



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS

“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE  
CELULAR Y HUMORAL EN RATONES,  
INDUCIDA POR LA PROTEÍNA Apa DE  
*Mycobacterium tuberculosis* Y SUS FORMAS  
RECOMBINANTES”.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ ALBERTO MARTÍNEZ SOTELO**

Tutor: Dra. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

MÉXICO, D. F.

JUNIO/2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN .....	7
EPIDEMIOLOGÍA .....	8
PATOGENESIS .....	10
DIAGNÓSTICO .....	11
RESPUESTA INMUNE .....	12
ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS .....	16
Antígenos secretados .....	16
Glicoproteínas .....	17
Antígeno rico en Alanina y Prolina (Apa) .....	18
Propiedades Fisicoquímicas de Apa .....	18
Propiedades Antígenicas de Apa .....	19
JUSTIFICACIÓN .....	20
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVOS .....	21
MÉTODOS .....	22
Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y medidas de seguridad. ....	22
Obtención de proteínas del medio de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
Purificación de las proteínas .....	22
Proteína Apa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22

Proteína Apa recombinante de <i>Streptomyces lividans</i> .....	23
Proteína Apa recombinante de <i>Escherichia coli</i> .....	24
Análisis de proteínas. ....	24
Electroforesis. ....	24
Inmunotransferencia.....	24
Obtención de la proteína para inmunización.....	25
Inmunización de ratones.....	25
Detección de anticuerpos por ELISA. ....	26
Evaluación de la respuesta Inmune Celular .....	26
RESULTADOS.....	27
Obtención de la proteína Apa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....	27
Purificación de Apa recombinante en <i>Streptomyces lividans</i> .....	33
Purificación de Apa recombinante en <i>Escherichia coli</i> . ....	36
Evaluación y comparación de la respuesta inmune.....	37
Respuesta Inmune Humoral.....	38
Respuesta Inmune Celular .....	39
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
CONCLUSIONES .....	52
PERSPECTIVAS.....	53
REFERENCIAS.....	54

### **Abreviaturas y acrónimos.**

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**- Sulfato de amonio.

**°C.**- Grados centígrados.

**Ala.**- Alanina.

**ANOVA.**- Análisis de varianza.

**Apa.**- Antígeno rico en prolina y alanina.

**APC.**- Aloficocianina.

**BCG.**- Bacilo Calmette y Guérin.

**BSA.**- Albúmina sérica bovina.

**CFP-10.**- Proteína de filtrado de cultivo-10.

**CFSE.**- Carboxifluorescein diacetato succinimidil ester.

**CMI.**- Inmunidad mediada por células.

**CO<sub>2</sub>.**- Dióxido de carbono.

**Con-A.**- Concanavalina-A.

**DAB.**- N, N- Diaminobenzidina.

**DC-SIGN.**- Molécula sujetadora no integrina de adhesión intracelular específica de células dendríticas.

**DMSO.**- Sulfóxido de dimetilo.

**DO<sub>280</sub> ó 450nm.** Densidad óptica a 280 ó 450nm.

**DPBS.**- Amortiguador fosfato salino de Dulbecco.

**DTH.**- Hipersensibilidad retardada.

**ELISA.**- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

**ESAT-6.**- Blanco antigénico de secreción temprana de 6 Kilodaltones.

**Gp.**- Material acoplado a la columna de Con-A.

**h.**- Hora.

**HBHA.**- Hemaglutinina de unión a heparina.

**HCl.**- Ácido clorhídrico.

**HPR.**- Peroxidasa.

**IgA.**- Inmunoglobulina A.

**IgG.**- Inmunoglobulina G.

**IL.**- Interleucina.

**INF-γ.**- Interferón gamma.

**iNOS.**- Sintasa de óxido nítrico inducible.

**KDa.**- Kilodalton.

**L.**- Litros.

**LAM.**- Lipoarabinomananos.

**M.**- Molar.

**ManLAM.**- Lipoarabinomananos manosilados.

**ManLAM.**- Lipoarabinomananos.

**MDR-TB.- Cepas de tuberculosis multirresistentes a fármacos.**  
**MHC-I y II.- Complejo mayor de histocompatibilidad I y II.**  
**min.-Minuto.**  
**mL.- Mililitros.**  
**mM.- Milimolar.**  
**mV.- Milivolts.**  
**N- terminal.- Amino terminal.**  
**NaCl.- Cloruro de sodio.**  
**NF- $\kappa$ B .- Factor de transcripción nuclear kappa-beta.**  
**NK.- Células asesinas naturales.**  
**no Gp.- Material no acoplado a la columna de Con-A.**  
**NOD.- Dominios de oligomerización de unión a nucleótidos.**  
**PAMP.- Patrones moleculares asociados a patógenos.**  
**PBS.- Amortiguador fosfato salino.**  
**PE.- Ficoeritrina.**  
**PP.- Proteínas precipitadas.**  
**PPD.- Derivado proteínico purificado.**  
**Pro.- Prolina.**  
**PRR.- Receptores de reconocimiento de patógenos.**  
**PVDF.- Difloruro de polivinilideno.**  
**rpm.- Revoluciones por minuto.**  
**SBF.- Suero fetal bovino.**  
**SDS-PAGE.- Electroforesis con geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.**  
**Ser.- Serina.**  
**SIDA.- Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.**  
**TB.- Tuberculosis.**  
**Thr.- Treonina.**  
**TLR.- Receptores tipo Toll.**  
**TNF- $\alpha$  .- Factor de necrosis tumoral alfa.**  
**Treg.- Células T reguladoras.**  
**VIH.- Virus de inmunodeficiencia humana.**  
**XDR-TB.- Cepas de tuberculosis extra-multirresistentes a fármacos.**  
 **$\alpha$  $\beta$ .- Alfa-beta.**  
 **$\gamma$  $\delta$  .- Gamma-delta.**  
 **$\mu$ m.- Micrómetros.**  
 **$\mu$ M.- Micromolar.**

## RESUMEN

La tuberculosis continua siendo un problema de salud mundial, por tal motivo, es muy importante la búsqueda de nuevas herramientas que permitan combatirla. Una de las estrategias utilizadas, ha sido la identificación de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune protectora que en el caso de la tuberculosis es principalmente la respuesta mediada por linfocitos T. Dentro de los antígenos con esta característica esta la proteína Apa, una glicoproteína manosilada inmunodominante presente en el filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, la cual además de ser reconocida por anticuerpos, produce una respuesta de hipersensibilidad retardada e induce proliferación de linfocitos T y secreción de IFN- $\gamma$ . Interesantemente, la actividad biológica de este antígeno ya sea como adhesina y/o como inductor de la respuesta celular ha estado asociada a la presencia de azúcares. Sin embargo, estos estudios se han visto limitados por la dificultad de contar con cantidades suficientes de la proteína glicosilada.

Una alternativa para producir las proteínas de *M. tuberculosis* con modificaciones post-trasduccionales como la glicosilación ha sido la de expresarlas en *Streptomyces lividans*. En el presente trabajo, se evaluó y comparó la respuesta inmune humoral y celular a la proteína Apa y sus formas recombinantes expresadas en *S. lividans* y *Escherichia coli* en el ratón. Los animales fueron inoculados intraperitonealmente con la proteína nativa y las células del bazo fueron estimuladas con la proteína nativa y sus formas recombinantes obtenidas en *E. coli* y *S. lividans*. El porcentaje de proliferación se determinó por citometría de flujo, encontrándose que la proteína Apa expresada en *S. lividans* induce una mayor respuesta linfoproliferativa comparada con la proteína nativa (p-valor < 0.05) a una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ . Asimismo, la proteína Apa recombinante expresada en *E. coli* estimuló un escaso nivel de proliferación comparado con la proteína nativa y la recombinante expresada en *S. lividans*.

En cuanto a la respuesta de anticuerpos, el título de inmunoglobulina G (IgG) fue de 100 y no hubo diferencias significativas en el reconocimiento de las proteínas recombinantes y la proteína nativa.

Estos resultados, tienen implicaciones importantes en cuanto a la utilización de *S. lividans* como una bacteria sustituta para la producción de proteínas modificadas postraduccionalmente como la evaluación bioquímica e inmunológica detallada y precisa, evitar trabajar con la cepa patógena de *M. tuberculosis*, evaluar el papel de estas modificaciones en la respuesta inmune al patógeno, entre otras.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* que afecta principalmente el pulmón, de donde puede diseminarse al sistema genitourinario, ganglios linfáticos, pleura, peritoneo y meninges. La infección se manifiesta en forma variada y dependerá de los factores inherentes del hospedero como la edad, inmunodeficiencia, malnutrición, etcétera; así como de la virulencia del microorganismo. Las bacterias del género *Mycobacterium* son bacilos no móviles y no esporuladas que poseen un alto contenido de G-C (61-71%) (Farer *et al.*, 1979; Palomino *et al.*, 2007).

Las micobacterias se caracterizan por poseer una pared celular con un alto contenido lipídico que representa hasta el 60% de su peso seco. La envoltura celular se compone de una barrera interna constituida por el complejo micolil-arabinogalactan-peptidoglicano y una barrera externa conformada por ácidos micólicos y un arreglo de lípidos (glicolípidos fenólicos y de trehalosa y sulfolípidos entre otros), intercalados con proteínas, fofatidilinositol-manósidos, lipomananos y lipoarabinomananos. Esta estructura única explica su inusual baja permeabilidad y por lo tanto contribuye a la resistencia a antibióticos comunes y agentes quimioterapéuticos. Además, la capa cerosa le confiere la característica idiosincrática del género: la ácido-alcohol resistencia que le permite retener con avidez el colorante carbol-fucsina, aun en la presencia de una mezcla alcohol-ácido. La extrema hidrofobicidad y la resistencia al daño de la pared micobacteriana hacen que esta sea considerada como un factor de virulencia y en este aspecto los componentes de la pared celular pueden ser efectores centrales en la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2005; Glickman & Jacobs, 2001; Palomino *et al.*, 2007).

La TB ha sido un continuo azote para la humanidad. Existen registros que indican que la enfermedad se conoció en Europa antes del cristianismo. Hipócrates la describió en la antigua Grecia y hay evidencias arqueológicas de lesiones tuberculosas en momias egipcias. Durante la Revolución Industrial su incidencia se incrementó debido a la urbanización, la alta densidad de población, la malnutrición y las condiciones inadecuadas de trabajo e ignorancia; alcanzando proporciones epidémicas durante los primeros años del siglo XIX, cuando se le llamó “la gran plaga blanca” (Palomino *et al.*, 2007).

Villemin en 1865, fue el primero en describir las lesiones de la TB con detalle y en 1882 la enfermedad fue considerada como infecciosa cuando Robert Koch logró aislar el agente causal en un medio de cultivo artificial y consiguió reproducirla en animales de experimentación (Bloom & Fine, 1994).



En 1906 Calmette observó que la infección por vía oral a cobayos con una cepa atenuada del bacilo de la TB confería resistencia a la reinfección por vía intravenosa. Posteriormente, Calmette y Guérin lograron aislar una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* denominado Bacilo Calmette y Guérin (BCG), que se ha administrado como vacuna desde 1921, con resultados de protección muy variables que van de 0 a 80% para la enfermedad pulmonar (Bloom y Fine, 1994); sin embargo, a pesar de la inconsistencia en la protección para tuberculosis pulmonar, la vacunación con BCG previene de otras formas de la enfermedad como son la TB meníngea y la diseminada (Rodríguez *et al.*, 1993).

Aunque no se ha establecido el porqué de esta variabilidad, la hipótesis más aceptada señala que la infección previa con micobacterias ambientales o atípicas puede interferir con el efecto protector de la vacuna. Eso fue sustentado por un estudio que involucró cobayos expuestos a 4 diferentes especies de micobacterias atípicas *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gauss*. Los resultados indicaron que la infección con estas cepas proporcionaba diferentes grados de protección ante un reto con *M. tuberculosis* y el efecto protector de la vacuna BCG no era aditivo al previamente adquirido con las micobacterias atípicas, sino que disminuyó al ser comparado con la protección conferida por la BCG en animales no expuestos a estas bacterias. Así, la protección heteróloga inducida por las infecciones de micobacterias atípicas reduce la eficacia observada (aparente) de BCG (Bloom & Fine, 1994).

A pesar de los intensos esfuerzos para controlar la TB esta permanece como un problema de salud global por dos factores muy importantes: la asociación de la infección con el VIH (Virus de inmunodeficiencia humana) y el incremento en las cepas multirresistentes a los fármacos de primera elección, por lo que se necesitan nuevas estrategias terapéuticas y preventivas que actúen frente a la TB (Ahmad, 2010).

## **EPIDEMIOLOGÍA**

En su informe de 2011, la Organización Mundial de la Salud calculó que en el 2010 hubo 8.8 millones de casos nuevos de TB en todo el mundo y 1.45 millones de muertes. La tasa más alta de incidencia (50% de los casos aproximadamente) ocurrió en Asia (China, India, Indonesia, Pakistan, Bangladesh y Filipinas), seguida por África, en la cual el 80% de los casos estaban asociados a VIH-SIDA. El informe también menciona que en 2010 hubo cerca de 650,000 casos de cepas de TB multirresistentes (MDR-TB, por sus siglas en inglés) al menos a 2 de los más importantes fármacos de primera línea (rifampicina e isoniazida). También señala que en 2008 las cepas de resistencia extendida (XDR-TB, por sus siglas en inglés),

invulnerables adicionalmente a fluoroquinona, kanamicina, amikacina, viomicina o capreomicina, se encontraron en 55 países. Mientras que MDR-TB es difícil y muy costosa de tratar, XDR-TB es virtualmente una enfermedad intratable en muchos de los países en desarrollo (Suhail & Mokaddas, 2009).

Los estudios basados en población muestran que algunos individuos están en mayor riesgo de adquirir la infección y desarrollar la enfermedad activa que otros. La transmisión también ocurre con mayor frecuencia en países con alta incidencia de TB donde las casas son pequeñas y hay una excesiva cantidad de población (Frieden *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2004).

Estudios de epidemiología molecular, mostraron que hay diferencias en la presentación de la enfermedad y la demografía en los países de baja y alta incidencia de TB. En diversos países de África y Asia, donde la transmisión de *M. tuberculosis* es estable se ha incrementado en los últimos años, la tasa de incidencia es mayor entre los adultos jóvenes y muchos de los casos son resultado de recientes episodios de infección o reinfección. Por el contrario, en países de baja incidencia del oeste de Europa y Norte de América, una alta proporción de casos ocurre en pacientes mayores o entre inmigrantes de países de alta incidencia. (Frieden *et al.*, 2003; Mathema *et al.*, 2008). La TB pulmonar da cuenta de más del 85% de los casos de la enfermedad activa en países de alta incidencia, debido a los altos índices de transmisión activa, mientras que la extrapulmonar es común en países de baja incidencia, particularmente entre individuos infectados con VIH-SIDA e inmigrantes originarios de países endémicos de TB (Golden & Vikram, 2005; Mokaddas *et al.*, 2008).

En México, los desafíos actuales en el control de la TB son diferentes debido a la heterogeneidad de la población, la más amplia brecha socioeconómica, la inequidad en los servicios y hábitos de salud inadecuados. De acuerdo con la Plataforma Única de Información Nacional, en su módulo tuberculosis, en 2008 se presentaron alrededor de 18,210 casos nuevos en todas sus formas, de los cuales 82.5% (15,035 casos) corresponde a TB pulmonar (Secretaría de Salud, 2009).

La tasa nacional para las formas pulmonares de la enfermedad es de 14 por cada 100 mil habitantes. La proporción hombre: mujer es de 1.5:1 y aunque varía de un estado a otro, sigue siendo más frecuente en hombres en edad productiva. La TB infantil representa 3.1% del total de casos registrados. La tasa en mayores de 15 años (utilizada como indicador internacional) fue de 20 por 100 mil habitantes para 2008, lo que refleja un decremento importante en comparación con 1997, ubicada en 29.46 (Secretaría de Salud, 2009).

Si bien la TB no tiene una temporalidad definida en nuestro país, el menor número de casos registrados se presenta en los meses de noviembre, diciembre y enero, sin que se presente una variación importante en el registro en el resto de los meses del año. La situación de la TB en las entidades federativas presenta patrones de concentración bien definidos, con tasas de incidencia elevadas principalmente en el occidente y Golfo de México y con menor incidencia en los estados del centro. La mortalidad se incrementa conforme la edad aumenta, los adultos en edad productiva en conjunto con los de 65 y más años concentran el 94% del total de las defunciones, siendo estos últimos los que registran el mayor riesgo de morir con una tasa de 12 defunciones por cada 100 mil habitantes (Secretaría de Salud, 2008).

### **PATOGÉNESIS.**

La TB es una enfermedad que se transmite por vía aérea y los pacientes con TB pulmonar son las fuentes de infección más importantes. La infección es iniciada por la inhalación de aerosoles expectorados por pacientes con TB activa (Frieden *et al.*, 2003; Mathema, 2008).

El desarrollo de la TB se puede dividir en cuatro etapas:

En la primera etapa, el bacilo es destruido o inhibido en su crecimiento por los macrófagos alveolares que lo han fagocitado; si el bacilo no es destruido se multiplica y destruye el macrófago.

La segunda etapa (simbiosis); el bacilo crece logarítmicamente dentro del macrófago inmaduro, formando la primera lesión;

En el siguiente estadio, el número de bacilos viables es estacionario, porque el crecimiento ha sido inhibido por la formación de centros caseosos dentro de los cuales el bacilo no puede multiplicarse. Alrededor de este centro, los macrófagos inmaduros permiten la multiplicación intracelular, pero los activados inhiben y destruyen el bacilo. La evolución de la enfermedad depende del tipo de macrófagos que predominen en el centro caseoso.

Finalmente en la última etapa, el bacilo evade la respuesta inmune, el centro caseoso es destruido y frecuentemente se forma una cavitación, es así como el bacilo se multiplica extracelularmente. Los bacilos entran al árbol bronquial, se esparcen a otras partes del pulmón y son eliminados al ambiente (Dannenberg, 1991).

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de uso común depende de la identificación del bacilo en secreciones o tejidos del paciente; sin embargo, no es fácil aislar el bacilo en casos de enfermedad pulmonar, extrapulmonar circunscrita o en niños. Además las micobacterias son organismos de crecimiento lento y el cultivo frecuentemente toma de 2 a 6 semanas (Daniel & Debanne, 1987).

Las personas infectadas con *M. tuberculosis* pueden ser identificadas por la prueba de tuberculina 6 a 8 semanas después de la exposición al bacilo. La induración de más de 5 mm, registrada 48 a 72 horas después de la inyección del PPD, es considerada como positiva (Dye *et al.*, 1999) y si supera los 20 mm es usualmente debida a enfermedad activa; sin embargo, la prueba negativa en un paciente con TB activa puede ser resultado de anergia o incorrecta administración del PPD. Las desventajas de la prueba de la tuberculina son su variabilidad en la sensibilidad y especificidad, no puede diferenciar entre infección con *M. tuberculosis* y sensibilización con otras micobacterias ambientales. Asimismo, la vacunación previa con BCG puede proporcionar falsos positivos (Dye *et al.*, 1999; Frieden *et al.*, 2003).

