

13  
11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA



"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE  
COMPONENTES DEL FILTRADO DE CULTIVO DE  
*Mycobacterium tuberculosis*  
POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDIAS  
( IN M U N O L O G I A )  
P R E S E N T A  
LAURA VERONICA SANCHEZ OROZCO

México, D.F.

1991



## **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 está 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.

## INDICE

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	4
Respuesta Inmune a enfermedades micobacterianas	5
Participación del macrófago en enfermedades micobacterianas	7
Participación del linfocito en enfermedades micobacterianas	8
Participación de células NK en enfermedades micobacterianas	12
Participación de leucocitos PMN en enf. micobacterianas	12
Respuesta inmune a antígenos micobacterianos	12
TABLA I. Caracterización de componentes de <i>Mycobacterias</i>	14
El antígeno de 71 KDa	15
El antígeno de 65 KDa	15
El antígeno de 38 KDa	16
El antígeno de 35 KDa	17
Los antígenos de 31/33 KDa	17
El antígeno de 23 KDa	18
El antígeno de 14 KDa	18
El antígeno MPB 70	19
Identificación de antígenos por anticuerpos monoclonales	19
Justificación del trabajo	22
Especificidad de las lectinas utilizadas para cromatografía de afinidad	24
FIFURA I. Estructuras glicosídicas reconocidas por las lectinas y características de las mismas	25
OBJETIVOS DEL TRABAJO	26
MATERIAL Y METODOS	27
Métodos bioquímicos	27
Purificación de las lectinas de lenteja y alubia	27
Preparación del extracto crudo de lenteja y alubia	28
Cromatografía de afinidad	28
Acoplamiento de lectinas a sefarosa 4B activada	28
Obtención del ETFC de <i>M. tuberculosis</i>	29
Cromatografía de afinidad utilizando lectinas	30
FIGURA 2. Proceso de purificación de glicoproteínas de <i>M. tb</i>	31
Composición de carbohidratos por cromatografía de gases	32
Electroforesis en geles de Poliacrilamida	32
Métodos inmunológicos	33
Obtención del suero hiperinmune	33
Producción de anticuerpos monoclonales	33
Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal	33
Linea celular de mieloma	33
Células esplénicas inmunes	34
Obtención de células de bazo	34
Fusión	34
Selección y clonación de hibridomas	35
Expansión de hibridomas	35
ELISA	36
Inmuno-electrotransferencia	37

RESULTADOS	38
Métodos bioquímicos	38
Purificación de las lectinas de lenteja y alubia	38
TABLA 2. Proceso de purificación de las lectinas de lenteja y alubia	38
Acoplamiento de lectinas a sefarosa activada	39
Cromatografía de afinidad utilizando lectinas para el aislamiento de componentes del ETFC	39
FIGURA 3. Patrones de elución	40
FIGURA 4. Patrón electroforético de las fracciones retenidas por cromatografía de afinidad y del ETFC de <i>M. tb</i> H37Rv	42
FIGURA 5. Patrón electroforético de las fracciones retenidas por cromatografía de afinidad y del ETFC de <i>M. tb</i> H37Ra	43
Determinación de proteínas y carbohidratos	44
TABLA 3. Composición de proteína y carbohidrato del ETFC de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y las diferentes fracciones retenidas	44
Composición de carbohidratos por cromatografía de gases	44
TABLA 4. Composición de carbohidratos de las fracciones retenidas	45
Métodos inmunológicos	46
Determinación de la presencia de anticuerpos	46
TABLA 5. ELISA de los sueros de pacientes con las fracciones aisladas	47
Producción de anticuerpos monoclonales	47
ELISA	48
TABLA 6. ELISA con las fracciones aisladas para determinar la reactividad de los anticuerpos monoclonales/policonales	48
Inmunolectrotransferencia	49
TABLA 7. Reacción del anticuerpo monoclonal MM.Con-A-B.8 con las diferentes micobacterias	50
FIGURA 6. Patrón de reconocimiento del anticuerpo monoclonal MM-Con-A-B.8 con el ETFC de <i>M. tuberculosis</i>	51
FIGURA 7. Patrón de reconocimiento del anticuerpo monoclonal MM-Con-AB.8 con los ETFC de diferentes cepas micobacterianas	52
DISCUSION	53
PERSPECTIVAS	62
BIBLIOGRAFIA	63

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
Amps	Amperes
BCG	Bacilo de Calmette y Guerin
CH <sub>3</sub> COOH	Acido acético
Con-A	Concanavalina A
D	Daltons
DME/DME-s	Medio de cultivo Dubelco modificado por Eagle/suplementado
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ETFC	Extracto total del Filtrado de Cultivo
GalNAC	N-acetil galactosamina
GlcNAC	N-acetil glucosamina
HAT	Medio DME suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina
HGPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa
HT	Medio DME suplementado con hipoxantina y timidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
ip	Intraperitoneal
IL	Interleucina
KDa	Kilodaltons
LAM	Lipoarabinomanana
M $\alpha$ DMP	Metil $\alpha$ D Manopiranosido
MIF	Factor inhibidor de la migración
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de Poliacrilamida
PBS	Solución salina en amortiguador de fosfatos
PBS-T	Tween 20 en PBS
PNC	Papel de nitrocelulosa
PPD	Proteína purificada derivada de tuberculina
SDS	Dodesil sulfato de sodio
SS	Solución salina (NaCl 0.9%)
TBP	Tuberculosis pulmonar
UHA	Unidades hemaglutinantes

## RESUMEN

Por cromatografía de afinidad con las lectinas de Con-A, lenteja y alubia se aislaron diferentes antígenos del filtrado de cultivo del *Mycobacterium tuberculosis* cepas H37Rv y H37Ra. Las diferencias más importantes entre las fracciones obtenidas indican variaciones de la concentración de proteína y carbohidratos, estas diferencias son a su vez cualitativas. En la cepa H37Rv, la fracción aislada en Con-A presenta los componentes de 93, 48 y 33 KDa; la aislada en lenteja los de 100, 96 y 38 KDa y en alubia se encuentran presentes los de 66 y 43 KDa. Las fracciones aisladas en la cepa H37Ra encontramos que el antígeno eluido en la lectina de Con-A es de de 31 KDa; en lenteja se aisló principalmente el de 38 KDa, aunque también se encuentran los de 61/58 KDa y los de 31/33 KDa; en alubia, el antígeno aislado de forma predominante es el de 38 KDa. En la composición de carbohidratos encontramos que en la fracción aislada en Con-A hay 2.3 veces mayor concentración de glucosa, 10 veces más xilosa, 14 veces más ácido murámico en la cepa H37Rv que en la cepa H37Ra. En la fracción eluida en lenteja hay 2.6 veces más glucosa, 20 veces más xilosa, 5 veces más ácido murámico en H37Rv y no se encuentra galactosa a diferencia de la cepa H37Ra. En la fracción eluida en alubia, la principal diferencia es que se encuentra el doble de concentración de glucosa en la cepa H37Ra en relación con la cepa H37Rv.

El anticuerpo monoclonal obtenido al inmunizar ratones BALB/c contra los antígenos aislados de *M. tuberculosis* cepa H37Rv por cromatografía de afinidad utilizando la lectina de Con-A, reconoce los antígenos de 31/33 KDa en la cepa H37Rv, y de los antígenos eluidos de la columna de Con-A reconoce únicamente al antígeno de 33 KDa de esta misma cepa.

## SUMMARY

Different antigens from *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and H<sub>37</sub>Ra were isolated by affinity chromatography in Con-A, common lentil and alubia lectin columns. In *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv the 93, 48 and 33 KDa antigens were eluted from the Con-A column. The 100, 96 and 38 KDa antigens from the lentil lectin column; the 66 and 43 KDa antigens from the alubia lectin column. In *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra the 31 KDa antigen was purified from the Con-A column. In the lentil lectin principally the 36 KDa antigen and in a lower amount of 61/58 KDa, 31/33 KDa antigens were obtained. From the alubia lectin column the 38 KDa was the principal isolated antigen.

The carbohydrate composition of the isolated antigens showed important differences, i.e. the H<sub>37</sub>Rv Con-A purified fraction was predominately composed by arabinose, xilose, glucose and muramid acid, whereas the H<sub>37</sub>Ra preparation had a minor content of glucose (2.3 times less), xilose (10 times less) and muramic acid was not present.

A monoclonal antibody (MM-Con-A-B.8) was produced against the Con-A purified fraction from H<sub>37</sub>Rv, which recognized the 33 KDa as well the 31 KDa antigen in the culture filtrate from the H<sub>37</sub>Rv, but also reacted with a high molecular weight component (65KDa). This monoclonal antibody only recognized the 33 KDa antigen in the H<sub>37</sub>Ra extract eluted from Con-A.

## INTRODUCCION

A pesar de que el bacilo tuberculoso fue descubierto desde 1882 por Robert Koch (22), la enfermedad producida por esta bacteria sigue siendo un problema mundial. Se cree que cada año hay 10 millones de personas que desarrollan la enfermedad y al menos 3 millones de ellas mueren a consecuencia de la misma (22,96,127). En países en desarrollo es una de las principales causas de mortalidad. Las tecnologías que se usan para su diagnóstico no han tenido el impacto esperado en su control, debido a que la detección de la enfermedad, especialmente en estadios tempranos, es difícil. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad no son específicas pudiendose confundir con otras enfermedades y/o presentarse asociada con neumoconiosis, neumonía, sarcoidosis o absceso pulmonar (7). Por otro lado se ha encontrado que los diagnósticos realizados basándose con placas simples del tórax tienen una inespecificidad que va del 30 al 50% (7).

Por las razones señaladas, en la mayoría de los países en desarrollo menos del 50% de los casos son identificados, por lo que las personas infectadas continúan transmitiendo la enfermedad (127).

Los avances de la tecnología del ADN recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales han permitido el aislamiento de antígenos puros de *Mycobacterium tuberculosis* tanto para el desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunológico como para el estudio de la interacción de estos componentes con el huésped; sin embargo se requieren aún más esfuerzos ya que a pesar de que alguno de los antígenos que se han logrado aislar poseen epitopos especie-específicos, otros son compartidos; éstos últimos dan una elevada reactividad cruzada. Lo anterior indica que aún no contamos con un método diagnóstico eficiente ni con el desarrollo de una vacuna superior a la de BCG.



## ANTECEDENTES

La tuberculosis es causada por bacterias del género *Mycobacterium*, patógeno intracelular facultativo que vive y se multiplica en macrófagos (22). Puede crecer en medios sintéticos simples que contienen al glicerol como principal fuente de carbono y la asparagina como fuente de Nitrógeno. Su crecimiento es estimulado por lípidos, ácidos grasos y por la yema de huevo (39). Usualmente el *M. tuberculosis* es identificado por sus colonias en cordón, no pigmentadas y rugosas, en agar oléico-albúmina. Su tiempo de duplicación es de 12 horas (39).

La pared celular de la micobacteria, además de ser más gruesa que la de otros microorganismos es lipofílica, lo que le da características específicas como la agregación de células, resistencia a muchos agentes bactericidas, incluyendo enzimas líticas producidas por las células infectadas del huésped, posible impermeabilidad a algunos nutrientes y antibióticos (123) y su característica de alcohol-ácido resistencia, propiedad debida a la existencia en la pared celular de ácidos micólicos característicos de la micobacteria (22,39,123).

La pared celular está compuesta de una membrana fosfolipídica en su parte interna, que contiene fosfolípidos no usuales como fosfatidil inositol manósido; en la parte externa, rodeando a esta membrana fosfolipídica en forma de halo, se encuentra la peptidoglicana similar a la de bacterias Gram (+), unida a ésta, por enlace fosfodiéster se encuentra la arabinogalactana a la cual se unen ácidos grasos de cadena larga (60 a 80 carbonos) llamados ácidos micólicos, a los cuales se unen azúcares tales como trealosa dando moléculas que originalmente fueron llamadas factor cordón (6,6'-dimicolato de trealosa). En la trealosa se encuentran unidos sulfolípidos así como también ésteres de ftiocerol dimicocerosatos (123).

En el bacilo tuberculoso existe un polipéptido asociado a la pared celular de ácido poli L-glutámico el cual se encuentra unido al peptidoglicano, parece que este no se encuentra presente en cepas avirulentas o en el *M. bovis* BCG por lo que se sugiere que podría jugar un papel en la virulencia del bacilo tuberculoso (123,124).

Los lípidos tienen un papel estructural, participan de manera importante en la patogenicidad de la micobacteria también son potentes inmunógenos. Así por ejemplo el dimicolato de trehalosa, polifitionoil trealosa y al micósido C se les ha identificado una actividad inhibitoria en la fosforilación oxidativa mitocondrial de las células del huésped, probablemente debida a que alteran la estructura y función de la membrana (113).

En *M. leprae* uno de los antígenos especie-específicos es el glicolípido fenólico I el cual puede ser de vital importancia en países endémicos de lepra para el uso de un sistema diagnóstico, la parte específica de este antígeno es proporcionada por estructuras de carbohidratos (26).

Del *M. bovis* se ha aislado un glicolípido fenólico el micósido B que contiene al azúcar 2-O-Metil ramnosa. Con el epitopo que tiene la parte glicánica se construyó una neoglicoproteína, encontrando que este epitopo es inmunodominante y específico para *M. bovis* (25).

#### RESPUESTA INMUNE A ENFERMEDADES MICOBACTERIANAS:

La infección primaria por micobacterias sucede cuando un huésped que no ha tenido contacto con la bacteria, inhala a la micobacteria que está suspendida en gotas de aire de 1-5  $\mu\text{m}$  de tamaño, la cual pasa a los alveólos (7). Las primeras reacciones celulares en tuberculosis humana aún son desconocidas, pero datos en animales de experimentación muestran que probablemente las reacciones de inflamación aguda se presenten en el alveólo, con

fagocitosis del bacilo por leucocitos polimorfonucleares, éstos son incapaces de matar a la micobacteria por lo que la liberación de factores quimiotácticos atraen en un segundo intento de defensa a los macrófagos. Los bacilos son rápidamente llevados por los macrófagos a nódulos linfáticos produciendo activación, dando lugar a células epiteloideas y fusión de macrófagos (células de Langhans) provocando la formación de granuloma. Dentro del granuloma se presenta caseificación cuando la hipersensibilidad cutánea a tuberculina es demostrable, uniendo en esta forma la patogénesis con el fenómeno de hipersensibilidad tardía (123).

Recientemente estudios hechos en ratones con la finalidad de seguir la cinética de la respuesta de macrófagos alveolares a un estímulo infeccioso por micobacterias, se encontró que si la infección es producida por cepas virulentas para el ratón, estas cepas inducen una respuesta celular mononuclear moderada, en cambio con cepas avirulentas se induce un flujo caracterizado predominantemente de leucocitos polimorfonucleares, fenómeno análogo al observado cuando micobacterias muertas por calor son introducidas en el pulmón. Esto sugiere que la micobacteria dentro del pulmón debe permanecer en un estado metabólicamente activo, para inducir una respuesta mononuclear máxima, probablemente porque la micobacteria en crecimiento libera factores quimiotácticos potentes para la atracción de monocitos sanguíneos circulantes. Hasta el momento no hay información con respecto a la naturaleza de los agentes quimiotácticos, si son productos bacterianos o factores del huésped, se ha sugerido que pudieran ser productos celulares con efecto inflamatorio tales como las interleucinas Il-4, Il-1, Il-8 ú otras citocinas liberadas como resultado de la infección microbiana dentro del tejido alveolar (29). De manera importante el bacilo que se replica en el macrófago puede hacer que éste estalle, debido a ello el bacilo pasa a la corriente sanguínea y se dispersa a nuevos sitios, incluyendo riñón y médula ósea (7).

