



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE MIMÓTOPOS  
PEPTÍDICOS DE ANTÍGENOS  
MICOBACTERIANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

**ERIKA SEGURA SALINAS**

TUTORA PRINCIPAL: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN  
COMITÉ TUTOR: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

México, D.F.

Diciembre 2011



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de noviembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SEGURA SALINAS ERIKA** con número de cuenta **78058688** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE MIMÓTOPOS PEPTÍDICOS DE ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN**:

Presidente: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN  
Vocal: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
Secretario: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN  
Suplente: DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN  
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

El Comité Académico aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 25 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de septiembre de 2011.

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
Coordinadora del Programa

## AGRADECIMIENTOS

Mi eterno reconocimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas por la oportunidad de realizar esta Maestría, mi gratitud y goya a la UNAM

Este trabajo fue realizado gracias a la subvención del proyecto PAPIIT IN218506 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.


 Todo mi agradecimiento al comité tutor:


Dra. Goar Gevorgian

Dr. Ignacio Terrazas

Dra. Luz María López

Por su paciencia, su ayuda y las observaciones siempre oportunas en todas las evaluaciones que llevaron a la conclusión de este trabajo.

 Gracias al súper-jurado por la premura en la revisión y por señalarme gentilmente los errores para corregir y mejorar mi trabajo

 Gracias a mi tutora Dra. López Marín, por enseñarme, por la inagotable fuente de corrección que tiene y por permitirme la realización de esta Maestría

## AGRADECIMIENTOS

- Gracias al Dr. Saavedra por la infinita exigencia
- Agradezco al Técnico Académico Biólogo Experimental Gonzalo Azariel Acero Galindo por la asesoría brindada en la técnica de *phage display*
- Agradezco al Técnico Académico Dr. José Prisco Palma Nicolás por la asesoría académica
- Agradezco a la Candidata a Dra. Leticia Kuri Cervantes por los experimentos realizados
- Agradezco a la Biól. Mactzil Peto Pineda por los experimentos realizados

## DEDICATORIA

- *A Manuel (A) cuate y otros y a Isabel (A) Chabelia y Pancha, porque creo que aun sin entender por completo, su preocupación y sus desvelos estuvieron siempre presentes en mis preocupaciones y mis desvelos para ayudarme y acompañarme .  
Gracias Pa, gracias Ma*
- *A Edí y Horacio porque los quiero mucho, porque son mis mejores hermanos, porque existen en mi vida y porque en la distancia y aquí, vivimos juntos esta aventura*
- *A Mireya, Tanya, Sabrina, Irma, Sofia ; o lo que es lo mismo: Mire, Rogaciana ó Chimol, Casi, Mima, Infanta porque se han atrevido a pertenecer a la familia*
- *Abraham y Erik: estoy segura que el increíble y hermoso resplandor que veo cada noche en el cielo es por ustedes; y su esfuercito siempre será el más honorable y grande que haya yo visto*
- *A tí Dra. Luz por enseñarme todo lo que sabes que espero haber aprendido muy bien, por darme la oportunidad de realizar estos estudios en un tema que antes de llegar a tu grupo, ni conocía (es fascinante) y por darme tu confianza y amistad invaluable.*
- *Al Ud. Dr. Rafael Saavedra por compartir su amistad conmigo, porque me “caí re bien”, porque no escatima su inteligencia y conocimientos conmigo, y por el terrorismo infringido sobre todo a últimas fechas para que concluyera este trabajo*
- *A Cecilia Amador Bedolla por la tortuosa, interminable, dolorosa ¿y por que no? . . . divertida Danza de los Demonios*
- *A tí Paulina, porque vas por la vida con una danza alegre y elegante y me siento complacida porque compartes tu fortaleza y amistad conmigo*

- *A tí Yuko porque eres mí amiga y he visto cómo luchas por todo lo que quíeres y lo que es mejor, alegremente lo consigues. Prueba de ello es Oberon*
- *A tí Gonzalo que tienes tus circunvoluciones llenas de información e inteligencia y que con una sonrisa, con cariño paternal y fraternal siempre estás ahí para hacerme caso en todo, y que aun cuando reniegues, eres mí amigo*
- *A tí Prisco que compartiste conmigo y aun ahora, todo lo que sabes, por toda la filosofía que generamos cuando nos tomamos todas las chelas, y porque nos atribuimos toda la inadaptación existente*
- *A tí Eda, porque sin pensar y/o sin querer y/o sin sentir, o pensando y/o queriendo, te siento mí muy amiga y por compartir conmigo tus conocimientos y por las incontables asistencias técnicas que me hizo más llevadero este trabajo, así como soportar el trance con los momentotes de terapia*
- *A Erik y Jorjote por ese aire encantadoramente misterioso en la sobriedad y viceversa*
- *Gracias Leticia y Mactzil porque este trabajo es su trabajo*
- *A todos los colegas de del instituto que hacen delicioso el tránsito por los pasillos*
- *A todos, todos, todos los chicos que han trabajado en el laboratorio ... porque en ese desfile, gozamos y lloramos, pero sobre todo cada uno me dejó una enseñanza sui géneris*

Uno es más auténtico, mientras más se acerca  
a lo que siempre ha querido ser

El acto de escribir no es más que el acto de aproximarse  
a la experiencia sobre la que se escribe;  
del mismo modo, se espera que el acto de leer el texto  
escrito  
sea otro acto de aproximación parecido.

*John Berger*



## INDICE

|   |    |
|---|----|
| Resumen   | x  |
| Abstract  | xi |
| I Introducción  |    |
| I.1 Actualidad  | 1  |
| I.2 Infección   | 3  |
| I.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>   | 4  |
| I.4 Vacunación  | 8  |
| I.5 Diagnóstico y control   | 10 |
| II Antecedentes   |    |
| II.1 Diagnóstico inmunoensayo   | 13 |
| II.2 Antígenos  | 14 |
| II.3 Despliegue en fagos  | 16 |
| III. Justificación  | 20 |
| IV Hipótesis  | 21 |
| V Objetivos   | 21 |
| VI Metodología  |    |
| VI. 1    Técnicas bioquímicas y de microbiología                                | 22 |
| VI. 1. 2. Proteína de 38 kDa  | 22 |
| VI. 1. 3. Cultivo de <i>M. tuberculosis</i>                                     | 22 |
| VI. 1. 4. Obtención de polisacáridos de<br><i>M. tuberculosis</i>               | 22 |
| VI. 1. 5. Purificación de arabinomanano   | 23 |
| VI. 1. 6. Cuantificación de sacáridos por el método<br>colorimétrico de Antrona | 24 |
| VI. 1. 7. Purificación del péptido 1  | 24 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| VI. 1. 8. | Biotinilación de P1   | 24 |
| VI. 1. 9. | Propagación de fagos M13  | 25 |
| VI. 2.    | Técnicas inmunológicas  |    |
| VI. 2. 1. | Anticuerpos de conejo contra la<br>proteína de 38 KDa   | 26 |
| VI. 2. 2. | Producción de anticuerpos de conejo<br>contra el polisacárido arabinomanano                                 | 26 |
| VI. 2. 3. | Producción de anticuerpos de<br>conejo contra P1  | 26 |
| VI. 2. 4. | Inmunoensayo para detectar anticuerpos<br>anti proteína de 38 kDa   | 27 |
| VI. 2. 5. | Inmunoensayo para detectar<br>anticuerpos anti AM   | 28 |
| VI. 2. 6. | Inmunoensayo para detectar reactividad<br>de sueros anti p-38 y anti AM con<br>péptidos expresados en fagos | 28 |
| VI. 2. 7. | Inmunoensayo para detectar<br>anticuerpos anti P1   | 29 |
| VI. 2. 8. | Variante de inmunoensayo para<br>detectar anticuerpos anti P1   | 30 |
| VI. 2. 9. | Inmunoensayo para detectar anticuerpos<br>humanos capaces de reconocer al<br>mimótopo P1 biotinilado        | 30 |
| VI.2. 10. | Análisis de mimetismo antigénico e<br>inmunogénico del P1   | 31 |
| VI. 3.    | Técnicas de biología molecular  |    |
| VI. 3. 1. | Bioselección de clones de fagos M13<br>que expresan mimótopos   | 31 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| VI. 3. 2.   | Selección de clonas de fagos M13 mediante cultivos en medio sólido de bacterias infectadas | 33 |
| VI.3. 3.    | Cuantificación de fagos mediante conteo de unidades formadoras de placa                    | 34 |
| VI. 3. 4.   | Purificación de ADN cadena sencilla  | 34 |
| VI. 3. 5.   | Secuenciación de ADN cadena sencilla   | 35 |
| VI. 3. 6.   | Análisis de secuencias   | 35 |
| VII.        | Muestras biológicas  |    |
| VII. 1.     | Material biológico humano  | 36 |
| VIII.       | Resultados   |    |
| VIII. 1     | Obtención de antígenos y anticuerpos   | 37 |
| VIII. 1. 1. | Purificación y producción de anticuerpos anti proteína 38 kDa                              | 37 |
| VIII. 1. 2. | Purificación del antígeno polisacárido AM  | 38 |
| VIII. 1. 3. | Producción de anticuerpos anti AM  | 39 |
| VIII. 2.    | Mimetismo antigénico y secuencias peptídicas de las clonas seleccionadas                   | 40 |
| VIII. 2. 1. | Mimetismo antigénico de clonas seleccionadas con suero anti-P38                            | 41 |
| VIII. 2. 2. | Análisis de la secuencia de aminoácidos en los mimótopos de la P38 identificados.          | 42 |
| VIII. 2. 3. | Mimetismo antigénico de clonas seleccionadas con suero anti-AM                             | 44 |
| VIII. 2. 4. | Secuencias peptídicas de las clonas que mimetizan AM                                       | 45 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| VIII. 3.    | Evaluación de mimótopos como reactivos para el inmunodiagnóstico de Tuberculosis                     | 47 |
| VIII.3.1    | Reactividad de la glicoproteína de 38 kDa y del polisacárido arabinomanano nativo con sueros humanos | 47 |
| VIII. 3. 2. | Reactividad de mimótopos expresados en fagos M13 con sueros humanos.                                 | 49 |
| VIII. 3. 3. | Reactividad de mimótopos peptídicos de AM, libres de fago, con sueros humanos.                       | 57 |
| VIII. 3. 4. | Optimización del uso del péptido sintético P1 como antígeno para inmunodiagnóstico de Tuberculosis   | 61 |
| IX.         | Conclusiones y Discusión   | 64 |
| X.          | Apéndice   | 68 |
| XI.         | Bibliografía   | 73 |

## RESUMEN

Considerada como una emergencia mundial, la tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Se transmite por vía aérea a través de aerosoles generados al toser por una persona enferma. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis es responsable de unas 5,000 muertes diarias a escala mundial, y se encuentra en estado latente en un tercio de la población mundial.

Un factor importante para evitar la diseminación es el diagnóstico rápido y oportuno de la enfermedad. Hasta ahora el diagnóstico de la tuberculosis activa es comúnmente realizado mediante baciloscopia, la cual se basa en la observación al microscopio de un frotis de esputo. Sin embargo, este método es poco eficaz, y otros métodos se encuentran en estudio.

El inmunodiagnóstico resulta atractivo por la sencillez de la metodología. Sin embargo, la obtención de antígenos puros de la bacteria requiere el uso de instalaciones adecuadas y personal altamente calificado para el manejo de grandes cantidades de cultivo del bacilo, y el rendimiento es pobre. Varios estudios han mostrado que la producción recombinante de antígenos proteicos no es actualmente una solución, ya que muchos anticuerpos asociados con individuos enfermos reconocen antígenos modificados post-traduccionalmente o productos genéticos secundarios.

En el presente trabajo se propone la producción de mimótopos (moléculas que sustituyen en función a la molécula nativa) obtenidos por la técnica de *phage display* para ser utilizados como reactivos en una prueba de inmunodiagnóstico para tuberculosis activa. El uso de mimótopos permitiría la aplicación de un sistema diagnóstico a gran escala, minimizando el riesgo y los costos.

## **ABSTRACT**

Considered a global emergency, tuberculosis is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. It is an airborne disease transmitted through infected droplets generated by infected people. According to the World Health Organization, tuberculosis causes about 5,000 deaths by day throughout the world, and is present at a latent stage in about one third of the world population.

An important factor to control tuberculosis transmission is the availability of rapid diagnostic tools. Up to now, active disease is commonly diagnosed by sputum smear microscopy. However, this method has failed to achieve a high diagnostic efficiency, and other strategies are being addressed.

Due to its simplicity, immunodiagnosis is a promising alternative for tuberculosis diagnosis. However, purification of antigens from the bacilli requires specialized facilities and highly trained technicians. Moreover, native antigens are poorly available and require cumbersome purification methods. Many studies have demonstrated that recombinant production of protein antigens is not the answer, since numerous antibodies associated to disease recognize post-translationally modified antigens or secondary genetic products.

Herein we propose the production of mimotopes (molecules able to functionally replace native molecules) identified by phage display technique, as alternative reagents for immunodiagnostics of active tuberculosis. The use of mimotopes would allow a diagnostic system to be applied at large scales, while minimizing risk and costs.

No hay enfermedades incurables, solo hay personas incurables

Dr. Bernie Siegel

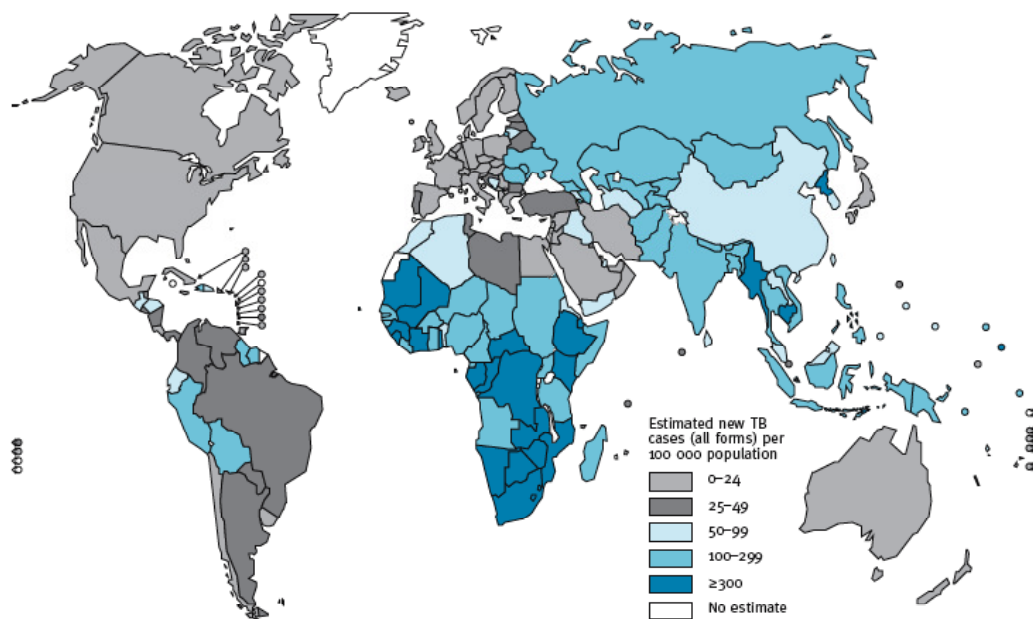
## I INTRODUCCIÓN

### I.1. Actualidad

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa y crónica causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) que afecta a seres humanos de cualquier edad. En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS), la declaró como una emergencia mundial. En el reporte del año 2009 se estimó que una tercera parte de la población mundial estaba infectada, murieron 1.7 millones de personas y se registraron 8 millones de nuevos casos en el mismo periodo (1,2). En la figura 1 se muestra la incidencia mundial de de la tuberculosis. En cuanto a México, la Secretaría de Salud en su Boletín de Epidemiología informó: 15 386 casos en 2007 y 14 986 casos en 2008. Estos datos se encuentran en los reportes de: Enfermedades Contagiosas del Aparato Respiratorio, y se considera en la estadística específicamente para tuberculosis pulmonar. ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)).

*M. tuberculosis* es transmitido por vía aérea en gotas de aerosol que expelen las personas enfermas, y se caracteriza por ser un patógeno intracelular capaz de sobrevivir en los macrófagos. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar son: cansancio, febrículas nocturnas, pérdida de peso y, cuando la enfermedad está muy avanzada, tos constante, en ocasiones con sangrado (hemoptisis). La tuberculosis es una enfermedad que generalmente se desarrolla en los pulmones; sin embargo, también puede afectar cualquier órgano o tejido: hueso, hígado, en meninges, etc. y en ocasiones puede establecerse de manera diseminada que es la tuberculosis miliar. El mecanismo de la infección extrapulmonar no es claro, así como tampoco es claro su diagnóstico debido a que los signos y síntomas que se presentan no son tan claros como en la tuberculosis

pulmonar, esta deficiencia en la detección lleva a datos como que del 33 al 80% de estos diagnósticos de tuberculosis extrapulmonar fueron hechos *post mortem* (3, 4)



**Fig 1.** Incidencia mundial de la tuberculosis, reporte 2010 de la OMS

Los factores que contribuyen a la persistencia de esta enfermedad son: **a)** el hacinamiento y la desnutrición en los países subdesarrollados, **b)** susceptibilidad genética, **c)** la resistencia a los antibióticos que dio como resultado el resurgimiento de la enfermedad; este rubro es multifactorial ya que puede deberse a problemas por parte del sector salud del país que no tiene disponible el medicamento, o bien que el paciente no termina



apropiadamente el tratamiento prolongado (en promedio de seis meses) (5,6,7). Este problema de resistencia a fármacos ha ido en aumento, de forma que ahora existen cepas resistentes a mezclas de antibióticos, inclusive existen cepas denominadas extremadamente resistentes (8) y finalmente **d)** con la aparición del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) se ha incrementado el número de personas infectadas con tuberculosis. Para las personas inmunocomprometidas el tratamiento farmacológico se dificulta por los efectos secundarios, por lo que estos enfermos tampoco terminan el tratamiento y se vuelven susceptibles al ataque de *Mycobacterium sp.* Como el virus de la inmunodeficiencia ataca a los linfocitos CD4+ la disminución de éstos promueve la infección *de novo*, o la reactivación de la tuberculosis (4, 9, 10).

## **I. 2. Infección**

*M. tuberculosis* se transmite por vía aérea cuando la persona con tuberculosis pulmonar activa habla, tose o estornuda generando aerosoles que contienen bacilos, los cuales llegan al tracto respiratorio de un individuo sano donde serán fagocitados por los macrófagos alveolares encargados de eliminarlos (11,12, 13). Sin embargo, puede ocurrir que el bacilo sobreviva y se multiplique dentro del macrófago, situación que logra principalmente al evitar la fusión fagolisosomal. Con la multiplicación de los bacilos, se provoca la muerte del macrófago, iniciando así una respuesta inflamatoria. Esto desencadenará el reclutamiento de una gran variedad de células como polimorfonucleares, neutrófilos, etc. que darán paso a la formación del granuloma, una lesión que generalmente es capaz de contener la propagación bacilar.