La evidencia obtenida por radiografía de tórax, al igual que la prueba de la tuberculina, son útiles pero no contundentes, por lo que son necesarias otras pruebas de laboratorio capaces de detectar la enfermedad temprana. Las técnicas actuales de uso común para la identificación de *M. tuberculosis* en el laboratorio son: análisis de lípidos de pared (ácidos micólicos) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación del ADN ribosomal 16S (Cole *et al.*, 2005)

Los ensayos de liberación de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) basados en inmunidad celular (IGRAs, por sus siglas en inglés), se desarrollaron para detectar la producción de INF- $\gamma$  posterior a la estimulación con los antígenos ESAT-6 y CFP-10, los cuales mostraron ser sensibles y específicos (Brock *et al.*, 2001; Nahid *et al.*, 2006; Pai *et al.*, 2004; Pai *et al.*, 2008). Una variación de los IGRAs convencionales es la Citometría de Flujo, cuya ventaja es que utiliza una menor cantidad de volumen de sangre (< 1 mL); sin embargo, su utilidad es limitada debido al requerimiento de expertos y el alto costo de citómetros (Suhail *et al.*, 1999; El-Shazly *et al.*, 2007; Fuhrmann *et al.*, 2008).

Los métodos moleculares tienen una sensibilidad mayor que el examen por frotis pero menor que el cultivo. Ocurren generalmente falsos positivos y falsos negativos, no pueden diferenciar entre bacilos muertos y vivos y son métodos muy costosos. Los métodos serológicos no han sido adecuadamente evaluados en zonas de alta

prevalencia de TB, generalmente personas infectadas con VIH proporcionan falsos negativos y los exámenes de anticuerpos no pueden distinguir entre infección latente y activa (Nazish, 2009).

## **RESPUESTA INMUNE**

La respuesta inmune contra la tuberculosis juega un papel fundamental en el resultado de la infección. La gran mayoría de la gente infectada por el bacilo tuberculoso (~90%) no desarrolla la enfermedad a través de su vida. Sin embargo, el riesgo de desarrollar TB incrementa considerablemente cuando la infección coexiste con una alteración en el sistema inmune, tal como el VIH o diabetes (Palomino *et al.*, 2007).

La infección con *M. tuberculosis* inicia con la fagocitosis del bacilo por macrófagos alveolares y células dendríticas. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) por receptores específicos de reconocimiento de patógenos (PRRs, por sus siglas en inglés), es central en la iniciación y coordinación de la respuesta inmune innata. (Suhail, 2010; Akira *et al.*, 2006). *M. tuberculosis* o sus componentes son reconocidos por receptores del hospedero que incluyen receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés), dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés), lectinas tipo C, como el receptor de manosa (CD207), la molécula sujetadora no integrina de adhesión intracelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) (Suhail, 2010; Jo, 2008), receptores de complemento, receptores Scavenger, receptores de proteína surfactante A, entre otros (Suhail, 2010).

La interacción de *M. tuberculosis* con TLRs inicia una señalización intracelular que culmina en la activación de una respuesta proinflamatoria, activando el factor de transcripción nuclear kappa-beta (NF- $\kappa$ B) y la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) e IL-12, quimiocinas y óxido nítrico, a través de la respuesta dependiente o independiente de la proteína MyD88 (Suhail, 2010; Jo *et al.*, 2007; Jo, 2008; Xu *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2003). Sin embargo, la bacteria ha desarrollado estrategias que apagan o modulan la respuesta inmune innata. Los ligandos de *M. tuberculosis* más importantes que interactúan con TLRs y otros receptores incluyen las lipoproteínas de 19 y 27 Kilodaltons (KDa), la glicoproteína de 38 KDa, los lipomananos y lipoarabinomananos manosilados (ManLAM). La fagocitosis por receptores de manosa dependiente de ManLAM es asociada con una respuesta antiinflamatoria, inhibiendo la producción de IL-12; asimismo ManLAM evita la maduración del fagolisosoma (Suhail, 2010; Kang *et al.*, 2005; Nigou *et al.*, 2001).

El macrófago alveolar infectado con *M. tuberculosis* produce citocinas inflamatorias y quimiocinas que sirven para que los monocitos, neutrófilos y linfocitos migren al sitio de infección, pero estos no son capaces de eliminar a la bacteria. En este período, la bacteria evita la maduración del fagolisosoma, se multiplica en el fagosoma y causa necrosis del macrófago (Suhail, 2010; Chen *et al.*, 2006). Mientras tanto, las células dendríticas maduras que ingirieron el bacilo migran a los nódulos linfáticos y activan células T (CD4+ y CD8+) que llegan al sitio de infección guiadas por las quimiocinas. La acumulación de macrófagos, células T, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales y estromales, guían a la formación del granuloma en el sitio de infección. La formación del granuloma separa al bacilo del resto del tejido pulmonar, evitando su propagación, y proporcionando el microambiente para las interacciones entre macrófagos y otras células del sistema inmune (Suhail, 2010).

Los estudios en modelos animales y en humanos han demostrado que una amplia gama de componentes inmunes (celulares y humorales) están involucrados en una efectiva respuesta contra *M. tuberculosis*; junto con los macrófagos y las células dendríticas, células T alfa-beta ( $\alpha\beta$ ), CD4+ y CD8+, células T localizadas CD1, células T gamma-delta ( $\gamma\delta$ ), así como las citocinas producidas por estas (Suhail, 2010; Tufariello *et al.*, 2003). Las células T CD4+ desarrollan funciones como producción de IL-2 y TNF- $\alpha$ , activación de macrófagos vía CD40, inducción de macrófagos y células dendríticas para producir citocinas inmunoregulatorias como IL-10, IL-12 e IL-15, (Cella *et al.*, 1996; Cooper, 2009) y además parecen ser críticas para la función citotóxica de las células T CD8+ mediada por IL-15 (Suhail, 2010; Cooper, 2009; Serbina *et al.*, 2001). Las células T CD8+ además de producir INF- $\gamma$  pueden controlar el crecimiento intracelular de la bacteria activando el mecanismo dependiente de óxido nítrico, que es independiente de la producción de INF- $\gamma$ , son citotóxicas para macrófagos infectados con la bacteria y pueden matar directamente a *M. tuberculosis* vía granulicina (Suhail, 2010; Cooper, 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que las células T CD1 y las células T  $\gamma\delta$  contribuyen a la protección contra TB (Suhail, 2010; Barral & Brenner, 2007; Beetz, 2008). Las células T CD1 reconocen glicolípidos, tales como lipoarabinomananos (LAM) que son abundantes en la pared celular de la micobacteria. Proteínas CD1, análogas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC-1, por sus siglas en inglés), tienen la capacidad para presentar antígenos lipídicos y lipopéptidos a las células T (Suhail, 2010; Barral & Brenner, 2007; Moody *et al.*, 2004).

Las células T  $\gamma\delta$  reconocen pequeños metabolitos que contiene fosfato (ligandos de fosfato), pueden tener un fenotipo CD8+ y funcionan en gran parte como células T citotóxicas. Pueden encontrarse en sangre periférica de sujetos sanos PPD+ y

secretan citocinas que pueden ser involucradas en la formación del granuloma (Munk *et al.*, 1990). Algunos estudios han demostrado que estas células fueron relativamente más comunes en pacientes con inmunidad protectora comparada con pacientes con inmunidad ineficiente (Tazi *et al.*, 1999; Ueta *et al.*, 1994).

Las células T reguladoras (T reg, por sus siglas en inglés) expresan Foxp3 y la gran mayoría CD25, son un grupo de células T CD4+ que son esenciales para mantener la tolerancia periférica y la homeostasis. Las T reg protegen al hospedero durante las infecciones evitando daños colaterales de la excesiva inflamación inducida por la respuesta inmune y recientemente se les ha asociado en la supresión de la respuesta inmune antimicrobiana, especialmente contra patógenos que establecen infecciones persistentes, entre ellos *Leishmania major* y *M. tuberculosis*. En infecciones murinas con *M. tuberculosis*, las T reg proliferan y se acumulan en los sitios de infección, evitan la eliminación de los bacilos y suprimen la respuesta de las células T  $\gamma\delta$  de memoria contra *M. tuberculosis*, también se observó que en el modelo murino una disminución en la carga bacteriana se asocia con la disminución en el número de las T reg. Por otra parte, pacientes con TB incrementaron el número de T regs que inhiben la producción de INF- $\gamma$ . (Periasamy *et al.*, 2011; Scott-Browne *et al.*, 2007).

Por otra parte, INF- $\gamma$  citocina clave para una respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* es producido principalmente por células T CD4+, CD8+ y células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés), actúa en conjunto con TNF- $\alpha$  y activa a los macrófagos para matar al bacilo, aumenta la presentación de antígenos reclutando células T CD4+ y/o células T CD8+ citotóxicas las cuales participan en la destrucción de la micobacteria y así previene al agotamiento de células T de memoria (Suhail, 2010; Chan & Flynn, 2004). INF- $\gamma$  induce la transcripción de más de 200 genes en los macrófagos, incluyendo el incremento de la expresión de MHC-II y la producción de óxido nítrico, radicales reactivos de nitrógeno y radicales de oxígeno, vía sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS por sus siglas en inglés) (Suhail, 2010; Chan & Flynn, 2004; Cooper, 2009; Scanga *et al.*, 2001).

TNF- $\alpha$  es una citocina importante en la protección contra *M. tuberculosis* en ratones y humanos, se produce en macrófagos, las células dendríticas y las células T. Esta citocina está involucrada en la respuesta inmune y en la inmunomodulatoria. Actúa en sinergia con IFN- $\gamma$  para incrementar la expresión de iNOS y para incrementar la actividad antimicobacteriana de los macrófagos. TNF- $\alpha$  inicia la migración celular y la formación de granulomas microbicidas e induce la expresión de quimiocinas como interleucina-8 (IL-8), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1 por sus siglas en inglés), entre otras; sin embargo su bloqueo guía a un sobrecrecimiento del patógeno

(Suhail, 2010; Algood *et al.*, 2003; Chan & Flynn, 2004; Cooper, 2009). Paradójicamente, TNF- $\alpha$  contribuye de manera significativa en el desarrollo de la inmunopatología asociada a la enfermedad (Bean *et al.*, 1999 Flynn & Chan, 2005).

Individuos con defectos en la producción de IL-12 o su receptor son altamente susceptibles a desarrollar TB activa (Lichtenauer-Kaligis, 2003). IL-12 induce la activación de células T CD4<sup>+</sup> que secretan citocinas INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Suhail, 2010; Cooper, 2009).

Las quimiocinas CC también son mediadores de la respuesta inmune, se secretan por macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, células endoteliales y otras células en el sitio de infección. CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 y otras son quimioatrayentes de monocitos, linfocitos, macrófagos, células dendríticas, células NK al sitio de infección y favorecen la respuesta Th1. En respuesta a IFN- $\gamma$  se producen las quimiocinas CXC (CXCL10 y CXCL9) las cuales atraen predominantemente linfocitos T y monocitos, propagando la respuesta de células T. Por otra parte, CXCL8, CXCL2 y CXCL1 son responsables de atraer células madre hematopoyéticas y granulocitos, y de la inflamación causada por neutrófilos en las etapas avanzadas de TB (Cardona, 2012).

Aun cuando los macrófagos son considerados el principal blanco de *M. tuberculosis*, recientemente se ha propuesto que otras poblaciones celulares pueden ser infectadas por la micobacteria, principalmente aquellas que son reclutadas de forma temprana. Sin embargo, los resultados obtenidos son controversiales, por ejemplo, hay reportes sobre las células NK, en los que se describe su capacidad de matar a la bacteria y otros donde el fenómeno no se observa. A pesar de lo anterior, se sugiere que esta población celular contribuye al control de la infección a través de la producción de citocinas, la inducción de la formación del granuloma y la transferencia de sus moléculas microbicidas a macrófagos infectados (Palomino *et al.*, 2007).

Por muchos años se estableció que la inmunidad mediada por células (CMI por sus siglas en inglés) era el mecanismo de defensa exclusivo contra patógenos intracelulares. Sin embargo, se ha observado que anticuerpos contra diversos patógenos intracelulares han modificado el curso de la infección. Es por esto que en la actualidad se ha establecido que una eficiente combinación entre la respuesta inmune celular y humoral puede ser la mejor elección para controlar ciertas enfermedades causadas por patógenos intracelulares. Hay evidencia que indica que los anticuerpos influyen en el desarrollo de TB pulmonar o diseminada. En 2005, se describió por primera vez que los anticuerpos humanos contra *M. tuberculosis* estimulaban una respuesta Th1 en lugar de disminuirla (de Valiere *et al.*, 2005). Por otra parte, niños con un bajo o nulo nivel de inmunoglobulina G (IgG) en el suero



estaban predispuestos a la diseminación de la micobacteria. En otro estudio se observó que la inmunoglobulina A (IgA) de saliva dirigida contra *Mycobacterium leprae* podría ser muy importante en la inmunidad protectora en mucosas. También, en la población indígena Totonaca de México, se asoció la presencia de altos títulos de anticuerpos contra el complejo antigénico Ag85 a pacientes con TB sin cavitaciones y a pacientes que se curaron con quimioterapia anti-TB. En contraste, los pacientes sin tales anticuerpos no presentaron un mejoría frente a la enfermedad (Cardona, 2012).

Aunque el efecto de los anticuerpos naturales en el curso de la TB es poco claro, los datos disponibles sugieren que ciertos anticuerpos pueden afectar favorablemente el curso de la infección. Además, la presencia de anticuerpos en el sitio de infección antes del ingreso de *M. tuberculosis* a las células y/o en hospederos inmunocomprometidos con una escasa CMI puede ser de particular importancia en la infección. Sin embargo, las condiciones óptimas para que los anticuerpos funcionen contra infecciones micobacterianas son escasamente entendidas (Cardona, 2012).

## **ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS**

Las bacterias patógenas interactúan con su hospedero en diferentes formas. Cada especie bacteriana ha evolucionado en forma única ya sea para atacar al hospedero o para evadir la respuesta inmune. *Mycobacterium* hace uso de un mecanismo sutil pero efectivo para vivir dentro del hospedero. No se han descrito exotoxinas pero mucho del tejido dañado se debe a la respuesta inmune del hospedero en el intento de combatir la infección. Janicki (1971) identificó 7 antígenos siguiendo una serie de fraccionamientos bioquímicos y reconocimiento con sueros hiperinmunes. Actualmente, los antígenos micobacterianos se designan con base en su peso molecular aproximado mediante geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) (Young *et al.*, 1992).

Se conoce un gran número de proteínas que son capaces de inducir respuesta inmune y muchas de ellas han sido seleccionadas para estudiar diferentes aspectos de la enfermedad. Para el inmunodiagnóstico por ejemplo, se han buscado antígenos inductores de respuesta inmune específica de especie, capaces de producir anticuerpos o hipersensibilidad retardada (Ivanyi, 2011).

### **Antígenos secretados.**

Se ha observado que la micobacteria muerta por calor no genera inmunidad de memoria (Orme & Collins, 1986), por lo que se ha puesto especial atención en las proteínas secretadas por considerarlas vitales para entender la interacción de

patógenos con el sistema inmune durante la primera fase de la infección. Las proteínas secretadas de *M. tuberculosis* son un grupo de proteínas expuestas al ambiente celular del hospedero, importantes en la fisiología y virulencia durante la infección del microorganismo y fueron objeto de algunos de los primeros estudios de la infección. Como un patógeno intracelular, *M. tuberculosis* sobrevive y crece dentro de los macrófagos. Las proteínas secretadas y exportadas están idealmente posicionadas para promover su sobrevivencia intracelular, ya sea por modificación del ambiente antimicrobiano del hospedero o para proteger al bacilo de las defensas del hospedero y del ataque de macrófagos. El desarrollo de mutantes ha permitido conocer la importancia de éstas en la patogénesis del bacilo. Estos estudios han demostrado que las proteínas de secreción tienen una función en la virulencia y pueden actuar como antígenos presentados al sistema inmune. Las proteínas secretadas pueden funcionar en el desarrollo de inmunidad protectora, lo que se demostró en experimentos en los cuales ratones y cobayos vacunados con estas proteínas fueron protegidos contra un reto con *M. tuberculosis* (Andersen, 1994; Pal & Horwitz, 1992).

Los linfocitos T aislados de ratones infectados con *M. tuberculosis* responden vigorosamente a las proteínas secretadas bacilares y estos antígenos pueden ser de importancia en la generación de inmunidad de protección contra la enfermedad. De esta manera, las proteínas secretadas de *M. tuberculosis* son candidatas para el desarrollo de vacunas y blancos de nuevos fármacos (Vallin *et al.*, 2006).

Se ha documentado que las proteínas de *M. tuberculosis* encontradas predominantemente en los sobrenadantes de cultivo inducen una fuerte respuesta inmune humoral y celular; entre estas encontramos a los antígenos 30 -31, 24, 22, 19 y 12 KDa. Por otra parte, un complejo proteínico inmunogénico de 45-47 KDa encontrado en sobrenadantes de cultivo de *M. bovis* BCG ha sido descrito como un inmunógeno dominante después de la inmunización de cobayos con BCG vivas (Romain *et al.*, 1992).

### **Glicoproteínas**

La modificación de proteínas con residuos glicosídicos está muy bien caracterizada en organismos eucariontes, donde la glicosilación diferencial tiene un impacto significativo en la función de la proteína (Lowe *et al.*, 2003).

Se ha observado en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* la existencia de un grupo de proteínas que se han definido como glicoproteínas debido a su unión a una lectina, Concanavalina-A (Con-A), dentro de estas se identificaron las proteínas de 38 KDa y 50-55 KDa (Espitia & Mancilla, 1989).

### **Antígeno rico en Alanina y Prolina (Apa)**

De las glicoproteínas existentes en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, Espitia *et al.*, (1995), identificaron la proteína de 50-55 KDa la cual presenta reactividad cruzada con el antígeno de 45-47 KDa de *M. bovis* (BCG). Este antígeno es rico en prolina y alanina por eso actualmente se denomina Apa, también puede identificarse como proteína de 50-55 KDa, complejo 45-47 KDa, glicoproteína de 45 KDa, antígeno de 45/47 KDa, antígeno MPT-32, proteína que se une a fibronectina (FAP-B), proteína inmunogénica MPT32 (UniProtKB, 2011).

Espitia *et al.*, (1995), encontraron una reactividad cruzada entre la proteína Apa de *M. tuberculosis* y la de *M. bovis* con un antisuero policlonal de conejo y con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína Apa de *M. tuberculosis* utilizando extractos protéicos de *M. bovis* BCG. El epítoto reconocido solo se presentó en las proteínas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG de las 11 especies de micobacterias evaluadas. La secuencia amino terminal y el contenido total de aminoácidos de estas proteínas muestran fuertes similitudes. Esta glicoproteína representa menos del 2% del material liberado durante el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (BCG) (Laqueyrie *et al.*, 1995).

#### **Propiedades Fisicoquímicas de Apa.**

Apa es una glicoproteína formada por 325 aminoácidos, con un peso molecular de 28.78 KDa y un punto isoeléctrico de 4.52 (Tuberculist Web server). Presenta O-manosilación (Dobos *et al.*, 1995), contiene una típica secuencia de señalización en su amino-terminal que le permite ser traslocada a través de la membrana plasmática por la ruta dependiente-SEC (Laqueyrie *et al.*, 1995), tiene la capacidad de unirse a fibronectina (Kumar *et al.*, 2003), se libera dentro de los fagosomas y otros compartimentos intracelulares de macrófagos infectados con BCG (Sable *et al.*, 2011). La proteína migra como una doble banda (47 y 45 KDa) en SDS-PAGE. La banda de 47 KDa pertenece a la proteína completa y la banda de 45 KDa corresponde a la proteína con un corte proteolítico en el carboxilo terminal entre la prolina<sup>275</sup> y la treonina<sup>276</sup>. Por otra parte, las diferencias entre la masa exacta de la proteína Apa determinada por espectrometría de masas y el método SDS-PAGE se relaciona con el alto porcentaje de prolina (20%) como ha sido demostrado para moléculas de colágeno ricas en este aminoácido (Horn *et al.*, 1999).