El desarrollo de tuberculosis se favorece en niños, en pacientes inmunosuprimidos de cualquier edad (7,36), en animales viejos de experimentación (36,99) y en individuos desnutridos. En el 90% de ataques por el bacilo tuberculoso se desarrolla inmunidad específica de forma adecuada, la multiplicación del bacilo es bloqueada y el huésped permanece asintomático (7), en el 5% de las personas infectadas no se lleva a cabo el control del microorganismo de forma adecuada y la enfermedad se presenta en el primer año de infección. Otro 5% desarrolla enfermedad a un tiempo más lejano a la adquisición de la infección (7,106). En enfermedades micobacterianas la inmunidad celular juega un papel muy importante para el control de la infección.

#### PARTICIPACION DEL MACROFAGO EN LA ENFERMEDAD MICOBACTERIANA:

Los macrófagos son unas de las principales líneas celulares efectoras de la respuesta inmune celular, así como también de la resistencia natural; pese a ello no se ha demostrado que el macrófago sea capaz de inhibir o matar al *Mycobacterium tuberculosis* (46,109). No obstante se ha asumido que la eliminación de la micobacteria depende de que sea fagocitada por el macrófago, de esta forma los antígenos micobacterianos son presentados en la superficie de esta célula asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Así en la fase efectora de la respuesta inmune celular, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> secretan citocinas tales como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF), e Il-2 que contribuyen al desarrollo del fenómeno de hipersensibilidad tardía. También se sabe que el IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II, de esta forma se favorece la interacción del linfocito T CD4<sup>+</sup> con el macrófago, siendo un mecanismo importante para la amplificación de la inducción del fenómeno de hipersensibilidad tardía (1).

Además el IFN- $\gamma$  es uno de los activadores más potentes para

el macrófago de ratón en términos de la inhibición del crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis*, evaluada ésta por el número de Unidades Formadoras de Colonias al ser cultivado el bacilo después de lisar los macrófagos infectados (53), o por la incorporación de (<sup>3</sup>H) uracilo por el *Mycobacterium* (42,53), aunque en algunos casos se ha observado que incrementa el crecimiento de *M. lepraemurium* (61,91). Estos estudios han sido realizados *in vitro* y en modelos murinos por lo que dificulta la extrapolación de los resultados al humano, además de que el IFN- $\gamma$  recombinante administrado *in vivo* tiene poco efecto sobre la enfermedad (111).

También se ha reportado que la vitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub> colecalciferol) tiene efecto en la disminución de la replicación del bacilo tuberculoso en macrófagos humanos (31). Una de las monocinas producidas por macrófagos alveolares, monocitos y linfocitos es el Factor de Necrosis tumoral. Su producción es estimulada por *M. bovis* BCG, por el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* cepas H37RV y H37Ra y por el antígeno 5 (119). Esta monocina puede estar involucrada en la patogénesis de la tuberculosis ya que tiene propiedades biológicas tales como inducción de fiebre y caquexia en animales, activación de leucocitos polimorfonucleares e induce la producción de la IL-1 (111). En pacientes con lepra lepromatosa la proliferación de timocitos de ratón inducida por la interleucina IL-1, es suprimida por la prostanglandina PGE-2, la cual es producida de forma significativa en cantidades mayores por los monocitos de sangre periférica de estos pacientes (108).

#### PARTICIPACION DEL LINFOCITO EN ENFERMEDADES MICOBACTERIANAS:

En estudios realizados en animales de laboratorio, se ha encontrado que las funciones de los linfocitos T en infecciones tuberculosas son: la de protección, la inducción del fenómeno de hipersensibilidad tardía y de la memoria inmunológica. En 1961 Najarian y col (95) demostraron que la transferencia de

linfocitos sensibilizados con BCG y marcados con timidina  $^3\text{H}$  a cobayos homólogos no sensibilizados, daba como resultado, la reacción positiva a tuberculina, al administrar por vía intradérmica el antígeno PPD. Encontrando 24 horas después, en el sitio de aplicación del antígeno células linfoides específicas marcadas con timidina  $^3\text{H}$ .

Posteriormente Lefford (75) demostró que las células reactivas a la tuberculina eran linfocitos T. Los linfocitos sensibles a la tuberculina tratados con anticuerpo anti linfocito T más complemento, no conferió la sensibilidad a la tuberculina en los animales no sensibilizados. Ultimamente con la ayuda de anticuerpos monoclonales (93) y con experimentos realizados en animales depletados de células T (76,98,114) apoyan el trabajo de Lefford acerca del papel que juega el linfocito T en la hipersensibilidad tardía. Así también se encontró que en los sobrenadantes de linfocitos sensibilizados con antígeno específico se encuentra una sustancia de naturaleza proteica no dializable, que inhibe la migración del macrófago del sitio de inflamación (12,38), más tarde se le dió a esta sustancia el nombre de MIF (factor inhibidor de la migración). Younger & Salvin (135) sugirieron que el MIF podría ser similar o idéntico al  $\text{IFN-}\gamma$ . Sin embargo actualmente aún no se define la identidad bioquímica y el significado biológico del MIF.

Estudios hechos en ratón para determinar la cinética de aparición de linfocitos T en las infecciones micobacterianas, muestran que a partir del quinto día de infección los linfocitos T se pueden identificar con el fenotipo  $\text{L3T4}^+$  ( $\text{CD4}^+$ ), encontrándose en mayor proporción entre los días 20-30, en los que se observa la fase de eliminación progresiva de la micobacteria. También, a los linfocitos  $\text{LyT } 2^+$  ( $\text{CD8}^+$ ) se les ha encontrado actividad protectora, pero ésta se presenta hasta la cuarta semana de la infección y en menor proporción que a la conferida por los  $\text{L3T4}^+$  (98). De forma importante se ha demostrado que la resistencia adquirida, se puede obtener de

manera acelerada en animales con memoria inmunológica para la micobacteria cuando éstos son retados con *M. tuberculosis* vivo, lo cual sugiere que los antígenos asociados con la micobacteria viva son los que tienen epitopos relevantes que pueden ser presentados por los macrófagos infectados. El fenotipo del linfocito T que da memoria en este tipo de infecciones podría ser el L3T4<sup>+</sup>, LyT 2<sup>-</sup> resistente a ciclofosfamida y a las radiaciones gamma (101).

Estudios realizados por Moretta y col (90) asocian la actividad cooperadora con una subpoblación de linfocitos T que presentan receptores Fc para IgM, mientras que la función supresora se asocia con linfocitos T con receptor Fc para IgG. Así, de forma importante, se demostró que la vacunación por BCG en cobayos a los que se les induce tuberculosis pulmonar, afecta la proporción y distribución de linfocitos T con receptores Fc para IgM, IgG o ambos. De forma específica en los cobayos vacunados se eleva la proporción de células T<sub>H</sub> en bazo y sangre periférica de forma significativa. Mientras que los niveles de T<sub>H</sub> declinan en todos los tejidos aunque en estos últimos no hay diferencias entre vacunados y no vacunados (9).

En pacientes con tuberculosis se han reportado alteraciones en el número de linfocitos T. En un estudio se demostró que la proporción relativa de linfocitos T fue menor en pacientes que en controles, mientras que los linfocitos B son normales. Además, la disminución de linfocitos T se correlaciona con la duración y grado de la enfermedad. Estudios fenotípicos muestran que grupos de pacientes no tratados tienen Linfocitos T supresores incrementados y los linfocitos T cooperadores disminuidos, lo que se corrige después de 4 a 6 semanas posteriores a la terapia (47).

A la IL-2, que es una linfocina producida por el linfocito T, se le ha encontrado actividad protectora para tuberculosis, ya que se ha visto que en macrófagos tratados con IL-2 el tiempo de

replicación del bacilo fue mayor que en los controles, como consecuencia en los macrófagos tratados con esta interleucina se observó un crecimiento lento del bacilo (21); también se encontró que esta interleucina reduce el número de cuentas bacterianas viables en el cojinete plantar, nódulo linfático e hígado de ratón infectado con *M. lepraemurium*, así como también en el bazo de ratón infectado con *M. bovis* BCG (64).

Aún no se sabe como actúa la IL-2, los posibles mecanismos que se le han sugerido son los siguientes:

- 1). Liberando IFN- $\gamma$  de linfocitos activados (66,136).
- 2). Puede tener efecto directo en macrófagos. Ya que se sabe que la IL-2 aumenta la muerte de células tumorales por macrófagos (83).
- 3). Activando células naturales asesinas (NK) o células asesinas activadas con linfocinas (LAK), tal efecto es observado *in vitro* (138).

En pacientes con tuberculosis se ha demostrado que sus células mononucleares periféricas son incapaces de producir cantidades adecuadas de IL-2, además de presentar dificultades para responder a la misma (89,115).

En ratones infectados con *M. lepraemurium* se ha detectado que la actividad de IL-3, está incrementada, lo cual en la infección micobacteriana podría jugar un papel doble:

- 1). El ratón podría ser protegido de los efectos deletereos y la pérdida del funcionamiento de la médula ósea por hematopoyesis extramedular.
- 2). Las elevadas cantidades de IL-3 en el suero puede aumentar el proceso de la enfermedad, estimulando la producción de células mielomonocíticas, haciendo disponible más células en las cuales el *M. lepraemurium* puede multiplicarse (107).



#### PARTICIPACION DE CELULAS NATURALES ASESINAS (NK) EN LAS ENFERMEDADES MICOBACTERIANAS:

Aún no se conoce la función de las células NK en la tuberculosis; sin embargo, se ha encontrado que su actividad está incrementada en pacientes con tuberculosis pulmonar. También se ha visto una mayor susceptibilidad a infecciones por *M. avium* y *M. intracellulare* en ratones deficientes de células NK (47).

#### PARTICIPACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES:

Son unas de las principales células encontradas durante los procesos inflamatorios y exudativos en la tuberculosis, uno de sus papeles importantes es la participación en la quimiotaxis y la fagocitosis (47).

#### RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS MICOBACTERIANOS:

En 1890 Robert Koch (35) reportó un producto al cual llamó tuberculina vieja, que es el filtrado del cultivo de micobacterias tuberculosas muertas por calor. En 1932 trataron de recuperar proteínas de este filtrado por precipitación con ácido tricloroacético, y en 1941 se preparó el PPD (proteína purificada derivada de tuberculina), a partir del filtrado de cultivo del *Mycobacterium tuberculosis* por precipitación repetida con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 50% de saturación a pH 7. La evaporación dada a los cultivos antes de la filtración, produjo *per se* una considerable desnaturalización de las proteínas (35). No obstante el PPD fue y sigue siendo la preparación estándar para la prueba en piel a tuberculina (49,115,117), como también ha sido usado ampliamente en la investigación de respuestas inmunológicas mediadas por células y como antígenos estándar para el estudio de la inhibición de la migración de macrófagos y de la blastogénesis en linfocitos cultivados (35,115,117).

El trabajo de Seibert representa la primera demostración de la complejidad de los antígenos micobacterianos, pues intentó purificar estos antígenos por fraccionamiento químico, usando precipitación con alcohol-ácido acético. Describió 3 proteínas y 2 polisacáridos, cada uno distinto en sus propiedades fisicoquímicas a las cuales designó proteínas A, B, C y polisacáridos I y II. Posteriormente la utilización de la inmunolectroforesis reveló numerosos picos electroforéticos de las fracciones proteicas de Seibert (35,47).

Las fracciones de Seibert se evaluaron por inmunolectrotransferencia con sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Los antígenos identificados en la fracción proteica A (antígeno de 32 KDa y uno de elevado peso molecular) reaccionan con los anticuerpos de todos los pacientes tuberculosos y con un 25% del suero de controles. En la fracción del polisacárido II se observaron los antígenos de 1000, 30,000-40,000 Daltons y un antígeno heterogéneo de elevado peso molecular. Esos antígenos reaccionaron con anticuerpos séricos en un 70% de pacientes con tuberculosis y con el 20-70% de los controles. Uno de los antígenos del polisacárido II con un peso molecular de 17-28 KDa reacciona con el 64% del suero de pacientes y sólo con el 1-15% de controles (28).

Actualmente con el avance en el desarrollo de técnicas para la obtención de antígenos puros y su análisis, se ha logrado obtener la identificación así como también la caracterización estructural detallada de una variedad de antígenos micobacterianos. Entre los métodos que han sido usados actualmente para el aislamiento y caracterización de componentes micobacterianos se encuentran descritos en la Tabla I mostrando algunos ejemplos. También han sido identificados y clonados los genes que codifican para muchas de las proteínas antigénicas (4,44,67,112,120). Los determinantes antigénicos han sido mapeados y reproducidos usando péptidos sintéticos (6).

TABLA I.

CARACTERIZACION DE COMPONENTES DE <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> y <i>M. leprae</i>		
METODO USADO	COMPUESTO ANALIZADO	REFERENCIAS
CROMATOGRAFIA DE GASES	AC. CARBOXILICOS (C2-C22)	
	AC. TUBERCULOESTEARICO	20
CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA	DIMICOLATO DE TREALOSA	113
	MICOSIDO C	113
	GRUPO FOSFATO DE LAM-B	128
INMUNOPRECIPITACION	LOS Ags DE 12,15,27,32-33 36, y 48 KDa	19
ULTRACENTRIFUGACION POR GRADIENTE DE DENSIDAD	MPB 70 y MPB 80	60
CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS	GRUPO FOSFATO DE LAM-B	128
INMUNOTRANSFERENCIA	FRACCIONES DE SEIBERT	28 30
ISOELECTROENFOQUE	MPB 80 y MPB 70	60
PURIFICACION DE COMPONENTES MICOBACTERIANOS.		
METODO USADO	COMPUESTO AISLADO	REFERENCIAS
CROMATOGRAFIA POR ADSORCION		
EN AC. SILICO	DIMICOLATO DE TREALOSA	113
	MICOSIDO C	113
	GLICOLIPIDO A1	23
	FOSFATIDIL-INOSITOL	23
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON ANTICUERPOS MONOCLONALES	LOS Ags DE 14,19,38 kDa	24
	EL Ag DE 70 KDa	18
	LOS Ags de 36 y 65 KDa	107
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR	LAM-B	128
	MPB 70	94

LAM. Lipoarabinomanana.

Ag.

Antigeno.

Entre las proteínas micobacterianas más estudiadas se encuentran:

#### EL ANTIGENO DE 71 KDa.

Inicialmente se identificó en *M. leprae*, *M. bovis* BCG *M. tuberculosis* y *M. scrofulaceum*. Es miembro de la familia de las proteínas de estrés, ya que tiene un 55% de homología con el gen *dnak* de *E. coli* y 51% de homología con la secuencia conocida de la proteína *dnak* (133). Solo se ha identificado un epítipo para linfocitos B en la proteína de 70 KDa de *M. leprae* con los anticuerpos monoclonales L7 y L27 (17). Es inmunogénica en humanos, ya que se ha encontrado que reacciona fuertemente con el suero de pacientes con lepra lepromatosa o con tuberculosis (18).