La presencia de los granulomas dictará el curso de la enfermedad ya que los bacilos pueden quedar confinados en latencia por tiempo indefinido desde semanas hasta años; sin embargo, en caso de

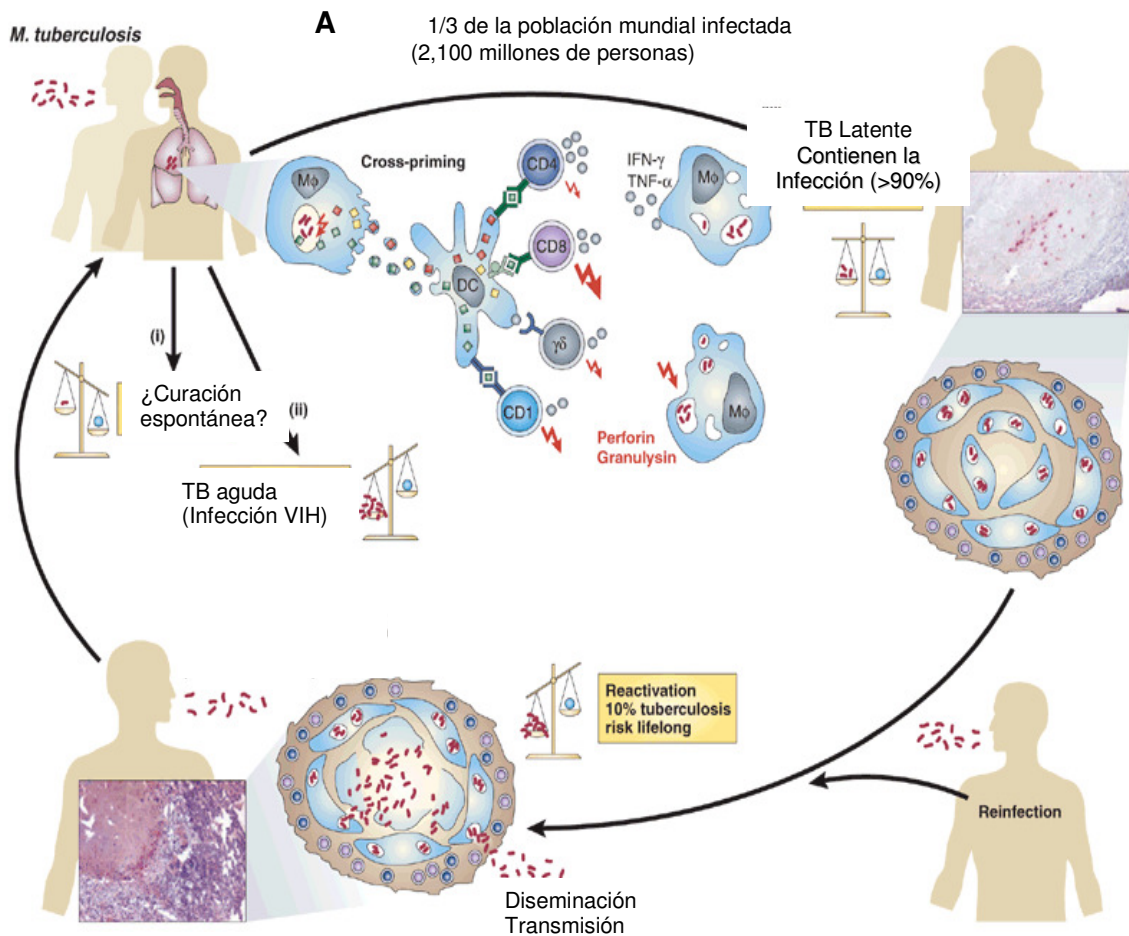
inmunosupresión, la lesión puede reactivarse y entonces desarrollar tuberculosis activa, ya sea en un tiempo corto después de la infección, o a partir de la reactivación de una lesión anteriormente controlada (tuberculosis de reactivación). Entre el 5 - 10% de la gente infectada desarrolla tuberculosis activa en algún momento de su vida, aunque la mayoría lo hace dentro de los 5 años a la primoinfección (14). La Figura 2 muestra la secuencia de la respuesta inmune después de que el bacilo es inhalado.

### **I. 3. *Mycobacterium tuberculosis***

El género *Mycobacterium* está constituido por organismos microscópicos en forma de bacilos que son resistentes a la decoloración con alcohol ácido (esta propiedad es utilizada para el método de diagnóstico por baciloscopía). El género abarca aproximadamente 100 especies, la mayoría de ellas son saprofitas aunque algunas causan daño a animales y al hombre (16).

Las especies patógenas usualmente son de lento crecimiento, tomando de 20 a 24 horas para su duplicación, y la velocidad de crecimiento es comúnmente usada como un parámetro de clasificación. *M. tuberculosis* y *M. bovis* (causantes de la tuberculosis en humanos y en bovinos, respectivamente) tienen la facultad de sobrevivir en los macrófagos. Esta capacidad se considera que en parte es debida a la complejidad de la pared celular (Fig.3), principalmente constituida por ácidos micólicos, los cuales se caracterizan en el género *Mycobacterium* como los ácidos grasos más largos que existen en la naturaleza (ácidos grasos de 70-90 carbonos). Otros componentes abundantes son: arabinogalactano, peptidoglicano, lípidos libres, azúcares y proteínas. En conjunto, los componentes de la pared generan un gran espesor y alta

hidrofobicidad, característica considerada como una posible barrera contra los fármacos y el sistema inmune (17,18).

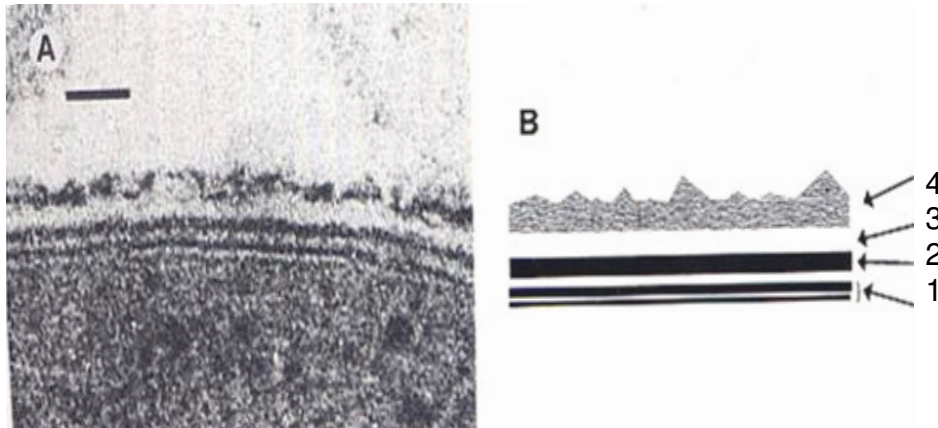


**Figura 2.** Respuesta inmune a la infección con *M. tuberculosis*. **a)** Transmisión vía aérea de los bacilos llegando a los macrófagos alveolares que serán los encargados de eliminar al bacilo, sin dejar rastro de la infección. **b)** Si las micobacterias logran sobrevivir a los macrófagos, entonces las células T (CD4+, CD8+) monocitos y macrófagos formarán un granuloma, el sistema inmune puede así controlar la enfermedad, pero el bacilo se encuentra latente. **c)** Si el individuo se encuentra inmunocomprometido, el granuloma no será suficiente para contener al bacilo y se desarrollará tuberculosis pulmonar activa (15).

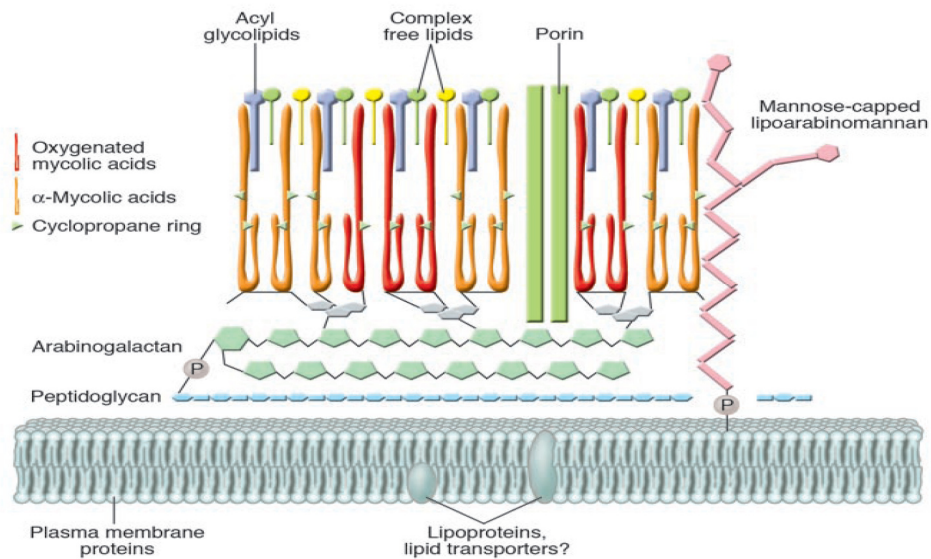
La complejidad de esta pared que llega a ser hasta el 40% del peso seco del bacilo, está correlacionada con el particular genoma de *M. tuberculosis*, el cual dedica un 30% de la información al metabolismo de los lípidos (19).

Hasta ahora la estructura de esta pared celular no se conoce totalmente; sin embargo, es claro que sus componentes juegan un papel clave en la patogenia de la enfermedad, ya que son los que están en contacto estrecho con las células del sistema inmune humano. Esta interacción entre los componentes de la pared celular y el hospedero ha sido también explotada para el diseño de herramientas para el control de la tuberculosis (17,24) ya que estos componentes representan agentes inductores de la respuesta inmune. Así, detectar respuesta inmune, incluyendo la producción de anticuerpos, ha sido una de las opciones más buscadas para el diagnóstico de casos de tuberculosis activa. En la Fig. 4 se muestra un modelo de la envoltura micobacteriana.

Algunas moléculas de la envoltura micobacteriana han sido consideradas como factores clave, tanto para la patogenia del bacilo, como por su alto valor como biomarcadores de la enfermedad. En particular, resulta interesante que entre los factores más abundantes y activos de la pared de micobacterias destaquen aquéllos con una importante composición de azúcares en su estructura (20).



**Figura 3.** Envoltura de la micobacteria. A) micrografía electrónica y (B) diagrama que ilustra las cuatro capas de las que está formada la pared, a saber: 1 membrana plasmática, 2 peptidoglicano - arabinogalactano, 3 capa transparente a electrones donde abundan los ácidos micólicos y 4 glicoconjugados, glicolípidos y proteínas unidos de manera no covalente al esqueleto de peptidoglicano (21).



**Figura 4.** Representación de la envoltura de las micobacterias. En este modelo estructural, las moléculas de la envoltura se encuentran en un arreglo acorde con los datos arrojados a partir de diversos estudios, tales como la microscopía electrónica de la figura 3. Imagen adaptada de (22).

Inmersas en esta pared se encuentran el glicoconjugado denominado lipoarabinomannano (LAM) que es muy abundante, y uno de los más importantes en la interacción micobacteria-célula huésped (16,17).

La estructura fina de la molécula consiste en un esqueleto de azúcares con ligeras variaciones en la parte superficial. Esta parte, llamada "cap", está constituida básicamente por manosa y representa una de las características distintivas de los aislados de cepas virulentas. Entre sus funciones biológicas, destaca la de inhibir la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\gamma$ ), citocina importante para combatir al bacilo (23). El LAM facilita la internalización del bacilo por medio de receptores como el receptor de manosa y DC-SIGN (24). Otra de sus actividades es su capacidad antiinflamatoria, que puede explicar el bajo nivel de IL-12 producida en la infección por *M. tuberculosis* (18).

La otra molécula de la pared celular con un importante contenido en azúcares y potencialmente implicada en virulencia, es la proteína de 38 kDa, una glicoproteína cuya estructura está conformada por azúcares en un 25%, y también identificada como lipoproteína (25,26). En particular, esta glicoproteína está involucrada en el metabolismo de fosfato (27,28).

Ambas moléculas constituyen antígenos ampliamente reconocidos por individuos infectados, lo cual ha generado interés en su uso como reactivos de inmunodiagnóstico.

#### **I.4. Vacunación**

Uno de los factores que ha impedido un mejor control de la tuberculosis es la baja eficacia de las vacunas disponibles, situación que se explica desde condiciones climáticas, el correcto almacenamiento de los viales, exposición a la luz solar o bien reacciones cruzadas con otras micobacterias. La vacuna en uso fue desarrollada a principios del siglo XX por los científicos franceses Albert Calmette y Camile Guérin a partir de la cepa atenuada de *M. bovis*, bacteria causal de la tuberculosis en el ganado. A la cepa resultante atenuada se le denomina bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Se trata de una vacuna de eficacia

extremadamente variable. Su efectividad ha sido reportada de 0 a 80% (15, 29), y únicamente se ha demostrado su capacidad de proteger contra la tuberculosis meníngea infantil. Una de las razones de la baja eficacia es, probablemente, su contenido en moléculas supresoras de la respuesta inmune, como el LAM. El desarrollo de una nueva vacuna es urgente, así como un mejor conocimiento de los factores de patogenia resulta indispensable para el planteamiento de la mejor estrategia para combatir esta enfermedad (30).

Los aspectos socioeconómicos tienen un gran peso en la efectividad de la vacuna ya que se ha visto que hacia el Ecuador, que es prácticamente donde se encuentran la mayoría de los países en vías de desarrollo, la vacuna pierde eficacia, circunstancia que se atribuye a la coinfección de parásitos y la respuesta inmune a la vacuna se ve modificada (31).

A propósito de la pérdida de la eficacia de la vacuna se piensa que es debido a que la memoria inmunológica generada por BCG desaparece con el tiempo dejando al individuo en estado *naïve* para inducir una inmunidad primaria, es por ello que en Estados Unidos se está proponiendo un refuerzo de la vacuna, ya que la incidencia de tuberculosis de reactivación en adultos, va en aumento y se piensa que la primoinfección fue años atrás (32).

También es importante mencionar que a investigación sobre vacunas ha dado la posibilidad de que millones de personas alrededor del mundo se salven sin embargo, para incrementar la eficacia en las nuevas generaciones de vacunas, incluida la de tuberculosis, es necesario desarrollar adyuvantes que favorezcan la respuesta inmune mediada por células (33).

## **I. 5. Diagnóstico y control**

Como se mencionó, la infección puede estar contenida en un granuloma en estado latente. El diagnóstico de esta infección latente se basa en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, la cual involucra células T de memoria del individuo contra el bacilo. La prueba, llamada prueba de la tuberculina, consiste en medir dicha reacción ante la administración intradérmica de un extracto de proteínas purificadas de *M. tuberculosis* (PPD, del inglés Protein Purified Derivative). Esta administración genera una reacción inflamatoria retardada activada por linfocitos T CD4+ y CD8+. Desafortunadamente, esta prueba presenta reactividad cruzada con antígenos de otras micobacterias incluida la cepa de la cual se obtiene la vacuna que es la de Calmette-Guerin. Si bien ahora se cuenta con un reactivo comercial "Quantiferon" (que se basa en determinar la concentración de IFN- $\gamma$  liberado por linfocitos extraídos de sangre periférica estimulados con antígenos específicos de *M. tuberculosis*) para determinar tuberculosis latente, al alto costo y la necesidad de infraestructura especial, dificulta la aplicación a poblaciones en riesgo para detectar la tuberculosis latente (34).

Otras técnicas para la detección de tuberculosis latente incluyen la detección de respuesta celular a partir de cultivos primarios tratados con antígenos del bacilo. Estas pruebas, principalmente representadas por el Quantiferon y el Elispot-TB, son altamente sensibles pero muy costosas (35,36,37)

Aunque el diagnóstico de tuberculosis latente resulta importante, el estado actual de la epidemia de tuberculosis necesita con mayor urgencia un diagnóstico eficaz para la tuberculosis activa. Actualmente, el método de uso común consiste en la tinción del bacilo con fucsina fenólica en muestras de esputo. Esta técnica, llamada tinción de Ziehl-Neelsen, permite un resultado rápido. Sin embargo, se estima que solamente un



individuo que expela de 5000 a 10000 bacilos/ml puede ser detectado mediante esta prueba (36). Se ha reportado que de 30 a 70% de individuos con tuberculosis activa pueden ser diagnosticados mediante este método. Dentro del desarrollo de la técnica, la aparición de falsos positivos demanda la presencia del paciente por lo menos durante 3 días consecutivos, dificultando su implementación en comunidades rurales. Por otro lado, esta técnica se dificulta cuando la persona enferma no puede expectorar (generalmente los niños) para lo cual se recomienda un lavado bronco alveolar (38).

En general cuando clínicamente el diagnóstico de tuberculosis es altamente probable y la tinción de Ziehl-Neelsen ha generado resultado negativo, la alternativa es utilizar el cultivo de las bacterias, que se realiza a partir de muestras de expectoración. Cabe destacar que el cultivo es un método extremadamente lento, de 6-12 semanas de incubación son necesarias para poner en evidencia el crecimiento, además de resultar sumamente costoso por el personal e instalaciones que se requieren (36).

El diagnóstico de la tuberculosis activa es una herramienta necesaria para limitar el contagio de la enfermedad. Por ello, varios métodos de diagnóstico han sido explorados. Principalmente, el diagnóstico de la tuberculosis puede auxiliarse de los siguientes métodos:

- Observación al microscopio: en medio de cultivo líquido el crecimiento de los bacilos se da en agregados que parecen cordones, a lo que se le denomina "factor cuerda" o "factor cordón" formado principalmente por la molécula dimicolato de trealosa. Empieza a formarse como a los 7 días de cultivo.
- Radiografía de tórax: este método es costoso y en ocasiones inespecífico porque pueden confundirse varias lesiones.

- Sistema de cultivo rápido: basados en reactivos secundarios cromogénicos, este método consiste en un medio de crecimiento que cambiará de color con el crecimiento de *M. tuberculosis* aún cuando no hayan aparecido las colonias.
- Sistema radiométrico: se utiliza una sustancia con C<sup>14</sup> como sustrato, y se detectan desechos metabólicos radiactivos en forma de gas entre 10-15 días a partir del cultivo.
- PCR (reacción en cadena de la polimerasa), requiere poca muestra y es rápida. Sin embargo, requiere de personal, equipo e instalaciones específicos.
- Inmunodiagnóstico: detección de anticuerpos circulantes.

Todas estas técnicas pueden ser utilizadas si se trata de tuberculosis pulmonar o diseminada (cuando se tiene el estudio clínico), entonces la fuente de la muestra para hacer el diagnóstico puede ser de: orina, muestra de sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.(38,39,40,41).

La elección de un método de diagnóstico depende en gran parte de las características de la enfermedad. En el caso de la tuberculosis, la prevalencia y aumento en ambientes socioeconómicos bajos y en pacientes infectados con VIH, ha impedido el control a través de métodos de alto costo o extremadamente sofisticados. Se carece de una prueba definitiva, rápida, barata y aplicable a poblaciones abiertas. Debido a la alta tasa de contagio de la tuberculosis, la detección temprana y oportuna es indispensable para la administración del tratamiento terapéutico conveniente, para controlar esta epidemia.

Una de las metodologías capaz de brindar resultados rápidos, de manera simple y a costos aceptables es el inmunodiagnóstico.

## II ANTECEDENTES

### II.1. Diagnóstico por inmunoensayo

El inmunodiagnóstico es un método que detecta la respuesta humoral en contra del patógeno y con ello se diagnostica la enfermedad. La mayoría de los pacientes producen anticuerpos para varios componentes antigénicos del bacilo durante el curso de la enfermedad, circunstancia que es aprovechada para el inmunodiagnóstico.

En el caso de la tuberculosis, varios antígenos de *M. tuberculosis* se han utilizado para este tipo de ensayo como se muestra en la siguiente tabla.

**TABLA 1.** Antígenos de *M. tuberculosis* que se han utilizado en ELISA,

| <b>Antígeno</b>    | <b>Características</b>           | <b>%sensibilidad</b> | <b>% especificidad</b> | <b>Ref.</b> |
|--------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| Ag 60              | Lipo-glico-péptido (incluye LAM) | 71-100               | 71-95                  | 35          |
| Kp90               | Proteína de secreción            | 63                   | 66                     | 36          |
| Ag 85              | Proteína de secreción            | 62-78                | 78-90                  | 42          |
| Proteína de 38 kDa | Proteína de secreción            | 49-89                | 93-100                 | 43          |
| Factor cuerda      | Glicolípido de pared             | 81                   | 96                     | 44          |

La proteína de 38 kDa (P38) es una molécula prometedora para el inmunodiagnóstico por su capacidad reactiva con los sueros de personas enfermas con tuberculosis (44). No obstante, como es el caso con otros antígenos micobacterianos, la sensibilidad del método es muy variable, pues se han reportado sensibilidades del 40 al 90%. Algunos estudios

señalan que una baja sensibilidad estaría relacionada con tuberculosis incipiente (45,46). Uno de los factores que dificultan en gran medida la reproducibilidad de estos resultados ha sido la participación de los motivos glicosilados de la P38 como epítomos abundantemente reconocidos por anticuerpos de humanos (45,46). En efecto, las eficacias más pobres han sido encontradas con la proteína recombinante obtenida en sistemas incapaces de glicosilar, tales como *Escherichia coli*. Actualmente, algunas investigaciones se encaminan a la búsqueda de sistemas de expresión para la P38 que sean capaces de glicosilar (25,44,47).