Estudios iniciales de unión a lectinas con proteínas de filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* sugirieron que el complejo de 50-55 KDa estaba glicosilado (Espitia y Mancilla, 1989; Espitia *et al.*, 1995). Su carácter de glicoproteína se sugirió a través de su unión a Con-A y la detección de carbohidratos con el sistema biotina-

streptavidina. Además, la digestión de estos con jack bean- $\alpha$ -D-manosidasa produjo una reducción del peso molecular y total eliminación de su unión a Con-A (Espitia *et al.*, 1995). Posteriormente, Dobos *et al.* (1995 y 1996) por medio de espectrometría de masas y secuenciación del amino-terminal (N-terminal), proporcionó la prueba química definitiva que la proteína Apa estaba verdaderamente O-glicosilada sobre residuos de treonina (Thr) con manosas con enlaces (1 $\rightarrow$ 2). Los sitios de glicosilación eran dominios ricos en prolina (Pro), alanina (Ala), Thr y serina (Ser) y los residuos de Thr glicosilados están 1 o 2 aminoácidos corriente abajo de un residuo de Pro. Dos residuos de Ala son localizados dentro de 1 a 2 aminoácidos corriente abajo del primero y segundo sitio de glicosilación. Se determinó que los residuos de Thr en las posiciones 10 y 18 fueron sustituidos con  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp (manobiosa), el residuo de Thr en la posición 27 fue sustituido con una única  $\alpha$ -D-Manp (manosa) y la Thr 277 fue sustituida con  $\alpha$ -D-Manp,  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp o  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp (manosa, manobiosa o manotriosa).

### **Propiedades Antigénicas**

La proteína Apa es reconocida por anticuerpos producidos por cobayos inmunizados con bacterias BCG vivas, además genera una potente respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH por sus siglas en inglés) (Romain *et al.*, 1993; Romain *et al.*, 1999), su homólogo en *M. avium* subespecie paratuberculosis activa células dendríticas e induce una polarización Th1. Por otra parte, induce una fuerte respuesta de anticuerpos caracterizada por un elevado nivel de IgG en suero y de IgA en los lavados nasales, también en células de tumores humanos de vejiga un anticuerpo monoclonal contra Apa suprimió la adhesión e internalización de BCG y fue necesaria la unión estable entre BCG y la mucosa de vejiga para la expresión de la actividad antitumoral inducida por BCG. (Sable *et al.*, 2011).

La evaluación inmunogénica de esta proteína ha presentado serios obstáculos, entre los que destacan las bajas cantidades de proteínas en los filtrados de cultivo, largas tiempos de incubación, la dificultad de crecer este microorganismo virulento porque requiere de condiciones de bioseguridad específicas, etcétera. De esta manera la proteína fue expresada en *Escherichia coli*; sin embargo, las moléculas recombinantes obtenidas fueron muy diferentes en su capacidad para estimular linfocitos T de cobayos *in vivo* e *in vitro* (Horn *et al.*, 1999). Asimismo, en un estudio paralelo se observó que las moléculas desglicosiladas, química o enzimáticamente, también presentaban una mucho menor capacidad para conseguir una reacción DTH *in vivo* o activar linfocitos T específicos *in vitro*. (Romain *et al.*, 1999), lo cual llevó a identificar la importancia de la fracción glicosídica en el desencadenamiento de la respuesta inmune.

Por lo anterior, la proteína Apa fue expresada en *Mycobacterium smegmatis*, donde la proteína si es manosilada, pero las moléculas recombinantes obtenidas también mostraron una menor capacidad para estimular linfocitos T de cobayos *in vitro*. El análisis de las moléculas por espectrometría de masas mostró que aunque se conservaban los sitios de glicosilación se presentaron cambios en la extensión global de la manosilación. El mayor porcentaje de moléculas tenía 8 residuos de manosa a diferencia de la proteína nativa que mayoritariamente tiene moléculas con 7 manosas. Esto incita a especular que además de la glicosilación, los cambios en la extensión de la manosilación pueden influir en la respuesta celular (Horn *et al.*, 1999; Romain *et al.*, 1999).

Por otra parte, se describió que la proteína Apa estimula una respuesta celular de linfocitos T CD4+ y secreción de INF- $\gamma$  en cobayos previamente inmunizados con bacterias BCG vivas, (Romain *et al.*, 1999), sin embargo, la proteína expresada en *E. coli* induce una respuesta celular mayoritariamente de linfocitos T CD8+ en células mononucleares de sangre periférica de individuos PPD positivos (Kumar *et al.*, 2003).

Finalmente, hay evidencia de que la respuesta inmune específica contra la proteína Apa puede proteger contra tuberculosis de manera similar a como lo hace BCG, lo cual fue revelado cuando cobayos inmunizados con una vacuna de DNA que expresa la proteína fueron retados con *M. tuberculosis* virulenta (Kumar *et al.*, 2003). Por la importancia de esta glicoproteína en la respuesta inmune. Lara *et al.* (2004), expresaron la proteína de 45/47 KDa en *Streptomyces lividans*, bacteria Gram-positiva, esporulante, micelial y no patogénica. Las cepas de *S. lividans* tienen la capacidad de producir proteínas de secreción, de glicosilar sus proteínas y también proteínas heterólogas. La existencia de vectores para expresión inducible de proteínas en *S. lividans* permite la producción de una gran cantidad de proteínas, las cuales pueden caracterizarse bioquímica e inmunológicamente. Vallin *et al.*, (2006), pudieron obtener Apa recombinante de *S. lividans*, determinaron que la proteína era antigénica y que producía altos títulos de anticuerpos específicos en el modelo murino. Por otra parte, Sable *et al.*, (2011) demostró que la proteína Apa expresada en *E. coli* era altamente inmunogénica y ofrecía un nivel significativo de protección en modelos animales, por medio de la administración intranasal de la proteína en una vacuna de subunidad multicomponente, sin embargo ninguno de estos estudios fueron comparados con la proteína nativa.

## **JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, la TB se ha convertido en un gran problema de salud mundial. La variabilidad de protección de la vacuna (BCG), incremento de personas infectadas con VIH, el difícil diagnóstico, incremento de cepas multirresistentes y las

precauciones de seguridad que se necesitan al trabajar con la cepa virulenta, son grandes obstáculos. Se ha observado que las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* son moléculas altamente inmunogénicas. El presente proyecto se enfoca en la proteína Apa, porque ésta tiene la capacidad de ser reconocida por anticuerpos, inducir DTH y respuesta de linfocitos T (CD4+ y CD8+). Sin embargo, existen obstáculos importantes que limitan su estudio, su obtención en forma nativa requiere de condiciones de bioseguridad ya que *M. tuberculosis* es un patógeno clasificado dentro del grupo de riesgo biológico nivel tres, aunado a esto los tiempos de crecimiento bacteriano son largos y las cantidades de proteína recuperada son demasiado pequeñas para realizar los estudios.

Se han desarrollado sistemas de ADN recombinante como una alternativa atractiva para obtener grandes cantidades de antígenos micobacterianos importantes en la respuesta inmune. Se utilizaron algunos sistemas como *E. coli* y *M. smegmatis*, pero se observó un cambio en la respuesta inmune, lo cual se atribuyó posteriormente a la glicosilación, sugiriendo que ésta juega un papel importante en la respuesta inmune. Por la importancia de la proteína Apa, *S. lividans* surgió como una nueva alternativa por su habilidad de glicosilar proteínas heterólogas, por no ser patógena, por su cercanía a *M. tuberculosis* y por su habilidad de producir proteínas de secreción.

Finalmente, la respuesta inmune obtenida contra la proteína Apa recombinante en *S. lividans* nos permitirá conocer si su comportamiento es comparable a la proteína nativa y el análisis de la respuesta a las tres proteínas permitirá identificar de manera general la importancia de la parte glicosídica en la respuesta inmune. Además, si la glicoproteína recombinante en *S. lividans* es capaz de comportarse inmunológicamente como la nativa, tendrá ventajas adicionales muy importantes: en primera instancia evaluación bioquímica e inmunológica de manera más detallada y precisa, sería más segura porque no se trabajaría con la cepa virulenta de TB, tiempos de producción menor, mayor cantidad de proteína, fácil manipulación del microorganismo, medios de cultivo baratos, entre otros.

## **HIPÓTESIS**

➤ La proteína Apa expresada en *S. lividans* inducirá una respuesta inmune similar a la proteína Apa de *M. tuberculosis* en ratones.

## **OBJETIVOS**

### **Generales**

- Evaluar y comparar la respuesta inmune inducida por la glicoproteína Apa de *Mycobacterium tuberculosis* con las proteínas recombinantes de *S. lividans* y *E. coli*.

## **Particulares**

1. Purificar la proteína Apa de *M. tuberculosis* y sus formas recombinantes expresadas en *S. lividans* y de *E. coli*
2. Evaluar la respuesta humoral por la determinación de anticuerpos en los sueros de los ratones.
3. Evaluar la respuesta de proliferación de linfocitos obtenidos del bazo de los ratones contra las proteínas Apa.

## **MÉTODOS**

### **Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* y medidas de seguridad.**

*M. tuberculosis* H37Rv se cultivó en el medio líquido sintético de Proskawer y Beck modificado por Youmans (1946) durante 4-6 semanas a 37°C.

La bacteria está clasificada en el grupo 3 de seguridad biológica por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos de América debido a su patogenicidad (National Institute of Health, 1986). Los patógenos clasificados en este grupo requieren de manejos especiales para evitar el riesgo de infección, debido a que la tuberculosis se puede adquirir por la inhalación de menos de 10 bacilos, por lo que para la manipulación de la bacteria el personal debe observar medidas de seguridad especiales.

### **Obtención de proteínas del medio de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.**

El medio de cultivo se filtró por vacío utilizando una trampa con fenol al 10%, a través de un filtro Whatman No. 3, posteriormente y de manera sucesiva a través de los filtros de 1.2, 0.45 y 0.22 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA). El filtrado se precipitó inmediatamente con 0.5 g/mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 4°C en agitación durante toda la noche. Se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min, las proteínas precipitadas (PP) se resuspendieron en un volumen mínimo de amortiguador fosfato salino pH 7.4 (PBS, por sus siglas en inglés) y se dializaron por 24 horas contra el mismo amortiguador. Las PP se cuantificaron, se almacenaron en alícuotas a -20 °C y se analizaron por SDS-PAGE.

### **Purificación de las proteínas**

#### **Proteína Apa de *Mycobacterium tuberculosis***

Para obtener una fracción enriquecida de la proteína Apa, las PP inicialmente se dializaron contra un amortiguador de acetatos 100 mM pH 5 toda la noche a 4°C, en membranas Spectra/Por MWCO 3500. Posteriormente se centrifugaron a 10,000

rpm, 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se dializó contra amortiguador catiónico pH 6 (anexo 1) toda la noche a 4°C, se centrifugó y el sobrenadante se pasó por una columna de Sepharosa Concanavalina-A, lavada previamente con 10 volúmenes de columna con amortiguador catiónico pH 6, la muestra se adicionó a razón de 1 mL por 1 mL de volumen de cama, el material no acoplado se lavo con amortiguador catiónico pH 6. La elución se llevó a cabo con 10 volúmenes de  $\alpha$ -metil manósido 0.01M en amortiguador catiónico pH 6, colectando fracciones de 1.2 mL. Se determinó la densidad óptica a 280 nm ( $DO_{280\text{ nm}}$ ) de las muestras eluidas y la columna se lavó con 10 volúmenes de amortiguador catiónico, 10 volúmenes de agua miliQ y se conservó en etanol al 20% a 4°C.

Las fracciones con  $DO_{280\text{ nm}} \geq 0.9$  se dializaron contra Tris-HCl (ácido clorhídrico) 20 mM pH 8.3 toda la noche a 4°C. Después se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, recuperando el sobrenadante y se sometió a cromatografía de intercambio aniónico a través de una columna de sepharose HiTrap-Q en un equipo UPLC ÄKTA. La columna se lavó con agua y con 10 volúmenes de columna de Tris-HCl 20 mM pH 8.3, antes de pasar la muestra. El material no acoplado se lavó con el mismo amortiguador y la elución se realizó con un gradiente de cloruro de sodio (NaCl) en Tris-HCl 20 mM pH 8.3, se analizaron por SDS-PAGE cada una de las fracciones que mostraron alguna respuesta en el cromatograma y aquellas fracciones donde se encontraba la proteína de interés se dializaron contra PBS pH 7.4.

### **Proteína Apa recombinante de *Streptomyces lividans*.**

La bacteria *S. lividans* cepa 1326 transformada con el plásmido pIJ6021MT-45 que contiene el gen *apa*, se cultivó en el medio Luria-Bertani adicionado con kanamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) y 34% de sacarosa (peso/volumen). El cultivo se llevó a cabo en un fermentador de 1L a 37°C por 60 h con la adición de inductor (thiostrepton 10  $\mu\text{g/mL}$ ) a las 16 h de cultivo. Posteriormente, el filtrado de cultivo fue centrifugado a 8,000 x g por 30 min a 4°C y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Los cultivos se llevaron a cabo en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Para purificar la proteína recombinante, el filtrado de cultivo se precipitó con sulfato de amonio al 73%, posteriormente el precipitado se dializó contra PBS pH 7.4 para eliminar toda la sal de la precipitación salina.

Para obtener una fracción enriquecida de esta proteína, la muestra obtenida previamente se dializó contra un amortiguador de acetatos 100 mM pH 5 toda la noche a 4°C, después se centrifugó a 10,000 rpm, 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se dializó contra Tris-HCl 20mM pH 8.3 toda la noche a 4°C, se centrifugó



a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se pasó a través de una columna de sepharose HiTrap-Q lavada previamente con agua y 10 volúmenes de columna de Tris-HCl 20 mM pH 8.3. El material no acoplado se lavó con el mismo amortiguador y la elución se realizó con un gradiente de NaCl, se analizaron cada una de las fracciones que mostraron algún pico en el cromatograma por SDS-PAGE y aquellas donde se encontraba la proteína de interés se dializaron contra PBS pH 7.4.

### **Proteína Apa recombinante de *Escherichia coli*.**

La proteína fue obtenida del banco de proteínas recombinantes del Laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia Pinzón, UNAM. La proteína se purificó por Cromatografía de Afinidad a Metales porque posee un tallo de histidinas. Posteriormente, la muestra fue pasada por la columna "Endotoxin removing gel", la cual fue previamente lavada con 5 volúmenes de agua libre de pirógenos y 5 volúmenes de cama de desoxicolato de sodio al 1%, se equilibró la columna con 5 volúmenes de cama de PBS pH 7.4 libre de pirógenos y se eluyó con el mismo amortiguador. Las muestras se cuantificaron y se analizaron por SDS-PAGE.

### **Análisis de proteínas.**

#### **Electroforesis.**

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE) de acuerdo con el método descrito por Laemmli, (1970). La separación electroforética se llevó a cabo en geles de acrilamida al 12% para el gel separador y 4.5% de acrilamida para el gel concentrador. Las muestras se diluyeron 1:1 en amortiguador de carga y se hirvieron durante 5 min en baño María. La electroforesis se corrió a 60 mV para gel concentrador y 120 mV para el gel separador.

#### **Inmunotransferencia.**

El gel se montó en una cámara de electrotransferencia (Hoefer Pharmacia Biotech) y se transfirió a membranas de difloruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) a 60 mV 80 min en amortiguador de corrida pH 8.4 (anexo 1). Posterior a la transferencia, la membrana se lavó 2 veces con PBS-Tween-20 0.05%, 3 min, cada vez, se incubó la membrana con el primer anticuerpo (anticuerpo monoclonal 6A3) a una dilución de 1:2000 en PBS-Tween 20 0.05%-albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés) 3%, 1 h a temperatura ambiente, después se lavó 3 veces con PBS pH 7.4-Tween-20 0.05%, 5 min cada vez. La membrana se incubó con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa, 1:2000), en PBS pH

7.4-Tween 20 0.05%-BSA 3%, 1 h a temperatura ambiente, se lavó como en el paso anterior, se reveló con DAB (N, N- Diaminobenzidina) en PBS pH 7.4 y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.1% y finalmente se lavó con agua.

Para la detección de carbohidratos (lectin-blot), la membrana se incubó con Concanavalina A (Con-A) marcada con peroxidasa (HPR) a una dilución de 1:1000 disuelta en PBS pH 7.4-Tween 20 0.05%- BSA 3% por 1 hora en agitación a temperatura ambiente, posterior a eso se dieron tres lavados con PBS pH 7.4-Tween 20 0.05% cinco minutos cada uno, se reveló con solución de PBS pH 7.4-DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1% y la membrana se lavó con agua.

### **Obtención de la proteína para inmunización.**

Los geles preparativos cargados con 150 µg (microgramos) de la proteína Apa de *M. tuberculosis* se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. En primera instancia, la membrana de nitrocelulosa se lavó con agua desionizada 10 min y con amortiguador de transferencia sin metanol por 10 min para equilibrarla y los geles preparativos al 12% se lavaron con amortiguador de transferencia por 20 min. Posteriormente, la transferencia se llevó a cabo en amortiguador de transferencia, 1.6 h a 20 miliampers y 4°C. La membrana transferida fue lavada con agua MiliQ y se tiñó con rojo de Ponceau. Las bandas de interés identificadas se procesaron de acuerdo a Aboud-Zeid *et al.* (1987). Primero se humedecieron y cortaron en trozos minúsculos, estos se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles, se adicionaron 500 µL de sulfóxido de dimetilo (DMSO, por sus siglas en inglés) para disolver los trozos y se dejaron 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 500 µL de amortiguador de carbonatos 50 mM pH 9.6 gota a gota agitando con el vortex en cada gota, así la nitrocelulosa se particularizó en un polvo muy fino, se centrifugó a 10,000 rpm, 1 min, se recuperó el precipitado y añadió 1 mL de PBS pH 7.4 estéril, se resuspendió completamente y se lavó 4 veces más con 1 mL de PBS pH 7.4 estéril. Finalmente, se resuspendió en el volumen necesario para inocular al ratón. Se realizó el mismo procedimiento con tiras de nitrocelulosa del mismo tamaño sin proteína y se inocularon las suspensiones con jeringas de insulina.

### **Inmunización de ratones.**

Se utilizaron ratones BALB/c, hembras de 6 a 8 semanas de edad en 3 grupos de 5 individuos. Grupo 1: Control inoculado con PBS pH 7.4, grupo 2: inoculado con PBS pH 7.4-Nitrocelulosa y grupo 3: inoculado con PBS pH 7.4-Nitrocelulosa-Apa *M. tuberculosis*. Cada ratón se inmunizó el día cero y al día 15 con 25 µg de proteína Apa de *M. tuberculosis* acoplada, con nitrocelulosa o con 100 µL de PBS pH 7.4. Se obtuvieron sueros al día 0, 21 y 30, y se sacrificaron al día 30.