La proteína de 70 KDa de BCG, purificada por afinidad con el anticuerpo monoclonal L7, estimula la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*, cuando se usan células de personas PPD positivas, e induce hipersensibilidad tardía en las mismas personas pero no en controles negativos (18). El anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno de 71 KDa de *M. tuberculosis* cruza con el antígeno de 70 KDa de *M. leprae* (126). Su gen ya ha sido clonado a partir de DNA de *M. bovis* BCG y *M. africanum* construyendo librerías de expresión de DNA recombinante  $\lambda$ gt11 en *E. coli* (82).

#### EL ANTIGENO DE 65 KDa.

Algunos grupos lo han descrito como un antígeno asociado a pared celular, ya que se ha encontrado en la fracción insoluble que permanece después de la ruptura de la célula micobacteriana (56). Otros autores han propuesto una localización periplásmica y han demostrado la liberación de la molécula en el sobrenadante de cultivo de *M. bovis* bajo condiciones de deficiencia de Zn. Ya que la secuencia de proteína no contiene regiones hidrofóbicas es poco probable que esté asociado a la pared celular (41).

Pertenece a la familia de proteínas de estrés, representada por el producto del gen groEL en *E. coli* (133).

Se han determinado epitopos en el antígeno para Linfocitos T (14,74,132,133) entre ellos uno específico para *M. leprae* y otro de reacción cruzada con las diferentes cepas micobacterianas (120). Encontrándose, que los linfocitos T con receptor  $\gamma/\delta$  de ratón se estimulan con el antígeno de *M. bovis* BCG, además se observó una buena respuesta proliferativa en los linfocitos de humano (14). Ya que esta proteína es un antígeno inmunodominante frecuentemente se generan anticuerpos monoclonales al inmunizar ratones BALB/c con extractos de *M. tuberculosis* o *M. leprae*.

Se han realizado estudios para inducir inmunidad protectora contra *M. tuberculosis* y *M. leprae* en modelos de ratón que han sido inmunizados con este antígeno y no se ha encontrado una protección significativa contra la infección micobacteriana (14). Su gen ya ha sido clonado (14,85,112), secuenciado (74,85) y amplificado (59). La secuencia de nucleótidos del gen que codifica para esta proteína en *M. tuberculosis* y *M. bovis* es idéntica y las secuencias espaciadoras del gen tienen una diferencia no mayor al 1% (82).

#### EL ANTIGENO DE 38 KDa.

Esta proteína es reconocida por los anticuerpos monoclonales HYT-28 (5), HBT 12 (79), HGT 3 (65), TB 71 y TB 72 (63), y se le han definido epitopos especie-específicos para *M. tuberculosis* (63).

El gen que la codifica fue clonado en *E. coli* a partir de DNA de *M. tuberculosis*, la secuencia de nucleótidos ya se conoce y se identificó un fragmento de 1122 pares de bases que codifican para un péptido de 374 aminoácidos que corresponde con el peso molecular de este antígeno (4).

Este antígeno por métodos serológicos es detectado en *M. tuberculosis* y en cantidades mucho menores en *M. bovis* BCG (131). Induce proliferación de linfocitos T inmunes de ratón, cobayo y humano (30).

#### EL ANTIGENO DE 35 KDa.

Inicialmente fue identificado con suero de pacientes leprosos y con el anticuerpo monoclonal específico para *M. leprae* F 47-9 así como con los anticuerpos monoclonales F67-5 y F 126-5 los cuales cruzan con epitopos de otras micobacterias (19). Otros estudios han reportado epitopos específicos para linfocitos B (126), además se le ha encontrado actividad supresora en la respuesta proliferativa de linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, por lo que se sugiere que al menos un epitopo supresor existe en esta molécula (110).

#### LOS ANTIGENOS DE 30/31 KDa.

Identificados inicialmente como las proteínas principales que se acumulan en el filtrado de cultivo durante el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (3). Una respuesta en forma cruzada es característica en el suero de pacientes leprosos a estos antígenos (37). Evidencias preliminares por mapeo de restricción indican que los antígenos de 30/31 KDa son codificadas por dos genes similares, pero no idénticos, los cuáles pueden haber surgido como resultado de alguna forma de duplicación génica (125).

En modelos experimentales se ha demostrado una respuesta incrementada de linfocitos T y lifocitos B hacia estos antígenos, pero aún no se ha llevado al cabo un mapeo detallado de epitopos (8). Estos antígenos micobacterianos se unen a fibronectina con una elevada afinidad, por lo que se sugiere que al ser secretados jueguen un papel importante en la enfermedad micobacteriana, podrían por ejemplo adherirse a superficies celulares y ser

presentados a linfocitos T en asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad o por otro lado podrían actuar como blancos para mecanismos citotóxicos (2).

#### EL ANTIGENO DE 23 KDa.

Este antígeno ha sido encontrado en el sobrenadante de los cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv de 4 a 7 días de cultivo. Constituye un 20% de las proteínas secretadas. Parece ser que es un dímero formado por subunidades de 13 KDa (3).

En un estudio hecho recientemente se ha visto que una proteína de 12 KDa es reconocida únicamente por el suero de pacientes tuberculosos tanto por ELISA como en inmunolectrotransferencia. Posiblemente este antígeno corresponda a la subunidad de 13 KDa identificada por Abud-Zeid ya que también es reconocida por el anticuerpo monoclonal SA-12 (121). La proteína de 23 KDa de *M. tuberculosis* se ha relacionado con la proteína de 28 KDa de *M. leprae*. Con el anticuerpo monoclonal D2D da reactividad cruzada, ya que también reacciona con la proteína de 28 KDa de *Mycobacterium leprae*, de la cual evidencias preliminares sugieren que se trata de una proteína de secreción (130). Su gen ya ha sido clonado a partir de DNA de *M. leprae* (134). También han sido reportados epitopos para linfocitos T (8).

#### EL ANTIGENO DE 14 KDa.

Esta proteína ha sido expresada en *E. coli*  $\lambda$ gt11 (67). Es reconocida por el anticuerpo monoclonal TB 68 (126). Tiene epitopos especie-específicos para *M. tuberculosis* a nivel de linfocitos B, aunque posee una reactividad cruzada a nivel de linfocitos T ya que se ha encontrado que induce proliferación de la célula T como también respuesta a hipersensibilidad tardía en ratones inmunizados con *M. leprae* y *M. bovis* (67).

Se ha encontrado que en pacientes con meningitis tuberculosa presentan una respuesta humoral en donde este antígeno es inmunodominante, así como también la Lipoarabinomanana (24).

#### EL ANTIGENO MPB 70.

Este antígeno ha sido aislado del filtrado de cultivo de *M. bovis* BCG (94). Su peso molecular ha sido calculado por electroforésis y gradiente de densidad resultando ser de 18 y 15 KDa respectivamente (94).

Este antígeno muestra una respuesta especie-específica de hipersensibilidad tardía para *M. bovis* BCG en cobayos que han sido sensibilizados con células muertas por calor de *M. bovis* BCG. En cambio los animales que fueron sensibilizados con *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* Aoyama B, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. phlei* no presentaron la reacción cutánea característica de hipersensibilidad tardía en presencia de este antígeno (94).

Se ha encontrado que el antígeno MPB 80 es muy similar al MPB 70 tanto en estructura como en función, por lo cual suponen que son productos del mismo gen, en donde modificaciones postranscripcionales de la proteína podrían explicar dichas diferencias (60).

#### IDENTIFICACION DE ANTIGENOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES:

El artículo publicado por G. Köhler y C. Milstein en 1975 ha sido de los más importantes en la inmunología por la aplicación de los anticuerpos monoclonales en una amplia variedad de problemas biológicos. El método desarrollado por los autores ha hecho posible la producción de cantidades ilimitadas de anticuerpos homogéneos producidos contra un antígeno deseado o haptenos. En el caso de un antígeno macromolecular, cada



anticuerpo monoclonal es específico para un epítipo en la molécula antigénica.

Los anticuerpos monoclonales son producidos por células híbridas, (hibridomas), donde una célula B productora de anticuerpos se fusiona con una célula de un mieloma apropiado para así formar una línea celular inmortal capaz de producir anticuerpos. Los agentes que pueden inducir la fusión de las células son el virus de Sendai o polietilén glicol, éste último es usado en la tecnología de la producción de hibridomas (55,129).

Para seleccionar las células que realmente se han fusionado, se deben elegir las condiciones del cultivo en donde únicamente se permita la sobrevivencia de las células fusionadas, para esto:

1). El mieloma debe de carecer de la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT).

2). Después de la fusión, el medio usado debe contener hipoxantina, aminopterina, y timina (medio HAT).

3). La aminopterina elimina a las células de mieloma ya que bloquea la síntesis de *nov*o de purinas y pirimidinas, las células de mieloma requieren de éstas para sobrevivir.

4). La aminopterina no elimina a las células fusionadas pues estas pueden utilizar la hipoxantina y timina del medio de HAT en una vía alterna para la síntesis de purinas y pirimidinas, esta vía requiere de la enzima HGPRT, de la cual carece la célula de mieloma. Sin embargo, las células del hibridoma contienen HGPRT ya que los genes que la codifican los obtiene de la célula B.

5). Cualquier célula B que no se haya fusionado morirá porque su periodo de vida es corto (129).

A principio de los 80s algunos laboratorios comenzaron a producir anticuerpos monoclonales usando células del bazo de ratones inmunizados con *M. tuberculosis* o *M. leprae* (17,27,57,62,79,88).

Trabajos realizados por la Organización Mundial de la Salud para caracterizar la especificidad y reactividad de 53 anticuerpos monoclonales producidos en 15 laboratorios (50,126), han demostrado la gran diversidad antigénica de las proteínas presentes en las preparaciones realizadas con los extractos micobacterianos, también reportan que todos los laboratorios involucrados en el desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales contra antígenos micobacterianos han logrado aislar al menos un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de 65 KDa y en 4 laboratorios diferentes han producido anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de 19 KDa presente en *M. tuberculosis*, esta observación sugiere que este grupo de proteínas seleccionadas preferentemente por anticuerpos monoclonales son "inmunodominantes" en lo que concierne a la respuesta humoral en la cepa de ratón BALB/c que ha sido la más usada para la preparación de hibridomas de este tipo.

Por lo anterior se puede observar el gran interés que hay sobre los estudios de la especificidad antigénica, así como también en la obtención de anticuerpos monoclonales especie-específicos. En este sentido *M. leprae* ha tenido mayor auge que *M. tuberculosis*, ya que se han logrado obtener un número mayor de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopos específicos presentes en *M. leprae* (50,57), en cambio para *M. tuberculosis* los anticuerpos monoclonales que se han logrado aislar con menor reactividad cruzada reconocen a todo el complejo de *M. tuberculosis*, éste involucra a las cepas H37Rv y H37Ra, *M. bovis* y a *M. africanum* (126), así solo ha habido un reporte de la producción de un anticuerpo monoclonal el HBT-10 que reacciona solo con *M. tuberculosis* y *M. marinum*, no mostrando reacción cruzada con *M. bovis* BCG (79).

## JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Con los estudios realizados en el género *Mycobacterium* se observa que estas bacterias presentan una estructura antigénica compleja, además de una elevada reactividad cruzada, aunque en *M. leprae* ha habido mayor éxito en la identificación de epitopos especie-específicos, se requieren mayores esfuerzos para el aislamiento de antígenos puros con metodologías sencillas y de bajo costo, y así poder identificar estos epitopos específicos, sintetizarlos químicamente y con estos producir nuevos reactivos para su uso en las pruebas de diagnóstico.

Además, tomando en cuenta que la respuesta inmune a infecciones producidas por el género *Mycobacterium*, involucra el reconocimiento de los antígenos micobacterianos en la superficie de células presentadoras de antígeno en asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad por el linfocito T, resultando así la activación de la célula T, la cual regula la respuesta inmune ya sea activando o suprimiendo otros tipos celulares. Por esto es necesario el aislamiento de componentes micobacterianos puros para tratar de identificar antígenos protectores. En el caso de tuberculosis serían aquellos que fueran reconocidos por un grupo específico de linfocitos T mediadores de una función inmune protectora. En relación a esto existe la prioridad de trabajar con los antígenos presentes en el filtrado de cultivo, ya que se ha encontrado que la micobacteria viva ofrece mayor protección (100,101), debido probablemente a su capacidad de secretar proteínas.

También hay que tomar en cuenta que los antígenos que son inmunodominantes para la respuesta inmune humoral, podrían no serlo para la respuesta inmune celular como lo han demostrado Lamb & Young en 1987 (73), así como también posibles modificaciones postraduccionales no realizadas por bacterias como *E. coli* (por ejemplo glicosilación) para el caso de los antígenos

que han sido clonados en este vector para su aislamiento, podría ser un factor de pérdida de alguna función importante del antígeno aislado. Un ejemplo de esto lo muestra van Schooten y col (120) en su trabajo, en donde los antígenos purificados por la tecnología del ADN recombinante no son reconocidos por algunas clonas de Linfocitos T, en cambio estas clonas sí reconocen a los mismos antígenos aislados por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales.

No olvidando la importancia que tienen la tecnología del ADN recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de antígenos puros micobacterianos, decidimos utilizar un método de fácil aplicación y bajo costo para tratar de purificar componentes micobacterianos. Goldstein & Misaki (58) y Ellner & Daniel (48) intentaron aislar e identificar componentes micobacterianos por cromatografía de afinidad, utilizando la lectina de Con-A, desde entonces hasta la fecha no se ha avanzado al respecto, además, encontramos trabajos en donde se habla de posibles glicolipoproteínas de *M. tuberculosis* (122), aunque no se realizaron estudios bioquímicos para caracterizar su estructura.

Esto nos llevó a intentar el aislamiento de los componentes micobacterianos del filtrado de cultivo por cromatografía de afinidad utilizando las lectinas de Con-A, lenteja y alubia, ya que éstas reconocen de forma específica estructuras sacarídicas.

## ESPECIFICIDAD DE LAS LECTINAS UTILIZADAS PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Las lectinas son proteínas que reconocen específicamente carbohidratos. Son detectadas y cuantificadas por su capacidad para aglutinar eritrocitos, se pueden purificar de manera sencilla por cromatografía de afinidad utilizando carbohidratos inmovilizados. Se clasifican en un número pequeño de acuerdo a la especificidad que presentan por grupos sacarídicos (77) Tanto las lectinas de Con-A como de lenteja son específicas para  $\alpha$ -Manosa/ $\alpha$ -Glucosa (16,40,71).

La lectina de Con-A tiene una elevada afinidad por una estructura biantenaria constituida por centro trimanosídico sustituido por 2 residuos de N-acetil D-glucosamina (16,40). (fig 1A).

La lectina de lenteja reconoce con elevada afinidad a una estructura biantenaria del tipo N-acetilactosamínico con residuos de galactosa en una posición terminal no reductora, su unión aumenta considerablemente si se encuentra unido un residuo de fucosa por enlace  $\alpha(1-6)$  en la GlcNAc que se encuentra unida a la Asparagina (40,71) (fig 1B).

La lectina de alubia es específica para galactosa, reconoce con elevada afinidad a oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídicos, en los cuales la manosa del centro trimanosil es sustituida por tres o cuatro estructuras de N-acetilactosamina (140) (fig 1C).