Otra molécula de interés para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis es también una molécula con un elevado grado de glicosilación, el lipoarabinomanano (LAM), o bien su forma exclusivamente glicosídica llamada: arabinomanano (AM). El uso de LAM para serodiagnóstico de tuberculosis ha sido promovido por varios autores, y forma parte de algunos sistemas de inmunodiagnóstico comerciales. Por su naturaleza química se esperaría una respuesta más homogénea comparada con los antígenos presentados por moléculas MHC. Sin embargo, su obtención natural implica la utilización de personal e instalaciones de alta calidad y por ser un compuesto glicosídico con variaciones estructurales específicas de especie, la obtención recombinante es imposible.

## **II.2. Antígenos**

Los antígenos de la prueba de la tuberculina derivados de la micobacteria han sido probablemente los más estudiados y usados en investigación. Éstos pueden ser especie específicos, y otros están ampliamente distribuidos en diferentes especies lo que contribuye a la reacción cruzada que se observa en la prueba de la tuberculina. En cuanto a los antígenos sacarídicos, se han logrado extraer los que se

agrupan en 4 diferentes tipos principales: arabinogalactanos, arabinomannanos, mananos y glucanos, de los cuales los arabinogalactanos y los arabinomannanos tienen actividad antigénica (48). También en varios laboratorios se han estudiado las proteínas que se encuentran en el filtrado de cultivo y se ha visto que son altamente inmunogénicas, y pudieran ser promesa para vacunas (32).

De estos estudios que se han realizado con los compuestos *M. tuberculosis*, se ha podido generalizar que las fracciones de pared celular son más ricas en compuestos lipídicos, y las preparaciones solubles son abundantes en proteínas y carbohidratos. A este respecto quedó establecida la importancia de los carbohidratos cuando se expuso suero de ratón anti-*M. tuberculosis* a extractos crudos, y a los extractos tratados con peryodato de sodio, y se observó por el método de ELISA, que el suero reacciona mucho mejor en los extractos intactos, esto es, en presencia de los compuestos glicosilados (31,48)

La molécula AM, componente de la pared de la micobacteria, es importante en el control de la enfermedad debido a que la inyección del anticuerpo monoclonal, prolongó la supervivencia de ratones infectados con tuberculosis. (49), de la misma manera que se ha visto que los anticuerpos anti-LAM (cuyo posible precursor es AM), resultan benéficos para combatir la infección. Así mismo el antígeno 5 que es muy importante por su especificidad para *M. tuberculosis* y *bovis* BCG, tiene un epítipo compartido con arabinomannano (51).

Ya que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular, su éxito radica en las moléculas de superficie expuestas para introducirse al macrófago y después su multiplicación. Una molécula muy importante en el bacilo y que tiene este doble papel, es el LAM ya que se adhiere al receptor de manosa para ser fagocitada, y dentro inhibe la secreción de TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$

para promover la destrucción intracelular. El LAM de especies no patógenas no tiene esta inhibición sobre las citocinas (73).

## **II. 2. Despliegue en fagos**

Desde hace unas 2 décadas, la posibilidad de emular la reactividad biológica de biomoléculas mediante péptidos pequeños se lleva a cabo con la tecnología de "Phage Display". Estos péptidos, llamados mimótopos, pueden ser obtenidos de manera simple y eficaz a través de su expresión recombinante en la superficie de fagos filamentosos. Por definición un mimótopo es un péptido que imita (mimetiza) estructural y/o funcionalmente un sitio biológicamente activo de la molécula nativa y por lo tanto, es capaz de interactuar con su ligando. Tienen la capacidad de ser reconocidos por anticuerpos y sustituir proteínas y azúcares y de esta forma inducir la formación de anticuerpos y ser usados como subunidades de vacunación, o bien para bloquear de manera dirigida a receptores (58). Sobre todo el hecho de que muchos de los antígenos microbianos son antígenos no proteicos (52).

La metodología más común que se utiliza para obtener mimótopos es el llamado "Phage Display". En la actualidad existen bibliotecas de despliegue en fagos que se encuentran disponibles de manera comercial. Así, una biblioteca consiste en combinaciones de hasta  $10^{13}$  péptidos con diferentes secuencias, a partir de las cuales sería posible encontrar un péptido que sea reconocido por anticuerpos anti-azúcares. A estos péptidos se les llama mimótopos, y pueden ser utilizados como herramientas de diagnóstico o como subunidades de vacunación (56,57).

Para obtener mimótopos utilizamos la técnica de bioselección a partir de *phage display*. Este término se refiere a péptidos que son expresados, mediante técnicas recombinantes, en el bacteriófago M13. Es decir, el fago es utilizado como vector para expresar secuencias que

codifican para oligopéptidos de secuencia variable. Actualmente, varias bibliotecas de bacteriófagos que expresan péptidos se encuentran disponibles en el mercado. En particular, nuestro trabajo fue realizado utilizando una biblioteca con millones de clonas, en donde cada una expresa un dodecapéptido con secuencia de aminoácidos al azar.

En la Figura 5 se muestra la estructura de un bacteriófago M13, el cual expresa el dodecapéptido como inserto en un sitio específico de su proteína de envoltura PIII.

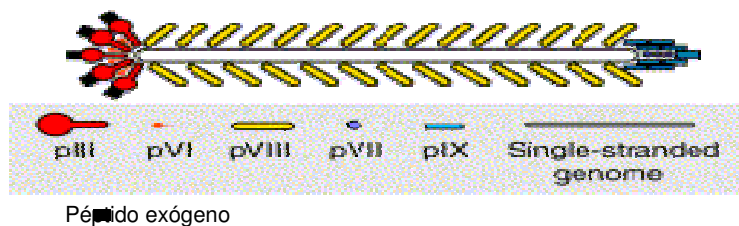


Figura 5. Esquema estructural del fago M13 recombinante. El fago está formado por varias proteínas. Entre ellas, tres a cinco copias de la proteína PIII se ensamblan en uno de los extremos. En la biblioteca comercial utilizada, las combinaciones de péptidos con secuencias de aminoácidos al azar se encuentran insertadas en dicha proteína.

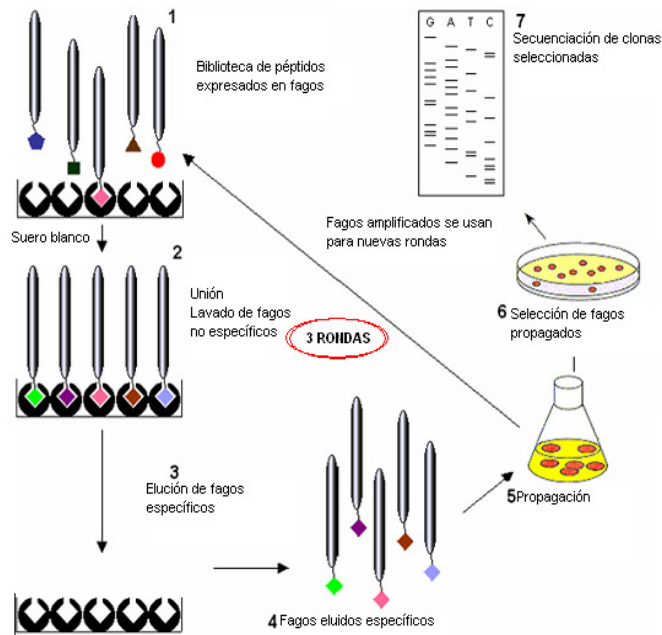
El hecho de que una biblioteca combinatorial de péptidos sea expresada en un bacteriófago brinda varias ventajas. Entre ellas destacan la facilidad para producir los péptidos de una manera simple y de bajo costo, mediante simple propagación del fago, así como la estabilidad de la partícula viral, la cual facilita el rastreo de los péptidos. La técnica de bioselección consiste en discriminar y separar fagos con insertos que

mimetizan al antígeno nativo, esto es, fagos que por afinidad se unen a anticuerpos.

La estrategia de bioselección comprende varias rondas de contacto con los anticuerpos, en donde fagos con péptidos no afines son excluidos, mientras que los fagos unidos a anticuerpos son selectivamente recuperados al final de cada ronda al eluirlos por cambio de pH (Figura 6). En general, la selección requiere del desarrollo de unas 3 rondas sucesivas antes de obtener clonas que expresen péptidos altamente afines. Al final del proceso se obtiene una mezcla con un gran número de fagos que expresan insertos diferentes. Los fagos serán crecidos en unidades formadoras de placa (clona), y cada una de las clonas se crecerá por separado para posteriormente utilizarse en el protocolo correspondiente.

El esquema de esta técnica, que ya se ha implementado en el laboratorio, se muestra a continuación.





**Figura 6** Bioselección de clonas que expresan mimótopos de un antígeno. 1) Una biblioteca de fagos que expresa diferentes secuencias de péptidos es expuesta a una placa cubierta con el blanco. 2) El fago que no se une es eliminado mediante lavados. 3) Los fagos que se unen específicamente son eluidos al disminuir el pH. 4) Se conservan solo los fagos eluidos específicos. 5) Los fagos eluidos son propagados en células de *E. coli*. 6) Los fagos propagados son seleccionados. 7) Después de tres rondas de bioselección, la secuencias de las clonas seleccionadas al azar, son analizadas.

Hay dos errores que uno puede cometer a lo largo del camino a la verdad:  
no llegar hasta el final y no comenzar

Buda

### III. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad altamente contagiosa, cuya epidemia es responsable de cerca de 5000 muertes diarias. La base para el tratamiento temprano de la tuberculosis, y el subsecuente control de diseminación, ha sido el diagnóstico oportuno. Aunque algunos antígenos micobacterianos prometedores han sido descritos para fines de inmunodiagnóstico, la dificultad para obtenerlos ha limitado la expansión de este tipo de prueba como un método de diagnóstico.

Si bien la tecnología recombinante ha hecho posible la obtención de una gran cantidad de antígenos de inmunodiagnóstico, en el caso de la tuberculosis se reporta que un alto porcentaje de anticuerpos en los humanos están dirigidos en contra de epítomos no proteicos. Por lo tanto es indispensable obtener la metodología para aplicarla en las pruebas diagnósticas.

En este trabajo se propone el uso del *Phage Display*, con el fin de identificar reactivos que sustituyan antígenos nativos, en particular antígenos no proteicos. Se ha demostrado que pequeños péptidos de 7 a 15 aminoácidos pueden mimetizar la estructura tridimensional de lípidos, carbohidratos y por supuesto proteínas. La metodología de *Phage Display* resulta no solamente una opción para identificar ligandos de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos dirigidos en contra de azúcares. Asimismo, el despliegue en fagos de un péptido definido resulta un proceso simple y de bajo costo, ya que una clona específica de fago expresando un péptido o mimótopo determinado, puede ser fácilmente producida

Un optimista puede ver una luz donde no hay ninguna, pero  
¿por que el pesimista siempre intenta correr a apagarla?  
Michael De Saint-Pierre

## IV. HIPÓTESIS

Motivos peptídicos y glicosilados de los antígenos de la proteína de 38 kDa y del arabinomanano (AM) de *Mycobacterium tuberculosis* pueden ser mimetizados por péptidos expresados en fagos filamentosos. Estos mimótopos pueden ser identificados por *phage display*, y podrían ser utilizados como reactivos de diagnóstico.

## V. OBJETIVOS

### General

Estandarizar una prueba de inmunodiagnóstico para tuberculosis por medio de la técnica de *phage display*, utilizando como antígenos modelo la proteína de 38 kDa y el glicoconjugado arabinomanano de *M. tuberculosis*.

### Particulares

- Purificar los antígenos de *M. tuberculosis*: AM y la proteína de 38 kDa.
- Producir anticuerpos contra AM.
- Identificar péptidos que mimetizan azúcares reconocidos por anticuerpos (mimótopos).
- Explorar y optimizar el uso de péptidos mimótopos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI. 1. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y DE MICROBIOLOGÍA**

#### **VI. 1. 1. Proteína de 38 KDa**

La proteína de 38 kDa recombinante que se utilizó en el presente trabajo fue expresada en *Mycobacterium smegmatis*, la cual fue generosamente donada por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

#### **VI. 1. 2. Cultivo de *M. tuberculosis***

Las micobacterias de la cepa H37Rv se crecieron en medio líquido Sauton (apéndice I) a 37°C durante 5-6 semanas.

#### **VI. 1. 3. Obtención de polisacáridos de *M. tuberculosis***

Los polisacáridos fueron obtenidos a partir de productos de secreción de cultivos en fase exponencial de *M. tuberculosis*. A partir de cultivos de 5-6 semanas de edad, se obtuvo medio de cultivo estéril. Para ello, el medio se filtró por un papel filtro grueso a fin de eliminar la masa bacteriana; posteriormente, el medio se filtró sucesivamente por membranas con tamaño de poro de 1.2, 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore nitrocelulosa tipo RA). El filtrado obtenido de esta manera se concentró por evaporación en rotavapor (Büchi), aproximadamente a 1/10 del volumen original. El medio concentrado fue tratado por partición de Folch (62), a fin de eliminar lípidos y sacáridos de menor solubilidad en agua. En breve, 3 volúmenes del concentrado fueron mezclados, dentro de un embudo de separación, con 3 volúmenes de cloroformo y 4 volúmenes de metanol, obteniendo una mezcla  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (3:4:3, v/v). La mezcla se dejó

en reposo a 4°C hasta separación de las fases (la fase orgánica, la fase inorgánica y una interfase con material blanquecino). La fase acuosa, que contiene los polisacáridos neutros, fue tratada con 6 volúmenes de etanol frío, dejando en agitación durante una noche a 4°C. El precipitado formado fue recuperado después de una centrifugación a 14000 g por 1 hr a 4°C. La muestra se resuspendió en el menor volumen de agua posible y se precipitó nuevamente, utilizando las mismas condiciones. Finalmente, la muestra se dializó contra agua destilada, a 4°C, utilizando una membrana de celulosa con un corte de peso molecular de 500 Da (Cellulose Ester - CE- Diálisis Membranas MWCO:500 Spectrum), con cambio del medio cada 12 hs. La fracción no dializable, que contiene polisacáridos, se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **VI. 1. 4. Purificación de arabinomanano (AM)**

El AM, polisacárido preponderante y neutro, fue obtenido mediante cromatografía de intercambio aniónico, capaz de retener componentes ácidos, tales como lipoarabinomanano y proteínas. Una columna de vidrio de 2 cm de diámetro por aprox. 50 cm de largo fue empacada con una suspensión de Trisacryl-DEAE (Sigma), y equilibrada con 150 ml de la solución amortiguadora disociante (apéndice I). Enseguida, los polisacáridos fueron aplicados en 2 ml de solución eluyente (apéndice I). La fracción neutra, que contiene el AM, fue obtenida eluyendo con 300 ml de dicha solución. Se colectaron 30-35 fracciones de 8 ml c/u, tomando 0.5 ml para detección colorimétrica de azúcares. Las fracciones positivas para azúcares fueron reunidas y liofilizadas, utilizando las mismas condiciones de diálisis que para la obtención de polisacáridos totales. El producto final fue titulado y conservado a -20°C hasta su uso.

### **VI. 1. 5. Cuantificación de polisacáridos por el método colorimétrico de antrona**

Para la cuantificación de azúcares se utilizó un método colorimétrico basado en la formación de derivados furfural de hexosas. Para ello, se preparó una solución de antrona (Sigma) al 0.2% en ácido sulfúrico puro, que fue utilizada entre 4 y 12 horas después de su preparación.

La muestra fue diluida con el reactivo de antrona en una proporción de 1:2 (muestra:antrona, v/v). La reacción se llevó a cabo a 92°C durante 8 minutos, y detenida por inmersión de los tubos en hielo; las muestras se mantuvieron al abrigo de la luz durante 30 min, y la densidad óptica fue medida a 585 nm. Una curva estándar fue preparada de manera simultánea, empleando arabinosa y manosa en proporción 1:1 (v/v).

### **VI. 1. 6. Purificación del péptido P1**

Después de seleccionar los mimótopos por la técnica de *phage display*, los péptidos insertados se secuenciaron y alinearon para ver homologías y/o secuencias consenso. Este péptido 1 corresponde a una secuencia consenso de los mimótopos de AM, que además funcionó como un reactivo antigénico e inmunogénico como se verá más adelante. Es pertinente mencionarlo en este apartado en el que se enlistan las herramientas utilizadas en este trabajo.

El péptido sintético P1 (QEPLMGTVPIRAGGGS), fue adquirido libre de sales de los laboratorios Invitrogen (CA, USA), y purificado por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC), según protocolos del fabricante.

### **VI. 1. 7. Biotinilación de P1**

El péptido P1 se diluyó a 1.0 mg/ml en PBS y fue funcionalizado por reacción con biotina esterificada con *N*-hidroxi-succinimida (NHS),

siguiendo el protocolo del proveedor (Biotin Labeling Kit Roche Indianápolis, IN, USA). La fracción biotinilada fue purificada por cromatografía. Los eluatos fueron analizados por espectrofotometría, a 230 nm, y las muestras proteicas fueron reunidas y dializadas.

#### **VI. 1. 8. Propagación de fagos M13**

Las células de *E. coli* cepa TG1 fueron cultivadas a 37°C, bajo agitación, en 10 ml de medio líquido 2xYT hasta alcanzar 0.4 - 0.5 de densidad óptica a 600 nm. Para propagar los fagos, se colocaron 500 µl de cultivo bacteriano en 50 ml de medio líquido 2-YT, y se agregaron 15 µl de fagos. Para facilitar la infección, el cultivo fue incubado durante 15 min a 37°C sin agitación, y posteriormente, en agitación a 220 rpm durante unas 4.5 hrs a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron durante 10 min a 10 000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 1/6 de volumen de polietilenglicol (PEG, ver apéndice), y se incubó a 4°C durante una noche a fin de precipitar los fagos. La suspensión se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de fagos se resuspendió en 1 ml de TBS. Con el fin de eliminar bacterias contaminantes, los microtubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min varias veces, eliminando cada vez el precipitado. El sobrenadante fue nuevamente tratado con 1/6 de volumen de PEG, y se incubó a 4°C por 1 hr. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó por 10 min a 14 000 rpm, a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla en 200 µl de TBS. Este procedimiento fue realizado a fin de propagar los fagos seleccionados por afinidad (eluídos), así como las clonas aisladas.

## **VI. 2. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS**

### **VI. 2. 1. Anticuerpos de conejo contra la proteína de 38 kDa recombinante.**

El suero preinmune e hiperinmune de conejo anti proteína de 38 kDa glicosilada, producida en *Mycobacterium sp*, fueron donados por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

### **VI. 2. 2. Producción de anticuerpos de conejo contra el polisacárido arabinomano (AM)**

Conejos Nueva Zelanda hembras de 0.5-1.0 kg fueron inmunizados por vía subcutánea con 1.0 mg de AM en un volumen de 1.0 ml de solución amortiguadora PBS (apéndice I), y 1.0 ml de adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Posteriormente, se realizaron dos refuerzos a intervalos de dos semanas entre cada aplicación, utilizando 0.5 mg de AM, homogenizados en 1.0 ml de PBS y 1.0 ml de adyuvante incompleto de Freund.