### **Detección de anticuerpos por ELISA.**

Las proteínas Apa (nativa y recombinantes) se diluyeron en amortiguador de carbonatos 50 mM pH 9.6 para tener una concentración de 2.5 µg/mL. Placas de ELISA de 96 pozos se sensibilizaron con 100 µL de la solución de las proteínas, incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se lavó con PBS pH 7.4-Tween 20 al 0.05% durante 3 min en agitación. Se agregaron 200 µL de PBS pH 7.4-Tween 20 al 0.05%-BSA al 2% y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 1 vez y se incubó con 100 µL de suero diluido 1:100 en PBS pH 7.4-Tween 20 al 0.05%-BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces y se incubó con 100 µL de IgG completa-Peroxidasa diluida 1:2000 en PBS pH 7.4-Tween 20 al 0.05%-BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se lavó la placa 5 veces con PBS pH 7.4-Tween 20 al 0.05% durante 3 min en agitación. Se agregaron 100 µL de solución reveladora, se dejó 30 min en oscuridad y se leyó la  $DO_{450nm}$  en un lector de ELISA.

### **Evaluación de la respuesta Inmune Celular**

Los ratones utilizados se sacrificaron por punción cardiaca y se desinfectaron con etanol al 70%. Las células linfoides se obtuvieron del bazo, que fue extirpado asépticamente y colocado sobre una mallita (Cell stainer 70µm, nylon tamiz cellulare) en una caja petri estéril (Corning 35 mm x 10mm dish nopyrogenic sterile) conteniendo 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640- HEPES 20 mM-bicarbonato de sodio 26 mM (anexo 1). Los bazos fueron macerados con un émbolo de jeringa de 3 mL y se transfirió a un tubo falcon de 15 mL. El macerado se centrifugó a 1500 rpm, 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante sin llevarse las células. Se adicionó 1 mL de solución de lisis de glóbulos rojos, se mezcló y dejó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de amortiguador fosfato salino de Dulbecco (DPBS, por sus siglas en inglés) pH 7.4 estéril y se centrifugó a 1500 rpm, 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante por decantación, se resuspendieron las células en 3 ml de DPBS pH 7.4 estéril. Después se tomaron 10 µL y se mezclaron con 30 µL de Azul de Tripano, para así determinar la cuenta de las células viables por mililitro en la cámara de Neubauer. El número total de células vivas se calculó multiplicando el factor de dilución de la cámara ( $10^4$ ) por 4 que es el factor de dilución con el azul de tripano, dando como resultado el número de células por mililitro. Conociendo la concentración celular, y tomando en cuenta que se necesitan  $1.5 \times 10^6$  células por cada pozo a utilizar, se determina el volumen necesario para ser teñido con carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE, por sus siglas en inglés).

Por otra parte, se preparó una solución de trabajo 50  $\mu\text{M}$  de CFSE a partir del stock de 5 mM, siempre protegiendo de la luz. A partir de la solución de 50  $\mu\text{M}$  se preparó una solución de 2  $\mu\text{M}$  para la estimulación con el mitógeno (Concanavalina-A) y una de 1  $\mu\text{M}$  para la estimulación con los antígenos. Se mezclaron 1 mL de cada solución con 1 mL de células de cada ratón necesarias para el ensayo, adicionando la solución de CFSE por las paredes del tubo, resuspendiendo suavemente y protegiendo siempre de la luz. Los tubos se agitaron horizontalmente con movimiento lento durante 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 12 mL de RPMI-1640 completo (anexo 1), precalentado a 37°C, rápidamente por las paredes del tubo, se centrifugó a 1500 rpm, 5 min a 8°C, se descartó el sobrenadante, se lavaron las células con 10 mL de DPBS- Suero fetal bovino (SBF, por sus siglas en inglés) 5% dos veces, se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min a 8°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en RPMI-1640 completo, 0.75 mL de medio de cultivo por pozo.

Las células se cultivaron *in vitro*, en placas de 24 pozos de fondo plano a razón de  $1.5 \times 10^6$  células por pozo y se estimularon con 2  $\mu\text{g}$ /pozo de mitógeno o con 1, 5, 10 y 25  $\mu\text{g}$ /pozo de las proteínas Apa nativa y sus formas recombinantes, en un volumen final de 1 mL. Se incubaron durante 5 días con las proteínas Apa (nativa y recombinantes) o durante 4 días con el mitógeno a 37°C con 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y 90% de humedad. Las células se cosecharon, se bloquearon los receptores Fc, se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 conjugado con ficoeritrina (CD4-PE por sus siglas en inglés) y anti-CD8 conjugado con alofococianina (CD8-APC por sus siglas en inglés) anti-ratón por 15 min en hielo, se lavaron dos veces con DPBS pH 7.4-SBF 2%, se resuspendieron en 300  $\mu\text{L}$  de DPBS pH 7.4 y se leyeron en un Citómetro de flujo (FACS Calibur Becton Dickinson). El análisis de la proliferación fue llevado a cabo por el análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) y posteriormente sometido a una prueba *pos hoc* de Tukey. El p-valor establecido fue  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **Obtención de la proteína Apa de *Mycobacterium tuberculosis*.**

Apa de *M. tuberculosis*, es una glicoproteína que se encuentra en el filtrado de cultivo (FC) y se observa como un doblete a 45 y 47 KDa en SDS-PAGE. Después de la precipitación salina (FC-1) se realizó un fraccionamiento a pH 5.

La fracción soluble (Sn-5) y la fracción precipitada a pH 5 (pp-5), se analizaron en membranas de PVDF.

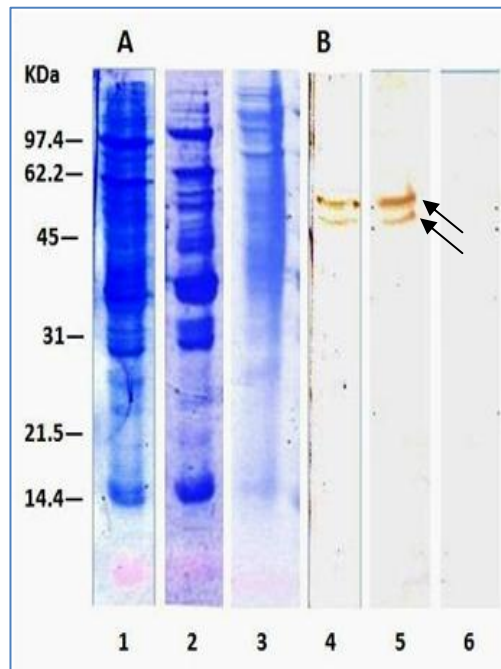


Figura. 1 SDS-PAGE de la precipitación salina y el fraccionamiento a pH 5 del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. El filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* se precipitó con 0.5 g/mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , las proteínas precipitadas se resuspendieron en PBS pH 7.4 y se fraccionaron con amortiguador de acetatos 100 mM pH 5. A. Membrana teñida con azul de Coomassie: carril 1: Filtrado de cultivo, carril 2: fracción soluble a pH 5, carril 3: fracción precipitada a pH 5. La proteína Apa de *M. tuberculosis* fue detectada con el anticuerpo monoclonal 6A3, panel B, obtenido previamente por Espitia *et al.* (1995). Carril 4: Filtrado de cultivo, carril 5: fracción soluble a pH 5, carril 6: fracción precipitada a pH 5. Se observa que la proteína Apa se encuentra en el filtrado de cultivo y se mantiene soluble a pH 5. Las flechas señalan la proteína Apa de *M. tuberculosis* que migra como una doble banda. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular.

En la figura 1, el panel A muestra los perfiles proteicos de las diferentes muestras analizadas (FC-1, Sn-5 y pp-5), observándose que después del fraccionamiento a pH 5 algunas proteínas se mantuvieron solubles (Sn-5) y otras precipitaron (pp-5).

Por otra parte, el inmunoblot con el anticuerpo monoclonal 6A3 obtenido contra la proteína Apa por Espitia *et al.* (1995) (figura 1, panel B), muestra que la proteína de interés se encuentra en FC-1 y en Sn-5 como se había descrito (Lara *et al.*, 2004).

Espitia y Mancilla (1989) identificaron y aislaron esta glicoproteína del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, a través de su afinidad a la lectina Concanavalina-A (Con-A). Basados en este reporte, la fracción soluble del fraccionamiento a pH 5 fue sometida a la Cromatografía de Afinidad a Concanavalina-A.

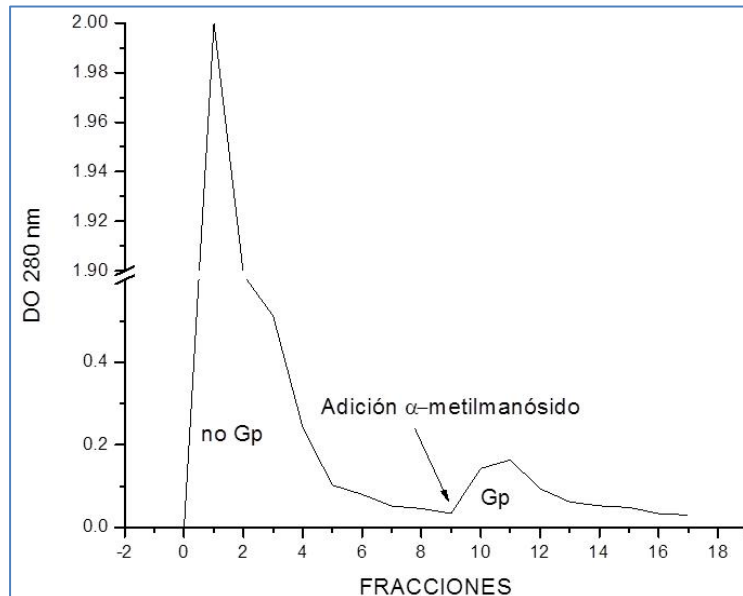


Figura. 2. Enriquecimiento de la proteína Apa de *M. tuberculosis* sobre una columna de Afinidad a Concanavalina-A. El sobrenadante del fraccionamiento a pH 5 fue cargado sobre una columna de afinidad a Concanavalina-A, el material no acoplado (no. GP) se lavó con amortiguador catiónico pH 6 (fracciones 1 a 9) y el material acoplado (Gp) se eluyó con  $\alpha$ -metil manósido 0.01M, colectándose fracciones con densidad óptica  $\geq 0.9$ . La flecha indica la adición del amortiguador de elución.

La figura 2 muestra el perfil cromatográfico típico de afinidad a Con-A; el primer pico (fracciones 1 a 9) pertenece a las proteínas que no tienen afinidad por la lectina (no-Gp). El segundo pico (Gp) se obtuvo después de adicionar el competidor  $\alpha$ -metil manósido, eluyendo así las proteínas glicosiladas dentro de las cuales se encuentra la proteína Apa (fracciones 10-12).

El rendimiento está entre 180-230  $\mu$ g de glicoproteína por miligramo de proteína total inicial, a partir de un cultivo de 6 semanas y después de 20 ensayos.

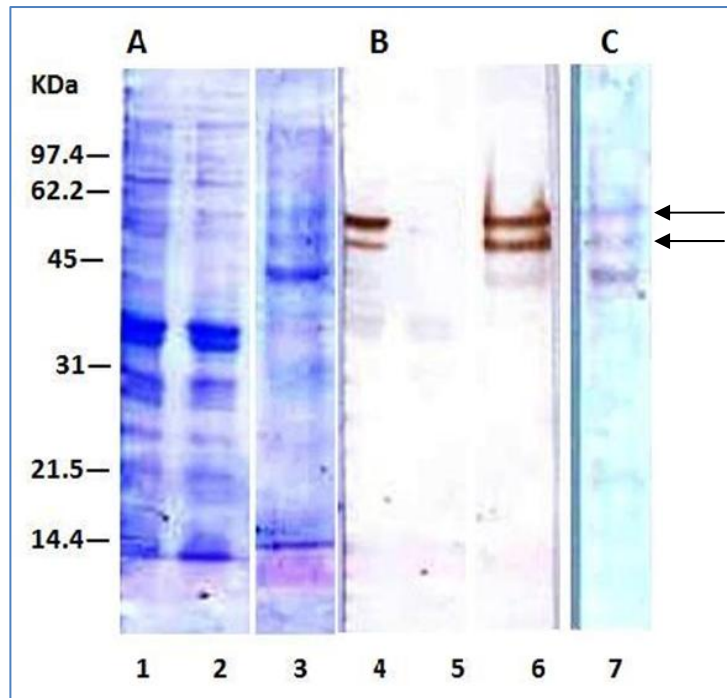


Figura. 3. SDS-PAGE del enriquecimiento de la proteína Apa de *M. tuberculosis* sobre una columna de Afinidad a Concanavalina-A. El sobrenadante del fraccionamiento a pH 5 fue cargado sobre una columna de Afinidad a Concanavalina-A, el material no acoplado se lavó con amortiguador catiónico pH 6 y se eluyó con  $\alpha$ -metil manósido 0.01M. A. Membrana teñida con azul de coomassie. Carril 1: Sobrenadante del fraccionamiento a pH 5, carril 2: fracción no acoplada (no Gp) a la columna de afinidad y carril 3: fracción eluida (Gp) de la columna de afinidad. La inmunodetección, panel B, se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal 6A3 (dilución 1:2000): carril 4: Sobrenadante del fraccionamiento a pH 5, carril 5: fracción no acoplada (no Gp) a la columna de afinidad y carril 6: fracción eluida (Gp) de la columna de afinidad. Para la detección de carbohidratos, panel C, la membrana PVDF se incubó con ConA-HPR (dilución 1:1000): carril 7: fracción de elución (Gp). Las flechas señalan la proteína Apa de *M. tuberculosis* que migra como una doble banda. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular

La fracción eluida de la cromatografía de afinidad a Con-A se analizó por SDS-PAGE. En la figura 3 se observan que la proteína de interés se encuentra en la fracción Gp, en el inmunoblot (panel B) se distinguen las dos bandas características de proteína nativa y con la tinción con azul de coomassie (panel A) se puede determinar que la proteína aún contiene contaminantes. Finalmente, para confirmar la presencia de manosas en la proteína se realizó el ensayo de lectin-blot (panel C, figura 3), observándose la presencia de al menos 3 bandas, dos de ellas que migran

cerca de 45 KDa y pertenecen a la proteína de interés y otra por debajo de los 40 KDa.

Como se observa en la figura 3, la fracción con la proteína de interés aun tiene contaminantes, por tal motivo y basados en Lara, *et al.*, (2004) se optó por utilizar la Cromatografía de Intercambio Aniónico (CIA) como siguiente paso de purificación.

La CIA generó los siguientes resultados.

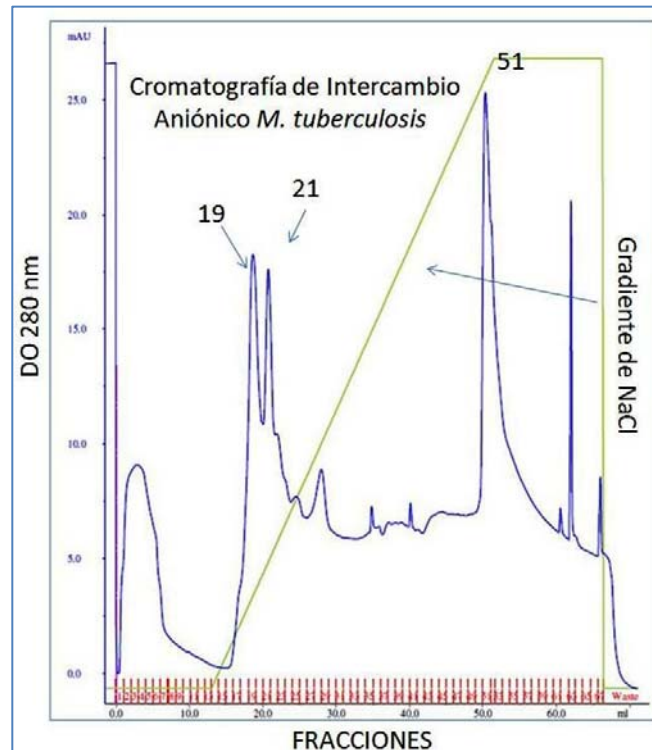


Figura 4. Purificación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* sobre una columna de Intercambio Aniónico. Las fracciones eluidas con  $DO \geq 0.9$  de la cromatografía de afinidad a Con-A se cargaron sobre una columna de intercambio Aniónico HiTrap Q-Sepharose. La columna se lavó con Tris-HCl 20 mM pH 8.3, las fracciones acopladas se eluyeron con un gradiente de NaCl, se colectaron y se analizaron por SDS-PAGE. La proteína se eluyó entre 155 y 300 mM de NaCl, fracciones 19 a 22.

La figura 4 muestra el perfil de separación de la Cromatografía de Intercambio Aniónico. La proteína de interés fue eluída entre la fracción 19 y 22, entre 155 y 300 mM de NaCl y el rendimiento fue de aproximadamente 300  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de proteína total. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE.



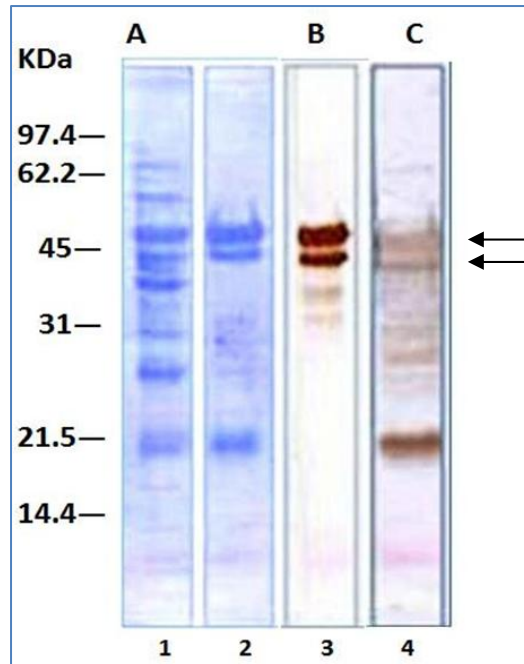


Figura 5. SDS-PAGE de la purificación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* sobre una columna de Intercambio Aniónico. Las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad a Con-A con DO 280nm  $\geq$  0.9 se cargaron sobre una columna de intercambio Aniónico HiTrap Q-Sepharose. Las fracciones acopladas a la columna se eluyeron con un gradiente de NaCl y la proteína Apa se identificó en las fracciones 19 a 21. A. Membrana PVDF teñida con azul de Coomassie: Carril 1: muestra inicial, carril 2: fracción 19 de elución. La inmunodetección, panel B, se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal 6A3 (dilución 1:2000). Carril 3: fracción 19 de elución. Para la detección de carbohidratos, panel C, la membrana PVDF se incubó con Concanavalina A-HRP (dilución 1:1000), carril 4: fracción 19 de elución. Las flechas señalan la proteína Apa de *M. tuberculosis* que migra como una doble banda. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular

Como se puede observar en el panel A y B de la figura 5, la proteína de interés representa el mayor porcentaje de la fracción 19, aproximadamente el 90%, sin embargo, se observa también la presencia de otra banda cercana a 21.5 KDa (panel A), que se sugiere es el antígeno de 19 KDa porque es una proteína glicosilada con afinidad por concanavalina-A (panel C) y está presente en el filtrado de cultivo. Las bandas ligeramente visibles debajo de la proteína de interés podrían ser producto de su degradación porque el anticuerpo utilizado en el inmunoblot es el monoclonal 6A3.