## OBJETIVOS DEL TRABAJO

1) El aislamiento y caracterización parcial de componentes del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* cepa H37Rv por cromatografía de afinidad utilizando lectinas. La caracterización parcial involucra el análisis de carbohidratos presentes y la determinación de sus pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).

2) Evaluar los componentes aislados con el suero de pacientes tuberculosos, con enfermedades afines y de personas sanas por el método de ELISA para el desarrollo de un probable método diagnóstico.

3) Seleccionar alguno de los componentes aislados para el desarrollo de anticuerpos monoclonales y definir su especificidad para las diferentes cepas de micobacterias.

## MATERIAL Y METODOS

### METODOS BIOQUIMICOS.

#### 1.1.-PURIFICACION DE LAS LECTINAS DE LENTEJA Y ALUBIA.

##### 1.1.1.- Preparación de la columna de estroma.

Las lectinas de lenteja y alubia se obtuvieron por cromatografía de afinidad utilizando una columna de estroma de eritrocitos humanos tipo  $O^+$  (97). A un paquete de sangre (400 ml del tipo  $O^+$ ) que fue obtenido del Banco Central de Sangre del IMSS se le extrajo el plasma, quedándose únicamente con el paquete celular, el cual fue lavado con NaCl al 0.9% (SS), y centrifugado a 1000 rpm a  $4^{\circ}C$  por 20 minutos (centrifuga Sorval RC-SB). Al precipitado se le añadió una solución amortiguadora de fosfatos 5mM pH 7.4 en una relación 1:10 respectivamente, incubando 30 min en agitación a  $4^{\circ}C$  con el objeto de provocar un choque hipotónico. Posteriormente se centrifugó a 16,000 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}C$  y el precipitado obtenido se lavó de forma alterna con el amortiguador de fosfatos 5mM pH 7.4 y agua hasta descartar la hemoglobina liberada (43).

A las membranas de los eritrocitos (estroma) se les añadió glutaraldehído al 1.5% v/v y se incubaron durante 24 horas a  $4^{\circ}C$  con el fin de entrecruzar las proteínas de la membrana del eritrocito formando bases de Schiff o aldíminas. Posteriormente el exceso de glutaraldehído fue eliminado con lavados de SS y los grupos aldehídos libres se bloquearon incubando con glicina 1M durante una noche a  $4^{\circ}C$ , se volvió a lavar con SS. El estroma se mezcló con Sefadex G 25 (Farmacia Uppsala, Suecia) que fue hidratado previamente y se procedió a montar en una columna de vidrio (22 cm por 1.5 cm de diámetro).



### 1.1.2.- Preparación del extracto crudo de lenteja y alubia.

Las semillas de lenteja y alubia fueron obtenidas de un mercado de la ciudad de México. El procedimiento se realizó de la misma manera para las 2 semillas. A 20 gr. de harina se le agregaron 100 ml de SS y se mezclaron 2 minutos en homogenizador, se ajustó el pH a 4 con ácido acético y se dejó incubar durante 24 horas en cuarto frío, posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm y al sobrenadante se le determina la actividad aglutinante en placas de 96 pozos (NUNC, Denmark) usando eritrocitos humanos A, B ú 0 de acuerdo al procedimiento de la doble dilución seriada descrito por Osawa (102), la concentración de proteínas por el método de Lowry (80) o Bradford (15).

### 1.1.3.- Cromatografía de afinidad.

El extracto crudo de lenteja se pasó por la columna de estroma-Sefadex. La Fracción no retenida fue eluída con SS y mediante la adición de glucosa 0.2M y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 5% se obtuvieron dos fracciones las cuales fueron dializadas con SS y se les determinó la actividad aglutinante (102) y concentración de proteína (15,80).

De forma similar se obtuvo la lectina de alubia con la diferencia de que la fracción con actividad aglutinante fue eluída de la columna de afinidad con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 5%.

### 1.2.- ACOPLAMIENTO DE LAS LECTINAS A SEPAROSA 4B-CL (MINI-LEAK).

El Mini-Leak fue obtenido de Kem-En-Tec (Copenhagen, Denmark). Las lectinas de lenteja y alubia fueron acopladas al "Mini-Leak" después de tratarlo de la siguiente manera:

- 1) El gel fue lavado con 3 volúmenes de amortiguador de fosfatos 1M pH 8.6 .

2) Las lectinas fueron disueltas en el mismo amortiguador y añadidas al gel (10 mg/ml) agitando durante 1 noche en cuarto frío (evitando el uso de agitador magnético).

3) Se lavó el gel con el amortiguador de fosfatos.

4) Los grupos inespecíficos se bloquearon con 1 volumen de una solución de etanolamina 0.1M HCl pH 8.5.

5) Se colocó el gel en una columna de vidrio se lavó con amortiguador de boratos-salina pH 8.6.

Nota: El Mini-Leak contiene la sefarose 4B-CL activada con Divinilsulfonato. La lectina de Con-A acoplada a Sefarosa 4B activada fue obtenida de Pharmacia Chemicals. Por cada ml de Sefarosa 4B activada tiene 10 mg de la lectina. La columna que contiene dicha lectina tiene una longitud de 6 X 1.2 cm. de diámetro.

### 1.3.-OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *M. tuberculosis* cepas H37Rv y H37Ra.

Las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y H37Ra fueron donadas por el laboratorio del departamento de Inmunología de la escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico. El bacilo liofilizado fue suspendido en medio libre de proteínas Proskawer-Beck-Youman (PBY) y se cultivó en el medio de Lowestein-Jensen durante un periodo de 15 días. La cepa obtenida de este medio se cultivó en 100 ml del medio líquido PBY a 37°C hasta haber obtenido una fase estacionaria de crecimiento (8 a 12 semanas). El medio de cultivo fue separado de la masa bacteriana por filtración en papel Watman No 3; las proteínas del medio fueron precipitadas con sulfato de amonio al 80% de saturación agitando durante 3 horas a 4°C, se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min y el sobrenadante se resuspendió y dializó contra el amortiguador de boratos pH 8.6.

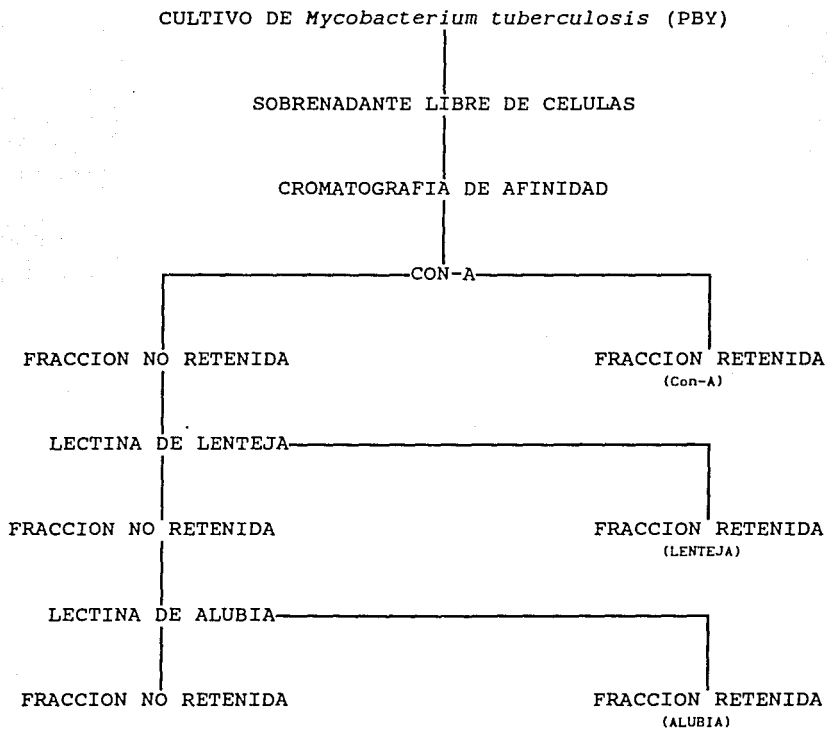
Al Extracto total del filtrado de cultivo (ETFC) se le hizo una extracción parcial de lípidos con hexano en una relación 1:1 (3 veces), y posteriormente se cuantificaron las proteínas (15,80) y carbohidratos por el método de fenol-sulfúrico (45).

#### 1.4.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD UTILIZANDO LECTINAS.

El ETFC fue pasado por la columna de Con-A, la fracción no retenida se eluyó con solución salina boratos pH 8.6. Las fracciones I y II fueron eluidas de la columna con Metil  $\alpha$ -D Manopiránosido 0.2M y con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 3 % para eluir el material con menor afinidad a la manosa, respectivamente. La Fracción no retenida se pasó posteriormente por la columna de afinidad de lenteja, la elución se realizó de la misma forma que con la columna de Con-A. La fracción no retenida de estas dos columnas se pasó a su vez por la columna de afinidad de alubia; de igual forma, la fracción no retenida se eluyó con solución salina boratos pH 8.6 y la fracción retenida con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 3% (Fig 2). Las diferentes fracciones eluidas fueron detectadas a 280 nm.

Figura 2

PROCESO DE PURIFICACION DE GLICOPROTEINAS DE  
*M. tuberculosis*



Las fracciones I y II obtenidas de las diferentes columnas fueron dializadas con la solución salina boratos pH 8.6 para eliminar el carbohidrato o el  $\text{CH}_3\text{COOH}$  que se utilizaron para su elución. A cada fracción obtenida de las diferentes columnas se les determinó concentración de proteína (15,80) y carbohidrato

(45) para determinar la capacidad de retención de la columna. Se determinó la composición de carbohidratos por cromatografía de gases (139) y los pesos moleculares por PAGE-SDS de acuerdo al método de Laemmli (72).

#### 1.5.- COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

Fue determinada después de hidrolizar cada fracción con metanol/HCl 0.5 M a 100°C/24 horas, provocando la formación de alditos los cuales son trifluoroacetilados mediante la adición de piridina y ácido trifluoroacético (139). Este trabajo fue realizado en el laboratorio de química biológica de la Universidad de Ciencias y Técnicas de Lille. Villeneuve d'Ascq, 59655 Francia.

#### 1.6.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de las fracciones purificadas en las diferentes columnas de afinidad y de los ETFC de las diferentes cepas micobacterianas se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (LKB Instruments) en condiciones reductoras y gradiente discontinuo de pH (72). El gel superior contenía 3% de acrilamida, 0.11% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel separador contenía 10% de acrilamida, 2.01% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%. El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%, pH 8.3. Posteriormente los geles se tiñieron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45) y el exceso de colorante se eliminó empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85).

## METODOS INMUNOLOGICOS

### 2.1.- OBTENCION DEL SUERO HIPERINMUNE.

El suero hiperinmune contra *M. tuberculosis* se obtuvo inmunizando conejos hembras Nueva Zelanda adultos durante 5 semanas con inyección intramuscular de 3.3 mg de filtrado de cultivo la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y 5 mg de *M. tuberculosis* H37Rv muerta por calor disueltas en una solución de  $Al(OH)_3$ . El suero fue obtenido antes de cada inmunización por sangrado de la vena marginal de la oreja y fue medido por Inmunolectroforesis contra el ETFC.

2.2.-PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA FRACCION RETENIDA DE *M. tuberculosis* POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN CONCANAVALLINA-A.

#### 2.2.1.- Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal.

Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c, en condiciones estériles. Los macrófagos así obtenidos se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle, suplementado con 15% de suero fetal bovino (Sigma Co), glutamina 2 mM, glicina 0.3  $\mu M$ , 2-mercaptoetanol 50  $\mu M$ , estreptomycin 100  $\mu g/ml$  y penicilina 100 U.I./ml (DME-s). 50  $\mu l$  de la suspensión de macrófagos, se colocaron en las placas de cultivo de 96 pozos (Immulon II; Dynatech, Chantilly, Va.) y se mantuvieron en una incubadora a 37°C, con 95% de humedad y 5% de  $CO_2$  hasta su uso.

#### 2.2.2.- Línea celular de mieloma.

Se emplearon células de la línea de mieloma de ratón SP2/0 (deficiente en HGPRT). Las células SP2 en DME-s, se mantuvieron en incubadora a 37°C, con 95% de humedad y 5% de  $CO_2$ . Las células se cosecharon en fase de crecimiento logarítmica para emplearlas en la fusión.

### 2.2.3.- Células esplénicas inmunes.

Esquema de inmunización: A 3 ratones BALB/c fueron inmunizados, por vía intraperitoneal (ip), el día 0 con 25,  $\mu\text{g}$  de la fracción retenida en la columna de Con-A de *M. tuberculosis* cepa H37RV en adyuvante incompleto de Freund y los días 30 y 50 con 10  $\mu\text{g}$  del mismo antígeno disuelto en PBS.

### 2.2.4.- Obtención de células de bazo.

Tres días después de la última inmunización, en condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y se depositó en una caja de petri conteniendo 5 ml de medio de cultivo DME (54). Dentro de una cámara de flujo laminar, con el objeto de liberar las células plasmáticas, se disgregó el bazo. La suspensión así obtenida, se dejó sedimentar durante 5 min con el fin de eliminar los restos tisulares. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 1200 rpm/5 min. El sedimento se resuspendió en 5ml de medio DME y el número de células viables se contó en una cámara de Neubauer, mezclando dos gotas de la suspensión de células con dos gotas de azul de tripán al 0.2%.

### 2.2.5.- Fusión

La fusión se efectuó, de acuerdo al método descrito por Köller y Milstein (55,69). Para esto, en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml, se colocaron y centrifugaron (1200 rpm/5 min)  $6.6 \times 10^6$  células de bazo/ml y  $3.3 \times 10^6$  células SP2/ml; la pastilla celular resultante se resuspendió en 0.1 ml de DME y se le agregó lentamente 1 ml de polietilenglicol 4000 (Aldrich Co.). Después de dejar reposar la mezcla 1 min a 37°C, se agregaron 8 ml de DME, gota a gota, y se dejó reposar 5 min. a 37°C. Posteriormente se adicionaron 30 ml de DME y después de 5 min se centrifugó a 800 rpm/5 min. La pastilla se resuspendió suavemente en 5 ml de medio DME-s y se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de esta suspensión en cada uno de los 96 pozos de una placa de cultivo (Immulon II; Dynatech,

Chantilly, Va.) la cual había sido recubierta con macrófagos. Veinticuatro horas después, se reemplazó el medio DME-s por medio HAT (DME suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina) (78). Posteriormente el cambio de medio se realizó cada tercer día. Al décimo primer día de cultivo el medio HAT se substituyó por medio HT (DME suplementado con hipoxantina y timidina). Las células se mantuvieron en este medio hasta el día 17.

#### 2.2.6.- Selección y clonación de hibridomas.

Cuando los hibridomas cubrieron la tercera parte del fondo del pozo de cultivo, se tomó el sobrenadante para cuantificar, por el método de ELISA, la presencia de anticuerpos específicos. Los hibridomas secretores de anticuerpos anti *M. tuberculosis* se clonaron dos veces por el método de la dilución limitante a 1 y posteriormente a 0.3 células por pozo.

#### 2.2.7.- Expansión de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

2.2.7.a- La expansión *in vitro*, se realizó en botellas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> (Nunc Co).