De manera previa a la inmunización, como control, y después de cada refuerzo, se tomó muestra de sangre para la determinación de anticuerpos en el suero. Dos semanas después del segundo refuerzo, los conejos se sangraron a blanco para obtener el suero anti-AM. Paralelamente, un suero control fue obtenido mediante el mismo esquema, pero utilizando el vehículo desprovisto de AM (PBS/adyuvante).

### **VI. 2. 3. Producción de anticuerpos de conejo contra péptido P1**

Conejos hembras Nueva Zelanda de 0.5-1.0 kg se inmunizaron por vía subcutánea con 0.5 mg de P1 en un volumen de 1.0 ml de solución PBS. Posteriormente se hicieron tres refuerzos, utilizando la misma dosis en intervalos de dos semanas entre cada aplicación. Dos semanas después



del tercer refuerzo, los conejos se sangraron a blanco para obtener el suero anti-P1, haciendo lo mismo para la obtención de un suero control.

#### **VI. 2. 4. Inmunoensayo para detectar anticuerpos anti- proteína 38kDa**

Para la medición de reacciones antígeno-anticuerpo de este trabajo se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Se utilizaron placas para inmunoensayo de fondo plano, especiales para adsorción de macromoléculas hidrofílicas (Nunc MaxiSorp, Denmark). Se preparó una dilución 10 µg/ml con la proteína de 38 KDa recombinante en solución amortiguadora de carbonatos (apéndice I) y se depositaron 100 µl/pozo (1 µg/pozo). La sensibilización para adsorción del antígeno fue realizada durante 1 noche a 4°C. Terminada la incubación, la placa se lavó 4 veces con solución PBS/Tween 20 al 0.2% (apéndice I), utilizando un lavador de placas (Denley Instruments Ltd, England), y después se agregó en cada pozo 200 µl de solución de bloqueo PBS/BSA al 2% (apéndice I), dejando incubar durante 1 hr a 37°C. Al término de la incubación se lavó de la misma manera. Los sueros fueron diluidos (1:100, v/v) en PBS/BSA al 1%/Tween 20 al 0.1% y depositados en los pozos (100 µl/pozo). La placa fue incubada durante 1 hr a 37°C. Al término de la incubación los pozos fueron lavados como en pasos anteriores.

Para detectar inmunoglobulinas anti-P38 de conejo capturadas, se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo producido en cabra, acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma). Este reactivo fue diluido 1:5000 en solución PBS/BSA al 0.1%, y agregado en cada pozo en un volumen de 100 µl.

Para la detección de inmunoglobulinas humanas, el reactivo utilizado fue un anticuerpo anti-IgG humana de cabra, acoplado a

fosfatasa alcalina (Sigma). Para su uso, se depositaron 100 µl de una dilución 1:10000 en PBS/BSA al 0.1% en cada pozo.

Las placas con anticuerpos secundarios fueron incubadas durante 1 hr a 37°C, y posteriormente lavadas bajo las condiciones arriba indicadas.

Para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, a cada pozo se agregó 100 µl de una solución de para-nitrofenilfosfato en dietanolamina (apéndice I), y se incubó durante 15 min a 37°C. La absorbancia fue analizada a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Opsys MR, Dynex Technologies).

#### **VI. 2. 5. Inmunoensayo para detectar anticuerpos anti- arabinomanano (AM)**

Se utilizaron placas para inmunoensayo de fondo plano (Nunc MaxiSorp, Denmark). Se preparó una dilución con 10 µg/ml de AM en solución amortiguadora de carbonatos y se depositaron 100 µl/pozo (1µg/pozo). Se incubó durante 1 noche a 4°C. Terminada la incubación, la placa se lavó 4 veces con solución PBS/Tween 20 al 0.1%. Se agregó en cada pozo 200 µl de solución de bloqueo (PBS/BSA al 3%), y se incubó durante 1 hr a 37°C. La placa fue lavada nuevamente y el resto del ensayo fue realizado bajo las mismas condiciones que el inmunoensayo para detección de anticuerpos anti-P38.

#### **VI. 2. 6. Inmunoensayo para detectar reactividad de sueros anti-P38 y anti-AM con con péptidos expresados en fagos.**

Un ELISA directo fue utilizado para analizar la reactividad entre sueros de conejo inmunizados con antígenos nativos y péptidos expresados en fagos. Los anticuerpos producidos en conejo, fueron capturados en placas para inmunoensayo preparadas con anticuerpo anti-IgG de conejo H+L (Zymed, San Francisco, Ca), depositado en una concentración de

500 ng/ml en PBS (100 µl/pozo durante 1 hr a 37°C), lavadas con solución de PBS/Tween al 0.2%, incubadas con 200 µl de solución bloqueadora (PBS/BSA al 3%) durante 1 hr a 37°C, y lavadas nuevamente. Los sueros preinmune y anti-P38 o anti-AM fueron diluidos (1:100, v/v) en PBS/BSA al 1.0%/Tween 20 al 0.1%, depositados e incubados durante 1 hr a 37°C. Después de 5 lavados, reactividad de los anticuerpos inmovilizados sobre los pozos y péptidos expresados en fagos fue monitoreada utilizando clonas de fagos seleccionadas, a una concentración de  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de placa (pfu)/ml, aplicando 100 µl /pozo. Después de haber incubado durante una noche a 4°C, las placas fueron lavadas y tratadas con 100 µl/pozo con un anticuerpo anti M13 acoplado a peroxidasa (Horse Radish Peroxidase/anti-M13 Monoclonal Conjugate, Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.) El reactivo se utilizó a una dilución 1:5000 (v/v) en PBS/BSA al 1% y se incubó durante 1 hr a 37°C. Al finalizar la incubación, se lavó, y posteriormente se agregaron 100 µl/pozo de ABTS (Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.), sustrato cromogénico de la peroxidasa. La reacción fue incubada durante 15 min a 37°C, y analizada en un espectrofotómetro de microplacas a 405 nm.

#### **VI. 2. 7. Inmunoensayo para detectar anticuerpos anti- P1**

El antígeno P1 fue preparado a una dilución de 10 µg/ml en solución amortiguadora de carbonatos y depositado en placas de microtitulación de fondo plano (100 µl/pozo, equivalentes a 1µg/pozo). Las placas fueron sensibilizadas con antígeno durante 1 noche a 4°C, después de lo cual el inmunoensayo fue proseguido de manera similar que para antígenos nativos.

### **VI. 2. 8. Variante de inmunoensayo para detectar anticuerpos anti P1.**

Los anticuerpos dirigidos contra el mimótopo peptídico P1 fueron también analizados utilizando una variante del inmunoensayo, en donde la superficie polimérica de los pozos fue previamente tratada durante 20 min a radiación de luz ultravioleta, utilizando un transiluminador (64). En esta variante, el P1 fue preparado (10 µg/ml) en una solución amortiguadora de boratos pH 8.2 (ver apéndice). Se depositaron 100µl/pozo y se dejó incubar una noche a 4°C. Al término de la incubación, se lavó 4 veces con PBS/Tween 20 al 0.1%, se añadió en cada pozo la solución bloqueadora (PBS/BSA al 2%, 200 µl), y se incubó durante 2 hr a 37° C, o durante cuatro horas a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados, se añadió suero humano (100 µl de una dilución 1:100 en PBS /BSA al 1%), y se incubó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, el inmunoensayo se prosiguió de la misma manera que para la detección de anticuerpos anti- proteína 38 kDa).

### **VI. 2. 9. Inmunoensayo para detectar anticuerpos humanos capaces de reconocer el mimótopo P1 biotinilado**

El P1 biotinilado fue diluido en una solución de carbonatos, y depositado (100 µl de diferentes diluciones) en placas funcionalizadas con estreptavidina (Streptawell). Después de incubar durante una noche a 4°C y lavar 4 veces con PBS/Tween 20 al 0.2%, se agregaron en cada pozo 300µl de solución bloqueadora (PBS-BSA al 2%), y se incubó por 1 hr a 37° C. Posteriormente, el inmunoensayo se prosiguió de la misma manera que para la detección de anticuerpos anti- proteína 38 kDa, salvo en el tiempo de incubación con los sueros y con el conjugado, el cual fue de 2 hr en este protocolo.

## **VI. 2. 10. Análisis de mimetismo antigénico e inmunogénico de P1**

El carácter antigénico del P1 (péptido seleccionado como mimótopo potencial del antígeno nativo AM) fue analizado mediante inmunoensayo enzimático, por medición de la reacción entre P1 con anticuerpos policlonales dirigidos contra el antígeno nativo (suero anti-AM). El ensayo fue realizado como se indicó en el punto No. II.5

La capacidad del P1 para inducir anticuerpos en conejo, dirigidos en contra del antígeno nativo, fue explorado por inmunización de conejos Nueva Zelanda con el péptido P1, y analizando la reactividad del suero hiperinmune obtenido con productos de secreción de *M. tuberculosis* mediante Western blot. El esquema de inmunización utilizado fue similar al correspondiente a la obtención de suero anti-AM, intercambiando las dosis de AM por P1 en una concentración de 0.5 mg en tres ocasiones.

## **VI. 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **VI. 3. 1. Bioselección de clonas de fagos M13 que expresan mimótopos**

Los péptidos con mimetismo a los antígenos nativos P-38 y AM fueron seleccionados a partir de una biblioteca comercial de dodecapéptidos (péptidos de doce aminoácidos) expresados al azar en el extremo amino de la proteína III (pIII) de la superficie del fago filamentoso M13 (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra). Para su selección, los péptidos expresados en fagos fueron expuestos a anticuerpos dirigidos contra los antígenos nativos, y selectivamente eluidos después de haber descartado los fagos de la biblioteca sin afinidad a los anticuerpos.

Para ello, los anticuerpos de conejo anti-P38 y anti-AM fueron depositados sobre placas de microtitulación a través de un puente con anti-IgG de conejo. Se preparó una solución de anti IgG de conejo H+L (Zymed, San Francisco, CA., E.U.A.) en solución amortiguadora de

carbonatos (1.0 µg/ml), y se depositaron 100 µl/pozo. Las placas fueron incubadas durante 1 hr a 37°C y, después de realizar 5 lavados con PBS/Tween al 0.2%, se agregó solución de bloqueo (200 µl de PBS/BSA al 3%). Las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C, y lavadas con PBS/Tween 20 al 0.2%. Los sueros anti-P38 y anti-AM fueron depositados (100 µl de una dilución 1:100 en PBS/BSA al 1%). Después de una incubación durante 1 hr a 37°C, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBS/Tween al 0.2%.

Para trabajar con la biblioteca comercial se preparó una dilución de 10 µl en 450 µl de PBS/BSA al 0.1%/Tween 20 al 0.1, lo que corresponde a  $1 \times 10^{11}$ /ml fagos (paso realizado en condiciones estériles a fin de conservar la biblioteca); de esta mezcla se agregaron 100 µl en cada pozo, y se incubaron durante una noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se hicieron cinco lavados con PBS/Tween 20 al 0.2% y otros cinco lavados más con PBS, evitando el uso de equipo automatizado a fin de evitar manipulaciones fuertes. Enseguida, los pozos con fagos adheridos fueron incubados con 100 µl de una solución tamponada de glicina-HCl 0.2 M, (apéndice I). Se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, y 10 min más a 37°C. Finalmente, los fagos eluidos fueron colectados a partir de los sobrenadantes de cada pozo, recuperando 100 µl por pozo. A fin de obtener una cantidad manejable de fagos, el procedimiento fue realizado en cuatro pozos, reuniendo los sobrenadantes en un solo microtubo (400 µl en total). La glicina fue neutralizada agregando 200 µl de Tris 0.2 M sin ajustar el pH, y a la mezcla resultante se le llamó "eluido de primera ronda".

Este eluido se propagó, a fin de utilizarlo para una segunda ronda de bioselección. En total, el procedimiento de bioselección se realizó dos veces más a fin de enriquecer los eluatos recuperados con fagos más afines a los anticuerpos del suero utilizado. Los eluatos son denominados

como “eluido de segunda ronda” y “eluido de tercera ronda”, siendo a partir de esta última que fagos individuales (clonas), que expresan un dodecapéptido determinado en la proteína III, pueden ser obtenidos.

### **VI. 3. 2. Selección de clonas de fagos M13 mediante cultivos en medio sólido de bacterias infectadas**

Se prepararon cajas de Petri con medio LB-agar, y solución para homogeneizar la siembra de bacterias sobre las placas (Top-Agar) (apéndice I).

Se transfirió una colonia de la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) cepa TG1 a 10 ml de medio 2-YT. La suspensión fue agitada hasta alcanzar 0.4 - 0.5 unidades de densidad óptica, y se colocaron 200 µl de la suspensión bacteriana resultante en un microtubo. Los fagos obtenidos del eluido final (tercera ronda), después de una bioselección, fueron utilizados para infectar bacterias de un microtubo (colocando 10 y 50 µl del eluido final en microtubos diferentes). Las suspensiones fueron incubadas a 37°C durante 40 min para facilitar la infección, se agregaron 15 µl del reportero IPTG/Xgal (apéndice), se mezcló y la suspensión resultante fue colocada en 4 ml de Top Agar líquido; después de mezclar, la suspensión fue inmediatamente esparcida sobre una caja de Petri con medio LB agar, e incubada durante una noche a 37°C.

Una caja de Petri con placas azules separadas fue seleccionada para recuperar 21 de ellas, las cuales fueron propagadas por separado en 10 ml de medio 2-YT, y posteriormente en 50 ml. La cantidad de fagos obtenida al final de este cultivo en 50 ml fue estimada mediante análisis de las unidades formadoras de placa (ufp).

### **VI. 3. 3. Cuantificación de fagos mediante conteo de unidades formadoras de placa (ufp)**

Para determinar el número de fagos/ml en cada propagado se realizaron tres diluciones seriadas (1:1000 cada vez) en medio 2-YT. De la dilución final se agregaron 1,10 y 50  $\mu$ l de suspensión en tres microtubos diferentes que contenían 200  $\mu$ l de la cepa *E. coli* TG1 previamente crecida (ver punto anterior). Los tubos se incubaron a 37°C durante 40 min, se agregó IPTG-XGal y se continuó con la siembra y conteo de ufp (colonias azules con expresión de inserto), tal como se describe en el punto anterior.

### **VI. 3. 4. Purificación de ADN de cadena sencilla**

Cada clona seleccionada fue propagada hasta obtener 1 ml de sobrenadante. A éste se añadieron 400  $\mu$ l de PEG y se incubó una noche a 4°C para la precipitación de los fagos. Se centrifugó durante 10 min a 14 000 rpm, se desechó el sobrenadante, se centrifugó 30 segs más para desechar completamente el líquido que se quitó con micropipeta y, el precipitado fue resuspendido en 200  $\mu$ l de solución de yodo (apéndice). Posteriormente, se agregaron 500  $\mu$ l de etanol absoluto, la suspensión se mezcló y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. A continuación se realizó una centrifugación durante 10 min a 14 000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu$ l de etanol al 70% para lavar. Después de centrifugar 1 min a velocidad máxima, se retiró completamente el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 15.5  $\mu$ l de agua bidestilada (según especificaciones del fabricante del kit 12-mer Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs).

Para verificar la integridad del ADN obtenido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1X (apéndice). Para cargar el gel, se mezclaron 2  $\mu$ l de ADN de cadena



sencilla de cada una de las clonas en una mezcla compuesta por 1  $\mu$ l de solución de carga 5X y 1  $\mu$ l de agua MilliQ estéril. La electroforesis fue corrida durante unos 90 min a 100V.

### **VI. 3. 5. Secuenciación de ADN de cadena sencilla**

La secuenciación del ADN de cada clona se realizó mediante el uso del kit de secuenciación "Sequenase Quik-Denature Plasmid Sequencing Kit" (Amershan Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA) y dATP  $\alpha$ -<sup>35</sup>S. La reacción de alineamiento se preparó con 12.5  $\mu$ l de templado (ADN de cadena sencilla de cada clona) y se siguió el protocolo del fabricante. Al término de la reacción, se cargaron 7  $\mu$ l en los carriles correspondientes de un gel de poliacrilamida al 8%. El gel se corrió a 1500 volts durante 30 min, y durante 4.5 horas a 1800 Volts. Al término de este tiempo se recuperó el gel mediante papel filtro y se colocó en el secador de geles (Bio-Rad, USA) durante 90 minutos a 80°C. Ya seco, el gel se colocó en una caja de exposición con una placa de rayos X (Kodak, X.O mat), se guardó a temperatura ambiente y se reveló después de 72 hr. Se llevó a cabo la lectura manual de la placa para determinar la secuencia de nucleótidos del inserto expresados en los fagos seleccionados (según especificaciones del fabricante del kit Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit, BioLabs).

### **VI. 3. 6. Análisis de secuencias**

Por medio del programa CLUSTAL 2, se realizó una alineación de las secuencias obtenidas a fin de buscar posibles homologías entre ellas y con el genoma de *M. tuberculosis*.

## **VII MUESTRAS BIOLÓGICAS**

### **VII. 1. Material biológico humano**

Los sueros humanos utilizados en este estudio fueron donados por el Hospital de Infectología Manuel Méndez del Centro Médico Nacional “La Raza” y por el “Hospital General” del sector salud de la Ciudad de México. Los individuos enfermos con tuberculosis pulmonar activa fueron diagnosticados por baciloscopía positiva y/o cultivo. Los sueros de individuos sanos, utilizados como control, se obtuvieron del personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM previo consentimiento informado.

Ahí donde está en nuestro poder el actuar, está también el no actuar  
[...] ahí donde está en nuestro poder el No,  
también está el Sí.  
Aristóteles, Ética a Nicómaco

## VIII. RESULTADOS

Considerando el potencial que existe para mimetizar antigénicamente una molécula glicosilada con péptidos pequeños, el presente trabajo se enfocó a obtener péptidos mimótopos para dos antígenos de *M. tuberculosis* considerados de alta eficacia para su uso como reactivos de inmunodiagnóstico de la tuberculosis. En los siguientes apartados se presenta la identificación, obtención y evaluación para serodiagnóstico de péptidos expresados en fagos filamentosos M13, capaces de mimetizar epitopes de un polisacárido AM y de la glicolipoproteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*.

### VIII. 1. Obtención de antígenos y anticuerpos

#### VIII. 1. 1. Purificación y producción de anticuerpos antiproteína 38 kDa

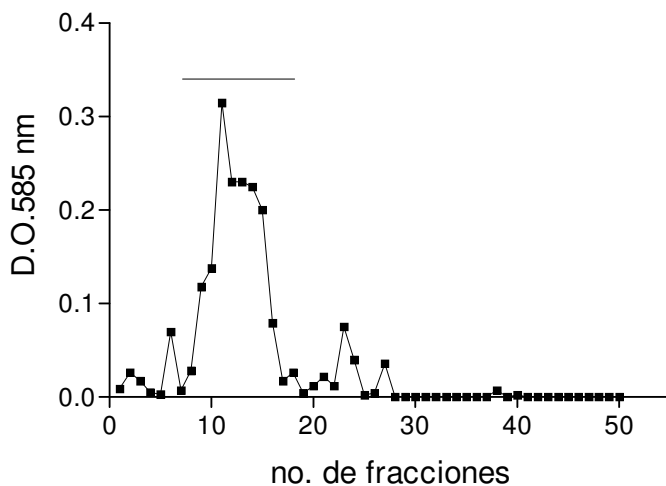
La glicoproteína de 38 kDa (P38) utilizada en este trabajo es una proteína recombinante que se expresa en *M. smegmatis* (micobacteria no patógena de crecimiento rápido). Contrariamente a los productos expresados en *Escherichia coli*, o en células eucariontes taxonómicamente alejadas a las micobacterias, el uso de *M. smegmatis* permite obtener un producto recombinante cuyos patrones de glicosilación son similares a los del antígeno nativo producido por *M. tuberculosis*.