Por otra parte, el panel C indica que la proteína esta glicosilada, esto es muy importante porque se ha descrito que la presencia de la glicosilación le confiere las propiedades inmunogénicas a la proteína (Horn *et al.*, 1999; Romain *et al.*, 1999). En

el panel C también puede observar la proteína de 19 KDa anteriormente sugerida y otras debajo de la proteína de interés.

### Purificación de Apa recombinante en *Streptomyces lividans*.

La proteína Apa recombinante de *S. lividans* también se encuentra en el filtrado de cultivo del microorganismo (FC-SI) y se observa como un doblete en SDS-PAGE, sin embargo, la diferencia en el peso molecular entre las dos bandas es ligera porque solo se debe a la falta de glicosilación de la proteína de 45 KDa y no a la proteólisis en el carboxilo terminal descrito para la proteína nativa. El FC-SI fue precipitado y sometido a un fraccionamiento a pH 5, obteniéndose dos fracciones, la fracción soluble a pH 5 (Sn-5SI) y la fracción precipitada a pH 5 (pp-5SI).

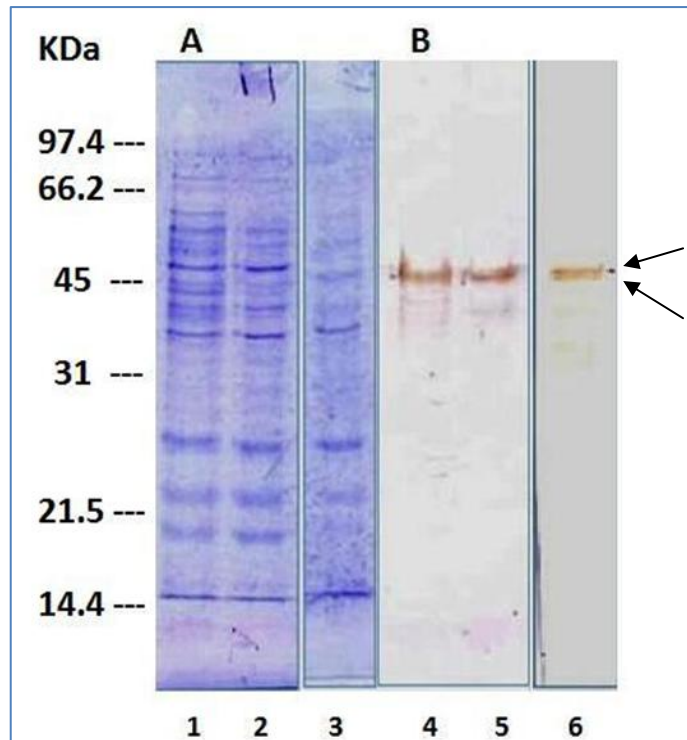


Figura 6. SDS-PAGE de la precipitación salina y el fraccionamiento a pH 5 del filtrado de cultivo de *S. lividans*. El filtrado de cultivo de *S. lividans* se precipitó con 0.5 g/mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , las proteínas precipitadas se resuspendieron en PBS pH 7.4 y se fraccionaron con amortiguador de acetatos 100 mM pH 5. La proteína Apa de *S. lividans* se mantuvo soluble a pH 5. A. Membrana teñida con azul de coomassie: carril 1: filtrado de cultivo, carril 2: muestra precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , carril 3: fracción soluble a pH 5. Inmunodetección (panel B) de la proteína Apa de *S. lividans* con el anticuerpo monoclonal 6A3 (dilución 1:2000), carril 4: filtrado de cultivo, carril 5: muestra precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y carril 6: fracción soluble a pH 5. Las flechas

señalan la proteína Apa de *S. lividans* que migra como una doble banda. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular

En la figura 6, panel A se muestran los perfiles proteicos de las muestras analizadas (carril 1, 2 y 3), observándose una disminución aparente de bandas al fraccionar a pH 5. El inmunoblot (Panel B) indica que la proteína Apa de *S. lividans* se encuentra en el filtrado de cultivo y en el sobrenadante del fraccionamiento a pH 5, también se observa que la proteína Apa de *S. lividans* es una doble banda con una muy ligera diferencia en el peso molecular. En la figura 6 (panel A, línea 3) se observa que la proteína de interés tiene contaminantes por lo cual se utilizó la Cromatografía de Intercambio Aniónico como siguiente paso de purificación (Lara *et al.*, (2004).

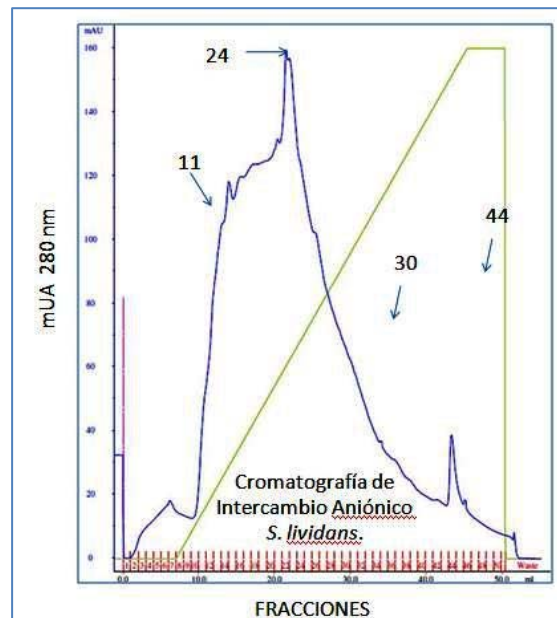


Figura 7. Purificación de la proteína Apa expresada *S. lividans* sobre una columna de Intercambio Aniónico. El sobrenadante del fraccionamiento a pH 5 fue cargado sobre una columna de intercambio Aniónico HiTrap Q-Sepharose. Las fracciones acopladas a la columna se eluyeron con un gradiente de NaCl, se colectaron y se analizaron por SDS-PAGE. La proteína Apa de *S. lividans* eluyó entre 155 y 300 mM de NaCl, fracciones 18 a 20.

La figura 7 muestra el perfil de separación de la Cromatografía de Intercambio Aniónico. La proteína fue eluída entre 155 y 300 mM de NaCl, fracciones de la 18 a la 20, el rendimiento fue de 2 mg de proteína recombinante por litro de medio de cultivo, después de 5 ensayos.

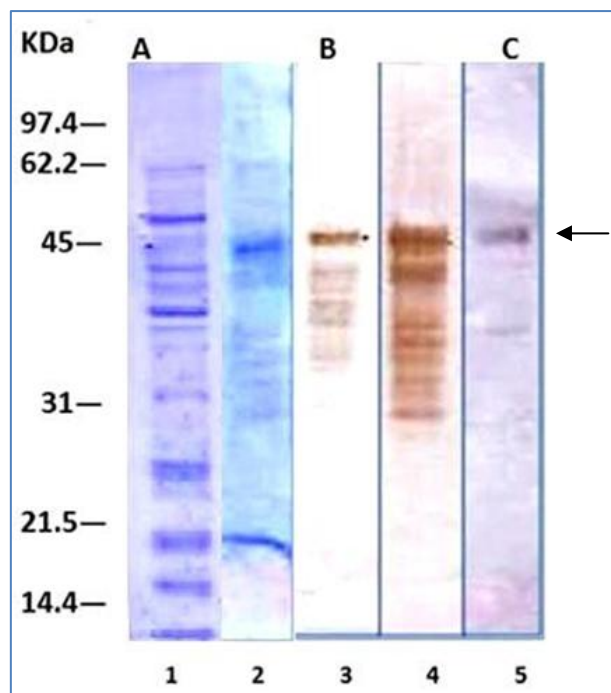


Figura 8. SDS-PAGE de la purificación de la proteína Apa expresada en *S. lividans* sobre una columna de Intercambio Aniónico. El sobrenadante del fraccionamiento a pH 5 fue cargado sobre una columna de Intercambio Aniónico HiTrap Q-Sepharose. Las fracciones acopladas a la columna se eluyeron con un gradiente de NaCl, se colectaron y se analizaron por SDS-PAGE y la proteína Apa recombinante se identificó en las fracciones 18 a 20 entre 155 y 300 mM de NaCl. A. Membrana PVDF teñida con azul de coomassie: Carril 1: fracción soluble a pH 5, carril 2: fracción 19 de elución. La inmunodetección, panel B, se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal 6A3 (dilución 1:2000). Carril 3: fracción soluble a pH 5, carril 4: fracción 19 de elución. Para la detección de carbohidratos, panel C, la membrana PVDF se incubó con Concanavalina A-HPR (dilución 1:1000) Carril 5: fracción 19 de elución. Las flechas señalan la proteína Apa de *S.lividans*. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular

El análisis del SDS-PAGE (figura 8) indica que la proteína de interés pudo separarse de los contaminantes, sin embargo, se observa degradación lo cual no es sorprendente porque en reportes anteriores (Vallin, 2006 y en nuestro laboratorio, purificaciones previas), se describió el mismo fenómeno. La proteína de interés en su forma completa, representa la mayor cantidad de la muestra y que posee una buena pureza, al comparar la tinción con azul de coomassie y el inmunoblot.

Se ha descrito que la presencia de la glicosilación en la proteína Apa juega un papel importante en las propiedades inmunogénicas, por tal motivo, es muy importante

asegurar que la proteína posea carbohidratos en su estructura. El análisis de Lectin-blot indica que la proteína está compuesta por una fracción que está glicosilada, sin embargo, y apoyados en el inmunoblot se observa una fracción que no está glicosilada como se ha descrito (Lara *et al.*, 2004).

### Purificación de Apa recombinante en *Escherichia coli*.

La proteína Apa recombinante de *E. coli* fue purificada por cromatografía de afinidad a níquel, porque posee un tallo de histidinas en el amino terminal.

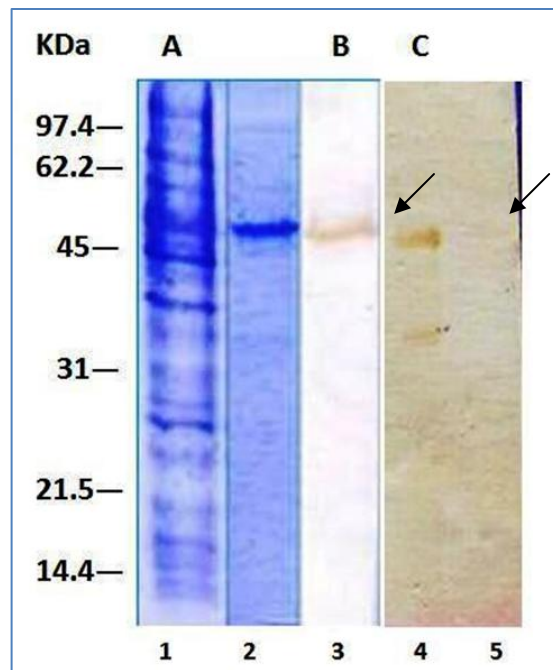


Figura 9. SDS-PAGE de la purificación de Apa recombinante en *E.coli* sobre una columna de Afinidad a metales (níquel). A. Membrana teñida con azul de coomassie: Carril 1: inicial, carril 2: fracción de elución. La inmunodetección, panel B, fue llevada a cabo con el anticuerpo monoclonal 6A3 (dilución 1:2000). Carril 3: fracción de elución. Para la detección de carbohidratos, panel C, la membrana PVDF se incubó con ConA-HRP (dilución 1:1000). Carril 4: Control positivo: Apa recombinante expresada en *S. lividans* y carril 5: Fracción de elución. Las flechas señalan a la proteína Apa de *E. coli* que migra como una sola banda. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular.

En la figura 9, panel A línea 2, se observa que la proteína Apa expresada en *E.coli*, se purificó por cromatografía de afinidad a níquel. La proteína migra a un peso molecular mayor al descrito para la proteína nativa lo cual se debe a la adición del tallo de histidinas en el amino terminal, asimismo, la proteína no se presenta como

una doble banda porque no se glicosila y tampoco sufre proteólisis en el carboxilo terminal en este microorganismo. Con el inmunoblot (Panel B, figura 9) se identifica que la proteína purificada es Apa y con el ensayo de lectin-blot (Panel C, figura 9) se muestra que la proteína recombinante no contiene carbohidratos, porque no se observa ninguna respuesta colorida después del análisis. El control positivo para este ensayo fue la proteína Apa producida en *S. lividans*.

La caracterización de las proteínas nos permite controlar la variable importante del trabajo, que en este caso es la glicosilación.

### **Evaluación y comparación de la respuesta inmune.**

Para evaluar la respuesta celular y humoral, cada ratón se inmunizó con 25 µg de proteína Apa de *M. tuberculosis*, previamente acoplada a nitrocelulosa.

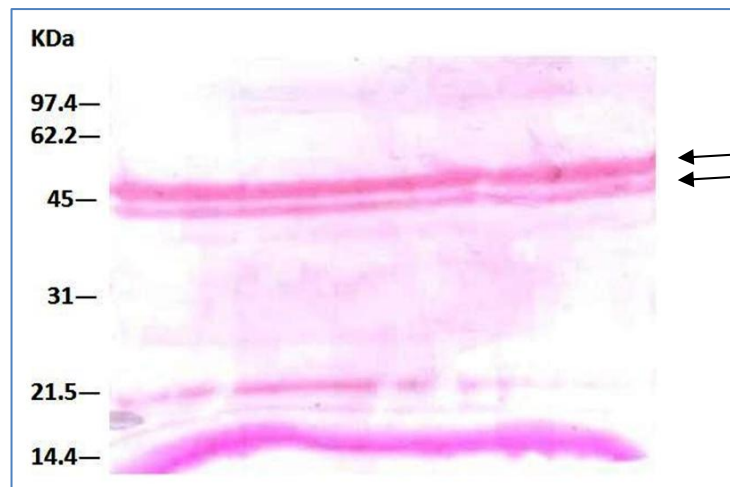


Figura 10. Membrana de nitrocelulosa de la proteína Apa de *M. tuberculosis* para inmunización. Geles preparativos al 12% cargados con 150 µg de la proteína Apa de *M. tuberculosis* se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 20 mA, 1.6 h y 4°C. La membrana transferida se tiñó con rojo de Ponceau y las dos bandas de la proteína se procesaron para inocular a los ratones. Las flechas señalan la proteína Apa de *M. tuberculosis* que migra como una doble banda. Los números de la derecha señalan los marcadores de peso molecular

En la figura 10 se muestra una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau, en la cual se observan las bandas correspondientes a la proteína Apa de *M. tuberculosis* y la banda sugerida como el antígeno de 19 KDa. Las dos bandas fueron cortadas y pulverizadas para inocular a los ratones.

## Respuesta Inmune Humoral

La respuesta de anticuerpos fue monitoreada por la prueba de ELISA, generando los siguientes resultados.

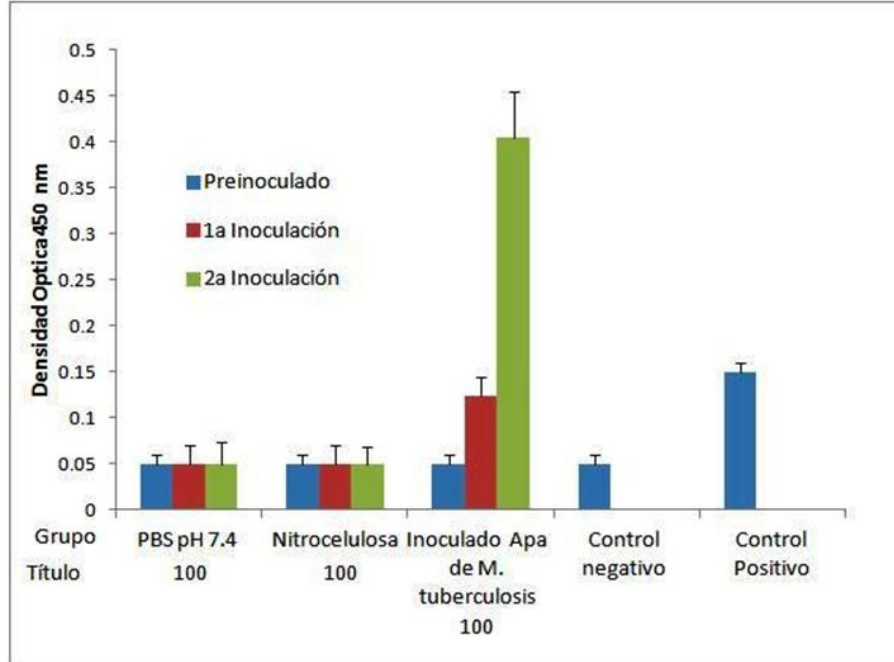


Figura 11 Niveles de inmunoglobulina G sérica contra la proteína Apa de *M. tuberculosis* en ratones. Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 25  $\mu$ g de proteína Apa de *M. tuberculosis* adsorbidos en nitrocelulosa, se estimularon 2 semanas después de la primera inoculación. Las muestras de suero se tomaron a las 0, 2 y 4 semanas. Placas de ELISA sensibilizadas con 100  $\mu$ L de la solución de las proteínas (2.5  $\mu$ g/mL) toda la noche a 37°C, se incubaron con los sueros de los ratones y se determinaron los niveles de inmunoglobulina G (IgG) con un anticuerpo anti-IgG marcado con peroxidasa. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA. En los sueros preinmunes de los tres grupos, del grupo PBS pH 7.4 y el grupo de nitrocelulosa no mostraron niveles de IgG (dilución 1:100) después de la primera y segunda inmunización. El grupo inoculado con la proteína Apa de *M. tuberculosis* exhibe una respuesta que incrementa con el número de inoculaciones. Control positivo anticuerpo monoclonal 6A3. El título de anticuerpos fue de 100. Los resultados son representados como los promedios  $\pm$  desviación estándar.

En la figura 11, se muestra la respuesta de IgG después de la estimulación de los ratones con proteína Apa de *M. tuberculosis*. Los sueros preinmunes de los tres grupos de estudio (PBS pH 7.4, nitrocelulosa y del grupo inoculado con la proteína Apa de *M. tuberculosis*) no exhiben respuesta frente a la proteína. Los sueros de la

primera y segunda inoculación del grupo sensibilizado con la proteína Apa, exhiben una respuesta que incrementa con el número de inoculaciones.

Por otra parte, se evaluó por prueba de ELISA la respuesta de los sueros frente a las diferentes proteínas estudiadas, proporcionando los siguientes resultados.