2.2.7.b.- La expansión *in vivo* se realizó en ratones BALB/c, inoculándolos con 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células de hibridoma en 0.5 ml de DME por vía ip, los cuales habían sido tratados, un mes antes con 0.5 ml de pristano (2,6,10,14 tetrametilpentadecano Sigma Co.). Cuando el tumor se hizo evidente, se obtuvo el líquido de ascitis mediante punción peritoneal (87).

2.2.7.c.- Almacenamiento de células: Con el objeto de conservar a los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, se prepararon viales conteniendo de 1 X 10<sup>6</sup> a 5 X 10<sup>6</sup> células en solución crioprotectora (9 volúmenes de suero fetal bovino y 1 volumen de dimetilsulfóxido), los cuales se almacenaron a -79°C durante 24 horas y posteriormente en nitrógeno líquido.



### 2.3.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA: ELISA

Para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la fracción purificada por cromatografía de afinidad en Con-A, lenteja y alubia y del ETFC de *M. tuberculosis* cepa H37Rv en el líquido de ascitis de ratón y en los sobrenadantes de hibridoma así como también en el suero de pacientes tuberculosos, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), neumonía o sanos, se empleó el método de ELISA (51). Para ello. Se recubrieron placas de 96 pozos (Immulon II; Dynatech, Chantilly, Va.) con 1 a 2 µg de ETFC o con 0.5 a 5 µg de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad Con-A, lenteja y alubia en amortiguador de carbonatos pH 9.6. Las placas se secan durante 3 horas en un desecador al vacío a temperatura ambiente. Los sitios no reactivos fueron bloqueados con gelatina al 0.3% en el amortiguador de carbonatos durante dos horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS). Posteriormente se agregó 0.2 ml del sobrenadante de cultivo de los hibridomas sin diluir ó 0.05 ml de los líquidos de ascitis a diferentes diluciones y de los sueros de 11 pacientes con Tuberculosis pulmonar, 3 con Pneumonía 4 con (EPOC) y 4 controles diluidos 1:40 y se dejaron tres horas a 37°C. Los sobrenadantes de cultivo, líquidos de ascitis y sueros fueron colocados por duplicado. Después de cuatro lavados con PBS-T se agregaron 100 µl de conjugado IgG de cabra α Humana o IgG de cabra α ratón conjugadas a peroxidasa (Sigma Chemicals) diluidas 1:1000 y 1:1500 en PBS-gelatina al 0.3% respectivamente y se incubó 1 hora a 37°C; después de 4 lavados con PBS-T se agregaron 100 µl de solución de sustrato {orto fenilendiamina (Sigma Co.) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) al 0.4 % en amortiguador de citratos pH 5.0}. La reacción se detuvo agregando 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5 M a cada pozo y la lectura de la densidad óptica a 492 nm es hecha en un lector de ELISA automático (Dynatech).

#### 2.4.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La electrotransferencia de las proteínas del ETFC de las cepas de *Mycobacterium* de los geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa (PNC), se llevó a cabo durante 1 hora a 1-1.5 Amps en un equipo de transferencia de Bio-Rad, Richmond Ca. Se empleó como amortiguador para la transferencia glicina 192 mM, metanol al 20% en Tris 20 mM, pH 8.3 (116). Transcurrido este tiempo y para comprobar que la transferencia se llevó a cabo, una parte del PNC se tiñó con azul de Coomasie y la otra se colocó 1 h a 37°C en solución de bloqueo (gelatina al 0.3%, Tween 20 al 0.1% en PBS (NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M pH 7.2)). Después de 4 lavados con PBS-T (Tween 20 al 0.1% en PBS), el PNC se incubó 1.5 horas a temperatura ambiente con la dilución óptima de antisuero de cabra conjugado a peroxidasa (anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma Co.)). Una vez pasado el tiempo de incubación, se lavó dos veces con PBS-T y dos veces con PBS para finalmente colocarlo durante 20 min en solución de sustrato (4-cloro-1-naftol 2 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.08% en PBS).

## RESULTADOS

### METODOS BIOQUIMICOS

#### 1.1.- PURIFICACION DE LAS LECTINAS DE LENTEJA Y ALUBIA.

La purificación de las lectinas de lenteja y alubia se realizó en un solo paso por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de estroma de eritrocitos humanos tipo O<sup>+</sup> inmovilizados en Sefadex G-25. La capacidad de retención de la columna es de 7.5 y 3.6 mg para las lectinas de lenteja y alubia respectivamente. Con este procedimiento recuperamos el 48% y el 36% de las unidades hemaglutinantes (UHA), lo que constituye el 1.5 y 4.3% de la proteína del extracto total de lenteja y alubia respectivamente, correspondiendo a lo reportado por otros métodos de purificación de estas lectinas (140). Nuestro método es eficiente ya que permite un incremento de la actividad específica de 30 y 8 veces en relación con el extracto crudo de las lectinas de lenteja y alubia respectivamente (Tabla 2).

TABLA 2. PROCESO DE PURIFICACION DE LAS LECTINAS DE LENTEJA Y ALUBIA.

FRACCION	CONC. PROTEINA TOTAL (mg/ml)	UHA* (totales)	ACT. ESPEC. UHA/(prot)	FACTOR PU- RIFICACION
LENTEJA CRUDA	480.0	57,600	120	1
LENTEJA PURA	7.5	27,600	3680	30
ALUBIA CRUDA	81.9	143,360	1750	1
ALUBIA PURA	3.6	51,200	14222	8

\*Unidades hemaglutinantes.

### 1.2.- ACOPLAMIENTO DE LAS LECTINAS A SEFAROSA 4B-C1 (MINI-LEAK)

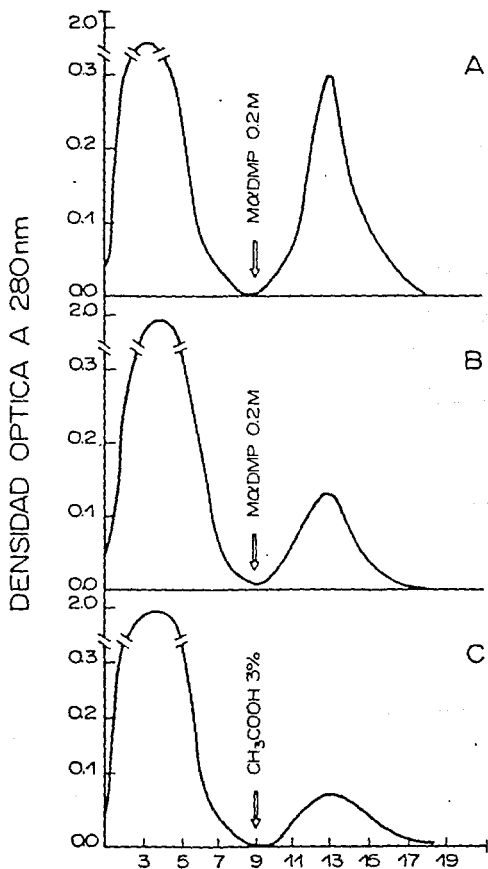
Las lectinas de lenteja y alubia purificadas fueron dializadas contra el amortiguador de fosfatos 1M pH 8.6. Se incubaron 16.24 y 29.76 mg de las lectinas de lenteja y alubia respectivamente con 3 ml de mini-leak. Ya acopladas las lectinas se retiró el sobrenadante y se midió la cantidad de proteína. Por diferencia se encontró que 14.9 y 25.6 mg de lenteja y alubia respectivamente, fueron las concentraciones que se acoplaron a la sefarosa. Antes de usar las columnas fueron lavadas con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 3%, para asegurar de que las lectinas no se despegaron del soporte. Ya que parte del material de la micobacteria purificado en estas columnas sería eluido con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 3%.

### 1.3.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD UTILIZANDO LECTINAS PARA EL AISLAMIENTO DE COMPONENTES DEL ETFC DE *M. tuberculosis*

Los patrones de elución para los componentes aislados del *Mycobacterium tuberculosis* por cromatografía de afinidad utilizando las lectinas de Con-A, lenteja y alubia fueron determinados al medir la densidad óptica de cada fracción obtenida a 280 nm. El patrón de elución en cada una de las columnas utilizadas para la cromatografía de afinidad fue consistente (fig 3).

FIGURA 4.

Cromatografía de afinidad utilizando Lectinas



FRACCIONES

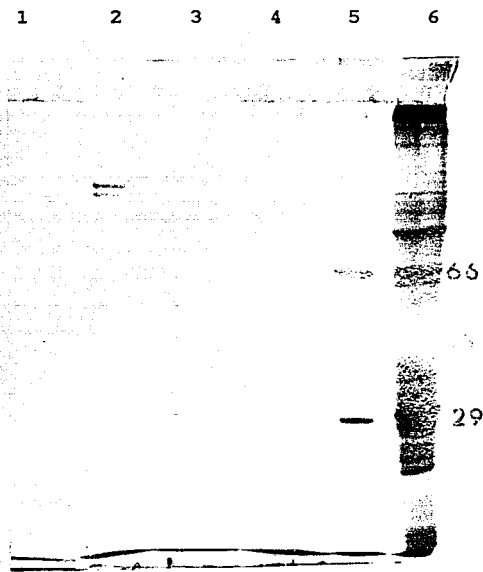
PATRONES DE ELUCION DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL ETFC POR  
 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD UTILIZANDO LAS LECTINAS DE A:  
 CONCAVALINA-A, B: LENTEJA Y C: ALUBIA. LAS COLUMNAS TIENEN  
 UNA LONGITUD DE 6 cm POR 1.2 cm DE DIAMETRO. LA VELOCIDAD DE  
 FLUJO UTILIZADA FUE DE 10 ml/h Y LA FRACCION COLECTADA POR  
 TUBO FUE DE 2.5 ml.

Las figuras 4 y 5 nos muestran el patrón electroforético de las fracciones retenidas en Con-A, lenteja y alubia de las cepas H<sub>37</sub>Rv y H<sub>37</sub>Ra, los cuales también fueron consistentes. La electroforesis se llevó al cabo en un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. En la figura 4 se muestra el gel realizado para la cepa H<sub>37</sub>Rv. Como marcadores de peso molecular se utilizaron albumina sérica bovina (PM 66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa) y anhidrasa carbónica (29 KDa). Encontramos que los antígenos aislados en Con-A son los de 93, 48 y principalmente el de 33 KDa. En la lectina de lenteja se aislaron principalmente los antígenos de 100 y 96 KDa y en menor proporción el antígeno de 38 KDa, y con la lectina de alubia se aislaron los antígenos de 66 y 43 KDa.

En el gel realizado para la cepa de H<sub>37</sub>Ra (fig 5) se utilizaron como marcadores de peso molecular albúmina (66 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), deshidrogenasa láctica (36 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa), tripsina (20.1 KDa) y  $\beta$  lactoalbúmina (14.6 KDa). Encontramos que el antígeno aislado en la columna de Con-A es el de 31 KDa, a diferencia de la cepa H<sub>37</sub>Rv de la cual el principal aislado es el de 33 KDa. En la lectina de lenteja se aisló principalmente el de 38 KDa, aunque también se observan muy debilmente los antígenos de 61/58 KDa y los de 31/33 KDa. Con la lectina de alubia se aisló de forma predominante el antígeno de 38 KDa, estas columnas también mostraron diferencias con los antígenos aislados de la cepa H<sub>37</sub>Rv.

FIGURA 4.

PATRON ELECTROFORETICO DE LAS FRACCIONES RETENIDAS Y EL EXTRACTO TOTAL DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *M. tuberculosis* CEPA H37Rv.

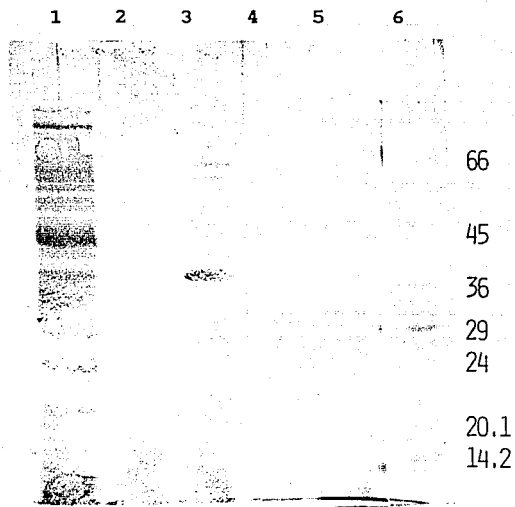


Carril 1.- Fracción retenida en alubia.  
Carril 2.- Fracción retenida en lenteja.  
Carril 3.- Fracción retenida en Con-A II.  
Carril 4.- Fracción retenida en Con-A I.  
Carril 5.- Marcadores de Peso Molecular.  
Carril 6.- Extracto total del filtrado de cultivo.

La electroforesis fue realizada en un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Se colocaron 10  $\mu$ g de proteína por pozo de las fracciones retenidas, y del extracto total del filtrado de cultivo 60  $\mu$ g por pozo. La tinción fue realizada con Azul de Coomassie.

FIGURA 5.

PATRON ELECTROFORETICO DE LAS FRACCIONES RETENIDAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD Y EL EXTRCTADO TOTAL DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *M. tuberculosis* CEPA H37Ra.



Carril 1.- Extracto total del filtrado de cultivo (ETFC) de *M. tuberculosis* cepa H37Ra.

Carril 2.- Fracción retenida en Con-A.

Carril 3.- Fracción retenida en Lenteja I.

Carril 4.- Fracción retenida en Lenteja II.

Carril 5.- Fracción retenida en Alubia.

Carril 6.- Marcadores de Peso Molecular.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Las concentraciones de proteína colocadas por pozo son las mismas usadas para la cepa H37Rv. La tinción fue realizada con azul de Coomassie.



1.4.-DETERMINACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS POR LOS METODOS DE BRADFORD Y FENOL SULFURICO (15,45)

Al hacer la cuantificación de proteínas y carbohidratos por los métodos de bradford y fenol sulfúrico encontramos que la relación proteína/carbohidrato en el ETFC es de 1/0.28. La cantidad de proteína en las fracciones aisladas por cromatografía de afinidad en las columnas de Con-A, lenteja y alubia corresponde al 23%, 4.2% y 2.5% y la de carbohidratos al 22%, 3.6% y 1% respectivamente (tabla 3).

TABLA 3. COMPOSICION DE PROTEINA Y CARBOHIDRATO DEL ETFC DE M. tuberculosis CEPA H37RV Y LAS DIFERENTES FRACCIONES RETENIDAS

	LENTEJA	CON-A	ALUBIA	H37RV
[PROTEINA] µg/ml	63.00	345.00	37.5	1500.0
	4.2%	23.0%	2.5%	100 %
[CARBOHIDRATO]µg/ml	15.00	92.00	4.2	420.0
	3.6%	22.0%	1.0%	100.%

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford (15) y la de carbohidratos por el método de fenol sulfúrico (45).