## **VIII. 1. 2. Purificación del antígeno polisacárido AM**

Durante el crecimiento de un cultivo líquido de *M. tuberculosis* se liberan al medio muchos metabolitos de secreción; uno de ellos es el AM, un polisacárido neutro. Para obtenerlo, las biomoléculas secretadas al medio de cultivo fueron fraccionadas mediante extracción de Folch y métodos cromatográficos de intercambio iónico. El AM difiere de muchas otras biomoléculas presentes en el extracto, tanto por su carga iónica como por su solubilidad en distintos solventes. Con el protocolo utilizado, la precipitación de polisacáridos fue favorecida con el uso de etanol. En esta fase se obtienen sacáridos que contienen manosa y arabinosa principalmente, y que pueden ser neutros o ácidos.

Por otro lado, la posible contaminación del producto con azúcares relacionados pero unidos a cadenas de ácido succínico fue descartada mediante cromatografía de intercambio aniónico. En particular, el LAM, es conocido por poseer dentro de su estructura, cadenas de succinato que le confieren carga negativa. En una cromatografía de intercambio iónico se recuperaron las fracciones neutras, con AM pero sin LAM, con una solución amortiguadora de Tris-EDTA a un pH neutro. En la Figura 7 se muestra la distribución de eluatos positivos a la detección de azúcares y obtenidos con un solvente neutro. Como puede verse, una fracción preponderante de azúcares neutros fueron eluidos en una distribución normal (fracciones 7 a la 20).

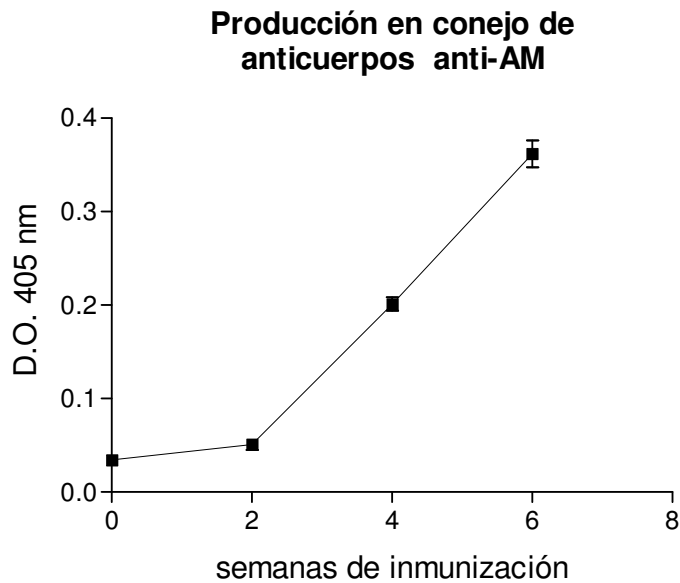
### Purificación de AM en columna de intercambio iónico



**Figura 7.** Purificación de AM en columna de intercambio iónico. Los polisacáridos obtenidos a partir del medio de cultivo de *M. tuberculosis* por lavado de Folch y precipitación con etanol, fueron sometidos a una cromatografía de intercambio aniónico a fin de obtener la fracción sacarídica neutra, la cual corresponde principalmente a AM.

#### VIII. 1. 3. Producción de anticuerpos anti-AM

Para la generación de anticuerpos en contra de AM se utilizaron conejos que se inmunizaron con dicho polisacárido. En la Figura 8 se muestra la cinética de producción de anticuerpos en uno de los animales inoculados. Como puede observarse, los anticuerpos anti-AM fueron producidos a partir de la cuarta semana después de la primera inmunización, obteniéndose un título aceptable después de la sexta semana post-tratamiento (>0.2 unidades D.O. de respuesta al antígeno con respecto al suero pre-inmune).



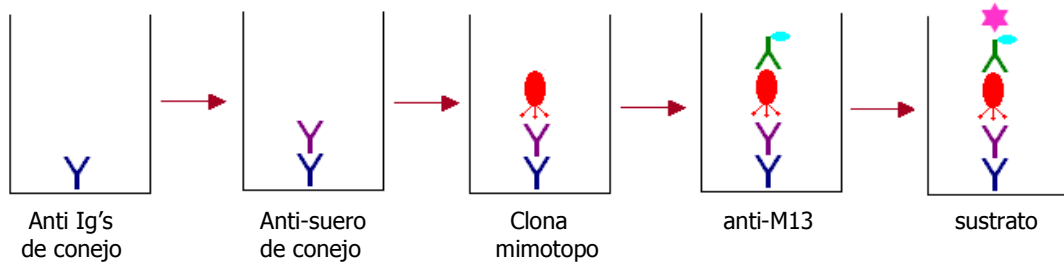
**Figura 8.** Producción de anticuerpos anti-AM en conejo. La formación de anticuerpos en suero de conejo inmunizado con AM fue monitoreado por ELISA a lo largo del proceso de inmunización. La totalidad del suero se obtuvo a la semana 7 de tratamiento.

## **VIII. 2. Mimetismo antigénico y secuencias peptídicas de las clonas seleccionadas**

Las clonas obtenidas fueron analizadas a fin de comprobar si los péptidos seleccionados mimetizan la molécula original. En este caso, la selección de péptidos expresados en fagos puede generar la obtención de dos tipos de mimótopos, a saber: i) mimótopos capaces de ser reconocidos por los anticuerpos (mimótopos antigénicos) y, ii) mimótopos que, además de ser antigénicos, sean capaces de inducir por sí mismos anticuerpos en contra de la molécula nativa (mimótopos inmunogénicos). Ambos grados de mimetismo son importantes, dado el potencial de uso que conllevan (diagnóstico, bloqueo de anticuerpos, vacunación, etc.)

La capacidad de los péptidos expresados en fagos de ser reconocidos por anticuerpos (mimetismo antigénico) fue analizada por inmunoensayo enzimático (ELISA), evaluando si los fagos aislados podían

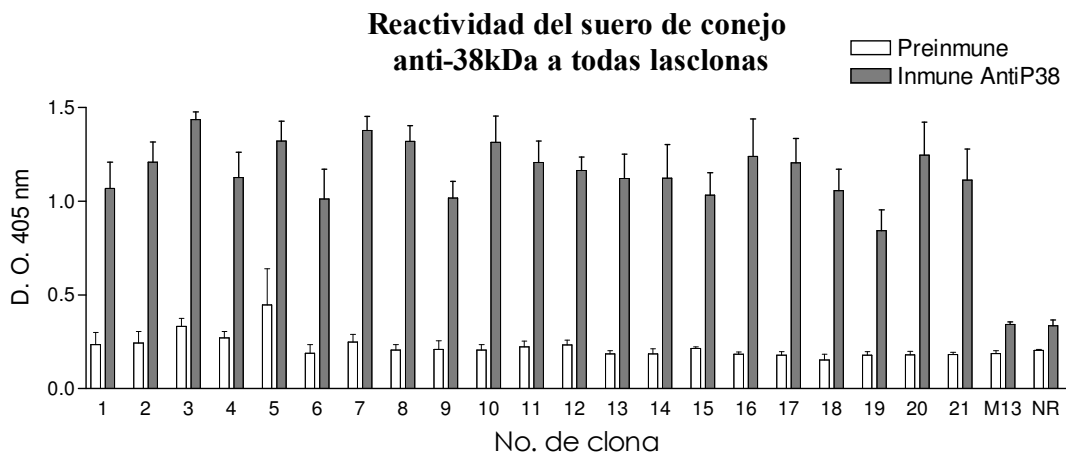
ser reconocidos por los anticuerpos utilizados para la bioselección. La estrategia del inmunoensayo utilizado se presenta en la Figura 9.



**Figura 9.** Inmunoensayo enzimático para medir la reactividad de fagos seleccionados con un anticuerpo. En pozos de microtitulación se fija un reactivo que capture la molécula blanco (el anticuerpo), tal como anticuerpos anti Ig-G de conejo. Una vez el anticuerpo inmobilizado sobre el pozo, su reactividad con los fagos se mide con anticuerpos secundarios unidos a una enzima catalizadora de una reacción colorimétrica.

## VIII. 2. 1. Mimetismo antigénico de clonas seleccionadas con suero anti-P38

Las 21 clonas anti-P38 seleccionadas se comportaron como mimótopos antigénicos, mostrando una reactividad claramente diferente entre los sueros de conejo preinmune e inmune (Figura 10).



**Figura 10.** Reactividad de las clonas seleccionadas con suero anti-GP38 y suero pre-immune. Como control se incluyó fago M13 silvestre (sin péptido inserto), y una clona que expresa un péptido no relacionado (NR).

La reactividad de los sueros preimmune y anti-P38 fueron analizados utilizando como reactivos clonas controles (sin péptido inserto o con un inserto sin relación a secuencias de *M. tuberculosis*). Como puede observarse en la Figura 10, la reactividad de las clonas control no muestra una diferencia clara entre ambos sueros, y esta reactividad fue similar a la encontrada con el suero pre-immune y clonas que expresan mimótopos. De acuerdo con estos datos, puede afirmarse que las clonas seleccionadas son mimótopos antigénicos de la P38.

### **VIII. 2. 2. Análisis de la secuencia de aminoácidos en los mimótopos de la P38 identificados.**

La secuencia de aminoácidos de los insertos peptídicos fue analizada en cada una de las clonas seleccionadas. Para ello, el ADN de cada clona fue secuenciado mediante el método de Sanger, y la secuencia peptídica traducida a partir de los nucleótidos secuenciados. En la Tabla 2 se muestran las secuencias peptídicas encontradas en los insertos de cada una de las 21 clonas seleccionadas.



**Tabla 2** Secuencias de aminoácidos de las clonas de p 38 kDa. Las secuencias analizadas con el programa CLUSTAL 2, permitieron hacer 4 grupos con algunos aminoácidos con secuencias consenso como lo indican los colores en cada grupo rojo y verde, los aminoácidos en azul son del mismo grupo. Con la cantidad de aminoácidos compartidos en las secuencias, es imposible decir que hay secuencias consenso y no hay representatividad en el genoma de *M. tuberculosis*.

```

Clona 4      ----FSSVALLWSAVF----
Clona 3      --SLASVWSLYSWV-----
Clona 2      ----FSFYTLISRLNE---
Clona 15     ---LGSWVSSILYF-

Clona 6      SYSVWAWAAWY-----
Clona 10     --SVYAWYGESSV----
Clona 5      ---VVDWYSASDY---
Clona 7      ----FAWYLADSW-WSA
Clona 9      ---VFAWVMLVDWSW--
Clona 12     ---VYSAGASVSWAW--
Clona 14     --DVYGFSGSFIWR---

Clona 21     ---NFMESLPRLGMH--
Clona 20     ---DRYWDHEPRNPT--
Clona 13     ---FYVNDLGIVGIR--

Clona 1      ---VALSSAASAEYA-
Clona 18     -HPLDDHFVASAR---
Clona 11     ---VSVGMKPSRP--
Clona 19     -AHKTAPTAPIPL---
Clona 17     ---LGQGRVVERVLE-
Clona 8      -ACLIGGVIIMRC---
Clona 16     --SGIISTNYGCCV--

```

Disponer de las secuencias peptídicas de mimótopos resulta interesante, ya que permite definir la similitud entre mimótopos, su frecuencia, y predicción de epítomos en la proteína nativa potencialmente mimetizados. Para el análisis se utilizó el programa CLUSTAL 2.

Este programa CLUSTAL se ha convertido en una herramienta muy valiosa ya que con la gran cantidad de secuencias nucleotídicas o de aminoácidos que existe, ha permitido obtener información de: homología y parentesco en una familia de secuencias, la predicción de estructuras secundarias, inferir posibles patrones de mutación deducir relaciones evolutivas etc., el programa CLUSTAL lo hace por medio de matrices de analogías que permitirá el mejor alineamiento de las secuencias incluyendo rupturas o ausencias para obtener el mayor grado de similitud (59,69,61).

- No se encontraron homologías en la comparación de los mimótopos de la P38 con el genoma de *M. tuberculosis*, probablemente porque estos mimótopos están relacionados con secuencias no peptídicas, en particular de azúcares de la P38, los cuales han sido reportados por poseer una alta inmunogenicidad.
- La alta frecuencia de aminoácidos aromáticos reconocidos por mimetizar azúcares, como triptófano, fenilalanina y tirosina, apoya la posibilidad de mimetismo de epítomos glicosilados.

### **VIII. 2. 3. Mimetismo antigénico de clonas seleccionadas con suero anti-AM**

De la misma manera que con las clonas seleccionadas con suero anti-P38, las 21 clonas seleccionadas de forma aleatoria por su reactividad con el suero anti-AM fueron analizadas en cuanto a su capacidad para mimetizar el antígeno AM, y ser reconocidas por el suero anti-AM. Como se puede observar en la Figura 11, las clonas seleccionadas funcionan como mimótopos antigénicos, pues se detectó una elevada reactividad con el suero anti-AM, pero no con el suero pre-inmune. En este ensayo se utilizó como control el fago M13 silvestre, carente de inserto peptídico.

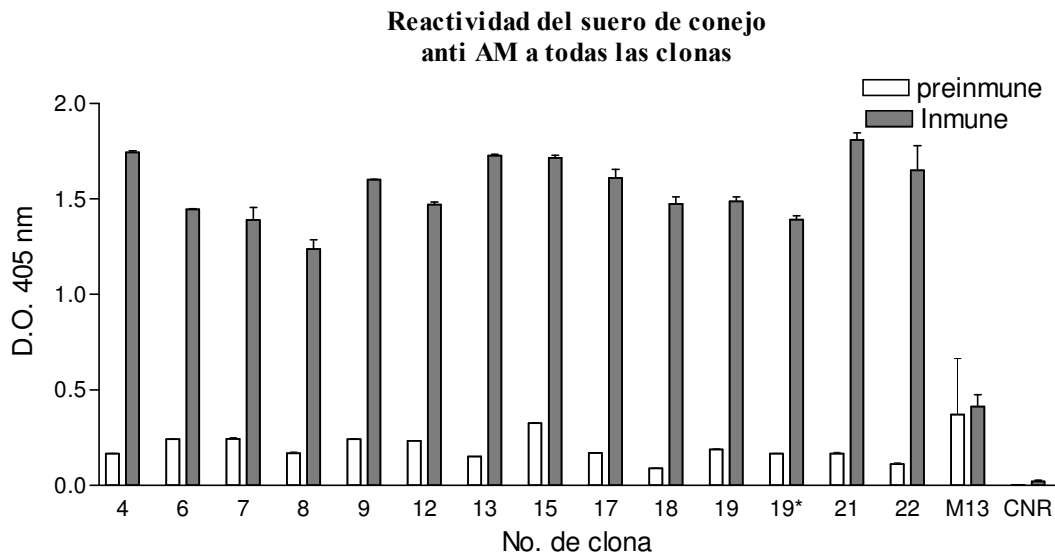


Figura 11. Reactividad de fagos bioseleccionados con suero anti-AM. Se muestra la reactividad con suero pre-inmune (barras blancas) y con suero hiperinmune anti-AM (barras grises). Además de utilizar fago silvestre M13 y una clona no relacionada CNR como controles

#### **VIII. 2. 4. Secuencias peptídicas de las clonas que mimetizan AM**

De cada una de las clonas con afinidad por anticuerpos anti-AM se extrajo el DNA y se secuenció el inserto utilizando el método de Secuensa, y de la misma manera que para las clonas de P-38, las secuencias de DNA fueron traducidas a secuencias de aminoácidos, las cuales están enlistadas en la tabla 3.

**Tabla 3.** Secuencias de aminoácidos de las clonas de AM. Las secuencias analizadas con el programa CLUSTAL 2, permitieron hacer 3 grupos que muestran las secuencias compartidas como lo indican los colores en cada grupo rojo y verde, y los aminoácidos en azul son del mismo grupo. Las secuencias consenso encontradas se encuentran dentro de los cuadros

|           |                               |           |
|-----------|-------------------------------|-----------|
| Clona 1   | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 2   | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 1 1 | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 1 4 | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 1 0 | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 5   | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 7   | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 16  | ----- <b>WSAPVLMGTVPP</b> --- |           |
| Clona 8   | ----- <b>QEP-LMGTVPIRA</b>    | <b>P1</b> |
| Clona 22  | ----- <b>RKVPLLSGTLPQ</b> --- |           |
|           |                               |           |
| Clona 9   | --- <b>QLNKLOIPLSII</b> ----  |           |
| Clona 20  | --- <b>QLNKIQIPLSII</b> ----  |           |
| Clona 15  | --- <b>THNHQVPLSII</b> S---   |           |
| Clona 12  | --- <b>TLQONMPLALVW</b> ---   | <b>P2</b> |
| Clona 21  | --- <b>DPEQPAPLFLVS</b> ---   | <b>P3</b> |
| Clona 18  | --- <b>APIQAHPLGLIR</b> ---   |           |
| Clona 6   | --- <b>TPWPNQSA LTLI</b> ---- |           |
|           |                               |           |
| Clona 13  | -- <b>IDIINPAQNLR L</b> ----  |           |
| Clona 17  | --- <b>PSIIGGSSVDLV</b> ----  |           |
| Clona 4   | --- <b>GKVG LHEPIRTR</b> ---- |           |

El alineamiento muestra que las primeras 8 clonas tienen la misma secuencia; en las clonas 9,15 y 20 se encontró el motivo QXPL y en las clonas 12, 21 y 18 se encontró el motivo QXXPL. En las clonas 8, 22, 6, 13, 17 y 4 no se obtuvo secuencia consenso alguna.

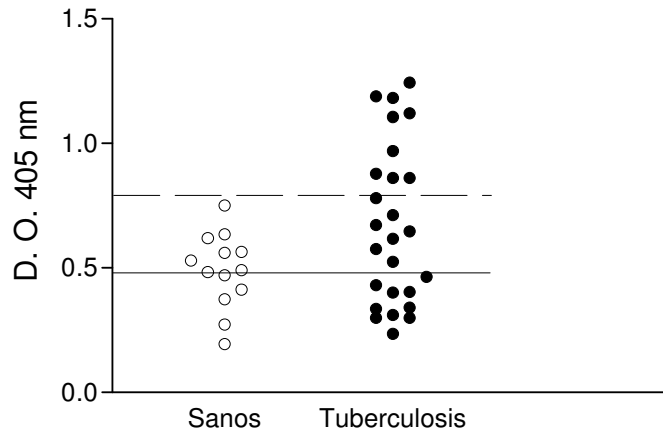
### **VIII. 3. Evaluación de mimótopos como reactivos para el inmunodiagnóstico de tuberculosis**

Como se mencionó antes, una de las aplicaciones potenciales de identificar mimótopos de antígenos de *M. tuberculosis* es su posible uso como reactivos para el inmunodiagnóstico de tuberculosis. En particular, una de las prioridades actuales para el control de esta enfermedad es el contar con un método de diagnóstico para la forma más infectiva de la enfermedad: la tuberculosis pulmonar en adultos. Los antígenos seleccionados para la obtención de mimótopos representan dos de las moléculas más prometedoras para diagnosticar tuberculosis en suero. Sin embargo, los resultados con distintas poblaciones ha sido variable, por lo que el primer paso de nuestro trabajo fue determinar la reactividad de los antígenos nativos con una colección de sueros humanos diagnosticados con tuberculosis pulmonar activa.

#### **VIII. 3. 1. Reactividad de la P38 y de AM nativo con sueros humanos**

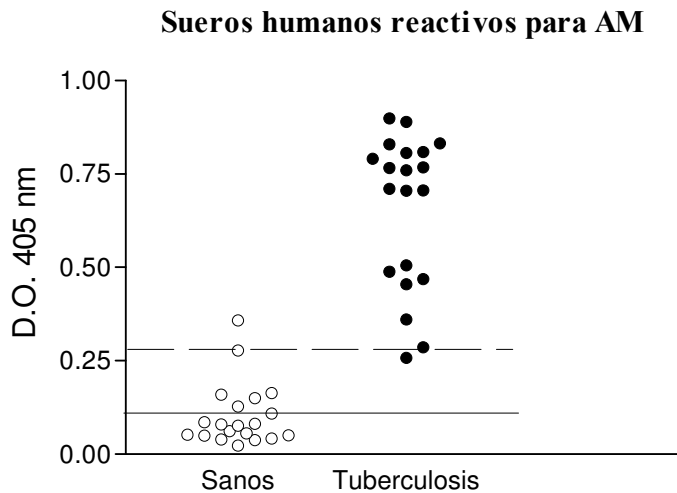
La reactividad de los antígenos nativos fue analizada en una muestra de 26 sueros de individuos con tuberculosis pulmonar activa y 13 sueros de individuos sanos. En la Figura 12 se muestra el ELISA con el antígeno recombinante P38 en el cual 30% de los sueros de tuberculosis es positivo, es a partir de este ensayo que se toma como muestra 10 sueros control y 10 sueros de individuos infectados, trabajar con las clonas.