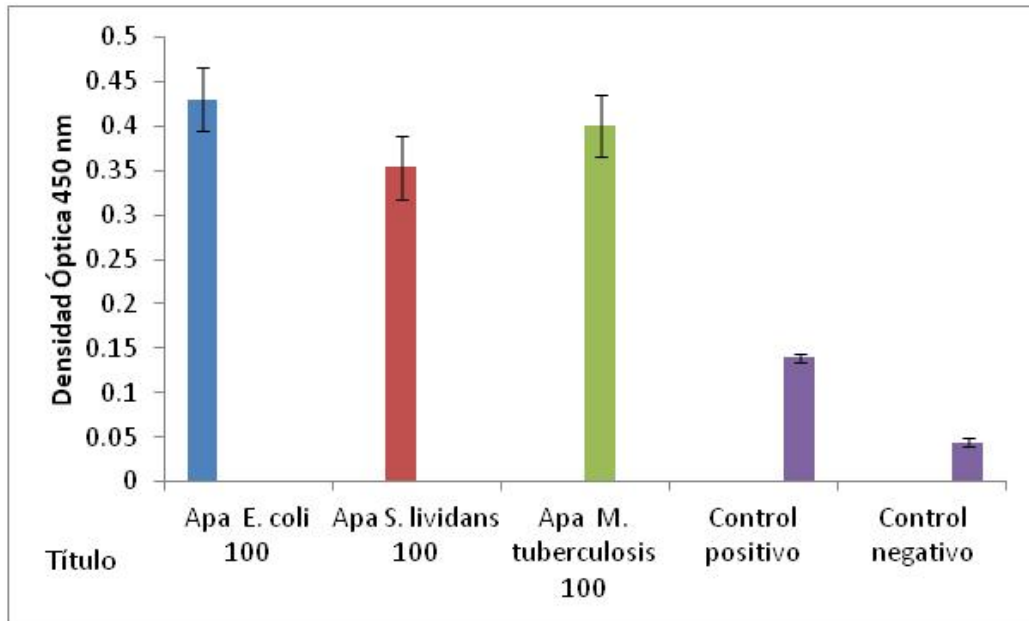


Figura 12. Comparación de la respuesta de anticuerpos (IgG) frente a las proteínas Apa (nativa y formas recombinantes). Placas de ELISA sensibilizadas con 100  $\mu$ L de la solución de las proteínas (2.5  $\mu$ g/mL) a 37  $^{\circ}$ C, se incubaron con los sueros de los ratones inoculados con la proteína Apa de *M. tuberculosis* y se determinaron los niveles de IgG con un anticuerpo anti-IgG-HPR. Control positivo anticuerpo monoclonal 6A3. El título de anticuerpos fue de 100. Los resultados son representados como los promedios  $\pm$  desviación estándar.

Como se observa en la figura 12, los anticuerpos IgG generados contra la proteína nativa también reconocen a las proteínas recombinantes. No se observan diferencias en los niveles de IgG determinados de las proteínas Apa recombinantes y nativa presentes en los sueros de los ratones inoculados con la proteína Apa de *M. tuberculosis*.

### Respuesta Inmune Celular

Para evaluar la respuesta celular se siguió el siguiente modelo experimental.



Tabla 1. Modelo experimental para la evaluación y comparación de la respuesta inmune celular de la proteína Apa y sus formas recombinantes.

Grupo	Microorganismo de origen de la proteína Apa / Concentración de proteína (µg/mL) adicionada a las células.			Células a identificar
Ratones sensibilizados.	<i>M. tuberculosis</i> 0, 1, 10 y 25	<i>S. lividans</i> 0, 1, 10 y 25	<i>E. coli</i> 0, 1, 10 y 25	Linfocitos totales
Ratones inoculados con nitrocelulosa	<i>M. tuberculosis</i> 0 y 5	<i>S. lividans</i> 0 y 5	<i>E. coli</i> 0 y 5	Linfocitos T CD4+
Ratones control	<i>M. tuberculosis</i> 0 y 5	<i>S. lividans</i> 0 y 5	<i>E. coli</i> 0 y 5	Linfocitos T CD8+

En la tabla 1 podemos observar que cada grupo de ratones fue estimulado con diferentes concentraciones de las proteínas estudiadas. El grupo de ratones inoculado con nitrocelulosa se uso como control para evaluar si la nitrocelulosa por si misma puede provocar estimulación de las células.

Las células de bazo se tiñeron con CFSE se incubaron con las proteínas Apa (nativa y recombinantes) y la respuesta frente al estímulo se monitoreó por citometría de flujo.

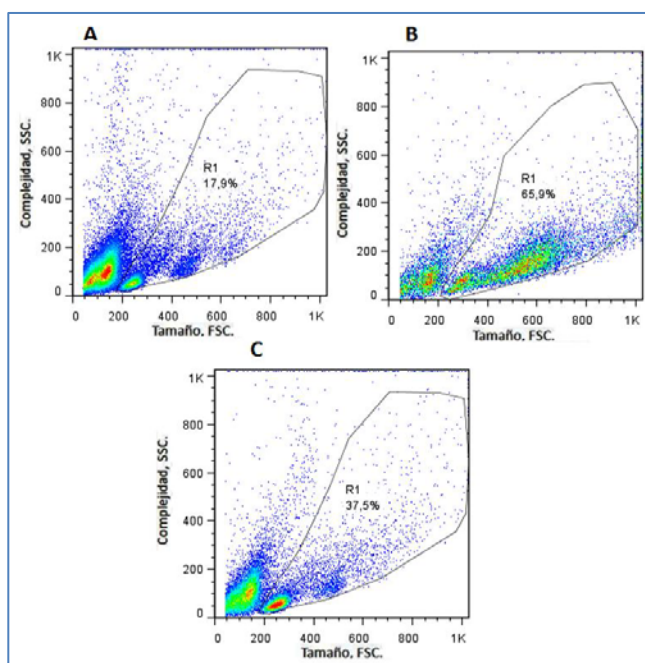


Figura 13. Dot plot de tamaño (FSC) vs complejidad (SSC) de las células del bazo estimuladas con la proteína Apa de *M. tuberculosis*. Las células del bazo estimuladas con la proteína Apa de *M. tuberculosis* se analizaron por citometría de flujo. La región R1 pertenece a los linfocitos porque se encuentra en los parámetros requeridos de tamaño (FSC) y complejidad (granularidad, SSC) establecidos en la literatura (FlowJo Tutorial, 2011) y la región R2 pertenece a las células que ante el estímulo de la proteína incrementan su tamaño y su complejidad (prolifera).

Panel A: células del bazo sin estímulo, panel B: células del bazo estimuladas con concanavalina-A (control positivo de proliferación) y panel C: células del bazo estimuladas con la proteína Apa de *M. tuberculosis*.

El análisis de proliferación generó los siguientes resultados.

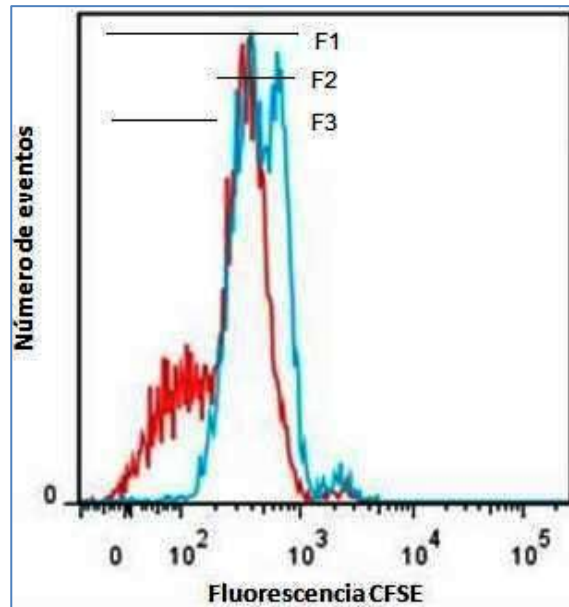


Figura 14. División de las células de bazo marcadas con CFSE estimuladas con 25 µg/mL de la proteína Apa de *M. tuberculosis*. Las células del bazo marcadas con CFSE se estimularon con las proteínas Apa (nativa y recombinantes) a 0, 1, 10 y 25 µg/mL a 37 °C, 90% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Se cosecharon después de 5 días y se analizaron por citometría de flujo. La división celular se caracteriza por la reducción del 50% de la fluorescencia de CFSE, expresada como un desplazamiento de la fluorescencia (CFSE) hacia la izquierda en el histograma. El porcentaje total de células en la muestra (F1) se dividió en dos zonas: el porcentaje de células con división basal (F2) y el porcentaje de células con una división mayor al nivel basal (F3). Línea roja: células de bazo estimuladas con 25 µg/mL de la proteína Apa de *M. tuberculosis* y línea azul: células de bazo sin estímulo.

El siguiente paso del análisis fue obtener histogramas de fluorescencia-vs-número de eventos para analizar la proliferación celular, a través de la disminución de CFSE en las muestras. La figura 14 muestra una línea roja para las células teñidas con CFSE (CFSE+) estimuladas y una línea azul para las células CFSE+ que no fueron estimuladas. Como se observa, la línea azul, que es el control negativo de proliferación, muestra que las células detectadas presentan homogeneidad en la cantidad de CFSE contenida en ellas, indicativo de una baja o nula proliferación.

Por otra parte, la línea roja (células estimuladas) presenta un desplazamiento hacia la izquierda, indicativo de pérdida de fluorescencia porque las células se están dividiendo.

Para determinar el porcentaje de células que se dividen, se determinaron tres regiones denominadas F1, F2 y F3.

En la figura 14 se observan las regiones de análisis para la evaluación de la proliferación, la región F1 incluye la totalidad de células de la muestra, la región F2 contiene todas las células que sufrieron solo proliferación basal y la región F3 es para las células que sufrieron un mayor número de divisiones celulares comparadas con la división basal.

Con toda la información obtenida de la Citometría de Flujo, se realizó un gráfico para observar de manera global las tendencias de la proliferación.

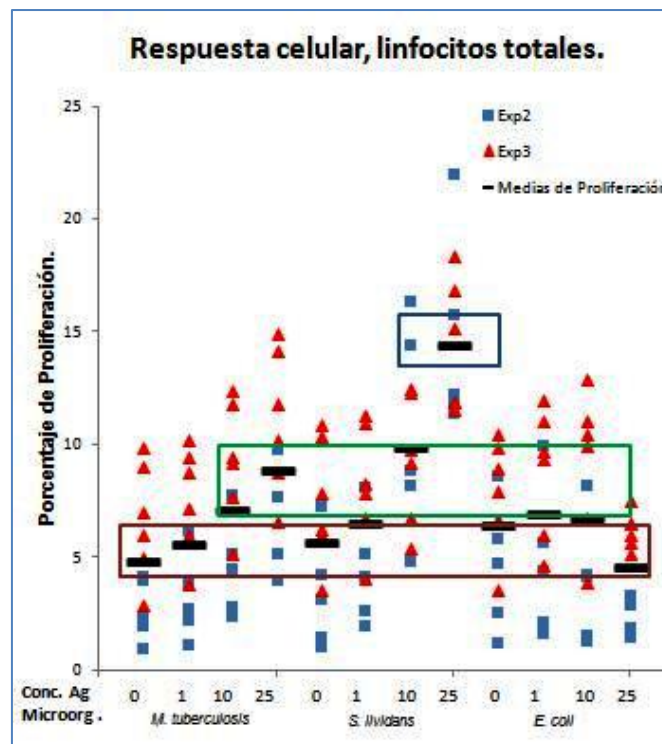


Figura 15. Porcentaje de proliferación de linfocitos totales inducido por las proteínas Apa (nativa y recombinantes). Las células del bazo de cada ratón se marcaron con CFSE, se estimularon por 5 días con las proteínas Apa (nativa y recombinantes) a 0, 1, 10 y 25 µg/mL a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. El porcentaje de linfoproliferación frente a los diferentes estímulos (expresados como pérdida de fluorescencia-CFSE), se determinó por citometría de flujo. Las medias de

proliferación se obtuvieron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre estas fue analizada con una prueba *Post hoc* de Tukey. El p-valor establecido fue  $p < 0.05$ . Resultados de dos experimentos independientes.

La figura 15 sugiere que la proteína Apa de *S. lividans* induce un mayor porcentaje de proliferación comparado con la proteína nativa y la recombinante expresada en *E. coli*. Se observa que las células estimuladas con la proteína de *M. tuberculosis*, incrementan su proliferación de manera dependiente de la concentración de antígeno y finalmente, las células estimulados con la proteína recombinante de *E. coli* no presentan alguna diferencia visual en su porcentaje de proliferación. Por otra parte, los resultados obtenidos de la proliferación celular de los ratones inoculados con nitrocelulosa y los ratones control, no presentan diferencias estadísticamente significativas al ser estimuladas con el antígeno, indicativo que la respuesta generada en los ratones sensibilizados es dependiente de la inoculación con la proteína (anexo 2).

Basados en las características del experimento, como lo son 3 grupos y diferentes concentraciones de antígeno, se decidió utilizar el análisis de varianza (ANOVA), el cual nos permite verificar si hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada grupo que en este caso son medias de proliferación. La prueba ANOVA necesita cumplir la condición de homogeneidad de varianza, la cual se evalúa con el valor estadístico de Levene (valor F). Para este proyecto el valor F fue de 0.328 con una significancia de 0.979, lo que nos indica que hay homogeneidad de varianza en las muestras porque la significancia del valor F es mayor a 0.05, cumpliéndose un requisito importante y necesario para llevar a cabo el análisis de varianza.

Posteriormente, los datos ingresados al software fueron sometidos a la prueba ANOVA en el cual la proliferación es la variable dependiente y los orígenes de variación son el microorganismo, la concentración de antígeno, la interacción del microorganismo y la concentración del antígeno y los ratones. La prueba generó la siguiente tabla de datos.

Tabla 2. Resultados prueba ANOVA.

Variable dependiente: proliferación.

Origen	Cuadrados medios (varianza).	F (Comparación de varianzas)	p-valor
Microorganismo	111.990	49.596	.000
Concentración de Antígeno	87.545	38.770	.000
Ratón	108.866	48.213	.000
Microorganismo-- Concentración de Antígeno.	67.935	30.086	.000
Error	2.258		

En la tabla 2 podemos observar que todos los p-valores son menores a 0.05, (última columna). Lo cual nos indica que los orígenes de la variación especificados en la tabla 2 influyen en la proliferación celular.

El ANOVA indica que al menos alguna de las medias de proliferación es diferente. Para saber cuál de ellas difiere, se utilizó la prueba *Post hoc* Tukey, la cual realiza comparaciones múltiples, a partir de las cuales establece subconjuntos homogéneos.

Tabla 3. Resultados de la prueba *Post hoc* Tukey de las medias de proliferación obtenidas por el análisis ANOVA.

Microorganismo/ Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Subconjunto de medias de proliferación (%)		
	1	2	3
<i>E. coli</i> , 25	4.55		
<i>M. tuberculosis</i> , 0	4.85		
<i>M. tuberculosis</i> , 1	5.60		
<i>S. lividans</i> , 0	5.67		
<i>E. coli</i> , 0	6.41		
<i>S. lividans</i> , 1	6.50		
<i>E. coli</i> , 10		6.79	
<i>E. coli</i> , 1		6.97	
<i>M. tuberculosis</i> , 10		7.13	
<i>M. tuberculosis</i> , 25		8.84	
<i>S. lividans</i> , 10		9.88	
<i>S. lividans</i> , 25			14.46

La tabla 3 y la figura 15 nos permite visualizar las medias de proliferación que difieren significativamente. Cada subconjunto (columna) contiene medias de proliferación que no difieren significativamente, y cada columna difiere significativamente de otra. Basados en lo anterior, podemos decir que la concentración de 25  $\mu\text{g}$  de la proteína de *S. lividans* es la que induce mayor proliferación celular, y esta difiere significativamente tanto del resto de las

concentraciones como de los microorganismos. Además, las células estimuladas con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la proteína Apa expresada en *E. coli*, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la expresada en *S. lividans* y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la proteína nativa poseen una respuesta estadísticamente similar a los controles sin estímulo y finalmente se sugiere una proliferación intermedia para las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Apa recombinante de *E. coli*, 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la proteína nativa y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la proteína expresa en *S. lividans*.

Posteriormente, para evaluar el tipo de células que proliferaban frente al estímulo se obtuvieron dot-blots Fluorescencia CFSE-vs- Fluorescencia CD4-PE ó CD8-APC. Lo cual nos indicaría que subtipo de linfocitos está respondiendo al estímulo de la proteína. Los resultados son los siguientes:

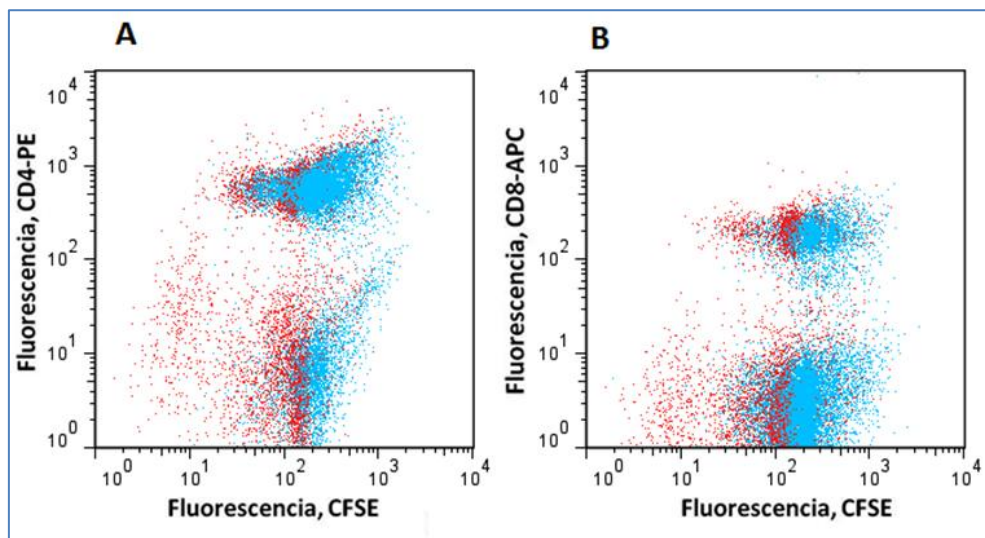


Figura 16. División de linfocitos T CD4+ Y CD8+ posterior a la estimulación con 25  $\mu\text{g}$  de la proteína Apa de *M. tuberculosis*. Las células del bazo marcadas con CFSE se incubaron sin estímulo o con las proteínas Apa (nativa y recombinantes) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 5 días, las células se cosecharon y se marcaron con anticuerpos anti-CD4 conjugado con ficoeritrina (CD4-PE) y anti-CD8 conjugado con alopiocianina (CD8-APC), 15 min en hielo, para identificar las subpoblaciones de linfocitos que son estimuladas con las proteínas Apa. Puntos azules: células de bazo sin estímulo y puntos rojos: células de bazo estimuladas con 25  $\mu\text{g}$  de la proteína Apa de *M. tuberculosis*.

En la figura 16 se muestra el dot-blot del análisis de células CD4+. El grupo de señales inferior es designado para las células CD4 negativas (CD4-) y el grupo de señales superior es para las células CD4 positivas (CD4+). Las señales azules son generadas por la muestra CFSE+ sin estimular y las señales rojas son para la

muestra CFSE+ estimuladas. El desplazamiento de las señales rojas a la izquierda es indicativo de su proliferación, por la pérdida de CFSE.

Tabla 4. Resultados de la prueba *Post hoc* Tukey de las medias de proliferación para linfocitos CD4+ y CD8+ obtenidas por el análisis ANOVA.