1.5.- COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

Al igual que los patrones electroforéticos, los resultados por cromatografía de gases nos muestran diferencias importantes en la composición de carbohidratos en la cepa H37RV con respecto a la H37Ra. Encontrando que en la fracción aislada de la cepa H37RV por cromatografía de afinidad en Con-A hay 2.3 veces mayor concentración de glucosa 10 veces más de xilosa, y 14 veces más de ácido murámico, que en H37Ra. En la fracción eluida en lenteja

hay 2.6 veces mayor concentración de glucosa, 20 veces más de xilosa, 5 veces más ácido murámico en H37RV y no se encuentra galactosa a diferencia de H37Ra. En la fracción eluída en alubia la principal diferencia es que se encuentra el doble de concentración de glucosa en H37Ra en relación con H37RV. Todos estos resultados están hechos en relación a 3 manosas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS DE LAS FRACCIONES RETENIDAS

AZUCAR	H37RV	LENTEJA	CON-A	ALUBIA
ARABINOSA	5	3	3	0
XILOSA	3	2	10	0
GALACTOSA	3	0	0	4
GLUCOSA	20	24	21	5
MANOSA	3	3	3	3
GLcNAc	1	1	0	1
GalNAc	1	0	0	0
ACIDO MURAMICO	13	5	14	0

AZUCAR	H37Ra	LENTEJA	CON-A	ALUBIA
XILOSA	7	0.1	1	3
GALACTOSA	2	3	0	3
MANOSA	3	3	3	3
GLUCOSA	5	9	9	10
GLCNAC	1	0	0	1
GalNAc	1	0	0	0
ACIDO MURAMICO	1	0	0	0.3

La composición de carbohidratos fue realizada por cromatografía de gases después de la hidrólisis con metanol/HCl 0.5M a 100°C/24 h, provocando la formación de alditoles, los cuales son trifluoroacetilados mediante la adición de piridina y ácido trifluoroacético (123). Los valores están reportados en relación a 3 manosas.

## MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

### 2.1.- DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS.

Al ser evaluadas las fracciones aisladas por cromatografía de afinidad de los ETFC de la cepa H37Rv con el suero de pacientes tuberculosos por el método de ELISA, la fracción retenida en Con-A eluida con MαDMP fue la que dió una mejor respuesta, encontrando que siete de los pacientes con TBP reaccionan con una intensidad muy similar, en comparación con el ETFC (media =  $0.37 \pm 0.12$  vs.  $0.39 \pm 0.16$ ), en cambio cuatro de los mismos pacientes muestran una reactividad pobre (media =  $0.20 \pm 0.04$  vs.  $0.39 \pm 0.15$ ). La fracción retenida en lenteja muestra una reactividad similar en intensidad a la Con-A, a diferencia de que hay una reactividad cruzada más intensa, y la fracción retenida en alubia reacciona de una forma más pobre con el suero de pacientes tuberculosos, mostrando además reactividad cruzada con el suero de pacientes sanos o enfermedades afines (tabla 5). Estos resultados nos muestran que estos antígenos no son los adecuados para el desarrollo de un sistema diagnóstico, al menos por el método de ELISA. Estos resultados apoyan lo reportado por Espitia y col (52), quienes encuentran que el suero de pacientes tuberculosos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la ciudad de México, reaccionan principalmente con el antígeno de 38 KDa con el cual los controles no reaccionan, en cambio tanto tuberculosos pero también un gran número de pacientes controles reaccionan con los antígenos de 31/33 KDa. Así, a pesar de que con el antígeno aislado en lenteja se encuentra el de 38 KDa, es probable que los antígenos de 100 y 96 KDa, que predominan en esta fracción colaboren con la reactividad cruzada.

**TABLA 5. LECTURAS DEL ELISA DE LOS SUEROS DE PACIENTES CON LAS FRACCIONES AISLADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD**

		TUBERCULOSIS	NEUMONIA	EPOC*	CONTROL
Ag	AISLADO EN CON-A	0.37	0.23	0.26	0.27
Ag	AISLADO EN LENTEJA	0.36	0.32	0.28	0.29
Ag	AISLADO EN ALUBIA	0.23	0.24	0.21	0.10

\* Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los antígenos aislados por cromatografía de afinidad en Con-A se colocaron a una concentración de proteína de 2.5 µg/pozo, los aislados en lenteja a 2 µg/pozo y los de alubia a 1 µg/pozo. Los sueros fueron colocados a una dilución de 1:40 y para la IgG de cabra α humana conjugada a peroxidasa 1:1000, como sustrato se usó orto-fenilendiamina.

## 2.2.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

De los ratones BALB/c inmunizados con la fracción retenida en Con-A, se seleccionó el bazo del animal que dió mejor respuesta al antígeno. Para ésto se obtuvo sangre del animal por sangrado retroocular y se separó el suero para determinar el título de anticuerpos por el método de ELISA. El animal que dió un título de anticuerpos de 1:25,000 fue seleccionado. A este animal se le extrajo el bazo en condiciones de esterilidad, y de éste se utilizaron las células no adherentes para la producción del hibridoma de crecimiento rápido y de elevado título de anticuerpos. La clona que obtuvo estas características fue utilizada para su proliferación y producción de líquido de ascitis. A esta clona se le dió el nombre de MM-Con-A B.8.

En nuestro laboratorio también fueron aislados otros anticuerpos monoclonales de ratones BALB/c inmunizados con ETFC. De estos se seleccionaron las clonas MM-TB1-D6, MM-TB1-E4, y MM-TB1-F8. (Este trabajo fue realizado por los Drs. Felipe Massó y Luis Felipe Montaña).

**TABLA 5. LECTURAS DEL ELISA DE LOS SUEROS DE PACIENTES  
CON LAS FRACCIONES AISLADAS.**

		TUBERCULOSIS	NEUMONIA	EPOC*	CONTROL
Ag	AISLADO EN CON-A	0.37	0.23	0.26	0.27
Ag	AISLADO EN LENTEJA	0.36	0.32	0.28	0.29
Ag	AISLADO EN ALUBIA	0.23	0.24	0.21	0.10

\*Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los antígenos aislados por cromatografía de afinidad en Con-A se colocaron a una concentración de proteína de 2.5 µg/pozo, los aislados en lenteja a 2 µg/pozo y los de alubia a 1 µg/pozo. Los sueros fueron colocados a una dilución de 1:40 y para la IgG de cabra α humana conjugada a peroxidasa 1:1000, como sustrato se usó orto-fenilendiamina.

#### 2.2.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

De los ratones BALB/c inmunizados con la fracción retenida en Con-A, se seleccionó el bazo del animal que dió mejor respuesta al antígeno. Para ésto se obtuvo sangre del animal por sangrado retroocular y se separó el suero para determinar el título de anticuerpos por el método de ELISA. El animal que dió un título de anticuerpos de 1:25,000 fue seleccionado. A este animal se le extrajo el bazo en condiciones de esterilidad, y de éste se utilizaron las células no adherentes para la producción del hibridoma de crecimiento rápido y de elevado título de anticuerpos. La clona que obtuvo estas características fue utilizada para su proliferación y producción de líquido de ascitis. A esta clona se le dió el nombre de MM-Con-A B.8.

En nuestro laboratorio también fueron aislados otros anticuerpos monoclonales de ratones BALB/c inmunizados con ETFC. De estos se seleccionaron las clonas MM-TB1-D6, MM-TB1-E4, y MM-TB1-F8. (Este trabajo fue realizado por los Drs. Felipe Massó y Luis Felipe Montaña).

### 2.2.1.- Ensayo inmunoenzimático en fase sólida: ELISA.

Para ver la reactividad de los anticuerpos monoclonales ya mencionados, se hizo un ELISA utilizando como antígenos las fracciones purificadas de la cepa H37Rv en las columnas de Con-A, lenteja y alubia, así como el ETFC. La presencia del anticuerpo se evaluó en los sobrenadantes del medio de cultivo de los diferentes hibridomas. Los resultados mostraron una respuesta positiva para el ETFC con los diferentes anticuerpos, en cambio con las diferentes fracciones purificadas solo se observa reactividad entre el anticuerpo monoclonal MM-Con-A B.8. y la fracción purificada en Con-A. (tabla 6).

TABLA 6.

LECTURA DEL ELISA HECHO CON LAS FRACCIONES AISLADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD UTILIZANDO LAS LECTINAS DE CON-A, LENTEJA Y ALUBIA CONTRA ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES.

ANTICUERPO	FRACCION			
	Con-A	Lenteja	Alubia	ETFC
Hiperinmune	0.165	0.103	0.098	1.630
MM-TB1.D.6	-	-	-	0.380
MM-TB1 E.4	-	-	-	0.102
MM-TB1-F.8	-	-	-	0.125
MM-ConA-B.8	1.903	-	-	0.432
MM-ConA-C.8	0.407	-	-	0.196

ETFC. Extracto total del filtrado de cultivo.

Se colocaron 2 µg/pozo de cada una de las fracciones purificadas y del ETFC. El suero hiperinmune fue añadido a una dilución de 1 a 40 y el sobrenadante del los cultivos de los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales se colocaron sin diluir. Las IgGs de cabra α ratón y α conejo fueron usadas a una dilución de 1:1500 y como sustrato se utilizó ortofenilendiamina.

### 2.2.2.- Inmunolectrotransferencia.

De los líquidos de ascitis producidos en los ratones BALB/c con el hibridoma MM-Con-A B.8 se seleccionó el de mayor título de anticuerpos por el método de ELISA. Con este líquido por la técnica de inmunolectrotransferencia se estudió su reactividad con el ETFC de 8 diferentes cepas de *Mycobacterium* (fig 7), la cual nos muestra que el anticuerpo monoclonal MM-Con-A-B.8 reconoce los antígenos de 72, 64 y 33 KDa en *M. triviale*, con la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra solo reacciona con el doblete de 31/33 KDa, reconoce muy débilmente los antígenos de 33/35 KDa en *M. terrae*, en *M. intracellulare* reconoce únicamente al antígeno de 33 KDa y en *M. gordonae* al de 35 KDa. Las cepas de *M. kansasii* y *M. fortuitum* no son recocidas con este anticuerpo. Estos resultados muestran una reactividad cruzada entre las diferentes cepas de *Mycobacterium*. Aunque no hay que descartar la importancia de que en el ETFC de *M. tuberculosis* cepa H37Rv reacciona con los antígenos de 31/33 KDa predominantemente, y en forma pobre con el antígeno de 64 KDa (fig 6), mientras que con la fracción retenida en Con-A solo reacciona con el antígeno de 33 KDa (resultado no mostrado), los antígenos de 47 y 84 KDa que también son aislados con esta lectina no son reconocidos por este anticuerpo. Así es posible, por cromatografía de afinidad, utilizando el anticuerpo monoclonal MM-Con-A-B.8, y la lectina de Con-A el aislamiento del antígeno de 33 KDa en forma pura.

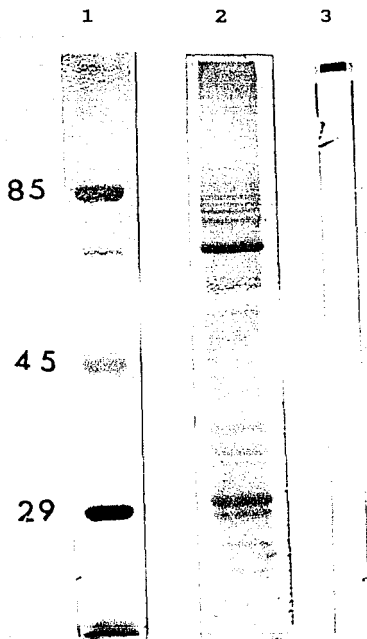
**TABLA 7. REACCION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL MM-CON-A B.8 CON LOS EXTRACTOS DE DIFERENTES CEPAS DE MYCOBACTERIUM**

CEPA	ANTGENO RECONOCIDO
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	31/33 KDa predominantemente. 65KDa de forma débil.
<i>M. tuberculosis</i> (H37Ra)	31/33 KDa.
<i>M. triviale</i>	80, 72 y 33 KDa (débil).
<i>M. terrae</i>	33 y 35 KDa (muy débil).
<i>M. intracelullare</i>	33 KDa.
<i>M. gordonae</i>	35 KDa.
<i>M. Kansasi</i>	No reacciona.
<i>M. fortuitum</i>	No reacciona.



FIGURA 6.

PATRON DE RECONOCIMIENTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL MM-Con-A B.8  
CON EL EXTRACTO TOTAL DEL FILTRADO DE CULTIVO DE *M. tuberculosis*  
CEPA H37Rv, POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.



Carril 1.- Marcadores de PM.

Carril 2.- Extracto total del filtrado de cultivo.

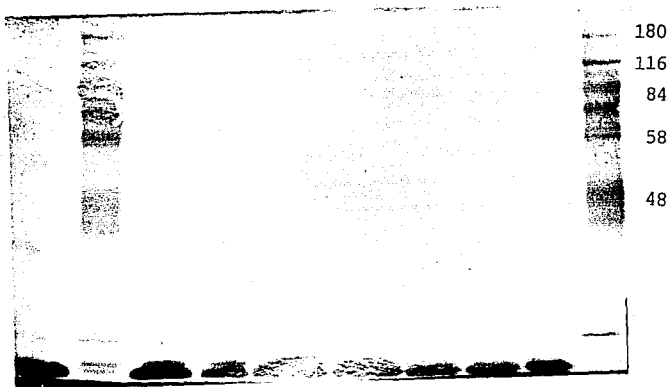
Carril 3.- Extracto total del filtrado de cultivo en presencia del anticuerpo monoclonal MM-Con-A.B.8.

La inmunoelectrotransferencia fue realizada a partir de un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. Los carriles 1 y 2 fueron teñidos con azul de coomassie. En el carril 3 la presencia del complejo antígeno-anticuerpo fue revelada al utilizar como segundo anticuerpo IgG de cabra  $\alpha$  ratón diluido 1:1500 acoplado a peroxidasa. El sustrato utilizado fue 4-cloro-naftol.

FIGURA 7.

PATRON DE RECONOCIMIENTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL MM-Con-A B.8 CON LOS EXTRACTOS TOTALES DEL DEL FILTRADO DE CULTIVO DE DIFERENTES CEPAS MICOBACTERIANAS, EVALUADO POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Carril 1.- *M. gordonae*. 2.- Marcadores de PM. 3.- *M. fortuitum*. 4 y 5.- *M. intracelulare*. 6.- *M. kansasii*. 7.- *M. terrae*. 8.- *M. tuberculosis* cepa H37Rv. 9.- *M. triviale*. 10.- Marcadores de P.M. La electrotransferencia fue realizada de un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras a papel de nitrocelulosa. Se utilizó como segundo anticuerpo IgG de cabra  $\alpha$  ratón diluido 1:1500 acoplado a peroxidasa, utilizando como sustrato 4-cloro-naftol.

## DISCUSION

La utilización de lectinas en el aislamiento y caracterización de estructuras sacarídicas ha sido reportada ampliamente (77). Debido a la gran especificidad que poseen las lectinas por oligosacáridos, consideramos la posibilidad de que en las fracciones purificadas del *M. tuberculosis* por cromatografía de afinidad, utilizando las lectinas de Con-A, lenteja y alubia, los oligosacáridos se encuentren unidos por enlaces N-glicosídicos (GlcNAC-Asparagina). Estas fracciones son reconocidas específicamente por las lectinas, y especialmente en la de lenteja, además de la presencia de fucosa unida al oligosacárido, para que éste sea reconocido (71), se requiere de la presencia de un residuo de asparagina unido covalentemente a la cadena glicosídica (40).

