al finalizar se dio lectura a las placas por luminiscencia con el equipo Genios Plus con el software Magellan. Después de determinar el título de anticuerpos en cada ratón, se eligió el ratón con mayor título contra BCG México y se reinmunizó una semana previa a la fusión.

3 Fusión, selección y clonación de hibridomas

3.1 Líneas celulares y fusión

Para realizar la fusión se deben preparar previamente las líneas celulares de mieloma y los esplenocitos de forma independiente, lo cual se describe a continuación.

3.1.1 Células de mieloma

La línea celular utilizada fue Sp2/0-Ag14 (ATCC, CRL-1581), la cual fue descongelada una semana previa a la fusión en medio DMEM-10% SFB (medios en Anexo II) y se mantuvo a una densidad celular entre 5×10^4 y 5×10^5 células/mL.

El día de la fusión las células de mieloma fueron cuantificadas con azul de tripano, para ajustar a un número de 2×10^7 células en 25mL de medio DMEM, con una viabilidad >95% y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta la fusión.

3.1.2 Esplenocitos

El ratón seleccionado fue sacrificado por dislocación cervical para la obtención de su bazo, el cual fue disgregado con medio DMEM sobre una tela de organza; la suspensión celular de esplenocitos fue cuantificada con una solución de ácido acético al 3% con azul de metileno, para ajustar a un número de 1×10^8 células viables en 25mL de medio DMEM y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta la fusión.

3.1.3 Fusión

Se añadieron 2×10^7 células de mieloma y 1×10^8 esplenocitos en un tubo cónico y fueron centrifugadas a 400g, 37°C por 10 min; todo el sobrenadante fue retirado e inmediatamente se adicionó 1mL de PEG (4000 al 50% en DMEM, GIBCO) gota a gota en un periodo de 1 min sin agitación, después fueron resuspendidas por 1 min. Se agregaron 4mL de medio DMEM y se mantuvo con agitación gentil durante 4 min.

Enseguida se agregaron lentamente 10mL de medio DMEM y se incubó a Baño María a 37°C por 15 min, después se adicionaron 30mL de medio DMEM-10% SFB y se centrifugó a 400g, 37°C por 7 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 10mL de medio DMEM-10% SFB, ésta suspensión celular fue transferida a una botella de cultivo celular con 20mL del mismo medio y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas.

3.2 Selección y clonación de hibridomas

Después de 24 horas de incubación las células fueron cosechadas a 400g, 37°C por 10 min; el sobrenadante fue eliminado y el paquete celular fue resuspendido con 10mL de medio DMEM-10% SFB. Esta suspensión celular fue adicionada a 90mL de medio HAT y mezclada por inversión.

La suspensión celular fue dividida en placas de 96 pozos estériles, colocando 70µL por pozo, las placas fueron incubadas por un periodo de 8 días bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Al finalizar éste periodo se les adicionó 150µL de medio HT por pozo y se dejaron incubando 4 días más.

Después del periodo de incubación se recolectó 100µL del sobrenadante de cada pozo y se analizaron con la técnica de ELISA (metodología en el punto 2.1), seleccionando las clonas provenientes de una fusión linfocito B con célula de mieloma. Éstas clonas fueron transferidas a placas de 24 pozos que contenían 1mL de medio HT y gradualmente se fue reemplazando a medio DMEM-10% SFB.

Se realizó una segunda selección de las clonas en base a su proliferación celular y reactividad de sus anticuerpos a BCG México, mediante la técnica de ELISA (metodología en el punto 2.1), se seleccionó las clonas con mayor reactividad a la cepa y similar proliferación celular. De éstas, la clona con mayor reactividad a la cepa fue elegida para la caracterización de sus anticuerpos.

4 Caracterización de anticuerpos monoclonales

4.1 Reacción cruzada

La evaluación de la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales frente a diferentes cepas de micobacterias se realizó a través de una ELISA, con cepas que corresponden a diferentes complejos del género *Mycobacterium*:

Complejo <i>M. tuberculosis</i>	MNT
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. microti</i> BCG Danesa BCG Japón BCG Phipps	<i>M. avium</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>

La obtención de las proteínas se realizó a partir de las cosechas de cada cepa, éstas fueron sonicadas y cuantificadas por el método de Bradford, además se verificó la calidad e integridad de las proteínas (Anexo 4). Se sensibilizaron las placas con 5µg/mL de proteína de cada cepa por duplicado. El protocolo de la técnica de ELISA se realizó como en el punto 2.1, con los anticuerpos monoclonales contra BCG México de la clona seleccionada como anticuerpo primario.

4.2 Identificación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales contra BCG México

Se realizaron dos geles de dos dimensiones (2D-PAGE) simultáneamente, con el objetivo de utilizar uno para la inmunodetección y otro para la identificación de las proteínas de interés.

4.2.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque

Se adicionaron 100µg de proteínas de extracto celular de BCG México (Anexo I) a una solución con urea 7M, tiourea 2M, DTT 1M, CHAPS 4%, anfolinas 1% y azul

de bromofenol 0.001% a un volumen final de 180 μ L (por duplicado). Con esta solución se hidrataron dos tiras de gradiente de pH inmóvil de 4-7 y 11 cm de longitud (IPG, BIORAD), durante 16 horas en aceite mineral para evitar su desecación. Al finalizar la hidratación se realizó la electroforesis en una cámara Multiphor II, con un sistema de enfriamiento a una temperatura de 17°C bajo las siguientes condiciones: 500V por 30 min, 1000V por 30 min, 1500V por 30 min, 2000V por 30 min y 2500V por 24 horas hasta completar 52,000 V/h.

4.2.2 Equilibrio y segunda dimensión

Al finalizar el isoelectroenfoco, las tiras se colocaron en buffer de equilibrio (Anexo II) con DTT 97mM por 15 min, seguido de una solución de buffer de equilibrio con IAA 203mM por 15 min; enseguida fueron colocadas en geles de acrilamida al 12% (Anexo II) dentro de una cámara de Hoeffer SE600. La electroforesis se realizó con un incremento gradual del voltaje: 50V aprox. 30 min, 100V 2 horas y 150V hasta que el frente de electroforesis llegó a 3 mm del borde inferior del gel.

4.2.3 Fijación y tinción con plata

Uno de los geles fue colocado en solución de fijación durante toda la noche a 4°C para su posterior tinción con plata (soluciones en Anexo II). Una vez fijadas las proteínas, el gel se colocó en una solución de pretratamiento por 1 min y después

en una solución de impregnación durante 20 min, enseguida se adicionó la solución de revelado hasta la aparición de los puntos en el gel (aproximadamente 10 min) y la reacción se detuvo con una solución de paro. La imagen fue capturada en formato digital en el densitómetro Molecular Imagen GS-800 (BIORAD), con el programa Quantity One (BIO-RAD).

4.2.4 Western Blot

El segundo gel fue transferido a una membrana de PVDF con poro de 0.45 μm (AMERSHAM), la cual se activó con metanol (100%) durante 10 segundos y se colocó en solución de transferencia Bjerrum y Schafer-Nielsen (soluciones en Anexo II) por 10 minutos.

El gel y la membrana fueron colocados en una cámara de transferencia Trans-Blot SD (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD), la transferencia se llevó a una diferencia de potencial constante de 10V durante 1h, al finalizar la membrana fue almacenada en TBS a 4°C hasta su uso.

La membrana fue bloqueada con leche 5% en TBS a 4°C durante toda la noche, después fue incubada con el anticuerpo monoclonal contra BCG México en TBS-Tween durante 1h. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG2a de conejo HRP (INVITROGEN) a una dilución 1:2000 durante 1h. Se adicionó el sustrato HRP Quimioluminiscente (Millipore) y se reveló en placas fotográficas.

Los puntos reconocidos en las placas fotográficas fueron identificados en el proteoma de la cepa BCG México de acuerdo a su MM y pI. Para la secuenciación de las proteínas identificadas se realizó un gel en segunda dimensión siguiendo las mismas condiciones de los puntos 4.2.1 y 4.2.2, únicamente modificando la cantidad de proteína de la cepa BCG México a 200µg. Al finalizar la segunda dimensión el gel fue fijado y teñido con Coomasie coloidal (Silver blue, Anexo II) y las proteínas de interés fueron secuenciadas por espectrometría de masas.

RESULTADOS

1 Cultivo de la cepa BCG México

- Identificación del cultivo

La pureza de la cepa BCG México se verificó microscópicamente realizando una tinción de Ziehl-Neelsen, en la cual se observaron bacilos ácido alcohol resistentes, pleomórficos (rectos o ligeramente curvos), con agrupación característica del género además de no mostrar contaminación por otra bacteria (Figura 8). A nivel macroscópico la cepa mostró colonias secas, rugosas, de un color beige y de crecimiento lento.

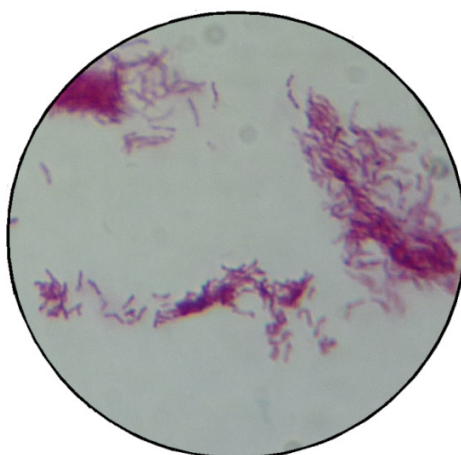


Figura 8. Tinción de Ziehl-Neelsen de la cepa BCG México en medio 7H10 con un aumento 100x

- Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la cepa BCG México se elaboró en un periodo de 30 días hasta la fase estacionaria, la fase media logarítmica fue alcanzada al día 20 de crecimiento a una DO_{600nm} 0.8 (Gráfico 1).