### Sueros humanos seleccionados reactivos a P38



**Figura 12.** Reactividad de la GP38 recombinante obtenida a partir de *M. smegmatis* con sueros de individuos sanos e individuos con tuberculosis pulmonar activa. La línea continua indica el promedio de la reactividad del antígeno con sueros de individuos sanos. La línea punteada indica el valor de corte para considerar positiva la reacción con la GP38, y corresponde al valor del promedio de D.O. en individuos sanos + dos veces la desviación estándar.

De igual forma se utilizó el AM que como se muestra en la Fig.13 dio como resultado 90% de sueros positivos, a partir de este ensayo se seleccionó una muestra de 10 sueros sanos y 10 sueros con tuberculosis pulmonar para realizar las pruebas con las clonas correspondientes, (cabe mencionar que los sueros utilizados para estos ensayos preliminares utilizando AM, no son los mismos sueros que se utilizaron para el ensayo con P-38).

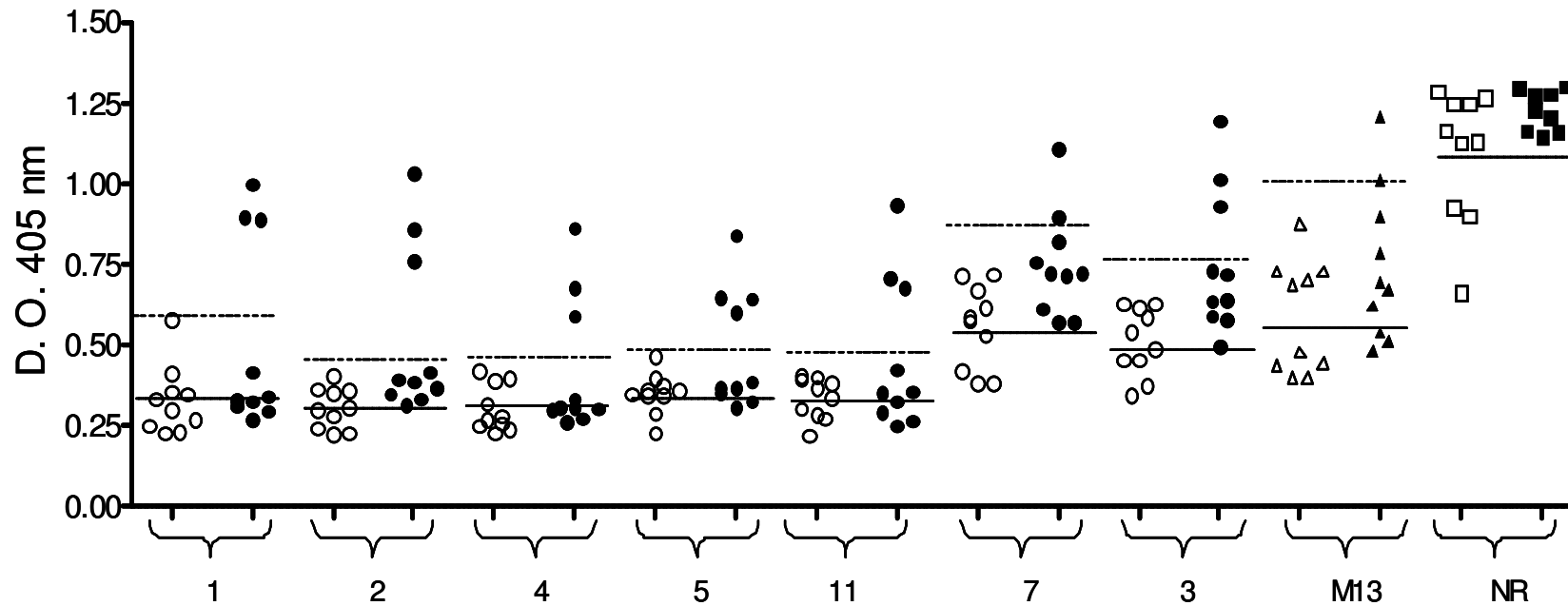


**Figura 13.** Reactividad del antígeno nativo AM con sueros de individuos con tuberculosis y de individuos sanos. La línea continua indica el promedio de la reactividad del antígeno con sueros de individuos sanos. La línea punteada indica el valor de corte para considerar positiva la reacción con el AM, y corresponde al valor del promedio de D.O. encontrado en sueros individuos sanos + dos veces la desviación estándar.

### VIII. 3. 2. Reactividad de mimótopos expresados en fagos M13 con sueros humanos.

Los mimótopos expresados en fagos M13 fueron analizados como reactivos de inmunodiagnóstico con las muestras de sueros positivos y negativos para los antígenos nativos correspondientes. Como puede observarse en la Figura 14, al utilizar las clonas que mimetizan antigénicamente a la GP38 no fue posible diferenciar entre individuos sanos e individuos enfermos. En general, se observó una reactividad importante de las clonas empleadas con cada uno de los sueros, independientemente de la identidad de la clona (mimótopo o control). Este resultado indica poca factibilidad para utilizar los péptidos mimótopos de P38 expresados en fago como reactivos de inmunodiagnóstico.

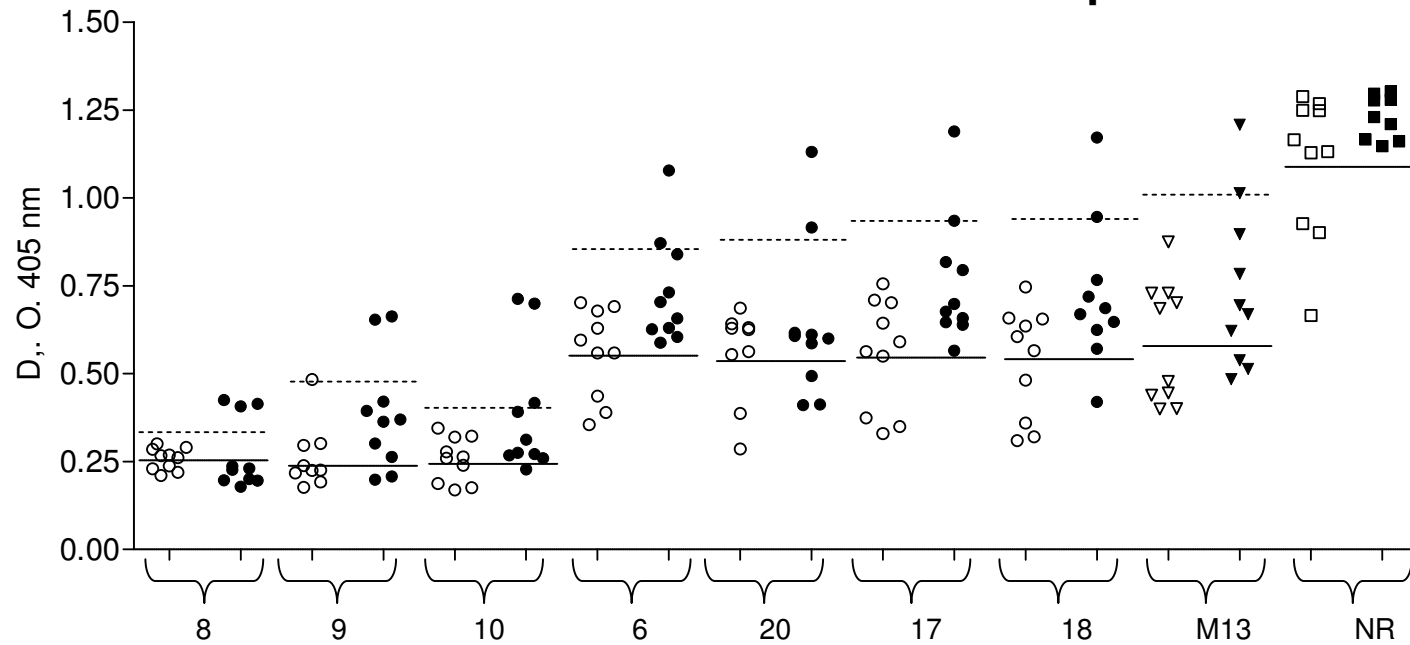
## Reactividad de sueros humanos a mimótopos de P 38 kDa



**Fig. 14.** Reactividad de clonas que mimetizan la GP38. Sueros de individuos sanos (circulo blanco) y sueros de individuos con tuberculosis (circulo negro). Las clonas del fago silvestre M13 y de una clona con inserto peptídico no relacionado (NR) fueron utilizadas como controles. La línea punteada indica el valor de corte para considerar positiva la reacción con cada clona, y corresponde al valor del promedio de D.O. encontrado en sueros individuos sanos (línea continua) + dos veces la desviación estándar.

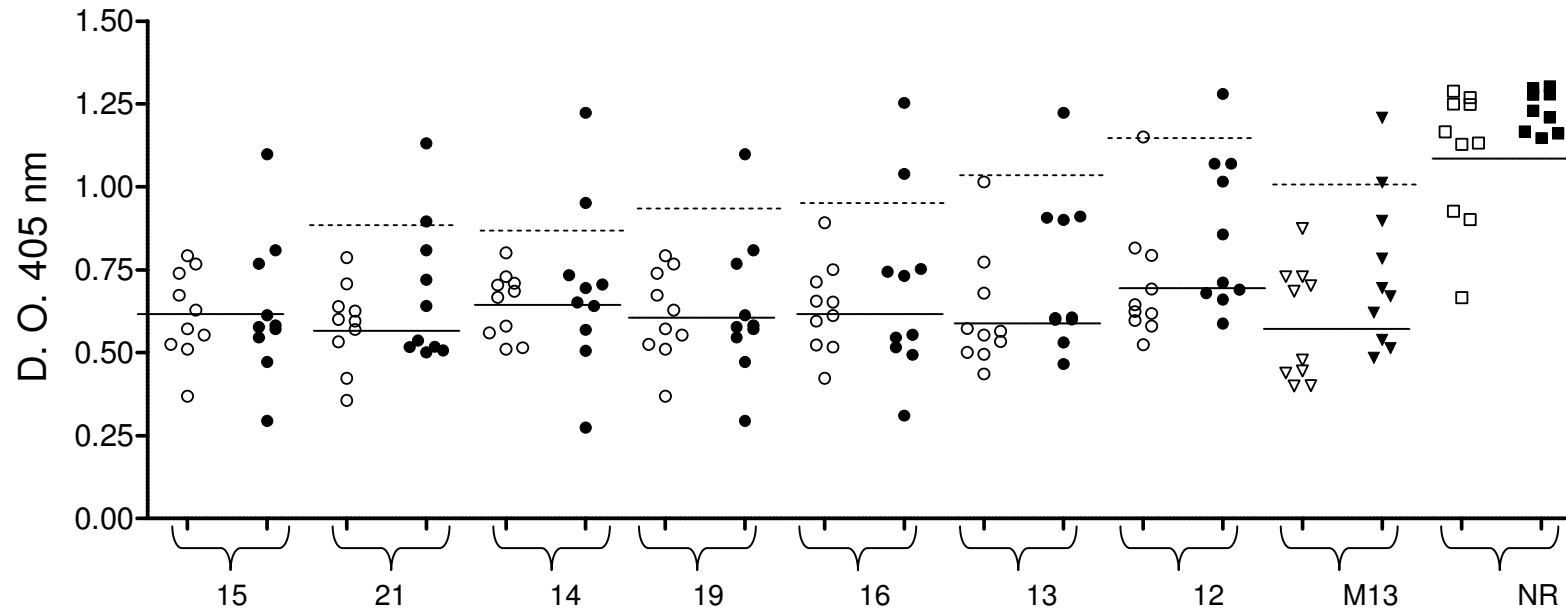


## Reactividad de sueros humanos a mimótopos de P 38 kDa



**Fig. 14 (continuación).** Reactividad de clonas que mimetizan la GP38. Sueros de individuos sanos (circulo blanco) y sueros de individuos con tuberculosis (circulo negro). Las clonas del fago silvestre M13 y de una clona con inserto peptídico no relacionado (NR) fueron utilizadas como controles. La línea punteada indica el valor de corte para considerar positiva la reacción con cada clona, y corresponde al valor del promedio de D.O. encontrado en sueros individuos sanos (línea continua) + dos veces la desviación estándar.

## Reactividad de sueros humanos a mimótopos de P 38



**Fig. 14 (continúa).** Reactividad de clonas que mimetizan la GP38. Sueros de individuos sanos (circulo blanco) y sueros de individuos con tuberculosis (circulo negro). Las clonas del fago silvestre M13 y de una clona con inserto peptídico no relacionado (NR) fueron utilizadas como controles. La línea punteada indica el valor de corte para considerar positiva la reacción con cada clona, y corresponde al valor del promedio de D.O. encontrado en sueros individuos sanos (línea continua) + dos veces la desviación estándar.

Lo que podemos decir de los mimótopos de la P 38kDa se resume en la siguiente tabla

| <b>Mimótopo</b>             | <b>Especificidad</b> | <b>Sensibilidad</b> |
|-----------------------------|----------------------|---------------------|
|                             | <b>%</b>             | <b>%</b>            |
| 5                           | 100                  | 40                  |
| 1,2,3,4,8,11,13,15          | 100                  | 30                  |
| 6,7,9,10,14,<br>16,17,20,21 | 100                  | 20                  |
| 12,13,19                    | 100                  | 10                  |
| M13                         | 100                  | 20                  |
| NR                          | 30                   | 10                  |

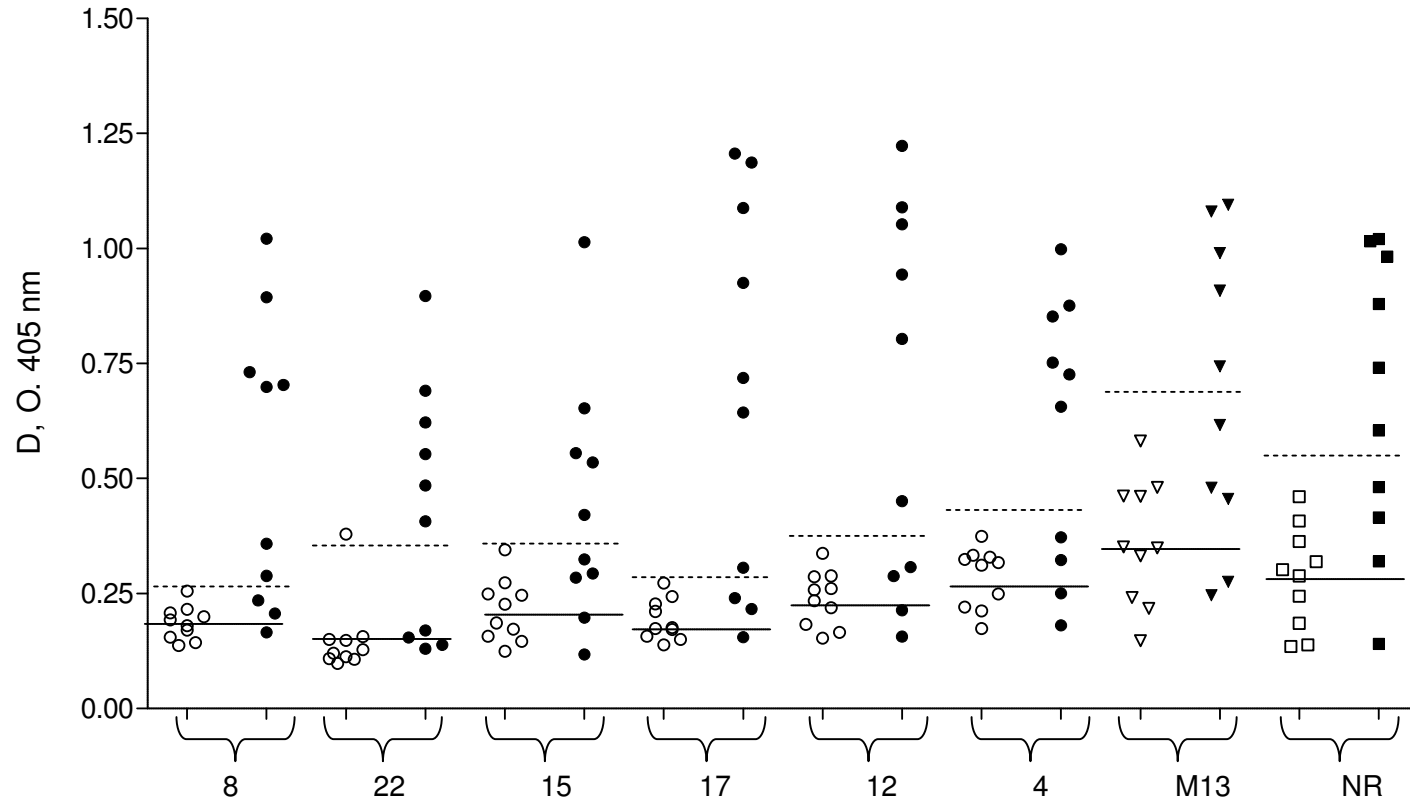
Cuando se hace el mismo trabajo con las clonas que expresan mimótopos de AM, la respuesta es la esperada, pues se observaron claras diferencias entre sueros de individuos sanos y enfermos (Figura 15). Cabe señalar que para estos mimótopos se consideró la reactividad de clonas con distinta secuencia peptídica, y no todas clonas, algunas de las cuales contienen insertos idénticos. Más del 50% de individuos enfermos presentaron una reactividad positiva con algunas de las clonas, de acuerdo con el valor de corte calculado para cada una de ellas. Sin embargo, al observar los resultados obtenidos con los fagos control, es decir el fago M13 silvestre, se observó también una respuesta mayor en sueros de individuos infectados que en sueros de individuos sanos. En vista de estos resultados, el análisis de los mimótopos de AM como reactivos de inmunodiagnóstico se continuó, pero ahora evitando el uso del fago M13. En su lugar se utilizaron los péptidos sintéticos de las secuencias obtenidas y que corresponden a las clonas

8,12

y

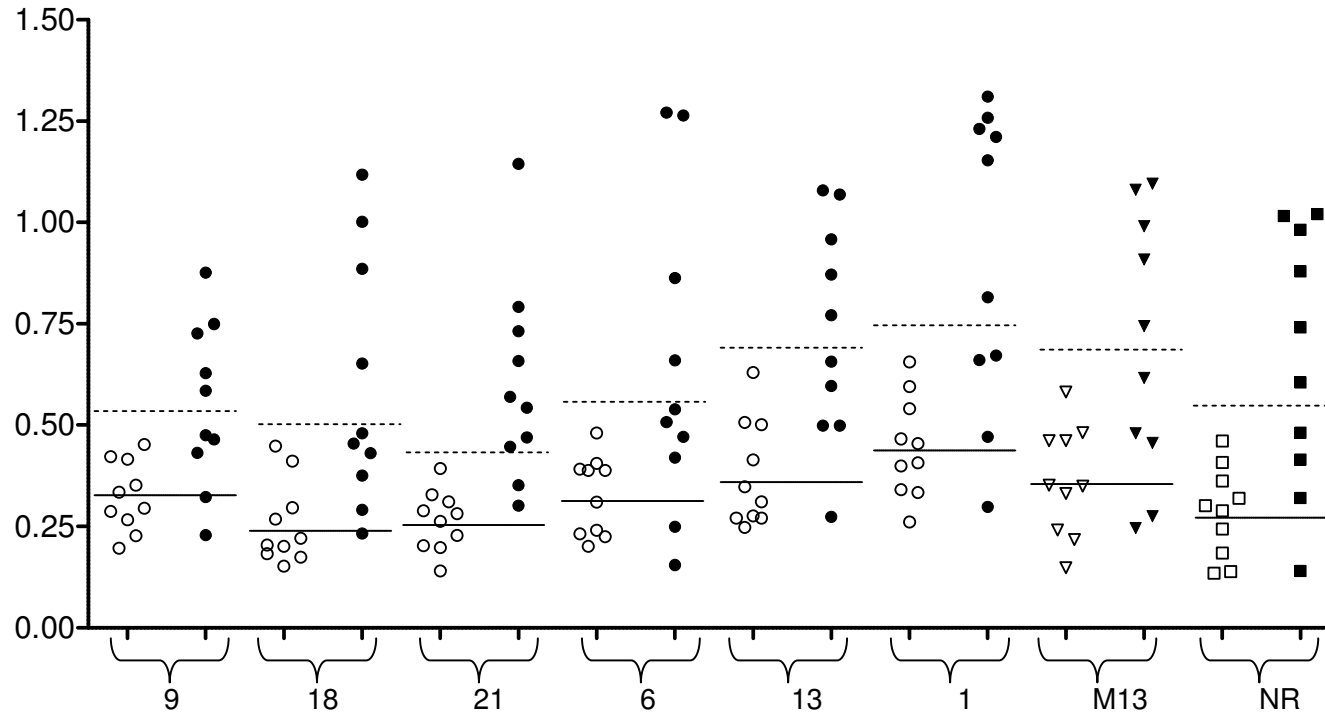
21.