Lo anterior nos ha llevado a especular la posibilidad de glicosilación de proteínas en la micobacteria. Este proceso se ha reportado poco en procariontes. Algunos trabajos como los de Mescher y col (86) describen una glicoproteína en la bacteria *Halobacterium salinarium*, esta glicoproteína se encuentra en la cubierta celular de la bacteria y por métodos bioquímicos han determinado los tipos de aminoácidos y carbohidratos presentes en ella, como también la presencia de enlaces O-glicosídicos en el aminoácido treonina y N-glicosídicos en el aminoácido asparagina. Por otro lado Morris y col (92) han caracterizado una glicoproteína fibrilar de *Streptococcus sanguis*, aún cuando no hace una demostración bioquímica del enlace covalente entre el aminoácido y el carbohidrato, su argumento para considerarla como una glicoproteína está basado en la tinción hecha al gel de poliacrilamida con azul de Coomassie y ácido periódico (Schiff).

Por lo que concierne a las partes oligosacarídicas aisladas del *M. tuberculosis* cepas H37Rv y H37Ra, conocemos la composición de carbohidratos de las fracciones. Nos falta aún por conocer no solo la secuencia y tipo de enlace de sus carbohidratos, sino

también, la molécula a la que se encuentran unidos covalentemente. Si consideramos la importancia que tiene la asparagina, unida covalentemente al oligosacárido para poder ser reconocido por la lectina de lenteja, podríamos suponer que la presencia de esta como posible aminoácido glicosilado en la proteína micobacteriana. Resultados obtenidos en este laboratorio (no reportados en esta tesis) sugieren que la micobacteria si requiere de la glicosilación de sus proteínas, pues si se cultiva en medio PBV en presencia de Tunicamicina, antibiótico que inhibe la glicosilación de proteínas, a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de medio, el crecimiento se inhibe, en comparación a un testigo al cual se le añadió NaOH a la misma concentración en que fue disuelta la tunicamicina, y en el que el crecimiento de la micobacteria fue normal. La cepa que se usó para este experimento fue la H37Rv. Por otro lado proteínas obtenidas del filtrado de cultivo por precipitación con sulfato de amonio al 80% de la misma cepa, al ser tratadas con pronasa (enzima que rompe enlaces peptídicos de forma inespecífica), hemos logrado aislar glicopéptidos que poseen la capacidad de interactuar con las lectinas de Con-A y alubia. Estos glicopéptidos nos han dado reacción positiva tanto a la ninhidrina como a la de fenol sulfúrico.

En eucariontes, en donde se conoce mejor el proceso de glicosilación proteica, se sabe que el organelo que participa en este proceso es el retículo endoplásmico rugoso; ahí las proteínas que van a ser secretadas o transportadas a otros organelos son glicosiladas. En contraste, a lo anterior las proteínas solubles del citosol no son glicosiladas. Los carbohidratos GlcNAC, manosa y glucosa son transferidos a la proteína en el retículo endoplásmico y son unidos en el grupo amino de la cadena lateral de la asparagina. A este tipo de oligosacáridos se les conoce como N-oligosacáridos. Y aquellos en los que los oligosacáridos son unidos al grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina o treonina se les conoce como O-oligosacáridos. En eucariontes la porción N-glicosídica de las

proteínas está formada generalmente por una estructura más compleja, con 3 manosas como mínimo, pudiendo encontrarse GlcNAC y galactosa (70). Es difícil tratar de explicar cual sería la estructura del oligosacárido que hemos aislado pues en procariotes hay escasos reportes en cuanto a la glicosilación de proteínas, además los carbohidratos identificados no se pueden relacionar con los azúcares que participan en la glicosilación de proteínas de eucariontes pues existen diferencias en cuanto a su proporción y tipo. Por ejemplo uno de los carbohidratos que nosotros encontramos en mayor proporción es la glucosa, el cual no se encuentra presente en las glicoproteínas de eucariontes, así como también arabinosa y xilosa. Además en éstos los residuos de GlcNAC están presentes en las glicoproteínas, y nosotros no encontramos este tipo de carbohidrato en todas las fracciones.

Otro hallazgo interesante al respecto es que los antígenos de 36 y 65 KDa descritos por Van Shooten y col (120) muestran que ciertas clonas de linfocitos T que son estimuladas con estos antígenos purificados por cromatografía de afinidad utilizando los anticuerpos monoclonales F47-9 y F47-10 respectivamente, no son estimuladas por los mismos antígenos cuando son obtenidos por ADN recombinante, en *E. coli*, probablemente ésto se deba a que el epitopo que está involucrado en el reconocimiento del linfocito T, sea glicosilado, proceso que no se realiza en *E. coli*.

De acuerdo a la composición de los carbohidratos que se muestra en la tabla 4, explicamos la interacción de las fracciones con las lectinas de la siguiente manera:

Debray y col (40) han demostrado que la Con-A tiene una alta afinidad por una estructura biantenaria, constituida por un centro trimanosídico sustituido por 2 residuos de GlcNAC; cuando los residuos de GlcNAC son sustituidos por galactosas, su afinidad se reduce. Esto coincide con nuestros resultados ya que en la fracción aislada por Con-A no encontramos residuos de galactosa. Esos mismos autores junto con Kornfeld y col (71) han identificado que la presencia de una fucosa con enlace  $\alpha(1-6)$  al

residuo de GlcNAc de la porción más interna del centro trimanosídico, es esencial para la interacción con la lectina de lenteja, así es posible que la interacción de las proteínas del ETFC de *M. tuberculosis* podría llevarse a cabo a través de una interacción con el residuo de xylosa en substitución al de la fucosa.

Reportes previos han demostrado que la lectina de alubia interactúa con un complejo estructural tetraantenario que contiene estructuras lactosamínicas, tales como la de los oligosacáridos de fetuina y orosomucoide (140), también ha sido establecido que la lectina de alubia necesita de por lo menos dos residuos de galactosa en la posición terminal para interactuar de forma eficiente con el receptor. La presencia de 5 residuos de galactosa en la fracción aislada en alubia sugiere que la unión de componentes del ETFC de *M. tuberculosis* a la columna de la lectina de alubia es a través de este mecanismo.

En el patrón electroforético en la fracción aislada en Con-A de la cepa H37Rv observamos la presencia de un componente principal de 33 KDa y dos componentes secundarios de 93 y 48 KDa. El componente de 33 KDa es uno de los antígenos más estudiados, a éste y el antígeno de 31 KDa se les ha dado el número de código 8T (MMTUB-90. S.F. Kaufman/R. Young). Son codificadas por una familia de 3 genes estructurales los cuales provienen de un gene original (13,84,125); son capaces de provocar una respuesta humoral (52,105), también han sido usados para distinguir los diferentes estadios de la lepra (37), y aunque su papel biológico no ha sido delucidado tiene epitopos que son reconocidos por el repertorio de células T (8), y ha sido encontrado dentro de macrófagos alveolares (33). Es uno de los principales antígenos de secreción y une a fibronectina (2) por lo que puede jugar un papel en la patogénesis de la bacteria, ya que una de las funciones de esta proteína es participar en las interacciones de la superficie celular entre células eucarióticas y microorganismos (2). Aún no podemos determinar la relevancia de

los antígenos de 93 y 48 KDa, solo podemos decir que contienen estructuras glicánicas, las cuales se unen a Con-A y aparentemente tienen una carencia de epitopos antigénicos suficientemente eficaces para inducir una respuesta inmune humoral, lo que ha sido demostrado por la pobre unión de los anticuerpos del suero de pacientes tuberculosos mexicanos a esos antígenos en ensayos de inmunoelectrotransferencia. (52).

La composición de carbohidratos de la fracción retenida en Con-A que hemos aislado del ETFC de *M. tuberculosis* muestra diferencias con el antígeno 5 descrito por Daniels. Este antígeno fue purificado a partir de la cepa H37Ra por cromatografía de afinidad utilizando la lectina de Con-A o con un antisuero monoespecífico (34). Para este antígeno Daniels reportó que es una proteína que contiene el 10% de carbohidrato. Su peso molecular por filtración en gel fue de 28,500 D y por PAGE-SDS de 35,000 D. En cuanto a su contenido de carbohidratos únicamente reportó la presencia de 0.04% de pentosas y el 1% de hexosas, sin aminoazúcares y sin ácido murámico (34). Del antígeno que aislamos por cromatografía de afinidad utilizando Con-A de la cepa H37Ra, reportamos la presencia de xilosa, manosa y glucosa y por PAGE-SDS encontramos que es de un peso molecular de 31 KDa, y de los antígenos de la cepa H37Rv (93,48 y 33 KDa) aislados por la misma técnica, cuentan además con la presencia de arabinosa y ácido murámico.

De las fracciones que hemos logrado aislar en las lectinas de lenteja y alubia poco se conoce; uno de los más conocido es el antígeno de 38 KDa, predomina en la fracción purificada de la cepa H37Ra en lenteja. Conocido también como antígeno 5, su número de código es 3 T (MMTUB-90. S.F. Kaufman/R. Young). Es reconocido por los anticuerpos monoclonales TB-71, TB-72 (5,63) HYT-28 (5), HBT-12(79) y HGT-3 (65). Muestra un 30% de homología con la proteína PstS de *E. coli*, la cual es una proteína específica para el transporte de fosfato, aunque aún no se ha determinado si el antígeno de 38 KDa micobacteriano pueda unir y

transportar fosfato (4). Se ha encontrado que induce la proliferación de linfocitos T y linfocitos B (30,52), su gen ya ha sido clonado (4). Se ha reportado que el 57% del suero de pacientes tuberculosos del Instituto Nacional de enfermedades respiratorias de la ciudad de México reaccionan con este antígeno, pero no los controles (52). Del antígeno de 100 KDa, de la cepa H37RV que también es reconocido por la lectina de lenteja se conoce poco. Su número de código es 16 T (MMTUB-90. S.F. Kaufman/R. Young), se ha logrado clonar parcialmente su gen unido al de la  $\beta$  galactosidasa (Ying Chang comunicación personal). Con la lectina de alubia solo se aislan 2 componentes en la cepa H37RV uno de 66 KDa y otro de 41 KDa. Aún no sabemos si el antígeno de 66 KDa que hemos logrado aislar, corresponde al ya reportado de 64-65 KDa. Este antígeno es uno de los más estudiados, ya se ha logrado clonar su gen (14,112). Se le han encontrado epitopos especie-específicos para *M. leprae*, y epitopos que son reconocidos por linfocito T (8,14,132,133) y es una de las proteínas de estrés (133).

De los antígenos de 93 y 48 KDa de la cepa H37RV que también son aislados por cromatografía de afinidad en Con-A; el de 41 KDa de la cepa H37RV aislado en alubia; el de 96 y el de 58 KDa de la cepa H37Ra aislados con la columna de lenteja, solo podríamos decir que contienen estructuras glicánicas, hecho demostrado al ser capaces de interactuar con lectinas.

Los resultados presentados en este trabajo nos muestran cómo las lectinas son capaces de reconocer específicamente componentes micobacterianos y lograr su aislamiento de una forma más sencilla a la reportada por los métodos fisicoquímicos. A la fecha somos el primer grupo de trabajo que ha logrado purificar componentes micobacterianos con el uso de las lectinas de lenteja y alubia. Previamente con la lectina de Con-A, Goldstein & Misanki (58) así como Ellner & Daniel (48) aislaron la lipoarabinomana de la pared celular de la micobacteria. A diferencia de dichos autores, nuestro interés estuvo enfocado no a las estructuras de la pared



bacteriana, sino al aislamiento de antígenos bacterianos obtenidos en la porción soluble del medio de cultivo. Aún más, en los procedimientos cromatográficos de afinidad utilizando la lectina de Con-A hemos decidido utilizar condiciones diferentes, manteniendo el ETFC en el amortiguador de boratos pH de 8.6, ya que el ETFC se mantiene en mejores condiciones en este amortiguador a pesar de lo reportado anteriormente en donde se menciona que la interacción óptima con la lectina de Con-A y componentes sacarídicos es a pH de 6.4 a 7.2 (11,16). Es probable que debido a estos cambios hemos logrado aislar componentes diferentes a los ya reportados y de una forma reproducible.

Creemos que el uso de lectinas para aislar componentes oligosacarídicos es de gran utilidad para el estudio de fracciones de carbohidratos que pudieran jugar un papel importante en el desarrollo de inmunidad protectora, ya que actualmente por opinión general se ha discutido la importancia de estos en el desarrollo de una posible vacuna (32). Crowle Ha encontrado un antígeno obtenido del bacilo tuberculoso capaz de inmunizar humanos, que contiene los carbohidratos arabinosa, manosa y galactosa, probablemente unidos a un péptido que podría darle un efecto de acarreador o adyuvante (32). En tuberculosis es necesario un antígeno capaz de provocar una respuesta inmunológica mediada por células, que confiera protección pero no hipersensibilidad tardía, de forma que al ser presentado este antígeno por el macrófago al linfocito T, sea capaz de activarlo haciéndolo producir interleucinas como la Il-2, la cual estimula al macrófago dándole una actividad microbicida más potente, y de esta forma destruir al bacilo tuberculoso. Si realmente el antígeno protector para enfermedades micobacterianas es una molécula glicosilada, las técnicas realizadas por ingeniería genética para la obtención de estos antígenos están en desventaja, a menos que se utilicen vectores eucarióticos tales como la levadura (137). Además se ha postulado que es necesaria la presencia del bacilo vivo, el cual probablemente induzca protección al secretar alguno de sus antígenos, ya que en

presencia de antígenos del bacilo muerto la inducción de la protección es poco frecuente (101).

Aún no hemos estudiado el papel biológico de las fracciones aisladas; una de nuestras metas es estudiar si alguno de estos glicoconjugados proporciona protección contra las enfermedades producidas por el *Mycobacterium tuberculosis*. O estudiar si son las responsables de la inducción del factor supresor, obtenido de macrófagos estimulados con el extracto total del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* cepa H37Ra, el cual en el cultivo de células T, inhibe de forma significativa su proliferación en respuesta a la fitohemaglutinina y la lectina de lenteja (104).

La diversidad antigénica de los componentes purificados ha sido evidente, ya que no se encontró reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal MM-Con-A B.8 con las fracciones purificadas en Con-A, lenteja y alubia. Así como tampoco el anticuerpo monoclonal MM-TB1-D6 que reconoce un epitopo especie-específico presente en *M. tuberculosis* cepa H37Rv (resultados no publicados), reacciona con las fracciones purificadas por el método de ELISA. Aunque en la inmunoelctrotransferencia si muestra reactividad con el doblete 31/33 KDa. el cual también es reconocido con el anticuerpo monoclonal MM-Con-A B.8. El anticuerpo monoclonal MM-Con-A-B.8 por su parte posee una elevada reactividad cruzada, hecho demostrado en la inmunoelctrotransferencia, al hacerlo reaccionar con los antígenos del filtrado de cultivo de diferentes cepas micobacterianas.

Podríamos suponer que el epitopo que reconoce el anticuerpo monoclonal MM-Con-A-B.8 es de origen proteico, ya que este anticuerpo interacciona únicamente con el antígeno de 33 KDa, en la fracción retenida en Con-A de la cepa H37Rv, a diferencia de que en el extracto total del filtrado de cultivo de la misma cepa es capaz de reconocer también al los antígenos de 31 y 65 KDa añadiendo el hecho de que además no reconoce las fracciones

purificadas en las lectinas de lenteja y alubia. Sin embargo una evidencia directa no la tenemos, aún no hemos determinado el epitopo reconocido.