En la cinética de crecimiento de la cepa BCG México se distinguen las diferentes fases del crecimiento bacteriano: la fase lag ó de adaptación de la bacteria al medio tuvo un periodo de 15 días, la fase exponencial ó logarítmica donde la bacteria incrementa su crecimiento por duplicación de su población a una velocidad constante y exponencial tuvo una duración aproximada de 10 días y la fase estacionaria en la que el número de bacterias es constante y fue apreciada en un corto periodo de tiempo ya que la cuantificación se detuvo al día 30 ^{5, 49}.

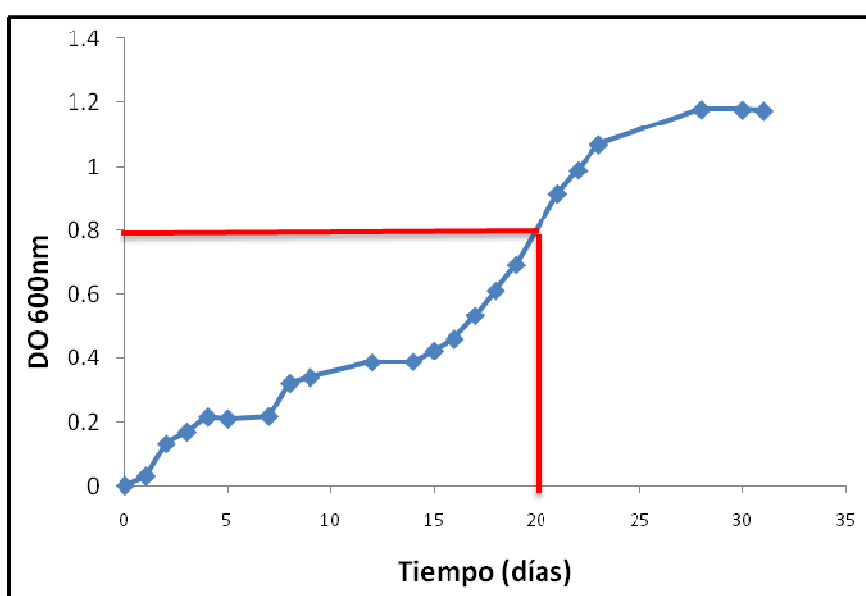


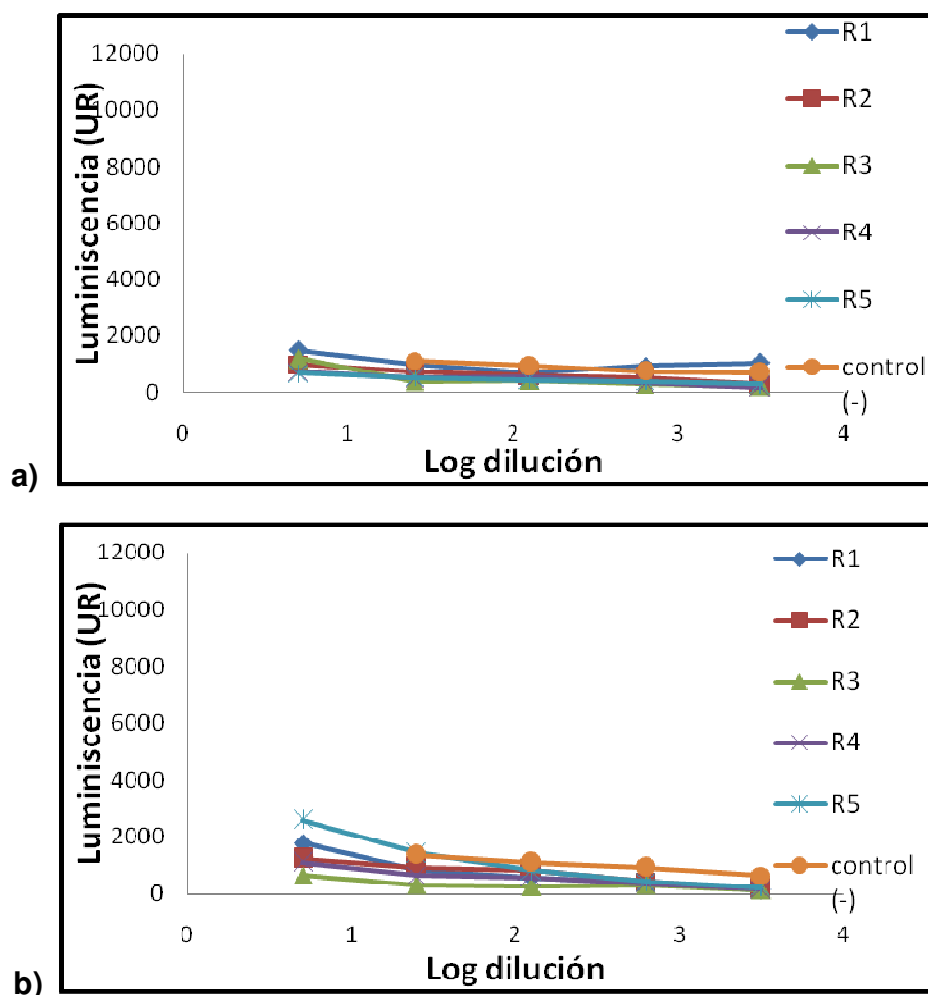
Gráfico 1. Curva de crecimiento de la cepa BCG México.

La cepa BCG México fue cultivada en medio Sauton y su crecimiento fue evaluado por medición de DO_{600nm} cada 24 horas. El gráfico representa los valores de DO_{600nm} vs tiempo, señalando con líneas rojas la fase media logarítmica.

2 Análisis de sueros obtenidos de los ratones inmunizados con BCG México

Los sueros de los 5 ratones no inmunizados e inmunizados con BCG México fueron analizados con el anticuerpo secundario IgG2a por la técnica de ELISA para evaluar la respuesta inmune humoral de cada ratón a lo largo del esquema

de inmunización (resultados del grupo control en Anexo 3). Los resultados obtenidos muestran que conforme se incrementa el número de inmunizaciones con BCG México, la producción de anticuerpos IgG2a contra BCG México aumenta (Gráfico 2). A través de los títulos de anticuerpos obtenidos del análisis de los sueros en la última inmunización, se seleccionó al ratón No. 1 ya que presentó el mayor título de anticuerpos IgG2a contra BCG México (Tabla 2).



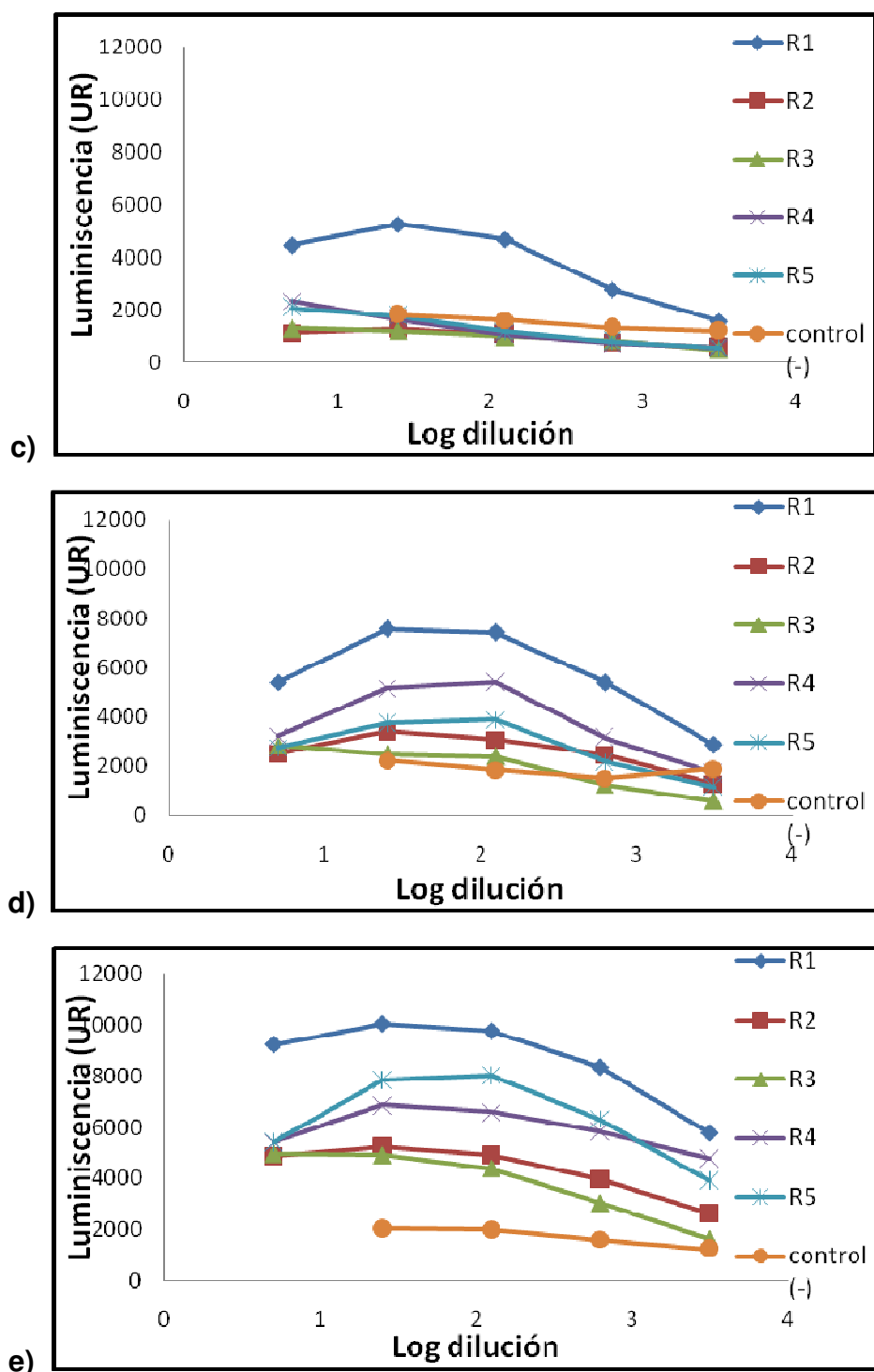


Gráfico 2. Determinación de anticuerpos IgG2a, por la técnica de ELISA, en ratones inmunizados con BCG México (R1-R5) y en el grupo control. a) Ratones no inmunizados, b) 15 días post-inmunización, c) 30 días post-inmunización, d) 45 días post inmunización, e) 60 días post-inmunización. El grupo control negativo representa el promedio de los 5 ratones inmunizados con SSI.