### Reactividad de sueros humanos a los mimótopos de AM



**Fig. 15.** Reactividad de clonas que mimetizan AM. Los sueros de individuos sanos (círculos vacíos) y sueros de individuos con tuberculosis (círculos negros). El fago silvestre M13 y una clona no relacionada con *M. tuberculosis* se utilizaron como control. La línea punteada indica el valor de corte, y corresponde al valor del promedio de D.O. encontrado en sueros individuos sanos (línea continua) + dos veces la desviación estándar.

## Reactividad de sueros humanos a mimótopos de AM



**Fig. 15 (continúa).** Reactividad de clonas que mimetizan AM. Los sueros de individuos sanos (círculos vacíos) y sueros de individuos con tuberculosis (círculos negros). El fago silvestre M13 y una clona no relacionada con *M. tuberculosis* se utilizaron como control. La línea punteada indica el valor de corte, y corresponde al valor del promedio de D.O. encontrado en sueros individuos sanos (línea continua) + dos veces la desviación estándar.

Lo que podemos decir de los mimótopos de AM se resume en la siguiente tabla

| <b>Mimótopo</b>             | <b>Especificidad</b> | <b>Sensibilidad</b> |
|-----------------------------|----------------------|---------------------|
|                             | <b>%</b>             | <b>%</b>            |
| 5                           | 100                  | 40                  |
| 1,2,3,48,11,13,15           | 100                  | 30                  |
| 6,7,9,10,14,<br>16,17,20,21 | 100                  | 20                  |
| 12,13,19                    | 100                  | 10                  |
| M13                         | 100                  | 20                  |
| NR                          | 30                   | 10                  |

### **VIII. 3. 3. Reactividad de mimótopos peptídicos de AM, libres de fago, con sueros humanos.**

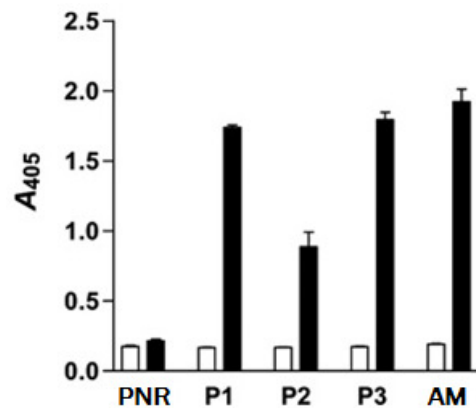
Como anteriormente se mencionó, los mimótopos de AM pudieron ser agrupados en secuencias consenso (Tabla 2). Para analizar los péptidos mimótopos sin el contexto del fago M13, seleccionamos tres secuencias pertenecientes a los grupos con secuencia consenso. Los péptidos fueron sintetizados con un tetrapéptido terminal GGGS, el cual se encuentra en el extremo C terminal de cada inserto del fago. De esta manera, se elaboraron tres peptidos sintéticos (Bio-Synthesis, Lewisville, TX, U.S.A.) con las secuencias siguientes:

P1 = QEPLMGTVPIRAGGGS (clona8)

P2 = TLQQNMPLALVWGGGS (clona 12)

P3 = DPEQPAPLFLVSGGGS (clona 21)

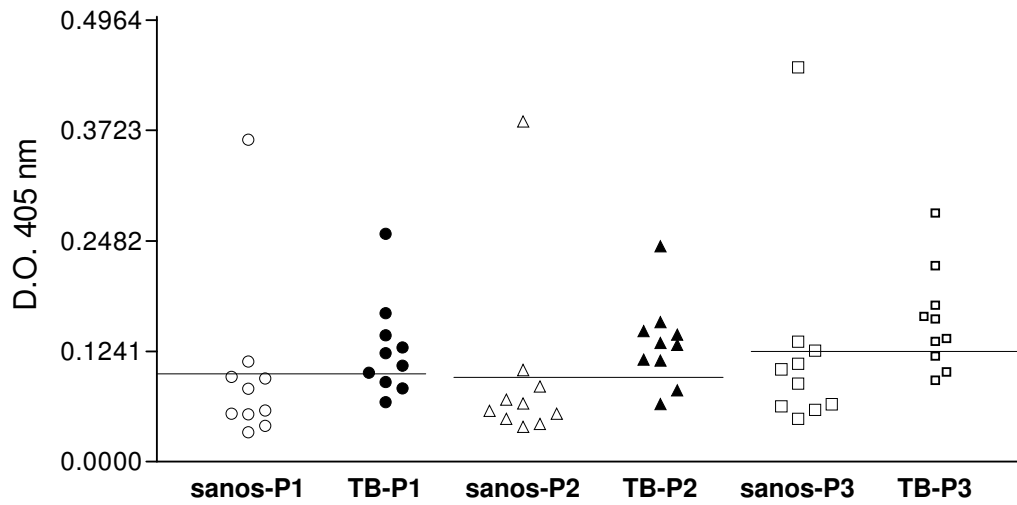
En la Figura 16 se muestra que estos péptidos son reconocidos por el suero anti-AM de conejo, pero no por el suero pre-inmune, y que esta reactividad es similar a la mostrada por el AM nativo. En contraste, un péptido no relacionado no reaccionó con el suero anti-AM.



**Figura 16.** Reactividad de los péptidos P1, P2 y P3 con un suero anti-AM y con el suero pre-inmune. PNR es un péptido no relacionado. Se muestra la reactividad con suero pre-inmune (barras blancas) y suero anti-AM (barras negras) (63).

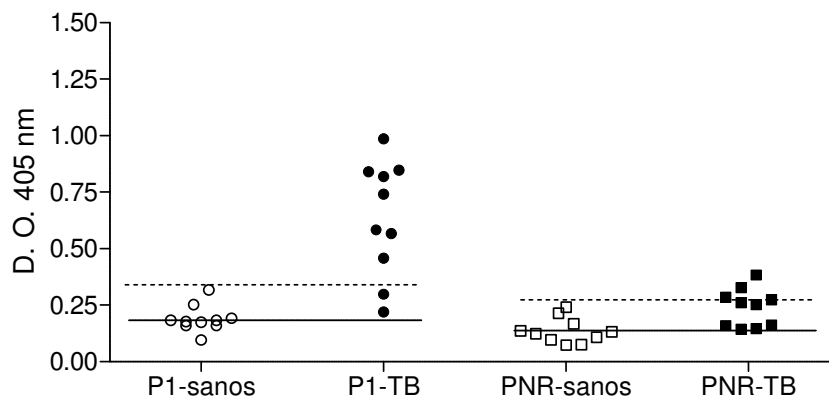
Con estos resultados se realizaron varios ELISA utilizando los tres péptidos como se muestra en la Fig. 17, y aun cuando no es evidente la diferencia, con la experiencia en el laboratorio y el trabajo previo con el antígeno nativo (AM), dieron la pauta para trabajar solo con P1 y utilizarlo como antígeno para explorar si este reactivo es capaz de diferenciar a los sueros de individuos sanos de los enfermos en una muestra mayor. En la Figura 18 se muestra el resultado de un ensayo preliminar utilizando un panel pequeño de sueros y un control de un péptido no relacionado.

### Reactividad de sueros humanos a péptidos sintéticos



**Figura 17.** ELISA con los 3 péptidos elegidos de las clonas. La reactividad de los sueros de enfermos va del 60 al 80 % dato favorable para la sensibilidad de la prueba diagnóstica.

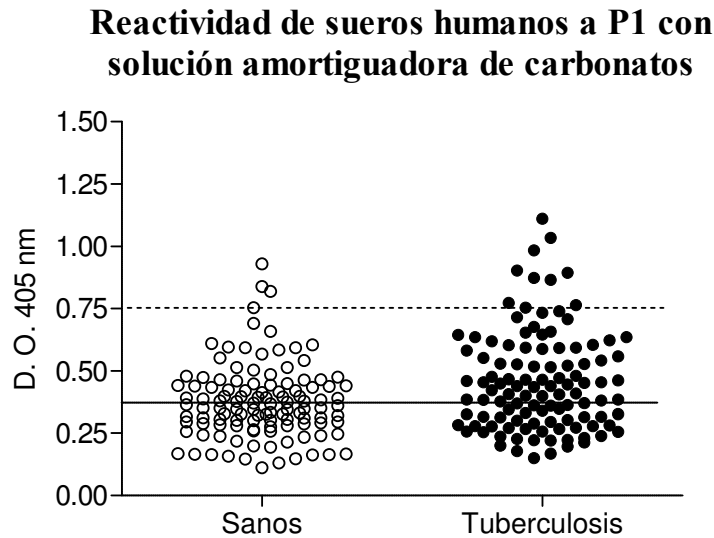
### Reactividad de sueros humanos a los péptidos sintéticos P1 y PNR



**Figura 18.** Reactividad de P1 y de un péptido no relacionado (PNR) con sueros de individuos sanos y de individuos con tuberculosis, la línea punteada indica 2.5 desviaciones estándar.



Con este ensayo, se decidió utilizar entonces todo nuestro banco de sueros de individuos sanos y de enfermos cuyo resultado se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Reactividad de P1 con 97 sueros de individuos sanos y 110 sueros de individuos con tuberculosis activa, evaluada mediante ensayo inmunoenzimático.

Al ampliar la cantidad de individuos analizados se observó que el péptido sintético P1 no funciona para diferenciar entre sueros de individuos sanos y tuberculosos tendiendo una especificidad de 96.52% y una sensibilidad de 9.90%. Considerando los resultados obtenidos con el suero de conejo anti-AM, el mimetismo antigénico de este péptido era claro, por lo que no debía descartarse que los resultados poco favorables fueran producto de una mala selección de las condiciones del inmunoensayo. En particular, es sabido que el uso de péptidos como antígenos en un inmunoensayo debe considerar aspectos estructurales, tales como punto isoeléctrico, que favorezcan la adsorción del antígeno sobre las placas de microtitulación. Alternativamente, es común el uso de

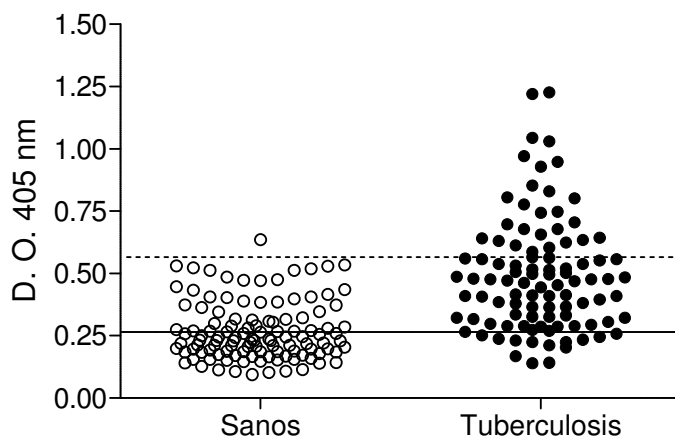
enlaces químicos entre péptidos y reactivos auxiliares que faciliten la adsorción del péptido o la medición de la reacción antígeno-anticuerpo. Por lo tanto se llevaron a cabo 2 estrategias diferentes con el fin de optimizar el uso de P1 como antígeno de inmunodiagnóstico de tuberculosis.

#### **VIII. 3. 4. Optimización del uso del péptido sintético P1 como antígeno para inmunodiagnóstico de tuberculosis**

La adsorción de oligopéptidos en placas de microtitulación ha sido optimizada en algunos trabajos mediante activación de la superficie plástica por irradiación ultravioleta (64). En principio, este procedimiento es capaz de generar la energía suficiente para modificaciones fotoquímicas de superficies plásticas. En este caso, dichas modificaciones favorecerían la adsorción de péptidos mediante cambios de polaridad de la superficie para adsorción del antígeno. Adicionalmente, este ensayo incluyó el cambio de solución amortiguadora, de acuerdo con protocolos recomendados para el uso de antígenos peptídicos.

En la Figura 20 se muestra la reactividad del P1 con sueros humanos, mediante inmunoensayo realizado sobre una placa irradiada con luz UV. Es interesante observar que, si bien la diferencia de reactividad entre los dos grupos de sueros (sanos e infectados) no es muy grande, sí pudo observarse una mayor consistencia de densidades ópticas incrementadas únicamente en el grupo de individuos infectados. Al analizar los datos, encontramos que con estas condiciones, el ensayo brindó una sensibilidad de 31% con una especificidad de 99.0%.

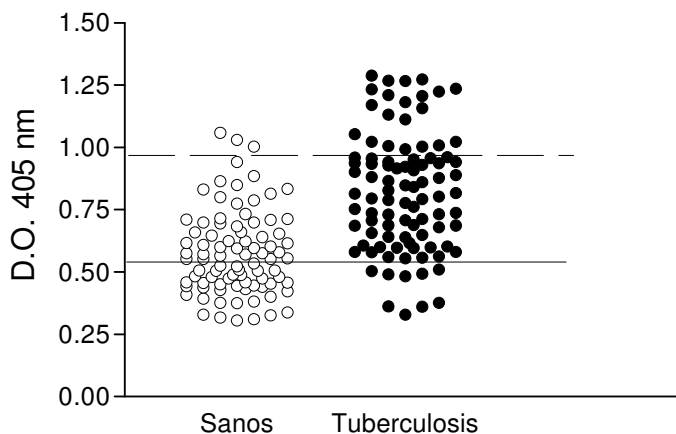
### Reactividad de sueros humanos a P1 utilizando solución amortiguadora de boratos



**Figura 20.** Reactividad del péptido sintético 1 (P1) con sueros humanos de individuos sanos e infectados con *M. tuberculosis*.

La segunda estrategia considerada fue la de inmovilizar el P1 a través de un puente estreptavidina-biotina. Para ello, el P1 fue biotinilado mediante reacción con N-hidroxisuccinimidil-biotina. Posteriormente, el P1 no derivado y la biotina remanente fueron eliminadas por cromatografía, y el reactivo fue colocado sobre placas de inmunotitulación sensibilizadas con estreptavidina. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 21. Este inmunoensayo brindó una sensibilidad de 37% con una especificidad de 95%, mostrando resultados similares que el P1 adsorbido sobre placas fotoactivadas.

### Reactividad de sueros humanos a P1 acoplado a biotina



**Figura 21.** Reactividad de sueros humanos con el péptido sintético 1 (P1) inmovilizado a través de un puente biotina-avidina.

Con esta metodología se obtiene un resultado similar al utilizado con las placas activadas con luz UV, con lo que podemos decir que de las estrategias propuestas en este trabajo para un diagnóstico rápido y a bajo costo, se concretan a la utilización de un péptido mimótopo de la molécula arabinomanana con la unión de avidina para fijarlo mejor a la placa de inmunoensayo.

"De lo que no se puede hablar es mejor callar"  
Wittgenstein

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El resurgimiento de la tuberculosis ha promovido la búsqueda de biomarcadores que permitan hacer una detección de la enfermedad en una etapa inicial o incipiente, para empezar inmediatamente el tratamiento químico correspondiente. En esta carrera por obtener el mejor marcador, se ha visto que mucho se desconoce de los metabolomas del patógeno y del individuo infectado en los distintos estadios de la enfermedad. En el caso particular de anticuerpos producidos por un individuo infectado que pudieran funcionar como biomarcadores de la enfermedad, resulta evidente que los perfiles de reconocimiento de antígenos son altamente heterogéneos de un individuo a otro, y que un porcentaje considerable de anticuerpos están dirigidos en contra de epítomos no proteicos (26,42). La persistencia de la tuberculosis es multifactorial, y la detección oportuna con un inmunodiagnóstico condicionado a un solo antígeno, es poco probable. Así, aunque en el mercado actual existen varios sistemas inmunodiagnósticos, estos productos están basados en antígenos de producción recombinante en sistemas bacterianos, resultando en el uso de antígenos poco variados que dependen de sistemas de expresión tradicionales, y carentes de estructuras post-traduccionales, tales como los azúcares. Con una eficacia muy limitada, el uso de los sistemas diagnósticos actualmente disponibles ha sido proscrito por la Organización Mundial de la Salud (74), y la búsqueda de nuevos reactivos de diagnóstico para tuberculosis resulta apremiante.

Dentro de las tecnologías desarrolladas en las últimas décadas para la producción y bioselección de reactivos de diagnóstico se encuentra el *phage display*. Con este método, bibliotecas combinatoriales se han rastreado para identificar péptidos que mimeticen antígenos (mimótopos) o anticuerpos de uso terapéutico o preventivo. Ha sido posible identificar mimótopos de antígenos proteicos lineales, pero también mimótopos de antígenos conformacionales o con modificaciones post-traduccionales y no peptídicos (52). Los campos de aplicación de los mimótopos incluyen la producción de vacunas (71) o la de péptidos útiles para combatir ciertos tipos de cáncer (53).

En este trabajo utilizamos la técnica de *phage display* para identificar mimótopos de dos antígenos útiles para el diagnóstico de tuberculosis activa: la proteína glicosilada de 38 kDa y el polisacárido arabinomanano de *M. tuberculosis*. Por sus características estructurales, estos antígenos no son susceptibles de producción mediante ingeniería genética. En el caso de la proteína de 38 kDa, se sabe que se trata de una molécula específica de *M. tuberculosis*, y con muy baja expresión en la cepa de vacunación (67). Más aún, los anticuerpos contra esta proteína durante una infección estarían dirigidos en contra de motivos sacarídicos, ya que su eficacia, como biomarcador, disminuye drásticamente cuando el reactivo es producido en *Escherichia coli* (44,69) Por su parte, el arabinomanano es una molécula altamente antigénica que presenta cambios estructurales entre *M. tuberculosis* y otras especies micobacterianas (17) Contiene motivos sacarídicos compartidos con el lipoarabinomanano, una de las moléculas más prometedoras para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (39).

En este trabajo decidimos utilizar antígenos producidos en *Mycobacterium*, capaces de generar los polisacáridos específicos (M.

*tuberculosis*) y proteína de 38 kDa glicosilada (*M. smegmatis* recombinante). Utilizando estos productos, seleccionamos péptidos expresados en fagos filamentosos capaces de mimetizar cada uno de los dos antígenos.