Microorganismo/ Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Subconjunto de medias de proliferación (%) CD4+		Microorganismo/ Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Subconjunto de medias de proliferación (%) CD8+	
	1	2		1	2
<i>M. tuberculosis</i> , 0	4.62		<i>M. tuberculosis</i> , 0	3.89	
<i>E. coli</i> , 25	4.92		<i>E. coli</i> , 25	4.01	
<i>M. tuberculosis</i> , 1	5.06		<i>M. tuberculosis</i> , 1	4.29	
<i>M. tuberculosis</i> , 10	5.47		<i>M. tuberculosis</i> , 10	4.88	
<i>S. lividans</i> , 0	5.63		<i>S. lividans</i> , 1	5.00	
<i>E. coli</i> , 10	5.72		<i>S. lividans</i> , 0		5.18
<i>S. lividans</i> , 1	5.84		<i>S. lividans</i> , 10		5.34
<i>E. coli</i> , 1		6.11	<i>M. tuberculosis</i> , 25		5.43
<i>E. coli</i> , 0		6.30	<i>E. coli</i> , 10		5.45
<i>M. tuberculosis</i> , 25		6.49	<i>E. coli</i> , 0		5.55
<i>S. lividans</i> , 10		6.55	<i>E. coli</i> , 1		5.82
<i>S. lividans</i> , 25		7.23	<i>S. lividans</i> , 25		6.26

La tabla 4 muestra la respuesta de proliferación de linfocitos CD4+ (izquierda) y CD8+ (derecha). La proliferación de linfocitos T CD4+ inducida por las proteínas Apa nativa y recombinante expresada en *S. lividans* presenta diferencias estadísticamente significativas de sus controles sin estímulo. La proteína nativa induce proliferación de linfocitos CD8+ que difiere significativamente de su control sin estímulo. De manera global se observa que los linfocitos CD4+ y CD8+ sin estímulo (0  $\mu\text{g/mL}$ ) que pertenecen al grupo de *E.coli*, se dividen un mayor número de veces que las células estimuladas con la proteína nativa (0, 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) y con la proteína Apa expresada en *S. lividans* (0 y 1  $\mu\text{g/mL}$ ), por lo que los resultados globales no son muy claros.



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La glicoproteína Apa identificada como un antígeno, ha sido considerada un importante candidato de estudio porque es capaz de estimular células T que secretan INF- $\gamma$  e induce respuesta de anticuerpos, lo cual es correlacionado con una respuesta inmune protectora a tuberculosis.

En el presente proyecto se obtuvo una fracción enriquecida con la proteína Apa de *M. tuberculosis*, la cual no pudo purificarse con la metodología implementada (Figura 5). Los motivos por los cuales la muestra enriquecida no se sometió a un siguiente paso de purificación fueron la poca cantidad de proteína presente en los filtrados de cultivo y los tiempos largos de incubación, a pesar de no purificarla pudo separarse de un alto porcentaje de contaminantes y se observó por medio SDS-PAGE que las muestras con la proteína no contenían contaminantes de peso molecular cercano (solo proteína de 19 KDa) con lo cual se optó por adsorberla en membranas de nitrocelulosa, las cuales servirían como transporte para el antígeno y de esta manera sensibilizar a los ratones como se describió en Aboud- Zeid *et al.* (1987), donde utilizaron partículas de nitrocelulosa para estimular linfocitos *in vitro* y establecieron aspectos importantes de esta metodología como: las partículas son fácilmente accesibles a los macrófagos, el procesamiento parece ser notablemente eficiente, se utiliza una menor cantidad de antígeno comparado con el antígeno soluble, se pueden estudiar respuestas a componente individuales presentes en mezclas y la nitrocelulosa no induce una respuesta por sí misma, no obstante, con la finalidad de controlar este último aspecto se utilizó un grupo de ratones inoculado únicamente con nitrocelulosa, en el cual no se observó respuesta humoral o de proliferación de linfocitos, coincidiendo con lo descrito y con datos de nuestro laboratorio utilizando otras proteínas (Figura 11).

La proteína Apa expresada en *S. lividans* se purificó a partir de cultivos en fermentador. Esta proteína recombinante también migra en SDS-PAGE como un doblete (45 y 47 KDa), sin embargo, si se comparan con la proteína Apa nativa la diferencia entre los pesos moleculares de las bandas es muy ligera (Figura 5, 6 y 7). Esta discrepancia no se debe a fragmentación proteolítica, como se determinó para la banda de 45 kDa de la proteína Apa nativa (Horn *et al.*, 1999), porque el análisis por espectrometría de masas indicó una secuencia idéntica para las dos bandas; se debe a la diferencia en la glicosilación porque la banda de 47 KDa está glicosilada y la banda de 45 KDa presente un 80% de moléculas no glicosiladas (Lara *et al.*, 2004) y se demostró que la desglicosilación (enzimática o química) de la proteína Apa nativa disminuye ligeramente el peso molecular aparente de las dos bandas (Romain *et al.*, 1999).

Por otra parte, el inmunoblot (Figura 8) obtenido de la muestra purificada indica que la proteína exhibe proteólisis representada por una gran variedad de bandas (no contaminación con otras proteínas) porque en esta prueba se utiliza un anticuerpo monoclonal que no tiene reactividad cruzada con otras proteínas presentes en el filtrado de cultivo, esto se demostró cuando el anticuerpo monoclonal solo reconoció la proteína Apa en el carril donde se corrió la muestra del filtrado de cultivo (Figura 6). Además, Vallin *et al.* (2006) demostraron la proteólisis de esta proteína lo cual era causada por proteasas secretadas por la cepa recombinante. Sin embargo, a pesar de la proteólisis un alto porcentaje de la proteína se encuentra en su forma completa o con un peso molecular cercano a la proteína completa. Se sugiere que la proteólisis por sí misma no tiene algún efecto (positivo o negativo) en la inducción de la proliferación porque las células presentadoras de antígenos procesan (fragmentan) las proteínas para su presentación a los linfocitos T (Murphy *et al.*, 2009), sin embargo, se tiene que evaluar experimentalmente con ensayos donde se utilice la proteína completa, la proteína con alto grado de proteólisis y una mezcla de las dos.

La proteína Apa expresada en *E. coli* fue purificada por cromatografía de afinidad a metales porque tiene un tallo de histidinas en su amino terminal, el cual le da la característica de migrar en SDS-PAGE a un peso molecular ligeramente mayor que las proteínas Apa nativa y recombinante en *S. lividans* (Figura 9) y además se observa como una banda porque no se fragmenta en su carboxilo terminal y no se glicosila (Horn *et al.*, 1999). La ausencia de glicosilación de esta proteína fue importante para evaluar de manera muy general el papel de los carbohidratos (manosas) en la inducción de linfoproliferación.

Para evaluar la respuesta inmune se administró intraperitonealmente la proteína Apa de *M. tuberculosis*, se determinaron los niveles de IgG a diferentes intervalos de tiempo y se estimularon las células del bazo con las proteínas Apa nativa y recombinantes. La respuesta de IgG contra la proteína Apa de *M. tuberculosis* incrementó de manera significativa en los diferentes intervalos de tiempo (Figura 11), debido a que la respuesta primaria de anticuerpos (primera inoculación del antígeno) se caracteriza por una respuesta alta de inmunoglobulina M (IgM) y baja de IgG en el suero y la respuesta secundaria (segundo estímulo) se caracteriza por un incremento significativo de IgG (Murphy *et al.*, 2009). Además, cuando se comparó la respuesta de IgG de las proteínas Apa (nativa y recombinantes) no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 12), sugiriendo que los anticuerpos se indujeron contra la parte proteica del antígeno, porque en la prueba de ELISA las tres proteínas se sometieron al mismo tratamiento y a pesar de la ausencia de las modificaciones con carbohidratos (proteína Apa de *E. coli*) la respuesta de IgG no

mostró diferencias. Por otra parte, el título de anticuerpos (IgG) obtenido de la proteína Apa (100) es muy bajo comparado con el inducido por las proteínas recombinantes 38 KDa (10,000), ESAT-6/Ag85B (1500), Hsp65 (6400), ESAT-6/CFP-10 (800), la proteína de fusión CFP-10/ESAT-6/PPE68' (5000) (Fonseca *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012), sin embargo, Sable *et al.* (2011) mencionan que la proteína Apa expresada en *E. coli* administrada intranasalmente (3 veces con 2 semanas de diferencia entre cada administración) induce una fuerte respuesta de anticuerpos IgG en el suero e IgA en lavados nasales lo cual se debe a que la vía de administración y el número de inoculaciones afecta la respuesta inducida por el antígeno (Murphy *et al.*, 2009).

Por otra parte, se determinó que en el ratón, las proteínas glicosiladas obtenidas de *M. tuberculosis* y *S. lividans* inducen una mayor respuesta linfoproliferativa que la proteína no glicosilada (*E. coli*). Estudios previos en un modelo de cobayo mostraron resultados similares, en un primer trabajo se utilizaron moléculas recombinantes no manosiladas que mostraron un decremento en su capacidad para estimular linfocitos T. Asimismo, en un estudio paralelo se observó que las moléculas desglucosiladas, química o enzimáticamente, también presentaban una mucho menor capacidad para conseguir una respuesta de linfocitos T. Estas observaciones concuerdan con reportes en los que para algunos antígenos los carbohidratos unidos a las proteínas inducían una respuesta inmune celular específica, en la cual los glicopéptidos inducen linfocitos T específicos (Deck *et al.*, 1995; Horn, *et al.*, 1999; Romain F., 1999).

Por lo anterior, la proteína Apa fue expresada en *Mycobacterium smegmatis*, obteniéndose una proteína recombinante manosilada. Sin embargo, comparada con la proteína nativa, estas moléculas mostraron una menor capacidad para estimular a los linfocitos T. El análisis detallado de la proteína mostró que aunque los sitios de glicosilación se conservaban, el patrón de manosilación era diferente. Para la proteína nativa, moléculas glicosiladas con 7 manosas representan el mayor porcentaje y para la proteína recombinante en *M. smegmatis* el mayor porcentaje estaba glicosilado con ocho manosas, esto sugirió que la extensión de la manosilación podría influir en la respuesta celular. (Horn *et al.*, 1999). Posteriormente, se demostró que para la proteína Apa expresada en *S. lividans* las moléculas glicosiladas con 6 manosas representaban el porcentaje mayoritario. (Lara *et al.*, 2004). En el presente trabajo la proteína expresada en *S. lividans* induce una mayor respuesta linfoproliferativa, lo cual sugiere que la presencia de moléculas con un menor número de manosas tiene una mayor afinidad con los receptores de las

células presentadoras de antígenos o los epítopes glicosilados estimulan de manera más efectiva las células T, lo cual se tiene que demostrar experimentalmente.

Además de diferir en el número de manosas por molécula, las proteínas Apa (nativa y recombinantes) exhiben diferentes patrones de glicosilación (glicoformas). Para la proteína nativa se observó un patrón que va de cero a nueve manosas, para la proteína recombinante en *M. smegmatis* de tres a nueve y para la proteína recombinante en *S. lividans* un patrón que va de cero hasta trece manosas por molécula (Horn *et al.*, 1999; Lara *et al.*, 2004; Romain *et al.*, 1999), además se describió que la proteína recombinante en *S. lividans* posee un porcentaje diferente de moléculas desglicosiladas, mayor al 1% definido para la proteína nativa (Lara *et al.*, 2004; Romain *et al.*, 1999). Todo lo anterior pone de manifiesto la importancia de la presencia de la fracción glicosídica.

A reserva de que se confirme experimentalmente por medio de estudios en los cuales se separen las diferentes glicoformas, los resultados del presente trabajo sugieren que a menor cantidad de manosas por molécula y mayor variabilidad de glicoformas se induce una mayor proliferación de linfocitos. Aunado a esto, también podría sugerirse que un balance entre las moléculas glicosiladas y desglicosiladas sería importante para inducir una mejor respuesta, porque la presencia exclusivamente de moléculas glicosiladas (*M. smegmatis*) o moléculas no glicosiladas (*E. coli*) inducen un nivel significativamente menor de proliferación.

Los resultados de linfocitos T CD4+ y CD8+ obtenidos en este proyecto sugieren que la proteína nativa estimula ambas poblaciones celulares (mayoritariamente CD4+), la proteína recombinante en *S. lividans* solo estimula linfocitos CD4+ y la proteína Apa expresada *E.coli* no estimula ninguna de la dos poblaciones celulares. Lo cual es similar a lo referido para la proteína nativa por Romain *et al.* (1999) en un modelo de cobayo, pero difiere de lo descrito por Kumar *et al.* (2003) que indica que la proteína Apa expresada en *E. coli* induce una respuesta mayoritario de linfocitos CD8+ en células mononucleares humanas. Sin embargo, de manera global los resultados no son muy claros porque las células sin estimular que pertenecen al grupo de *E. coli* se dividen un mayor número de veces que otras células que pertenecen al grupo de la proteína nativa (0, 1 y 10 µg/mL) y al grupo de la proteína Apa expresada en *S. lividans* (0 y 1 µg/mL), por lo que los resultados globales no son muy claros.

Sin embargo, es importante destacar que a pesar de la escasa proliferación de linfocitos T inducida por la proteína Apa expresada en *E.coli*, se desarrolló una vacuna de subunidad que inhibió significativamente el crecimiento de *M. tuberculosis* en ratones (Sable *et al.*, 2011).

Asimismo, no solo se ha demostrado que la glicosilación es importante para inducir una respuesta inmune, se ha descrito que la metilación en la hemaglutinina de unión a heparina (HBHA por sus siglas en inglés) es importante para la inducción de inmunidad protectora de células T contra TB, además que algunas proteínas que retienen en su amino terminal metionina formilada y péptidos formilados pueden ser unidos específicamente a moléculas MHC clase Ib e inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos a patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*.

Con este estudio se pudo determinar que la proteína Apa recombinante en *S. lividans* es capaz de inducir una mayor proliferación de linfocitos que la proteína Apa de *M. tuberculosis* y que la recombinante expresada en *E.coli*. Lo cual tiene implicaciones muy importantes porque la proteína Apa nativa ha generado un nivel de protección comparable al de BCG (Kumar *et al.*, 2003) y la proteína expresada en *E. coli* inhibió de manera significativa el crecimiento de *M. tuberculosis* cuando se administró por vía intranasal (Sable *et al.*, 2011), sin embargo, se observó que la inducción de la respuesta inmune depende de la glicosilación en la proteína (Horn *et al.*, 1999; Romian *et al.*, 1999), por lo tanto, esta proteína glicosilada que induce un nivel significativamente mayor de proliferación que la proteína nativa tiene un alto potencial para ser considerado como un candidato vacunal con mejores resultados que la proteína Apa expresada en *E.coli*.

## CONCLUSIONES

1. La respuesta de anticuerpos IgG determinada en los sueros de los ratones contra la proteína Apa de *M. tuberculosis* no difieren significativamente de la respuesta establecida contra las proteínas Apa recombinantes expresadas en *S. lividans* y *E.coli*.
2. La respuesta linfoproliferativa inducida por la proteína recombinante expresada en *S. lividans* fue mayor que la respuesta estimulada por la proteína nativa y la recombinante expresada en *E. coli*.
3. La glicosilación juega un papel muy importante en la respuesta celular.
4. Las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ son estimuladas por las proteínas Apa nativa y recombinante expresada en *S.lividans*.

## **PERSPECTIVAS**

1. Determinar los diferentes porcentajes de glicoformas en la proteína expresada en *S. lividans*.
2. Evaluar el perfil de citocinas estimuladas con las diferentes proteínas.
3. Desarrollar un modelo de vacunación con la proteína expresada en *S. lividans*.
4. Investigar el receptor o receptores con los cuales interactúan las proteínas.

## REFERENCIAS

- About-Zeid, C., Filley, E., Steele J., Rook & G. A. W. (1987). A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. *Journal of Immunological Methods*, 98, 5-10.
- Akira, S., Uematsu S. & Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Algood, H. M., Chan, S. J. & Flynn, J. L. (2003). Chemokines and tuberculosis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14(6), 467-477.
- American Thoracic Society. (1990) Center for disease control. Diagnostic standars and classification of tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, 142: 725-735.
- Andersen, P. (1994). Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infection and Immunity*, 62, 2536–2544.
- Barral, D. C. & Brenner, M. B. (2007). CD1 antigen presentation: how it works. *Nature Reviews Immunology*, 7(12), 929-941.
- Bean, A. G. D., Roach, D. R. & H. Briscoe. (1999). Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *The Journal of Immunology*, 162(6), 3504-3511.
- Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H. H. & Kabelitz, D. (2008). Innate immune functions of human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunobiology*, 213(3-4), 173-182.
- Bloom, B. R. & Fine, P. E. M. (1994). The BCG Experience: Implications for future vaccines against tuberculosis. En Bloom, B. R. (Ed.), *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control* (531-557). Washington, DC. American Society of Microbiology.
- Brock, I., Munk, M. E., Kok-Jensen, A. & Andersen, P. (2001). Performance of whole blood IFN- $\gamma$  test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5(5), 462-467.
- Cardona P. E. (Ed.). (2012). *Understanding Tuberculosis-Analyzing the origin of Mycobacterium tuberculosis pathogenicity*. Croacia: INTECH.

- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine*, 184(2), 747-752.
- Chan, J. & J. Flynn. (2004). The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clinical Immunology*, 110(1), 2-12.
- Chen, M., Gan, H. & Remold, H. G. (2006). A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3707-3716.
- Cole, S. T., Davis, E. K., McMurray, D. N. & Jacobs Jr, W. R. (2005). Tuberculosis and the tubercle bacillus. EUA: American Society of Microbiology PRESS.
- Cooper, A. M. (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 27, 393-422.
- Daniel, T. M. & Debanne S. M. (1987). The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunoabsorbent assay. *American Review of Respiratory Disease*, 135, 1137-1151.
- Dannenber, A.M. Jr. (1991). Delay type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today*, 12, 228-232.
- Dobos, K. M., Swiderek, K., Khoo, K., Brennan, P. J. & Belisle, J. T. (1995). Evidence for glycosylation sites on the 45-Kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 63(8), 2846–2853.
- Dobos, K. M., Khoo, K., Swiderek, K. M., Brennan, P. J. & Belisle, J. T. (1996). Definition of the full extent of glycosylation of the 45-Kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2498–2506
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V. & Raviglione, M. C. (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Journal of the American Medical Association*, 282(7), 677–686.
- El-Shazly, S., Mustafa, A. S., Suhail, A. & Al-Attiyah, R. (2007). Utility of three mammalian cell entry proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in the serodiagnosis of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(6), 676–682.



Espitia, C. & R. Mancilla. (1989). Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clinical and Experimental Immunology*, 77, 378–383.

Espitia, C., Espinosa, R., Saavedra, R., Mancilla, R., Romain, F., Laqueyrie, A. & Moreno, C. (1995). Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-Kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-Kilodalton antigens. *Infection and Immunity*, 63(2), 580-584.

Farer, L. S., Lowel, L. M. & Meador, M. P. (1979). Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *American Journal of Epidemiology*, 109, 205-217.

Flynn, J. L. & Chan, J. (2005). What's good for the host is good for the bug. *Trends in Microbiology*, 13(3), 98-102.

Fonseca, D. P. A. J., Benaissa-Trouw, B., van Engelen, M., Kraaijeveld, C. A., Snippe, H. & Verheul, A. F. M. (2001). Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-Kilodalton protein. *Infection and Immunity*, 69(8), 4839-4845.

Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. & Dye, C. (2003). Tuberculosis. *The Lancet*. 362(9387), 887–899.

Fuhrmann, S., Streitz, M. & Kern, F. (2008). How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis. *Cytometry Part A*. 73(11), 1100–1106.

Glickman, M. S. & Jacobs Jr, W. R. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell*, 104, 477-85.

Golden, M. P. & Vikram, H. R. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American Family Physician*, 72(9), 1761–1768.

Hill, P. C., Brookes, R. H. & Fox, A. (2004). Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clinical Infectious Diseases*, 38(7), 966–973.