Ratón	Título de anticuerpos IgG2a
1	3.2
2	2.8
3	2.8
4	2.8
5	3.1

Tabla 2. Título de anticuerpos IgG2a en base logaritmo a 60 días post-inmunización con BCG México.

3 Fusión, selección y clonación de hibridomas

De la fusión y clonación se obtuvieron 1440 posibles clonas, las cuales fueron seleccionadas con medio HAT y evaluadas para determinar su reactividad contra la cepa BCG México con la técnica de ELISA. Para la selección de las clonas positivas se estableció como punto de corte un valor de luminiscencia de 1000 UR; es decir, aquellas clonas con valor de luminiscencia superior a éste fueron seleccionadas. Los resultados obtenidos para una de las placas se muestran en el gráfico 3 y las clonas seleccionadas de ésta placa se muestran en la tabla 3.

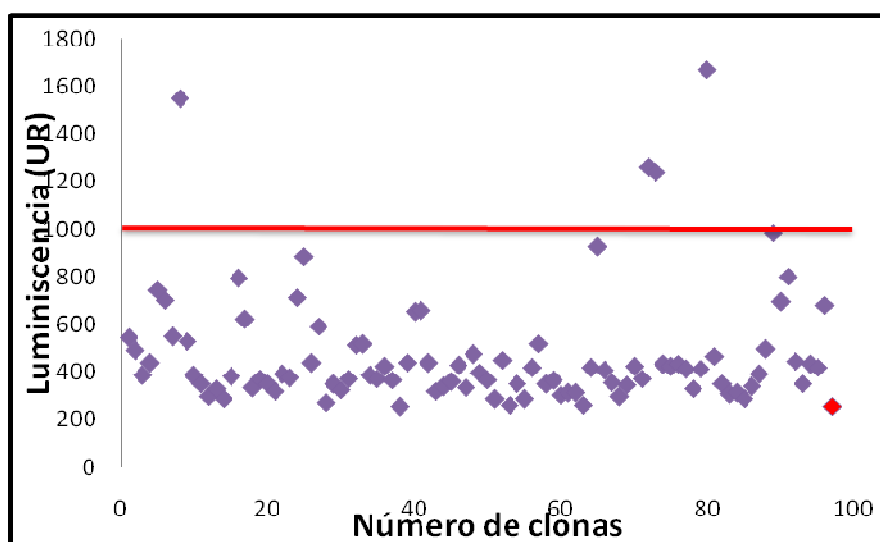


Gráfico 3. Valores de luminiscencia de las clonas obtenidas en la placa 1, el control negativo es representado en rojo. La línea roja muestra el punto de corte (1000 UR)

Clona	Luminiscencia	Clona	Luminiscencia
1A10	1243	1H9	1263
1H1	1550	1H10	1672

Tabla 3. Valores de luminiscencia de las clonas positivas seleccionadas en la placa 1.

En total se seleccionaron 110 clonas que reconocieron a BCG México, con un valor de luminiscencia mayor al punto de corte establecido, lo que equivale a un 7% del total de las clonas obtenidas durante la selección y clonación (Figura 9).

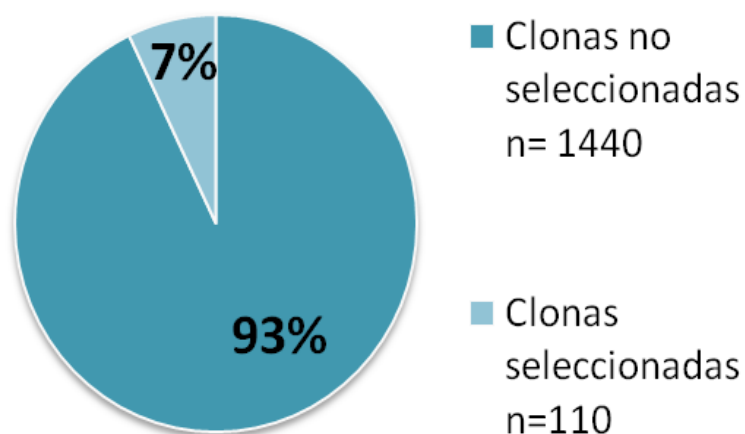


Figura 9. Porcentaje de clonas seleccionadas y no seleccionadas tomando como base el reconocimiento a BCG México.

A partir de las 110 clonas se realizó un segundo escrutinio, el cual se basó en la proliferación celular y la reactividad de sus anticuerpos contra BCG México (técnica de ELISA). Diez de las clonas probadas presentaron similar confluencia celular (mayor 75%) y la mayor reactividad contra BCG México (Tabla 4); y la clona 2A10 fue la productora de anticuerpos con mayor reactividad hacia esta micobacteria.

Clona	Luminiscencia
2A10	4282
2A12	2949
4G10	2385
7G10	2375
7A12	1932
6A6	1639
7A5	1622
7F12	1468
7F1	1360
5F1	1322

Tabla 4. Valores de luminiscencia de las 10 clonas seleccionadas en el segundo escrutino, todas las clonas presentaba una confluencia celular mayor al 75%.

4. Caracterización de anticuerpos monoclonales

- Reacción cruzada

Para evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal, se determinó su reactividad frente a antígenos similares a la cepa BCG México; es decir, se empleó proteínas provenientes de bacterias lisadas del mismo género de la cepa, para determinar si los anticuerpos de la clona 2A10 fueron capaces de reconocer a éstas proteínas.

Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico 4, en el cual se observa que existe reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales de la clona 2A10 contra antígenos de diferentes cepas de micobacterias. Sin embargo, el mayor reconocimiento es hacia la cepa BCG México, al menos 2 veces más si se

compara con las cepas BCG Danesa y *M. Abscessus* que son las que le siguen en reactividad.

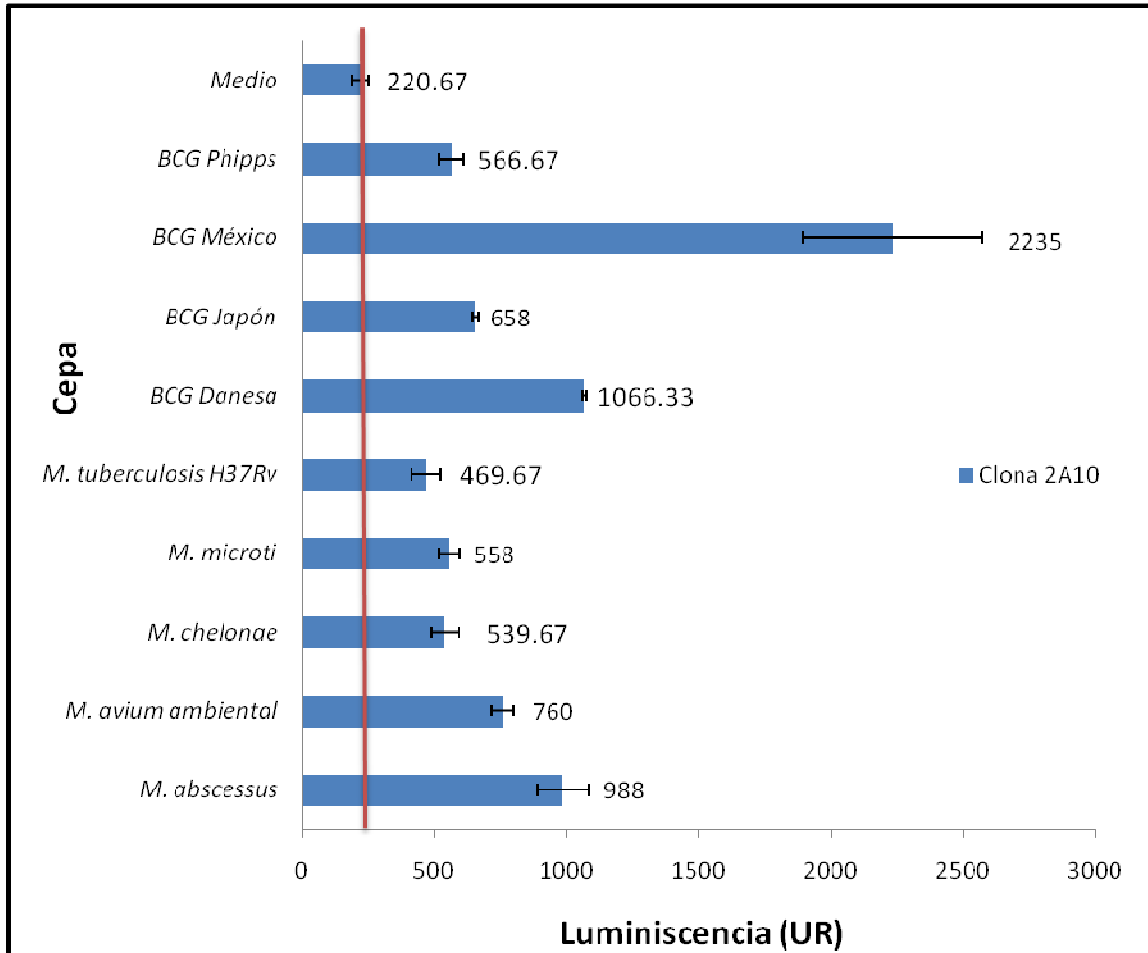


Gráfico 4. Reacción cruzada con diferentes micobacterias utilizando como anticuerpo primario el sobrenadante de la clona 2A10 con la técnica de ELISA por quimioluminiscencia.