El mimetismo de los fagos seleccionados fue demostrado por la capacidad de ser reconocidos específicamente por sueros hiperinmunes de conejo dirigidos en contra de los antígenos bacterianos. De manera interesante, el mimetismo de algunos de los péptidos identificados fue conservado cuando los insertos fueron analizados sin el contexto del fago M13, con péptidos sintéticos. Más aún, uno de los péptidos mimótopos fue capaz de generar, en conejos, anticuerpos en contra del antígeno nativo. La identidad de los epítomos mimetizados por los péptidos seleccionados queda por determinarse, lo cual podría abordarse mediante el uso de pruebas bioquímicas.

En este trabajo, la posible utilidad de los mimótopos de la proteína de 38 kDa y del arabinomanano como reactivos de inmunodiagnóstico no pudo ser demostrada. Nuestros resultados sugieren que el uso de mimótopos expresados en fago es poco viable, ya que los sueros humanos presentan una reactividad no despreciable en contra del fago, generando reacciones cruzadas. El fago M13 es un virus de *E. coli*, bacteria comensal en el tracto digestivo. Queda por explorarse si la realización de ensayos con preadsorción de anticuerpos anti-M13 es capaz de abatir esta reactividad. En cambio, el uso de péptidos sintéticos libres de fago parece prometedor. De acuerdo con nuestros datos, el uso de un único oligopéptido mimótopo, el péptido P1, fue capaz de proporcionar una sensibilidad de diagnóstico de 37%. Si bien este porcentaje resulta insuficiente para proveer un diagnóstico eficaz, es de resaltarse que la

sensibilidad que proporciona es equivalente o mayor a antígenos proteicos recombinantes utilizados de manera individual (69) Por lo tanto, proponemos como nuevo reactivo para inmunodiagnóstico de tuberculosis el péptido P1, el cual resulta de interés para pruebas en una muestra de individuos más amplia y definida (i.e. etapa de la enfermedad, poblaciones vacunadas y/o provenientes de zonas endémicas).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el encontrar un método que provea un 70% de sensibilidad sería suficiente para mejorar el control de la enfermedad. Será interesante explorar el uso de otros mimótopos sintéticos a fin de abarcar una población amplia y respuestas humorales heterogéneas.

Es de notarse que la poca disponibilidad de antígenos que brinden un inmunodiagnóstico eficaz ha sido la principal limitante de esta técnica como un método de diagnóstico rápido de tuberculosis activa. Otras alternativas de diagnóstico rápido corresponden a metodologías poco amigables, las cuales son adaptables a centros hospitalarios especializados, mas no a clínicas de primer nivel. En este sentido, nuestra propuesta para identificar mimótopos de los antígenos más prometedores para inmunodiagnóstico redundaría en la disponibilidad de reactivos de diagnóstico fácilmente accesibles, y en la producción de sistemas diagnósticos libre de alto riesgo biológico.



## APÉNDICE

### Crecimiento de micobacterias

- Medio líquido Sauton

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| - Citrato de fierro y amonio    | 0.05 g |
| - Sulfato de magnesio           | 0.5 g  |
| - Fosfato de potasio monobásico | 0.5 g  |
| - Ácido cítrico                 | 2.0 g  |
| - Asparagina                    | 4.0 g  |
| - Glicerol                      | 60.0 g |

Disolver en aproximadamente 900 ml, se ajusta el pH a 7.2 – 7.3 con hidróxido de amonio y se afora a 1.0 litro

### Purificación de polisacaridos

- Solución amortiguadora disociante

|                    |         |
|--------------------|---------|
| - Trisma base      | 0.05 M  |
| - NaN <sub>3</sub> | 0.02%   |
| - EDTA             | 0.010 M |
| - NaCl             | 1.0 M   |

La solución se ajusta a pH 6.5

- Solución Eluyente

|               |         |
|---------------|---------|
| - Trisma base | 0.05 M  |
| - EDTA        | 0.010 M |

La solución se ajusta a pH 7.0

- Solución de antrona

|           |       |
|-----------|-------|
| - Antrona | 0.2 g |
|-----------|-------|

- Ácido sulfúrico concentrado 100.0 ml

Para la cuantificación, la solución es estable 12 horas al abrigo de la luz.

### **Soluciones para Inmunizar**

PBS Solución amortiguadora de fosfatos

Adjuvante Incompleto de Freund

### **Soluciones para ELISA**

- PBS 1X

- Fosfato de sodio 0.001 M

- Fosfato de sodio 0.01 M

- Cloruro de sodio 0.137 M

- Cloruro de potasio 0.0027 M

La solución se ajusta a pH 7.4

- Solución amortiguadora de carbonatos

- Bicarbonato de sodio 0.420 g

- Carbonato de sodio 0.178 g

La solución se prepara en un volumen de 50.0 ml pH 9.5

- Solución para bloquear

- PBS 1X 100.0 ml

- Bovine Serum Albumine (BSA) 2.0 g

- Solución de lavado

- PBS 1X 1.0 l

- Tween 20 1.0 ml

- Solución para dilución de sueros

|            |          |
|------------|----------|
| - PBS 1X   | 100.0 ml |
| - BSA      | 0.1 gr   |
| - Tween 20 | 0.1 ml   |

- Solución amortiguadora de dietanolamina

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| - Dietanolamina       | 10.0 ml |
| - Cloruro de magnesio | 10.2 mg |
| - Azida de sodio      | 40.0 mg |

Llevar la solución a 100 ml, y ajustar a pH 9.8 con ácido clorhídrico concentrado.

- Solución reveladora

Se prepara una solución de 1.0 mg/ml de 4-Nitrophenyl phosphate (4-NPP) disuelto en la solución amortiguadora de dietanolamina

### **Soluciones para la bioselección**

- Glicina

|           |       |
|-----------|-------|
| - Glicina | 0.2 M |
|-----------|-------|

La glicina se prepara en agua ultra pura, y se ajusta a un pH 2.2 con ácido clorhídrico concentrado

- Tris

|               |       |
|---------------|-------|
| - Trizma base | 1.0 M |
|---------------|-------|

El tris se prepara con agua ultra pura, y no es necesario ajustar el pH, la solución se usa así.

- Polietilenglicol (PEG)

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| - Cloruro de sodio      | 2.5 M  |
| - Polietilenglicol-8000 | 20.0 % |

La solución se esteriliza y se guarda a temperatura ambiente, se trabaja en esterilidad.

- TBS

- Tris 0.05 M
- Cloruro de sodio 0.150 M

La solución se ajusta a pH 7.5, se esteriliza y se guarda a temperatura ambiente, se trabaja en esterilidad.

- Medio Luria Agar

- Se prepara según las indicaciones de la casa comercial (Invitrogen), y después de esterilizar, se llenan las cajas de Petri

- Top Agar

- Medio 2-YT 3.1 g
- Agarosa 0.7 g
- Cloruro de magnesio 0.1 g

Se preparan 100 ml, y se esteriliza.

### **Soluciones para la secuencia de DNA**

- Solución de yoduro

- Tris pH 8.0 10.0 mM
- EDTA pH 8.0 1.0 mM
- Ioduro de sodio 1.0 mM

- Solución amortiguadora para corrimiento de geles de secuencia TBE

Tris

EDTA

Ácido bórico

- Solución stock de acrilamida/bisacrilamida 30/2%

Acrilamida 190.0 g

Bisacrilamida 10.0 g

Aforar a 500 ml, filtrar y almacenar a 4°C

- Gel de secuencia 8%

Urea 39.6 g

Stock acrilamida/bisacrilamida 16.0 ml

TBE 10 X 8.0 ml

Agua milliQ 26.4 ml

## Reactivos

- Freund's Adjuvant Incomplet Adyuvante incompleto de Freund  
SIGMA
- BSA Bovine Serum Albumine SIGMA
- Anti – M13 Anti-M13 monoclonal antibody  
Amersham
- IgG anti – Rabbit Anti-rabbit IgG (whole molecule)  
Alkaline phosphatase conjugate  
developed in goat. Sigma
- IgG anti – Human Anti-human IgG (whole molecule)  
Alkaline phosphatase conjugate  
developed in goat. Sigma
- Nitrofenilfosfato 4-Nitrophenyl phosphate  
(4-NNP). ROCHE
- LB Broth base. GIBCO BRL
- 2 – YT 2 – YT Btoth. INVITROGEN

## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Report 2008. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing. 2008.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control Epidemiology, strategy, financing. 2009.
3. Wang J.Y., Hsueh P.R., MD, Wang S. K., BS, Jan I. S., Lee L.N., Liaw Y.S., Yang P.C. and Luh K.T.. Disseminated Tuberculosis. A 10-Year Experience in a Medical Center. (Baltimore). 2007. 86(1):39-46.
4. LoBue P., Enarson D., Thoen T. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States. 2010. Int .J. Tuberc. Lung Dis. 14(10):1226–1232.
5. Orme,I.M. McMurray D.N. and Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. Tends in Microbiol. 2001 9:115-118
6. Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development. Vaccine 2005.18;23(17-18):2105-2108
7. Roche P.W. Triccas J.A., Avery D.T. Fifis, T., Billman-Jacobe H. and Britton WJ. Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination whit bacile Calmete-Guerin from infection with Mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis 1994 170:1326-1330
8. Migliori GB, Loddenkemper R, Blasi F y Raviglione MC.125 years after Robert Koch´s discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic. Eur. Respir. J. 2007; 29: 423-427
9. Flynn J.L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. Tuberculosis. 2004. 84(1-2):93-101
10. Haase A. T. Population biology of HIV-I infection viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. Annual Rev Immunol. 1999.17:625-656

11. Hirsh CS, Ellner JJ, Russell DG Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages .1994 Jan 15;152(2):743-53.
12. Dannenberg A.M. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: Basic principles. Indian J. Chest Dis Allied Sci. 1982. 24:68-77
13. Dannenberg A.M. Immune mechanism in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis. 1989 suppl 2:S369-378
14. Suhail Ahmad. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. 2010. Respiratory Research, 11(169):1-17
15. Kaufman SH and MCMichel JA. Annuling a dangerous liaison: Vaccination strategies against AIDS and tuberculosis.Nat.Med.2005.11:33-44
16. Inderlied C., Kemper C., and Bermudez. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev. 1993.6(3):266-310
17. I. Vergbe and M. Daffé. Frontiers in Bioscience.3: d865-d876. 1998
18. Nigou J., Gilleron M., and Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis Biochimie.2003.85 (1-2):153-166.
19. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *M. tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998. 393(6685):537-544.
20. Brennan P.J. Draper P. 1994. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis* in: Bloom BR. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press, USA 271-284 p.

21. Ehlers MR, Daffé M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key?. 1998. Trends Microbiol. 6(8):328-335. Review.
22. Quesniaux V., Fremont C., Jacobs M., Parida S., Nicolle D., Yermeev V, Bihil F., Erard F., Botha T., Drennan M., Soler M. N., Le Bert M., Schnyder B., Ryffel B. Toll like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. Microbes infect .2004. 6(10):946-959
23. Emoto M., Emoto Y., Buchwalow I., Kaufmann S. Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer t cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmete Guerin. Eur J Immunol. 1999.29:650-659
24. Geijtenbeek T.B.,VanVliet S., Koppel E., Sanches H., Vandenbroucke-Grauls, Appelmek B and VanKooyk. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. J Exp med.2003.197(1):1-5
25. Espitia C. and Mancilla, R.. Identification, isolation and partial characterization of *M. tuberculosis* glycoprotein antigens. Clin. Exp. Immunol. 1989.77: 378-383.
26. Harboe M. and Wiker H.G. The 38-kDa Protein of *M. tuberculosis*: a review. The Journal of Infectious Diseases. 1992.166: 874-884.
27. Torres A., Juárez M.D., Cervantes R., Espitia C. Molecular analysis of *M. tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). Microbial Pathogenesis. 2001. 30: 289-297.
28. Chang Z., Choudhary A., Lathigra R., Quioco F.A. The immunodominant 38-KDa lipoprotein antigen of *M. tuberculosis* is a phosphate-binding protein. The Journal of Biological Chemistry. 1994. 369 (3): 1956-1958
29. dha R. Y Kabra S.K. Newer diagnostic modalities for tuberculosis. Indian J. Pediatr. 2004.71(3): 221-227.



30. Gobec S., Plantan I., Mravilak J., Wilson R.A., Besra G.S., Kikeli D. Phosphonate inhibitors of antigen 85C, a crucial enzyme involved in the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. *Bioorg Med Chem Lett* 2004 Jul 5;14(13):3559-62
31. Rook G.W., Dheda K. and Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nature Reviews/ Immunology*. 2005. 5: 661-667.
32. Brooks J., Frank A., Keen M., Mellis J., and Orme I. Boosting vaccine for tuberculosis. *Infection and Immunity*.2001. 69(4): 2714–2717
33. Agger E, Rosenkrands I., Hansen J., Brahimi K, Vandahl B., Aagaard C., Werninghaus K., Carsten Kirschning C., Lang R., Christensen D., Theisen M., Follmann F., Andersen P. Cationic Liposomes Formulated with Synthetic Mycobacterial Cordfactor (CAF01): A Versatile Adjuvant for Vaccines with Different Immunological Requirements. 2008. 3(9):1-10
34. Restrepo IB. Nuevas herramientas para la detección de la tuberculosis latente. *Biomédica*. 2004; 24: 202-11.
35. Pai M, Kalantri S y Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II active tuberculosis and drug resistance. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6(3): 423-432.
36. Zenteno CR. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Res. Mex.* 2004; 16: 181-186.
37. Ajit Lalvani and Manish Pareek. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. 2010. *British Medical Bulletin*. 93: 69–84
38. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, Sanchez E, Pinedo Y, Saravia JC, Salazar C, Oberhelman R, Hollm-Delgado MG, LaChira D, Escombe AR y Friedland JS. Microscopic-observation drug susceptibility assay for the diagnosis of tb. *N. Engl. J.Med.* 2006; 355(15):1539-50.

39. Sada D.E. La respuesta inmune en la tuberculosis Gaceta Médica de México. 2003. 139(5):481-486.
40. Restrepo IB. Nuevas herramientas para la detección de la tuberculosis latente. Biomédica. 2004; 24: 202-11.
41. Pai M, Kalantri S y Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II active tuberculosis and drug resistance. Expert. Rev. Mol. Diagn. 2006; 6(3): 423-432.
42. Lyashchenko K., Colangeli R., Houde M., Al Jahdali H., Menzie, D., Gennaro M.L. Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. Infection and Immunity. 1998. Vol. 6, No. 8: 3936-3940.
43. Samanich K.M., Keen M.A., Vissa V.D., Harder J.D., Spencer J.S., Belisle J.T., Zolla-Pazner S., Laal S. Serodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of *M. tuberculosis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2000.7(4): 662-668.
44. Espita C., Cervera I., González R., Mancilla R. A 38-kD *M. tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. Clin. Exp. Immunol. 1989. 77: 373-377.
45. Chan E.D., Heifets L., Iseman M.D. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. Tubercle and Lung Disease. 2000.80(3): 131-140.
46. Houghton R.L., Lodes M.J., Dillon C.D., Reynolds L.D., Day C.H., McNeill P.D., Hendrickson R.C., Skeiky Y.A., Sampaio D.P., Badaro R., Lyashchenko K.P., Reed S.G. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2002.9:883-891.
47. Andersen A.B., Hansen E.B. Structure and characterization of antigenic domains of protein antigen b, a 38 000-molecular-weight protein of *M. tuberculosis*. Infection and immunity. 1989.57(8): 2481-2488
48. Daniel T. and Janicki BW. Mycobacterial antigens: a review of their isolation,

chemistry, and immunological properties. 1978. *Microbiological reviews*, 42(1):84-113.

49. Navoa J., Laal S., Pirofski I., Malean G., Dai Z., Robbins J., Schneerson R., Casadevall A., and Glatman-Freedman A. Specificity and diversity of antibodies to mycobacterium tuberculosis arabinomannan. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003. 10(1):88-94.

50. Hamasur B., Haile M., Pawlowski A., Schröder U., Källenius G. and Svenson S. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its Fab fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*. 2004. 138:30–38.

51. Daniel T. And Olds. Demonstration of a shared epitope among mycobacterial antigens using a monoclonal antibody. 1985. *Clin. exp. Immunol*. 60: 249-258.

52. Monzavi-Karbassi P., Cunto-Amesty G., Luo P. and Kieber-Emmons T. Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. 2002. *TRENDS in Biotechnology*. 20(5): 207-214.

53. Meng Li, Zhen Yan, Wei Han and Yingqi Zhang. Mimotope vaccination for epitope-specific induction of anti-CD20 antibodies. 2006. *Cellular Immunology* 239: 136–143

54. Bothamely G.H. and Rudd R.M. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of *M. tuberculosis*. *Eur. Respir. J*. 1994. 7:240-246.

55. Beck S.T., Leite O.M., Arruda R.S., Ferreira A.W. Humoral response to low molecular weight antigens of *M. tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2005. 38(4):587-96

56. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel express vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985.14,228(4705):1315-1317

57. Meola A., Delmastro P., Monaci P., Luzzago A., Nicosia A., Felici F., Cortese R., Galfre G. Derivation of vaccines from mimotopes. *Immunologic*

properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J. immunol.* 1995. 154(7):3162-3172

58. Meloen R., Puijk J. Slootstra. Mimotopes: realization of an unlikely concept. *Journal of Molecular Recognition.* 2000. 13: 352-359. Review

59. Desmond G. Higgins and Paul M. Sharp. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 1988. 73 : 237-244

60. Julie D. Thompson, Toby J. Gibson, Frédéric Plewniak, François Jeanmougin and Desmond G. Higgins. The CLUSTAL \_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No. 24 { 1997

61. Ramu Chenna, Hideaki Sugawara, Tadashi Koike, Rodrigo Lopez, Toby J. Gibson, Desmond G. Higgins and Julie D. Thompson. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*,. 2003. 31: 13 3497–3500DOI: 10.1093/nar/gkg500

62. Waksman BH., Porter H., Lees MD, Adams RD and Folch J.A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. 1954. *J. Exp. Med.* 100(5):451-471

63. Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma J, Espitia C, Manoutcharian K y López ML. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem. J.* 2005; 387:411-417.

64. Boudet F, Théze J y Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol. Methods.* 1991 ; 142 :73-82.

65. Suhail Ahmad. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection.2010. *Respiratory Research.* 11:169

66. Bonington A., Strang G., Klapper P., Hood S., Rubombora W., Penny M., Willers R. and Wilkins E. Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium*

*tuberculosis* PCR in Early Diagnosis of Tuberculous Meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998. 36(5):1251-1254.

67. Andersen A. and Hansen E Structure and Mapping of Antigenic Domains of Protein Antigen b, a 38,000-Molecular-Weight Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 1989. 57(8):2481-2488

68. Suman Laal, karen M. Samanich, Michael G. Sonnenberg, Susan Zolla-pazner, J. M. Phadtare, and John T. Belisle. Human Humoral Responses to Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: Immunodominance of High-Molecular-Mass Antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1997. 4 (1):49-56

69. Lyashchenko K., Colangeli R., Houde M., Al jahdali H., Menzies D. and Gennaro L. Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. *Infection and Immunity*,1998. 66 (8):3936-3940

70. Pheiffer, C., Betts JC., Flynn HR., LukeyPT. and van Helden P. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 2005. 151:1139-1150

71. Monzavi-Karvassi B., Cunto-Amesty G., Luo P. and Kieber-Emmons T. Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discoveri. 2002. *Trends in Biotechnology*. 20(5):207-213.

72. Li Xu, Bo-quan Jin and Dai-ming Fan. Selection and identification of mimic Epitopes for Gastric Cancer-associated Antigen MG7 Ag. 2003. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2:301-306.

73. Vercellone A., Nigou J. and Puzo G. Relationship between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. 1998. *Frontiers in Bioscience* 3:149-163.

74. Morris K. WHO recommends against inaccurate tuberculosis test. 2011. *Lancet*, jan8;377(9760):113-114

A nuestro instinto más poderoso,  
a ese tirano que llevamos dentro,  
no sólo se somete nuestra razón,  
sino también nuestra conciencia

Nietzsche