Horn, C., Namane, A., Pescher, P., Riviere, M., Romain, F., Puzo, G., Barzu, O. & Marchal, G. (1999). Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to

changes in their mannosylation pattern. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32023–32030.

Ivanyi, J. (2011). Serodiagnosis of tuberculosis: Due to shift track. Review. *Tuberculosis*, 92, 31-37.

Janicki, B. W., Chaparas, S. D., Daniel, T. M., Kubica, G. P., Wright Jr, G. L. & Yee G. S. (1971). A reference system for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *American Review of Respiratory Diseases*, 104, 602-604.

Jo, E.K. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(3), 279–286.

Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H. & Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cellular Microbiology*, 9(5), 1087–1098.

Kang, P. B., Azad, A. K. & Torrelles, J. B. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 987–999.

Kumar, P., Rao-Amara, R., Kumar-Challu, V., Kumar-Chadda, V. & Satchidanandam, V. (2003). The Apa Protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4 and CD8 T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infection and immunity*, 71, 1929–1937.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Laqueyrie, A., Militzer, P., Romain, F., Eiglmeier, K., Cole, S. & Marchal, G. (1995). Cloning, sequencing, and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-Kilodalton secreted antigen complex. *Infection and immunity*, 63(10), 4003–4010.

Lara, M., Servín-González, L., Singh, M., Moreno, C., Cohen, I., Nimtz, M. & Espitia, C. (2004). Expression, secretion and glycosylation of the 45- and 47-kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Applied and environmental microbiology*, 70, 679–685.

Lichtenauer-Kaligis, E. G., Boer, R. T. & Verreck F. A. W. 2003. Severe *Mycobacterium bovis* BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor  $\beta$ 1

deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *European Journal of Immunology*, 33(1), 59–69

Lowe, J. B. & Jamey M. (2003). A genetic approach to mammalian glycan function. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 643–691.

Mathema, B., Kurepina, N., Fallows, D. & Kreiswirth, B. N. (2008). Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 29(5), 467–480.

Mokaddas, E., Suhail, S. & Samir, I. (2008). Secular trends in susceptibility patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait, 1996-2005. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 12(3), 319–325.

Moody, D. B., Young, D. C. & Cheng T.Y. (2004). T cell activation by lipopeptide antigens. *Science*. 303(5657), 527–531.

Munk, M. E., Gatrill, A. J. & Kaufmann S. H. (1990). Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. *Journal of Immunology*, 145, 2434-2439.

Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Inmunología de Janeway*. México: Mc Graw-Hill.

Nahid, P., Pai, M. & Hopewell P. C. (2006). Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(1), 103–110.

Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 158, 670-689.

National Institute of Health. (1986). Department of health and human services, part III. Federal register (USA). 51: 16958-16961.

Nazish, F. (2009). Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Respiratory Medicine CME*, 2(4), 151-154.

Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M. & Puzo, G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7477–7485.

Orme, I. M. & Collins, F. M. (1986). Crossprotection against nontuberculous mycobacterial infections by *Mycobacterium tuberculosis* memory immune T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 163, 203-208.

Pai. M., Riley, L.W. & Colford Jr, J. M. (2004). Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*. 4(12), 761–766.

Pai, M., Zwerling, A. & Menzies, D. (2008). Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Annals of Internal Medicine*, 149(3), 177–184.

Pal, P. G. & Horwitz, M. A. (1992). Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*, 60, 4781–4792.

Palomino, J. C., Leão, S. C. & Ritacco, V. (2007). Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Recuperado de <http://www.tuberculosisintextbook.com>

Periasamy, S., Dhiman, R., Barnes, P. F., Paidipally, P., Tvinnereim, A., Bandaru, A., lakshmi-Valluri, V. & Vankayalapati, R. (2010). Programmed death 1 and cytokine inducible Sh2-containing protein dependent expansion of regulatory t cells upon stimulation with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 203,1256–63

Quah, B. J. C., Warren, H. S. & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*. 2(9), 2049-2056.

Rodríguez, L. C., Diwan, V. K. & Wheeler, J. G. (1993). Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 22(6), 1154-1158.

Romain, F., Horn, C., Pescher, P., Namane, A., Riviere, M., Puzo, G., Barzu, O. & Marchal, G. (1999). Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* Cellular Immune responses. *Infection and Immunity*, 67(11), 5567-5572.

Romain, F., Augier, J., Pescher, P. & Marchal, G. (1993). Isolation of a proline-rich mycobacterial protein eliciting delayed-type hypersensitivity reactions only in guinea pigs immunized with living mycobacteria. *Immunology*, 90, 5322-5326.

Sable, S. B., Cheruvu, M., Nandakumar, S., Sharma, S., Bandyopadhyay, K., Kellar, K. L., Posey, J. E., Plikaytis, B. B., Amara, R. R. & Shinnick, T. M. (2011). Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination. *PLoS ONE*, 6(7), 1-12.

Scanga, C. A., Mohan, V. P., Tanaka, K., Alland, D., Flynn, J. L. & Chan, J. (2001). The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infection and Immunity*, 69(12), 7711–7717.

Scott-Browne, J. P., Shafiani, S., Tucker-Heard, G., Ishida-Tsubota, K., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., Bevan, M. J. & Urdahl, K. B. (2007). Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2159-2169.

Secretaría de Salud. (2009). Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México.

Secretaría de Salud (2008). Vigilancia Epidemiológica Semana 14.

Serbina, N. V., Lazarevic, V. & Flynn, J. L. (2001). CD4+ T cells are required for the development of cytotoxic CD8+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology*, 167(12), 6991–7000.

Shi, C., Wang, X., Zhang, H., Xu, Z., Li, Y. & Yuan, L. (2007) Immune responses and protective efficacy induced by 85B antigen and early secreted antigenic target-6 kDa antigen fusion protein secreted by recombinant bacille Calmette-Guérin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*. 39(4), 290-296.

Shi, C., Yuan, S., Zhang, T., Wang, L. & Xu, Z. (2008). Cell-mediated immune response and protective efficacy against infection with *Mycobacterium tuberculosis* induced by Hsp65 and hIL-2 fusion protein in mice. *Scandinavian Journal of immunology*, 69, 140-149.

Suhail, A. (2010). Pathogenesis, immunology and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection Review Article. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 1-17.

Suhail, A. & Mokaddas, E. (2009). Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant *tuberculosis*. *Respiratory Medicine*, 103(12), 1777–1790.

Suhail, S., Amoudy, H. A., Thole, J. E. R., Young, D. B. & Mustafa, A. S. (1999). Identification of a novel protein antigen encoded by a *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1 region gene. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49(5), 515-522.

Tazi, A., Bouchonnet, F., Valeyre, D., Cadranel, J., Battesti, J. P. & Hance, A. J. (1992). Characterization of gamma/delta T- lymphocytes in the peripheral blood of patients with active tuberculosis. A comparison with normal subjects and patients with sarcoidosis. *American Review of Respiratory Disease*, 146, 1216-21.

Tuberculist Web server, 2010. Disponible en: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>

Tufariello, J. M., Chan, J. & Flynn, J. L. (2003). Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(9), 578-590.

Toossi, Z., Kleinherz, M. E. & Ellner, J. J. (1986). Defective IL-2 production and responsiveness in human tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 163, 1162-1172.

Ueta, C., Tsuyuguchi, I., Kawasumi, H., Takashima, T., Toba, H. & Kishimoto, S. (1994). Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. *Infection Immunity*, 62, 5434-41.

UniProtKB, 2011. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q50906>

De Valiere, S., Abate, G., Blazevic, A., Heuertz, R. M. & Hoft, D. F. (2005). Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infection and immunity*, 73(10), 6711-6720.

Vallin, C., Ramos, A., Pimienta, E., Rodríguez, C., Hernández, T., Hernández I., Del Sol, R., Rosabal, G., Van Mellaert, L. & Anné, J. (2006). *Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Tuberculosis*, 86, 198-202.

Van Pinxteren L. A. H., J. P. Cassidy, B. H. C. Smedegaard, E. M. Agger, P. Andersen. (2000). Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *European Journal of Immunology*, 30(12), 3689-3698.

World Health Organization. (2009). Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. WHO/HTM/ TB/2009.411, WHO, Geneva, Switzerland.

Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejska, K. E. & Eissa, N. T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 27(1), 135–144.

Xu, J. N., Chen, J. P. & Chen, D. L. (2012). Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* composed of the 10-Kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68. *Clinical and Vaccine Immunology*, 536-544.

Yamamoto, M., Sato, S. & Hemmi, H. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway, *Science*. 301(5633), 640–643.

Youmans, G. P. (1946). A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent human type tubercle bacilli. *Journal of Bacteriology*, 51, 703-710.

Young, D. B., Kaufmann, S. H. E., Hermans, P. W. M. & Thole, J. E. R. (1992). Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Molecular Microbiology*, 6, 133-145.

Zhang, H., Peng, P., Miao, S., Zhao, Y., Mao, F., Wang, L., Bai, Y., Xu, Z., Wei, S & Shi, C. (2010). Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72, 349-357.

## ANEXO 1

### Soluciones utilizadas

1. Medio líquido sintético de Proskawer y Beck modificado por Youmans.

Reactivo	Concentración (mM)
Asparagina	37.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36.0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.80
Citrato de sodio-2H <sub>2</sub> O	2.00
MgCl-6H <sub>2</sub> O	0.96
Glicerol	0.68

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 5N. Se esteriliza en autoclave

2. Amortiguador fosfato salino 10x pH 7.4 (PBS pH 7.4).

NaCl 0.15 M-Fosfatos 0.15 M

Preparar las siguientes soluciones:

A) NaCl	1.5 M
B) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 M
C) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 M

Ajustar el pH de la solución B a 7.4 con la solución C. A 900 mL de la solución A agregar 100 mL de la solución B ajustada.

Nota: El fosfato dibásico de sodio se disuelve solamente calentando ligeramente el agua.



3. Preparación de geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE) al 12%.

Gel separado al 12%		Gel concentrador al 4.5%	
Resolving gel buffer (4x)	1.25 mL	Stacking gel buffer 4x	0.313 mL
Agua	1.75 mL	Agua	0.75 mL
Acrilamida	2 mL	Acrilamida	0.188 mL
Persulfato de amonio al 10% (APS)	50 $\mu$ L	Persulfato de amonio al 10% (APS)	25 $\mu$ L
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	5.0 $\mu$ L	Tetrametiletilendiamina (TEMED)	2.5 $\mu$ L

Adicionar el TEMED instantes antes de colocar en la placa.

Primero dejar polimerizar el gel separador y adicionar posteriormente el gel concentrador.

4. Amortiguador de acetatos 100 mM pH 5.

A) Ácido acético	0.2 M (5.8 mL/500mL)
B) Ácetato de sodio-3H <sub>2</sub> O	0.2 M (27.2g/1000mL).

Mezclar: 280 mL de A + 704 mL de B y aforar a 2000 mL.

5. Amortiguador catiónico pH 6.

Cantidades para preparar 2 L.

Reactivo	Gramos.
Acetato de sodio (0.1 M)	16.406
NaCl (1 M)	116.88
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O (1 mM)	0.396
MgCl <sub>2</sub> - 6H <sub>2</sub> O (1 mM)	0.730
CaCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O (1 mM)*	0.294

\* El  $\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$  se disuelve por separado y se adiciona después de ajustar el pH a 6 con ácido acético.

6. Amortiguador de lavado cromatografía de intercambio Aniónico. Tris-HCl 20 mM pH 8.3.

Tris-HCl	4.844 g
Agua	Aforar a 2L.

7. Amortiguador de elución cromatografía de intercambio Aniónico. Tris-HCl 20 mM pH 8.3.

NaCl	58.44 g
Tris-HCl 20mM	Aforar a 1000 mL

8. Medio de cultivo Luria Bertani.

Cantidades para la preparación de 1L de medio de cultivo.

Bacto Tristona.	10 g
Extracto de levadura.	5 g
NaCl.	10 g

Se adicionó con:

Kanamicina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
sacarosa (peso/volumen)	34%

9. Solución de Desoxicolato al 1%.

Desoxicolato de sodio	1 g
Agua libre de pirógenos	100 mL

10. Amortiguador de carga.

Tris-HCl pH 6.8	62.5 mM
Glicerol	25%
SDS	2%
$\beta$ -mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0.01%

11. Amortiguador de corrida.

12. Amortiguador de transferencia.

A 800 mL de Tris 25 mM-Glicina 193 mM adicionar 200 mL de etanol absoluto.

13. Amortiguador de transferencia sin metanol.

Tris	25 mM
Glicina	193 mM

14. Solución de azul de coomassie.

Para tinción con Coomassie R azul brillante, para 200 mL

Coomassie R 0.1%	0.2 g
Metanol 50%	100 mL
Ácido acético 7%	14 mL

Aforar a 200 mL

15. Solución de rojo de Ponceau.

Rojo de Ponceau	0.3%
Ácido tricloroacético (CCl <sub>3</sub> COOH)	3%

16. Amortiguador de carbonatos 50 mM pH 9.6.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15 mM
NaHCO <sub>3</sub>	34.8 mM

Ajustar el pH a 9.6 con NaOH o HCl

17. Solución reveladora de ELISA.

DAB (N, N- Diaminobenzidina) en PBS pH 7.4

Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.1%

18. Medio de cultivo RPMI-1640 sin complementar.

Reactivo	Cantidad
RPMI polvo con L-glutamina	1 sobre
Agua	1 litro
NaHCO <sub>3</sub> 26 mM	2.2 gramos
HEPES 20 mM	4.76 gramos

\*Si el RPMI no tiene L-glutamina se adiciona 1 mL por cada 100 mL de medio.

19. Medio de cultivo RPMI-1640 complementado.

Reactivo	Cantidad (mL)
RPMI con L-glutamina	44
Suero fetal bovino inactivado 10%	5

Antibiótico/antimicótico-1x	0.5
Aminoácidos no esenciales (NE)-1x	0.5
2-Mercaptoetanol (2-ME)	50 $\mu$ L

20. Solución de lisis de glóbulos rojos.

Reactivo	gramos para 250 mL
NH <sub>4</sub> Cl 155 mM	2.06
NaHCO <sub>3</sub> 10 mM	0.21
EDTA 0.1 mM	0.0093 (9.0306 mg)

21. Amortiguador fosfato salino de Dulbecco.

Reactivo	gramos para 250 mL
NaCl 140 mM	2.04
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	0.35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.8 mM	0.06
KCl 2.7 mM	0.05

22. Solución de azul de tripano al 0.4%.

Azul de tripano	0.4 g
Agua destilada	100 mL
Filtrar.	

23. Solución stock de carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE).

Disolver el CFSE en sulfóxido de dimetilo (DMSO) a una concentración a 5 mM que se almacena en alícuotas.

Las soluciones de trabajo se preparan a partir de la solución stock y se diluyen con DPBS.

24. Solución de concanavalina A para estimulación de células.

Del Stock que está a 1 mg/mL preparar solución de trabajo 100 µg/ml y adicionar 20 µl por pozo.

25. Solución para citometría de flujo.

DPBS	100 mL
Suero fetal bovino inactivado	2 mL

## ANEXO 2

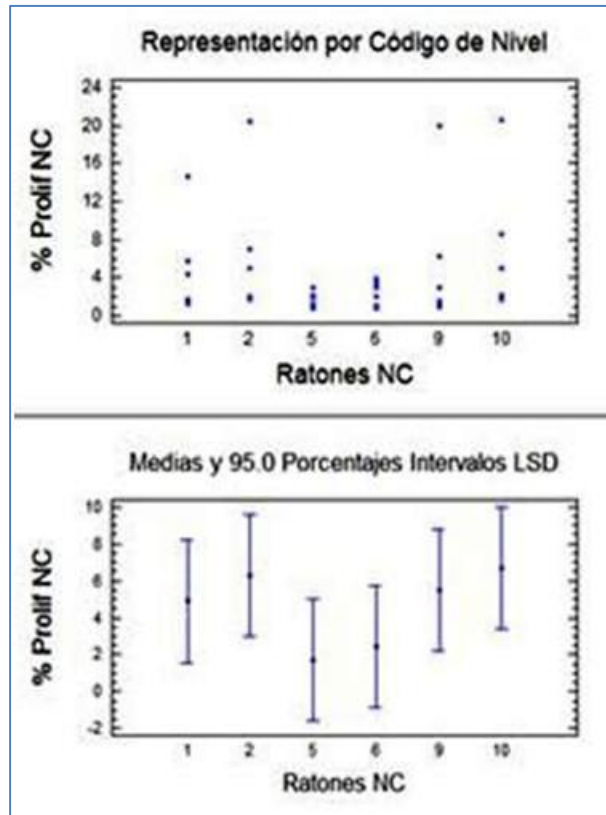


Tabla ANOVA para % Prolif NC según Ratones NC

### Análisis de la Varianza

---

Fuente	Sumas de cuad.	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	128.054	0.82	0.5448

---

La tabla ANOVA descompone la varianza de % Prolif NC en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 0.820609, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual

a 0.05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las % Prolif NC medias de un nivel de Ratones NC a otro para un 95.0%.

Carril 1: Células sin estimular *M. tuberculosis*, carril 2: células estimuladas con 5 µg/mL de la proteína Apa de *M. tuberculosis*, carril 3: Células sin estimular *S. lividans*, carril 4: células estimuladas con 5 µg/mL de la proteína Apa expresada en *S. lividans*, Carril 5: Células sin estimular *E. coli*, carril 6: células estimuladas con 5 µg/mL de la proteína Apa expresada en *E. coli*.

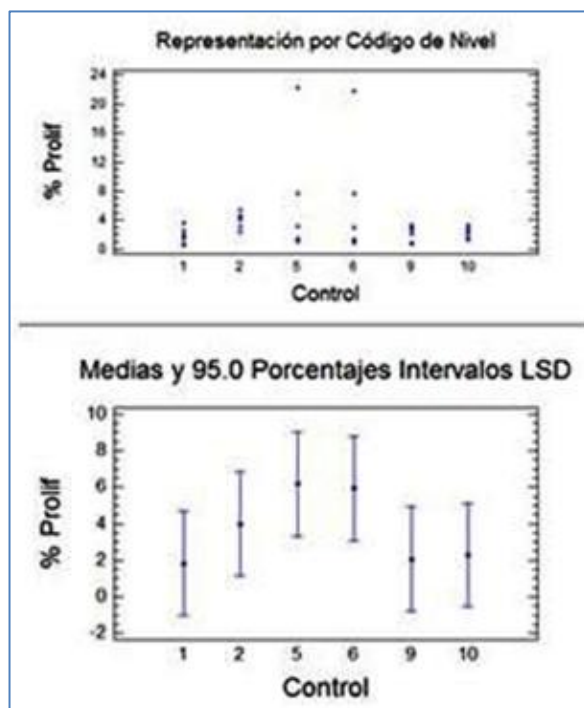


Tabla ANOVA para % Prolif según Control

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	116.121	1.00	0.4374



La tabla ANOVA descompone la varianza de % Prolif en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 0.99521, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0.05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las % Prolif medias de un nivel de Control a otro para un 95.0%.

Carril 1: Células sin estimular *M. tuberculosis*, carril 2: células estimuladas con 5 µg/mL de la proteína Apa de *M. tuberculosis*, carril 3: Células sin estimular *S. lividans*, carril 4: células estimuladas con 5 µg/mL de la proteína Apa expresada en *S. lividans*, Carril 5: Células sin estimular *E. coli*, carril 6: células estimuladas con 5 µg/mL de la proteína Apa expresada en *E. coli*.