- Identificación de proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales contra BCG México

Para identificar las proteínas específicas reconocidas por el anticuerpo monoclonal en BCG México, se elaboró un gel de dos dimensiones de la cepa BCG México, en éste se observó una distribución de las proteínas en un intervalo de pH 4-7 y de

MM entre 10-150kDa. A partir de éste gel se realizó un Western-blot con el sobrenadante de la clona 2A10 como anticuerpo primario.

En el inmunoproteoma se identificó 3 proteínas que fueron reconocidas por los anticuerpos monoclonales, su ubicación se muestran en el proteoma de la cepa (Figura 10). Las 3 proteínas reconocidas se identificaron mediante la secuenciación por espectrometría de masas y su búsqueda en la base de datos en el sitio Mascot⁵² del complejo micobacteriano, que identifica proteínas a partir de una base de datos de secuencia primaria.

La identificación de las proteínas se elaboró con la base de datos de la cepa *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2, ya que su genoma esta secuenciado y es el más cercano a la cepa BCG México (Orduña-Estrada y col. Manuscrito en preparación, 2010). Dos de las proteínas forma parte de procesos metabólicos y una proteína es hipotética conservada (Tabla 6).

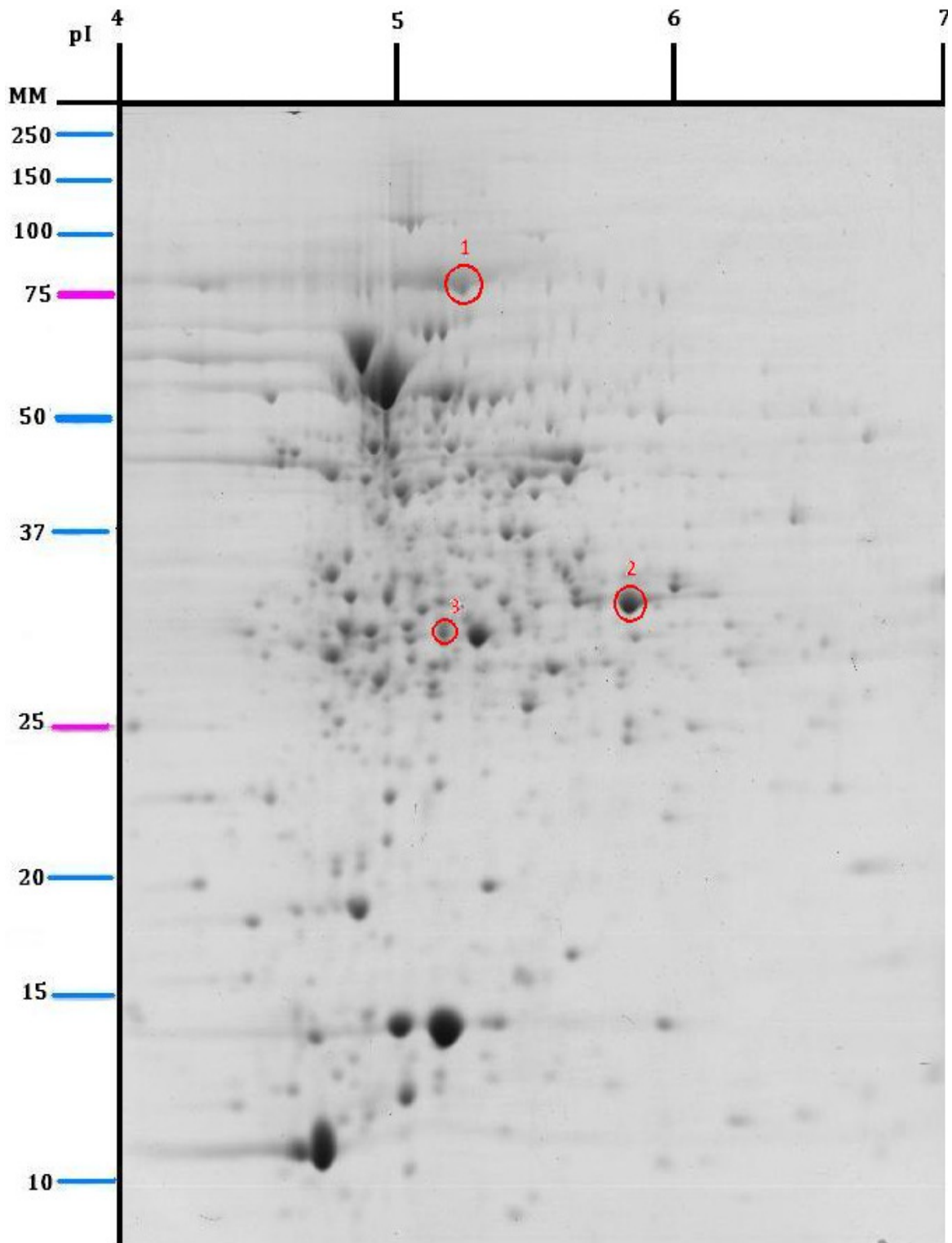


Figura 10. Inmunoproteoma de BCG México. Gel en 2D con 200 μ g de lisado proteico de BCG México teñido por Silver Blue. Los círculos rojos representan las proteínas reconocidas con el anticuerpo monoclonal de la clona 2A10 sobrepuesto en el proteoma de BCG México, este gel fue elegido para la identificación de las proteínas de interés por espectrometría de masas.


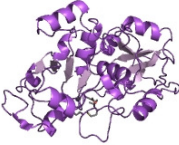
No. spot	Nombre	Función (*)	MM Teórico	pI Teórico	No. Péptidos identificados	% cobertura ó secuencia	NCBI BLAST
1	Glicina deshidrogenasa 	Enzima que cataliza la reacción de descarboxilación de la glicina (7). EC 1.4.4.2	100074	5.31	27	32	gij31793022
2	Proteína Hipotética Rv2623	Función desconocida, su región se encuentra dentro la familia de proteínas de estrés universal (10)	31747	5.46	67	60	gij15609760
3	Tiosulfato sulfotransferasa CysA2 	Enzima que cataliza la transferencia del átomo sulfuro del tiosulfato al cianuro, para formar sulfito y tiocianato (7) EC 2.8.1.1	31110	5.14	26	58	gij15607955

Tabla 5. Identificación de las proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal de la clona 2A10 contra BCG México. Con el sitio Mascot <http://www.matrixscience.com/>

*Clasificación por categoría funcional de proteínas de acuerdo al BCGList⁵³ donde: “0” virulencia, detoxificación y adaptación, “1” metabolismo de lípidos, “2” vías de información, “3” pared celular y procesos celulares, “4” ARNs estables, “5” segs inserción y fagos, “6” PE/PPE, “7” metabolismo intermediario y respiración, “8” desconocidas, “9” proteínas regulatorias, “10” hipotéticas conservadas, “16” hipotéticas conservadas con un ortólogo en *Mycobacterium*.

Se realizó un alineamiento de las tres proteínas identificadas, para compararlas en diferentes micobacterias con genoma secuenciado (Tabla 7), obteniendo que las cepas pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis* tienen una identidad mayor o

igual al 99% con las proteínas de BCG México, mientras que la identidad en otras cepas pertenecientes al mismo género varía, pero es inferior al 90%.

	<i>M. sp</i>	<i>M. tuberculosis complejo</i>	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis BCG str. Pasteur 1173P2</i>	<i>M. bovis BCG str. México</i>	<i>M. bovis BCG str. Tokio 172</i>	<i>M. avium complejo</i>	<i>M. avium subsp. avium</i>	<i>M. abscessus</i>
Glicina deshidrogenasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	81	99	99	100	100	100	100	88	87	78
Proteína Hipotética Rv2623	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		100	100	100	100	100	100	56	56	37
Tiosulfato sulfotransferasa CysA2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	85	100	100	100	100	100	100	28	27	86

Tabla 6. Identificación de las proteínas en los genomas secuenciados de diferentes micobacterias, a través de un BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- Alineamiento de las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales contra BCG México

Con las secuencias de las 3 proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal se les realizó un alineamiento con el software ClustalW, esto para identificar si compartían secuencias de aminoácidos en común. Éste análisis permitió identificar regiones conservadas entre las tres proteínas y 117 aminoácidos en común (Figura 11).

ALINEAMIENTO DE LAS 3 PROTEÍNAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES EN BCG MÉXICO

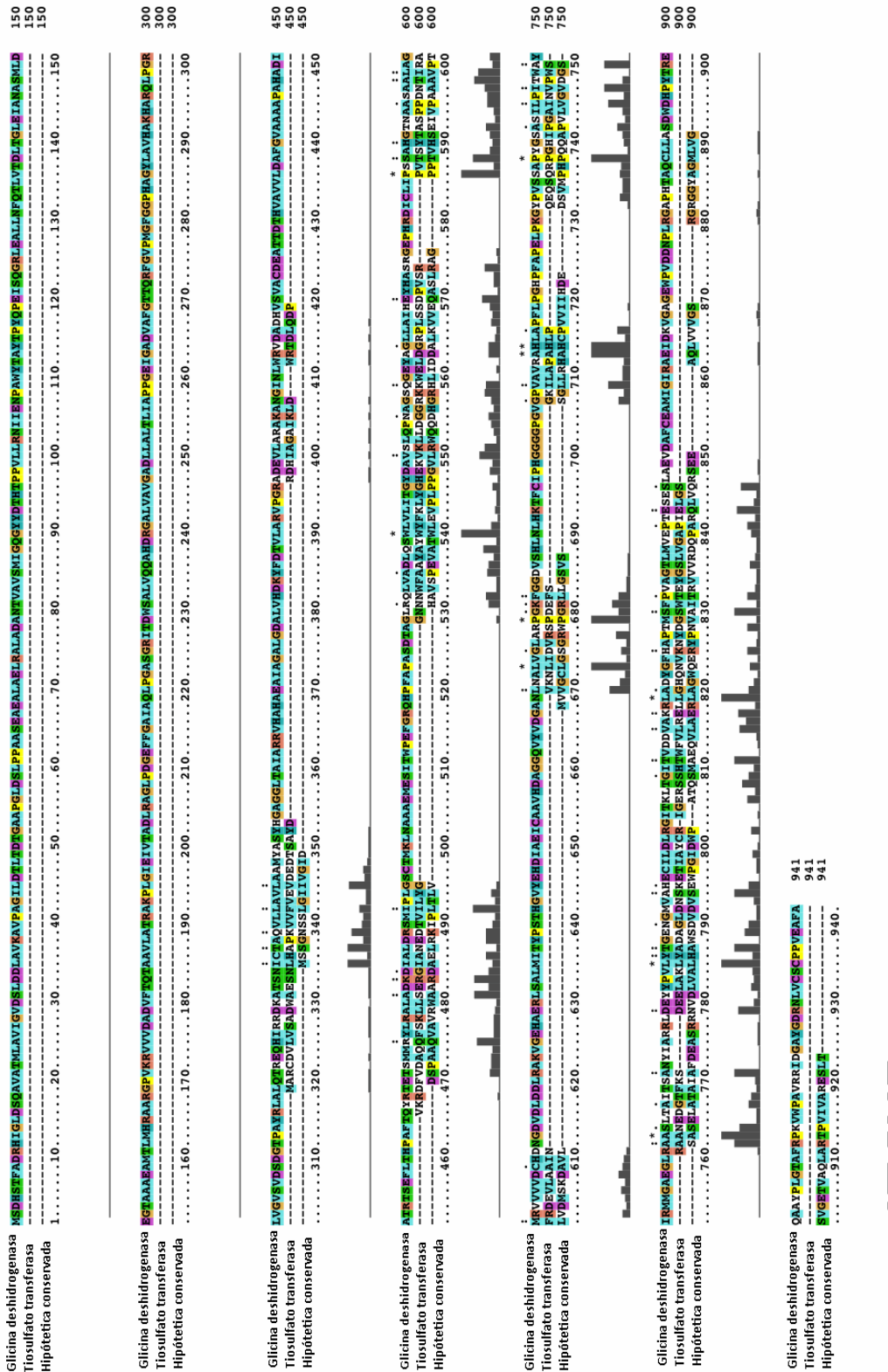


Figura 11. Consenso de las 3 proteínas reconocidas por el anticuerpo monoclonal en BCG México con el software ClustaW.

DISCUSIÓN

La BCG es la única vacuna empleada para la prevención de la tuberculosis, pero ha sido cuestionada por la variabilidad en la eficacia protectora que confiere contra la tuberculosis pulmonar en adultos. Esta variabilidad ha sido atribuida a diversos factores, entre los que se encuentran las diferencias genéticas y antigénicas entre las subcepas BCG^{24, 29, 31}. Dadas estas evidencias, en el presente trabajo se optó por buscar proteínas inmunogénicas y únicas de la BCG, las cuales están involucradas en la eficacia protectora conferida por la vacuna, a través de la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales.

La subcepa de elección fue BCG México, ya que ha sido estudiada ampliamente a nivel proteico y genómico en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, donde actualmente se ha secuenciado su genoma, también ha sido incluida en estudios comparativos de eficacia protectora con diferentes subcepas BCG y fue empleada como cepa vacunal en México^{20, 32}.

La producción de los anticuerpos monoclonales comprendió: el crecimiento de la subcepa BCG México para su uso como inóculo, la inmunización en ratones BALB/c, la producción de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la cepa y la caracterización de éstos a través de la reactividad cruzada frente a diferentes micobacterias e identificación de las proteínas reconocidas.

La cepa BCG México presentó un crecimiento lento, de aproximadamente 30 días en medio líquido Sauton, característico de las subcepas BCG³². Los bacilos de la cepa fueron identificados como ácido alcohol resistentes a través de la tinción de Ziehl-Neelsen, en la cual las micobacterias se tiñen de color rojo debido al alto contenido de lípidos que presentan en la pared celular, que les confiere resistencia a la decoloración alcohol-ácida^{4, 49}.

Para la preparación del inóculo el cultivo de la subcepa BCG México se cosechó en la fase media logarítmica de crecimiento, ya que en ésta fase existen la mayor cantidad de células viables en el cultivo, se tiene la máxima actividad metabólica y se expresan una mayor cantidad de proteínas⁴⁹.

Para la inmunización se eligió el ratón BALB/c como modelo animal debido a que ha proporcionado hibridomas estables con líneas de mieloma provenientes de la misma especie, además de su fácil manejo, disponibilidad y que desarrolla una respuesta inmune frente a micobacterias^{32, 40, 41, 46}. La inmunización se realizó en 4 ocasiones para asegurar la presencia de linfocitos B de memoria productores de anticuerpos con alta afinidad a las proteínas de la cepa^{41, 46}. Se realizaron sangrías previas a cada inmunización por punción en la vena maxilar, ya que ésta vía no es invasiva para el animal y proporciona cantidades de suero suficientes para el análisis posterior, esto para corroborar el incremento en la producción de anticuerpos al avanzar con el esquema de inmunización.

El análisis de los sueros de ratones inmunizados con BCG México fue realizado con la técnica de ELISA, ésta técnica confiere ventajas tales como sencillez, economía y reproducibilidad; además se utilizó como detección la quimioluminiscencia lo que le aportó una mayor sensibilidad a la técnica. Como anticuerpo secundario se usó el IgG2a anti-ratón, ya que las micobacterias despiertan una respuesta protectora mediada por linfocitos T, los cuales se diferencian a linfocitos efectores T_{h1} que secretan citocinas como IFN- γ , él cual actúa sobre los linfocitos B favoreciendo el cambio de isotipo a IgG2a en ratones ⁴⁶.

El análisis de los sueros de los ratones mostró que conforme incrementa el número de inmunizaciones también aumenta la cantidad de anticuerpos IgG2a en suero. Esto se debe a que el inóculo despierta una respuesta humoral primaria donde los linfocitos B son estimulados y diferenciados a células secretoras de anticuerpos y de memoria; al re-inmunizar se da una respuesta humoral secundaria donde se estimulan los linfocitos B de memoria que da lugar a una proliferación y diferenciación más rápida, lo que lleva a una mayor producción de anticuerpos con alta afinidad por el inóculo ⁴⁶.

La fusión se realizó con la línea celular de mieloma Sp2/0-Ag14 proveniente de ratones BALB/c, lo cual favorece la formación de híbridos estables además de no secretar inmunoglobulinas y tener una propagación *in vitro* indefinida ^{37, 38, 40}. La selección y clonación se efectuaron simultáneamente con el objetivo de disminuir

tiempos de trabajo. La selección se realizó con el medio HAT ya que únicamente permite la sobrevivencia de aquellas clonas provenientes de una fusión esplenocito-mieloma, mientras que para la clonación se realizaron diluciones para individualizar una clona por pozo y de ésta forma garantizar la monoclonalidad del anticuerpo^{39, 50}.

Posterior a los 12 días de clonación se realizó el primer escrutinio en base a la reactividad de cada clona contra BCG México, lo cual permitió seleccionar clonas productoras de anticuerpos específicos contra la cepa. Un total de 110 híbridos fueron identificados, lo que representa un 7.6% del total de clonas. Para seleccionar los anticuerpos con mayor reconocimiento a la cepa se realizó un segundo escrutinio, basado en la proliferación celular y reactividad de los anticuerpos contra la cepa BCG México; de aquí se seleccionaron 10 clonas que presentaron similar proliferación celular y la mayor reactividad contra la cepa.

En la literatura se estima que de una fusión de 2×10^5 células de bazo se obtiene 1 híbrido y del total de híbridos solo el 1% producirán anticuerpos específicos al antígeno de interés³⁹. En este trabajo se inició con 1×10^8 células de bazo, teóricamente se esperaría un aproximado de 500 híbridos de los cuales solo 5 clonas serían de interés; después de un segundo escrutinio se eligieron 10 clonas de interés lo que representaría el doble de clonas estimadas, debido a que en la practica la cantidad de clonas de interés suele ser mayor a lo esperado.

Para la caracterización de los anticuerpos monoclonales se seleccionó la clona 2A10 cuyos anticuerpos tuvieron la mayor reactividad a la cepa BCG México. La caracterización se realizó con base en la reactividad cruzada con otras micobacterias y la identificación de las proteínas que reconocen en la cepa BCG México.

El ensayo de reactividad cruzada se realizó con el fin de evaluar si los anticuerpos tienen reconocimiento a antígenos en otras cepas del mismo género. Para ello se eligieron cepas representativas del género *Mycobacterium*: micobacterias que pertenecen al Complejo *M. tuberculosis* (*M. microti* y *M. tuberculosis* H37Rv), micobacterias pertenecientes al mismo complejo pero que han sido atenuadas y empleadas como cepas vacunales (BCG Danesa, BCG Japón y BCG Phipps) y micobacterias no tuberculosas que causan enfermedades pulmonares similares a la tuberculosis (*M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*).

Los resultados mostraron que los anticuerpos presentan reactividad contra antígenos de diferentes cepas micobacterianas, sin embargo, el mayor reconocimiento se da para BCG México. Lo cual indica que existen antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales de BCG México en otras micobacterias que no son necesariamente idénticos sino que son estructuralmente relacionados ó el anticuerpo tiene sitios multiespecíficos que reconocen dos ó más entidades diferentes de epítopes.

La segunda parte de la caracterización de los anticuerpos monoclonales comprendió la identificación de las proteínas reconocidas por éstos en BCG México. Tres proteínas fueron reconocidas por los anticuerpos de la clona 2A10, dos forman parte de procesos metabólicos (GLDC, TS) y una es una proteína hipotética conservada.

La glicina deshidrogenasa (GLDC) es uno de los componentes del sistema de segmentación de la glicina. Ésta enzima cataliza la reacción de descarboxilación de la glicina, utiliza como segundo sustrato H-proteína-lipoil-lisina y como cofactor a piridoxal-5'-fosfato, obteniéndose como productos dióxido de carbono y H-proteína-S-aminometildihydroilipoil-lisina. Como enzima es clasificada como EC 1.4.4.2 por catalizar reacciones de oxidación/reducción y forma parte del metabolismo intermediario y la respiración ^{52, 53, 54, 55}.

La tiosulfato sulfotransferasa (TS), también llamada rodanasa, es una enzima que participa en el metabolismo del azufre catalizando la transferencia de un átomo de sulfuro del tiosulfato al cianuro para formar sulfito y tiocianato, participa en la destoxificación del cianuro. Como enzima es clasificada como EC 2.8.1.1 porque es una transferasa y forma parte del metabolismo intermediario y la respiración ^{52, 53, 57}.

La proteína hipotética es una proteína con función desconocida cuya expresión no ha sido demostrada. Pero, la secuencia presenta dominios conservados con la familia de proteínas de estrés universal (USP), las cuales son expresadas cuando

la célula es expuesta a agentes estresantes y su función es incrementar la tasa de supervivencia de las células durante una exposición prolongada a tales condiciones. Además, el homólogo de la USP de *M. tuberculosis*, *Rv2623*, es uno de los genes altamente inducidos en el regulón de dormancia cuando los bacilos son sometidos a hipoxia y estrés oxidativo, lo cual es altamente relevante durante la infección^{52, 53, 56}.

La búsqueda de secuencias de las tres proteínas en diferentes genomas de micobacterias mostró que éstas se encuentran presentes en todos los genomas analizados; con una similitud mayor al 99% en aquellas pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*, mientras que con las micobacterias no tuberculosas, la similitud fue menor al 90%. Esto correlaciona con la ubicación de ambos grupos de micobacterias en las filogenias que se han construido dentro de este género utilizando la comparación de la secuencia de genes housekeeping^{58, 59}.

Esto implica que las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales de la clona 2A10 no son únicas de la cepa BCG México. Sin embargo, la mayor reactividad contra las proteínas de BCG México puede deberse a que los anticuerpos presentan mayor avidéz y/o a que las proteínas presentan una mayor expresión en la cepa. Una alternativa para encontrar proteínas únicas en la cepa BCG México, sería comparar los proteomas de diferentes subcepas BCG y de otras micobacterias con el de BCG México.

Para determinar si las tres proteínas identificadas comparten regiones de secuencia que son reconocidas por el anticuerpo monoclonal, se realizó el alineamiento de la secuencia proteica con el programa ClustalX2. Esto permitió identificar regiones conservadas entre las tres proteínas, las cuales son las responsables del reconocimiento de los anticuerpos monoclonales hacia éstas tres proteínas. Para corroborar ésta hipótesis se requiere de ensayos específicos.

La producción de anticuerpos monoclonales es un trabajo que requiere de altos costos y tiempo, pero la ventaja que ofrecen es que son reproducibles ya que las clonas producirán anticuerpos específicos de forma indefinida, además de la especificidad que se logra con éstos.

CONCLUSIONES

- BCG México generó una respuesta inmune adaptativa en los ratones inmunizados.
- 10 hibridomas tuvieron alto reconocimiento hacia BCG México.
- Los hibridomas secretan anticuerpos del tipo IgG2a.
- Existe reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales contra BCG México con diferentes micobacterias.
- Dos de las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales pertenecen al metabolismo de la bacteria y la otra es una proteína hipotética conservada.
- Las proteínas reconocidas comparten regiones conservadas.
- Las proteínas reconocidas por los anticuerpos monoclonales son idénticas en micobacterias pertenecientes al Complejo *M. tuberculosis*.

REFERENCIAS

1. **Palomino, J. C., Leao, S., Ritacco, V.** 2007. Tuberculosis 2007, From basic science to patient care. [Online] <http://www.Tuberculosisistextbook.com>
2. **Moreno Altamirano, L.** 2004. "Desde las fuerzas mágicas hasta Roberto Koch: Un enfoque epidemiológico de la tuberculosis." *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 17(2): 9.
3. **Daniel, T. M.** 2006. "The history of tuberculosis." *Respir Med* 100(11): 1862-70.
4. **Murray, P. R., Rosenthal, Ken S., Pfaller, Michael A.** 2006. *Microbiología Médica*. Madrid, España.
5. **World Health Organization.** 2009. Tuberculosis. [Online] <http://www.who.int>
6. **Fenton, M. J. and M. W. Vermeulen.** 1996. "Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes." *Infect Immun* 64(3): 683-90.
7. **Mustafa Abu, S. and R. Al-Attiyah.** 2003. "Tuberculosis: looking beyond BCG vaccines." *J Postgrad Med* 49(2): 134-40.
8. **Neonakis, I. K., Z. Gitti, et al.** 2008. "Molecular diagnostic tools in mycobacteriology." *J Microbiol Methods* 75(1): 1-11.
9. **Anónimo.** 2009. "Global tuberculosis control 2009: epidemiology, strategy, financing." WHO report 2009.

10. **World Health Organization.** 2009. "Tb/HIV Facts 2009." [Online] <http://www.who.int>
11. **Anónimo.** 2009. "Estándares para la atención de la tuberculosis en México". Secretaría de Salud, México.
12. **Fine, P. E. M., Carnerio, Ilona A. M., Clements, C. John.** 1999. "Issues relating to the use of BCG in immunization programmes." WHO, Genova
13. **World Health Organization.** 2006. "The stop Tb strategy". [Online] <http://www.who.int>
14. **Milstien, J.** 1993. "The Immunological Basis for Immunization Series, Module 5: Tuberculosis." WHO, Geneva.
15. **World Health Organization.** "BCG Vaccine". [Online] <http://www.who.int>
16. **Liu, J., V. Tran, et al.** 2009. "BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy." *Hum Vaccin* 5(2): 70-8.
17. **Behr, M. A. and P. M. Small.** 1999. "A historical and molecular phylogeny of BCG strains." *Vaccine* 17(7-8): 915-22.
18. **Brewer, T. F. and G. A. Colditz.** 1995. "Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis." *Clin Infect Dis* 20(1): 126-35.
19. **Anónimo.** 1995. Cien años de lucha por la salud. 1st ed. Instituto Nacional de Salud. de Higiene, Secretaría México
20. **León A. P.** 1963. Laboratorio de producción de la vacuna BCG. Instituto Nacional de Higiene, México.

21. **Secretaría de Salud.** 1993. NOM-006-SSA2-1993. Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud
22. **Bannon, M. J.** 1999. "BCG and tuberculosis." *Arch Dis Child* 80(1): 80-3.
23. **Brewer, T. F.** 2000. "Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature." *Clin Infect Dis* 31 Suppl 3: S64-7.
24. **Colditz, G. A., T. F. Brewer, et al.** 1994. "Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature." *JAMA* 271(9): 698-702.
25. **Andersen P, Doherty TM.** 2005. "The success and failure of BCG – implications for a novel tuberculosis vaccine" *Nat. Rev. Microbiol.* 3(8): 656-62.
26. **Mendoza-Coronel E., et al.** 2010. "PD-L2 Induction on dendritic cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulates BCG-specific T cell response" *Tuberculosis* (en prensa).
27. **Nava-Aguilera E., et al.** 2009. "Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis" *Int J Tuberc Lung Dis.* 13(1):17-26.
28. **Brosch, R., S. V. Gordon, et al.** 2007. "Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5596-601.
29. **Behr MA.** 2002. "BCG--different strains, different vaccines?". *Lancet Infect Dis*, 2:86-92
30. **WHO.** The requeriments for dried BCG vaccine. ". [Online] <http://www.who.int>

31. **Ritz, N., W. A. Hanekom, et al.** 2008. "Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis." *FEMS Microbiol Rev* 32(5): 821-41
32. **Castillo-Rodal, A. I., M. Castanon-Arreola, et al.** 2006. "*Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis." *Infect Immun* 74(3): 1718-24
33. **Hayashi, D., T. Takii, et al.** 2009. "Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains." *FEMS Immunol Med Microbiol* 56(2): 116-28
34. **Rodriguez-Alvarez M et al.** 2009. "Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level". *Tuberculosis*, 89(2):126-35.
35. **Kohler, G. and C. Milstein.** 1975. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-7.
36. **Goding, J. W.** 1980. "Antibody production by hybridomas." *J Immunol Methods* 39(4): 285-308.
37. **Sikora, K. a. S., Howard M.** 1986. *Anticuerpos monoclonales*. REVERTÉ, Barcelona, España
38. **Coll Morales, J.** 1993. *Técnicas diagnóstico en virología*. DÍAZ DE SANTOS, España
39. **Álvarez-Vanilla, L.** 2004. *Anticuerpos monoclonales: realidades y perspectivas*. COMPLUTENSE, Madrid, España.

40. **Yokoyama, W. M., M. Christensen, et al.** 2006. "Production of monoclonal antibodies." *Curr Protoc Immunol* Chapter 2: Unit 2 5.
41. **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.
42. **Petty, H. R.** 1993. *Molecular biology of membranes: Structure and function.* PLENUM, New, York, United States of America.
43. **Harris, H.** 1978. *Núcleo y citoplasma.* SALVAT, México
44. **Lehninger, A. L.** 2005. *Principios de bioquímica.* 4th ed, OMEGA, Barcelona, España
45. **Stryer, L.** 1995. *Biochemistry.* 4th ed, FREEMAN, New York, EUA.
46. **Abbas, A. K. and Litchman, A. H.** 2008. *Inmunología celular y molecular.* 6th ed, ELSEVIER, Barcelona, España.
47. **Campbell, A.** 1984. *Monoclonal antibody technology: the production and characterization of rodent and human hibridomas.* 2nd ed ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, United States of America.
48. **Payne WJ Jr, Marshall DL, et. al.** 1988. "Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies" *Clin. Microbiol. Rev.* 1(3):313-29.
49. **Pumarola, A.** 1995. *Microbiología y parasitología médica.* 2nd ed. ELSEVIER, España.
50. **Anónimo.** 2009. *Technical Manual, ClonaCell-HY Hybridoma Cloning Kit.* StemCell Technologies Inc.

51. **Anónimo.** 1999. "Monoclonal Antibody Production" National Academy Press, Washinbton, DC
52. **Mascot** [Online] <http://www.matrixscience.com/>
53. **BCGList World Wide WebServer.** [Online] <http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>
54. **Hiraga, K. and Kikuchi G.** 1980. "The mitochondrial glycine cleavage system, functional association of glycne decarboxilase and aminomethyl carrier protein" J. Biological Chemistry 255(24): 11671-76.
55. **Kikuchi, G. et al.** 2008. "Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycemia" Proc. Jpn Acad. 84
56. **Drumm, J. E., et al.** 2009. "Mycobacterium tuberculosis Universal Stress Protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-binding: requierement for establishing chronic persistent infection" Plos Pathogens.
57. **Sorbo, B. H.** 1953. "Crystalline rhodanase II. The enzyme catalyzed reaction" Acta. Chem. Scand 7: 1137-45
58. **Kim H, Kim SH, Shim TS, et al.** 2005. "Differentiation of mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65)". Int J Syst Evol Microbiol. 55: 1649-1656
59. **Adekambi T, Drancourt M, Raoult D.** 2009. "The rpob gene as a tool for clinical microbiologists" Trends Microbiol.; 17: 37-45.

ANEXO I

Técnicas

- **Tinción de Ziehl-Neelsen**

El frotis es fijado con calor durante 30 min, se adiciona solución de fucsina-fenicada calentando la muestra hasta la emisión de vapores durante 5 min, se enjuaga con agua, se decolora la muestra con solución alcohol-ácido (etanol – HCl) por 1 min, se enjuaga con agua, se adiciona como contraste azul de metileno por 1 min y se enjuaga el exceso.

- **Lisis de micobacterias por sonicación**

Los cultivos bacterianos fueron cosechados por centrifugación, el paquete celular fue lavado 3 veces con agua desionizada estéril y fue ajustado a una concentración de 0.1 g/mL.

De la suspensión obtenida se tomaron de 1 a 2mL los cuales fueron lisados con ultrasonido (sonicador Vibra Cell), dando 15 pulsos de 1 min con intervalos de 1 min entre éstos, se adicionó PMSF como inhibidor de proteasas a una concentración final de 20mM. Al finalizar la muestra se centrifugo a 5000 rpm durante 3 min, se alicuoto y almacenó a -70°C hasta su uso.

Para verificar que las micobacterias hayan sido lisadas se realiza un frotis, se tiñe por Ziehl-Neelsen y en el microscopio se observa que no haya presencia de bacterias completas.

- **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Se elabora una curva estándar utilizando BSA (1 mg/mL) por duplicado:

μL de BSA	0	1	2	3	4	5	6	8	10
μL H ₂ O	50	49	48	47	46	45	44	42	40

Para la muestra a cuantificar se toma 1 μL de ésta y se adicionan 49 μl de H₂O, por duplicado, enseguida se adicionan 200 μl del reactivo de Bradford (CBB G-250 0.01%, Etanol 5%, H₃PO₄ 10%), se incuba 5 minutos en la oscuridad y se mide a λ=595nm y λ=450nm.

ANEXO II

Preparación de medios y soluciones

1. Medios

- Medio sólido Middlebrook 7H10 suplementado con OADC

Medio Middlebrook 7H10 (BD)	19g
Glicerol	5mL
H ₂ O	c.b.p. 900mL

Esterilizar a 121 °C por 8 min. Adicionar en condiciones de asepsia 100mL de OADC y vaciar en placas petri. Guardar a 4 °C.

- Medio líquido Sauton

L-Asparagina	4g
Ácido cítrico	2g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
Tween 80	0.5mL
Citrato de amonio férrico	0.05g
Glicerol	60mL

Ajustar a pH 7.4 y llevar a un volumen final de 1L. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM (GIBCO)	13.5g
NaHCO ₃	3.7g
HEPES	25mL

Ajustar a pH 7.3 y llevar a un volumen final de 1L, filtrar en membrana de 0.22µm.

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% SFB

DMEM	900mL
SFB (GIBCO)	100mL

Adicionar suero fetal bovino (SFB) al 10% y filtrar por una membrana de 0.22µm. Guardar 4 °C.

- Medio Hipoxantina Aminopterina Timidina (HAT)

Medio DMEM 10% SFB	500mL
Suplemento de medio HAT 50X (SIGMA)	1 vial

Tomar 10mL del medio y reconstituir un liofilizado del suplemento de medio HAT 50X (SIGMA), filtrar por una membrana de 0.22µm y transferir al medio DMEM 10% SFB. Almacenar a 4 °C, protegido de la luz.

- Medio Hipoxantina Timidina (HT)

DMEM 10% SFB	495mL
Suplemento líquido HT 100X (GIBCO)	5mL

Adicionar el suplemento HT al medio DMEM 10% SFB y filtrar por una membrana de 0,22µm. Guardar a 4 °C.

2. Soluciones para técnica de ELISA por quimioluminiscencia

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g

Ajustar a pH 7.4 y llevar a un volumen final de 1L.

- Buffer de carbonatos

Na ₂ CO ₃	0.159g
NaHCO ₃	0.293g

Ajustar a pH 9.6 y llevar a un volumen final de 100mL.

- PBS-Tween 0.05%

Tween 20	0.5mL
----------	-------

Adicionar tween a un volumen final de 1L de PBS.

3. Soluciones para geles 2D - PAGE

- Buffer de equilibrio

Urea	36.036g
------	---------

Glicerol	37.86g
Tris pH 8.8(stock 1.5M)	3.33mL
SDS	2g
Azul de bromofenol (stock 1%)	4 μ L

Llevar a un volumen final de 100mL.

- Buffer de corrida 5X

Glicina	72g
Tris base	15g
SDS	5g

Llevar a un volumen final de 1L.

- Gel acrilamida 12%

H ₂ O desgasificada	16.4mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	20mL
Tris pH 8.8,1.5M	12.5mL
SDS 10%	500 μ L
PSA 10%	500 μ L
TEMED	20 μ L

Solución que polimeriza en 1 hora.

4. Soluciones para la tinción con plata

- Solución de fijación

Metanol	50mL
Ácido acético	40mL
H ₂ O	10mL

- Solución de pretratamiento

Na ₂ S ₂ O ₃ 5H ₂ O	0.2g
---	------

Llevar a un volumen final de 1L.

- Solución de fijación

AgNO ₃	2g
Formaldehído	0.75mL

Llevar a un volumen final de 1L.

- Solución de revelado

Na ₂ CO ₃	60g
Formaldehído	0.5mL
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	4mg

Llevar a un volumen final de 1L.

- Solución de paro

Ácido acético	10mL
---------------	------

Llevar a un volumen final de 1L.

5. Soluciones para la tinción con Coomassie (Silver blue)

- Solución de Coomasie coloidal (silver blue)

Ácido fosfórico	14.8mL
Sulfato de amonio	25g
Metanol	50mL
CBB-G250	0.3g

Disolver y llevar a un volumen final de 250mL; solución coloidal.

6. Soluciones para la inmunodetección

- Solución de transferencia Bjerrum y Schafer-Nielsen

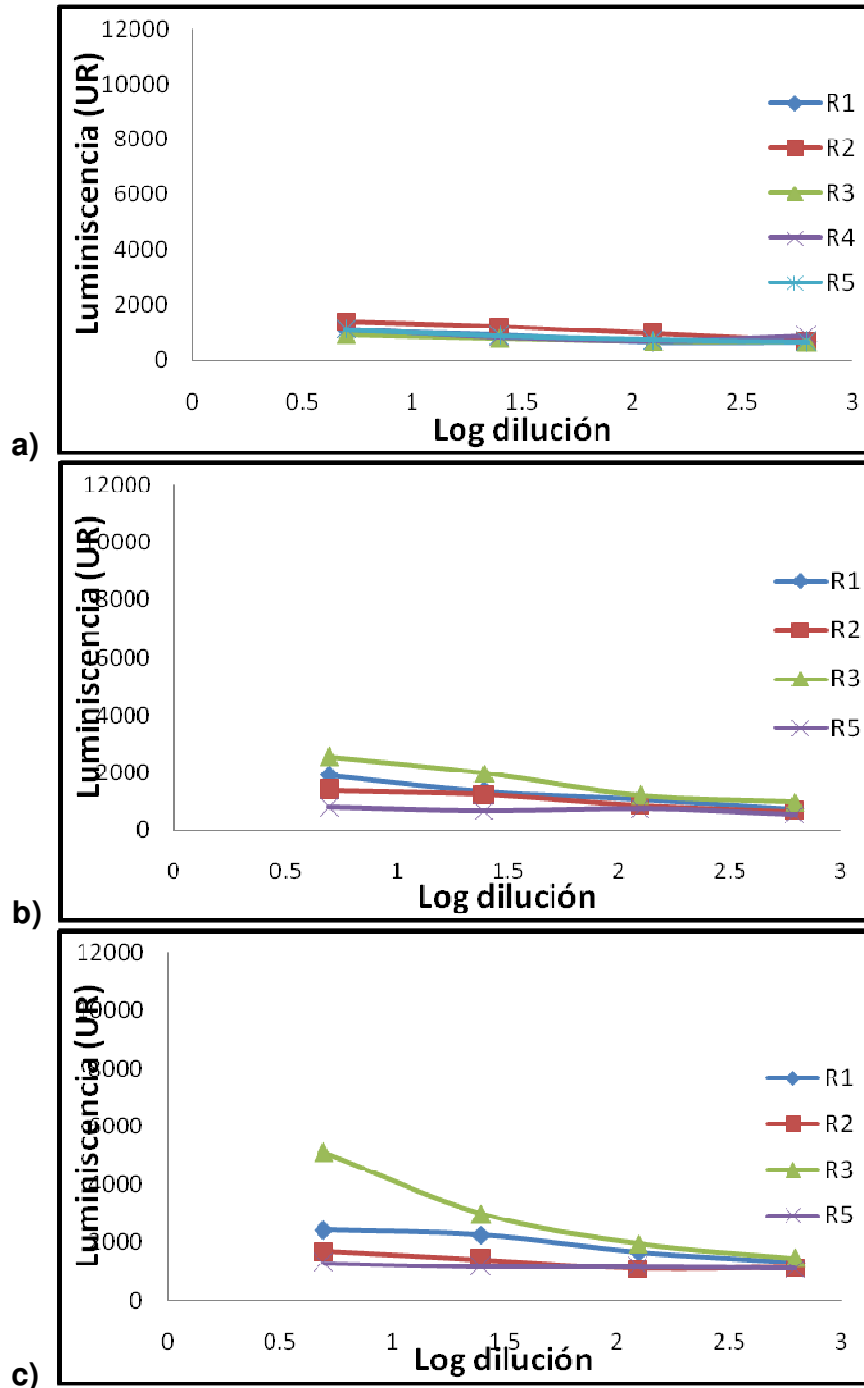
Metanol	200mL
Tris-HCL	5.82g
Glicina	2.93g

Llevar a un volumen final de 1L.

Anexo III

Análisis de sueros del grupo control negativo

- Títulos de anticuerpos IgG2a en los ratones inmunizados con SSI.



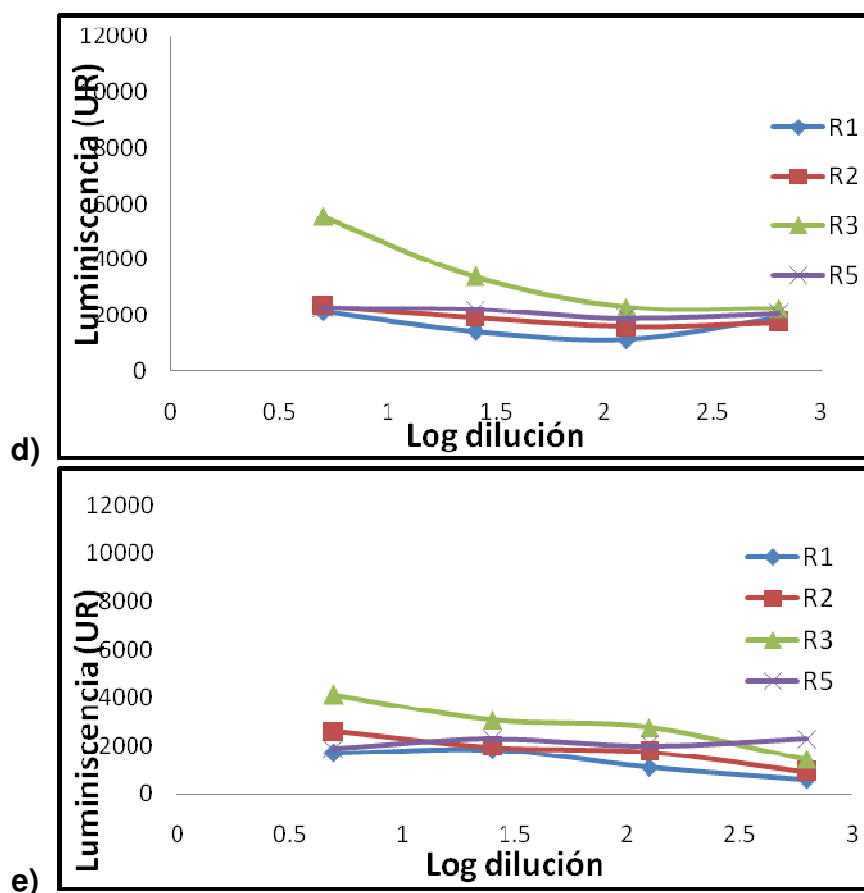


Gráfico 5. Análisis de anticuerpos IgG2a en 5 ratones sin inmunización y post-inmunización con SSI, determinados con la técnica de ELISA. a) Ratones sin inmunizar, b) 15 días post-inmunización, c) 30 días post-inmunización, d) 45 días post inmunización, e) 60 días post-inmunización.

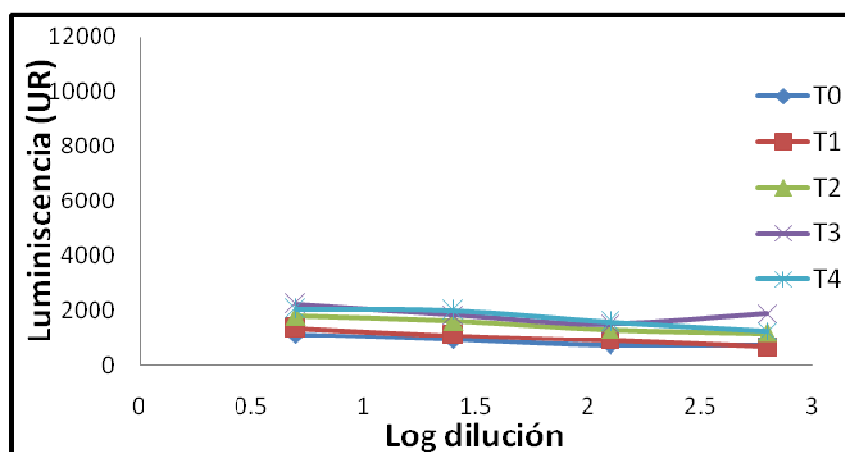


Gráfico 6. Promedio de los títulos de anticuerpos IgG2a de los ratones controles negativos. De cada tiempo de inmunización se obtuvo el promedio de los títulos de anticuerpos de todos los ratones, el cual fue representado en el Gráfico 2.

Anexo IV

Cepas empleadas en el ensayo de reactividad cruzada

Se verificó la calidad e integridad de las proteínas de extracto celular empleadas en el ensayo de reactividad cruzada, realizando un gel de poliacrilamida de 8-25% en el equipo Phast-System, para cada cepa se cargó 1 µg de proteína.

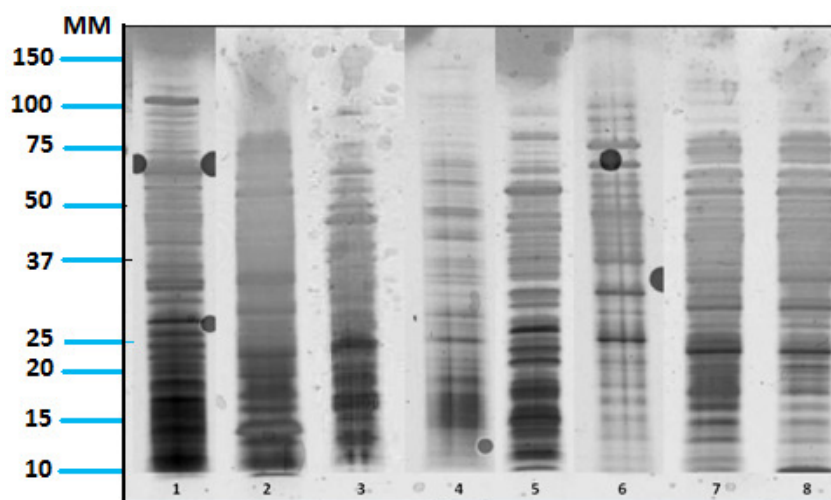


Figura 12. Gel de poliacrilamida de 8-25% teñido con plata. Cada carril se cargó con una cepa micobacteriana diferente representada con números del 1-8, los nombres de éstas se encuentran en la tabla 7.

Posición	Cepa
1	<i>M. microti</i>
2	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>
3	<i>M. abscessus</i>
4	<i>M. avium ambiental</i>
5	<i>M. chelonae</i>
6	BCG Danesa
7	BCG Japón
8	BCG Phipps

Tabla 7. Posición de las cepas micobacterianas en el gel de poliacrilamida.