A pesar de que el anticuerpo MM-Con-A-B.8 mostró reactividad cruzada con las cepas de *M. triviale*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. intracellulare* y *M. tuberculosis* cepa H37Ra, creemos que es de gran utilidad, en combinación con la lectina de Con-A para la purificación del antígeno de 33 KDa, y con la ventaja de que el antígeno es obtenido en su forma nativa pudiendo así realizar un estudio más completo de su actividad biológica.

## PERSPECTIVAS

1.- Aislamiento de antígenos puros. Por cromatografía de afinidad utilizando de forma combinada la lectina de Con-A y el anticuerpo monoclonal MM-Con-A-B.8 acoplados a sefarosa para la purificación del antígeno de 33 KDa, posteriormente por cromatografía de exclusión molecular aislar los antígenos de 93 y 48 KDa.

2.- Con estos antígenos realizar un estudio más fino a nivel de su estructura bioquímica, como también de su efecto biológico ya sea estudiando la respuesta humoral o la interacción que tengan estos antígenos con las células inmunes de tuberculosos mexicanos.

3.- Estudiar el papel de los antígenos aislados por cromatografía de afinidad en el desarrollo de inmunidad protectora, ya que por opinión general se ha discutido la importancia de los carbohidratos en el desarrollo de una posible vacuna para la tuberculosis.

4.- Es necesario demostrar si la micobacteria es capaz de glicosilar sus proteínas, hecho poco reportado en procariontes. Esto abriría una perspectiva para la utilización de la micobacteria como vector para la tecnología del ADN recombinante.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbas A.K., Lichtman A.H. & Pober J.S. 1991. Effector cells of cell-mediated immunity. Cellular and Molecular Immunology. (ed). W.B. Saunders Company Cap. 12: 245-258.
- 2.- Abou-Zeid C., Ratliff T.L., Wiker H.G., Harboe M., Bennedesen J. & Rook G.A.W. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 56(12): 3046-3051.
- 3.- Abud-Zeid C., Smith I., Grange J.M., Ratliff F.L., Steele J. & Rook G.A.W. 1988. The secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship to those recognized by the available antibodies. J. Gen. Microb. 134: 531-538.
- 4.- Andersen A.B. & Hansen B.E. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 57(8): 2481-2488.
- 5.- Andersen A.B., Zeng-Lin Yuan., Haslov K., Vergmann B. & Bennedesen S. 1986. Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. J. clin. Microbiol. 23(3): 446-451.
- 6.- Anderson D.C., Barry M.E. & Buchanan T.M. 1988. Exact definition of species-specific and cross-reactive epitopes of the 65-Kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* using synthetic peptides. J. Immunol. 141(2): 607-613.
- 7.- Bass J.B., Farer L.S., Hopewell P.C., Jacobs R.F. & Snider D.E. 1990. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 142: 725-735.
- 8.- Barness P.F., Mehra V., Hirschfield G.R., Fong S., Abou Zeid C., Rook G.A.W., Wu Hunter S., Brennan P.J. & Modlin R.L.; 1989. Characterization of T cell antigens associated with the cell wall protein-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 143: 2656-2662.
- 9.- Bartow R.A. & McMurray D. 1989. Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG affects the distribution of Fc receptor-bearing T Lymphocytes in experimental pulmonary tuberculosis. Infect. Immun. 57(5): 1374-1379.
- 10.-Bhardway B. & Colston M.J. 1988. The processing and presentation of mycobacterial antigens by human monocytes. Eur. J. Immunol. 18(5): 691-696.
- 11.-Bhattacharyya L. & Brewer F. 1989. Interactions of concanavalin A with asparagine-linked glycopeptides.

Structure/activity relationships of the binding and precipitation of oligomannose and bisected hybrid-type glycopeptides with concanavalin A. Eur. J. Biochem. 178: 721-726.

- 12.-Bloom & Bennet. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type Hypersensitivity. Science. 153: 80-82.
- 13.-Borremans M., De Wit L., Volckaert G., Ooms J., De Bruyn J., Huygen K., Van Vooren J.P., Stelandre M., Verhofstadt R. & Content J. 1989. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-Kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 57(10): 3123-3130.
- 14.-Born W., Happ M.P., Dallas A., Reardon C., Kubo R., Sninnick T., Brennan P. & O'Brien R. 1990. Recognition of heat shock proteins and  $\gamma\delta$  cell function. Immunol. Today. 11(2): 40-43.
- 15.-Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 16.-Brewer F., Bhattacharyya L., Brown R.D. & Koeing S.H. 1985. Interactions of concanavalin A with a trimannosyl oligosaccharide fragment of complex and with hight mannose type glycopeptides. Bioch. Bioph. Res. Comm. 127(3): 1066-1071
- 17.-Britton W.J., Hellqvist L., Basten A. & Raison R.L. 1985. *Mycobacterium leprae* antigens involved in human immune responses. J. Immunol. 135(6): 4171-4177.
- 18.-Britton W.J., Hellquist L., Basten A. & Inglis A. 1986. Immunoreactivity of a 70 KD protein purified from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin by monoclonal antibody affinity chromatography. J. Exp. Med. 164: 695-708.
- 19.-Britton W.J., Hellqvist L., Garsia R.J. & Basten A. 1988. Antigens of *Mycobacterium leprae* identified by immunoprecipitation with sera from leprosy and tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 71: 394-398.
- 20.-Brooks J.B., Daneshvar M.I., Haberberger R.L. & Mikhail I.A. 1990. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography detection of carboxylic acids in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 28(5): 989-97.
- 21.-Bucklin R.C. & Crowle A.J. 1986. Effect of recombinant I1-2 on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured human macrophages. J. Leuk. Biol. 40(3): 324-325.
- 22.-Burrows. 1986. *Mycobacterium*. En Microbiología 22a. Ed. Cap. 31: 691-715.

- 23.-Chan S.L., Reggiardo Z., Daniel T.M., Girling D.J. & Mitchison D.A. 1990. Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigens. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 385-390.
- 24.-Chandramuki A., Bothamley G.H., Brennan P.J. & Ivanyi J. 1989. Levels of antibody to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculous meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 27(5): 821-825.
- 25.-Chatterjee D., Bozic C.M., Knisley C., Nae-Cho S. & Brennan P.J. 1989. Phenolic glycolipids of *Mycobacterium bovis*: New structures and synthesis of a corresponding seroreactive neoglycoprotein. *Infect. Immun.* 57(2): 322-330.
- 26.-Cho S.N., Fujiwara T., Hunter S.W., Rea T.H., Gelber R.H. & Brennan P.J. 1984. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *J. Infect. Dis.* 150(3): 311-322.
- 27.-Coates A.R.M., Allen B.W., Hewitt J. & Ivanyi J. 1981. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet.* 167-169. (July 25).
- 28.-Coates S.R., Hansen D., Schecter G., Slutkin G., Hopewell P., Affronti L. & Echenberg D.F. 1986. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in Seibert fractions by immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 24(1): 126-130.
- 29.-Collins F.M. 1990. Dynamics of the phagocytic cell response within the lungs of parabiotic mice infected with mycobacteria with decreasing virulence for mice. *Infect. Immun.* 58(7): 2303-2308.
- 30.-Collin F.M., Lamb J.R. & Young D.B. 1988. Biological activity of protein antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect. Immun.* 56(5): 1260-1266.
- 31.-Crowle A.J., Ross E.J. & May M.H. 1987. Inhibition by 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect. Immun.* 55(12): 2945-2950.
- 32.-Crowle A.J. 1988. Immunization against Tuberculosis: What kind of Vaccine? *Infect. Immun.* 56(11): 2769-2773.
- 33.-Damiani G., Bianco A., Beltrame A., Vismara D., Filippone M., Collizzi V., Young D.B. & Bloom B.R. 1988. Generation and characterization of monoclonal antibodies to 28-35-, and 65-Kilodalton proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 56(6): 1281-1287.

- 34.-Daniel T.M. & Anderson P.A. 1978. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117: 533-539.
- 35.-Daniel T.M. & Janicki B.W. 1978. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol. Rev.* 42(1): 84-113.
- 36.-Dannenberg A.M. 1989. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 11 (supp 2): S369-S378.
- 37.-Das P.K., Rambukkana A., Baas J.G., Groothuis D.G. & Halperin M. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for distinguishing serological responses of lepromatous and tuberculoid leprosis to the 29/33-kilodalton doublet and 64-kilodalton antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microb.* 28(2): 379-382.
- 38.-David R.J. 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 56: 72-77.
- 39.-Davis., Dubelcco., Eisen., Ginsberg. & Wood. 1979. *Mycobacterium*. *Tratado de Microbiología*. 2a. Ed. Salvat. Cap. 35: 868-892.
- 40.-Debray H., Decout D., Strecker G., Spick G. & Montreuil J. 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117: 41-55.
- 41.-De Bryn J., Bosmans R., Turneer M., Wecky M., Myabenda J., Vooren J.P., Falmagne P., Wiker H.G. & Harboe M. 1987. Purification, partial characterization, and identification of a skin-reactive protein antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 55(1): 245-252.
- 42.-Denis M. 1991. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercule bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cellular Immunol.* 132: 150-157.
- 43.-Dodge J.T., Mitchell C. & Hanahan D.J. 1962. The preparations and chemical characterization of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100: 119-130.
- 44.-Doherty T.M., Booth R.J., Love S.G., Gibson J.J., Harding D.R.K. & Watson J.D. 1989. Characterization of an antibody-binding epitope from the 18-KDa protein on *Mycobacterium leprae*. *J. Immunol.* 142: 1691-1695.



- 45.-Dubois M., Gilles K.A., Halmilton P.A., Rebers P.A. & Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350-356.
- 46.-Douvas G.S., Looker D.L., Vatter A.E. & Crowle A.J. 1985. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect. Immun.* 50(1): 1-8.
- 47.-Edwards D. & Kirpatrick C.H. 1986. The immunology of Mycobacterial diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 1062-1071.
- 48.-Ellner J.J. & Daniel T.M. 1979. Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. *Clin. exp. Immunol.* 35: 250-257.
- 49.-Ellner J.J. & Wallis R. 1989. Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 11(2): S455-S459.
- 50.-Engers H.D. 1985. Results of a World Health Organization-Sponsored Workshop of monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 48: 603-605.
- 51.-Engvall E. & Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochem.* 8: 874-879.
- 52.-Espitia C., Cervera I., González R. & Mancilla R. 1989. A 38-KD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serological evaluation. *Clin. Exp. Immunol.* 77(3): 373-377.
- 53.-Flesh I. & Kaufmann S.H.E. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon  $\gamma$  activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138(12): 4408-4413.
- 54.-French D., Fischberg E., Buhl S. & Scharff M.D. 1986. The production of more useful monoclonal antibodies. I. Modifications of the basic technology. *Immunol. Today.* 7:344-346.
- 55.-Galfré G. & Milstein C. 1981. Preparations of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. *Methods in Enzymol.* 73: 3-95.
- 56.-Gillis T.P., Miller R.A., Young D.B., Khanolkar S.R. & Buchanan T.M. 1985. Immunochemical characterization of a protein associated with *Mycobacterium leprae* cell wall. *Infect. Immun.* 49(2): 371-377.
- 57.-Gillis T.P. & Buchanan T.M. 1982. Production and partial characterization of Monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 37(1): 172-178.

- 58.-Goldstein I.J. & Misaki A. 1970. Interaction of concanavalin A with an arabinogalactan from the cell wall of *Mycobacterium bovis*. J. Bacteriol. 103(2): 422-425.
- 59.-Hance A.J., Grandchamp B., Lévy-Frébault V., Lecossier D., Rauzier J., Bocart D. & Gicquel B. 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol. Microbiol. 3(7): 843-849.
- 60.-Harboe M., Nagai S., Patarroyo M.E., Torres M.L., Ramirez C. & Cruz N. 1986. Properties of proteins MPB 64, MPB 70 and MPB 80 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 52(1): 293-302.
- 61.-Hirokazutoba., Crawford. & Ellner J. 1989. Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activated factor activity of gamma interferon. Infect. Immun. 57(1): 239-244..
- 62.-Ivanyi J., Sinha S., Aston R., Cussel D., Keen M. & Sengupta U. 1983. Definition of species specific and cross-reactive antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* using monoclonal antibodies. Clin. Exp. Immunol. 52: 528-536.
- 63.-Ivanyi J., Bothamley G.H. & Jackett P.S. 1988. Immunodiagnostic assays for tuberculosis and leprosy. Brit. Med. Bull. 44(3): 635-649.
- 64.-Jeevan A. & Asherson G.L. 1988. Recombinant interleukin-2 limits the replication of *Mycobacterium lepraemurium* and *Mycobacterium bovis* BCG in mice. Infect. Immun. 56(3): 660-664.
- 65.-Kadival G.V. & Chapara S.D. 1987. Production, Characterization, and species specificity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 25(1): 76-80.
- 66.-Khor M., Lowrie D.B. & Mitchison D.A. 1986. Effects of recombinant interferon-gamma and chemotherapy with isoniazid and rifampicin on infections of mouse peritoneal macrophages with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium microti* in vitro. Br. J. Exp. Pathol. 67: 707-717.
- 67.-Kingston A.E., Salgame P.R., Mitchison A. & Colston J. 1987. Immunological activity of a 14-Kilodalton recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. Infect. Immun. 55(12): 3149-3154.
- 68.-Klatser P.R., Van Rens M.M. & Eggelte T.A. 1984. Immunochemical characterization of *Mycobacterium leprae* antigens by SDS-poliacrylamide gel electrophoresis immunoperoxidase technique (SGIP) using patients' sera. Clin. Exp. Immunol. 56: 537-544.

- 69.-Köhler G. & Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (London). 256: 495-497.
- 70.-Kornfeld R. & Kornfeld S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631-664.
- 71.-Kornfeld K., Reitman M.L. & Kornfeld R. 1981. The carbohydrate-binding specificity of a pea and lentil lectins. *J. Biol. Chem.* 236(13): 6633-6640.
- 72.-Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- 73.-Lamb J.R. & Young D.B. 1987. A novel approach to the identification of T-cell epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* using human T-lymphocyte clones. *Immunology.* 60: 1-5.
- 74.-Lamb F.I., Kingston A. E., Estrada I. & Colston M.J. 1988. Heterologous expression of the 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium leprae* and murine T-cell responses to the gene product. *Infect. Immun.* 56(5): 1237-1241.
- 75.-Lefford M.J. 1975. Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* 11(6): 1174-1181.
- 76.-Leventon C., Barnass S., Champion B., Lucas S., Souza B., Nicol M., Banenjee D. & Rook G. 1989. T-cell-mediated protection of mice against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 57(2): 390-395.
- 77.-Lis Halina & Sharon N. 1986. Lectins as molecules and as tolls. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35-67.
- 78.-Littlefield J.V. 1964. Selection of hybrids from making of fibroblast *in vitro* and their presumed recombinants. *Science.* 193: 265-275.
- 79.-Ljungqvist L., Worsaae A. & Heron I. 1988. Antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* in 11 strains of inbred mice: Novel monoclonal antibody specificities generated by fusions, using spleens from BALB.B10 and CBA/J mice. *Infect. Immun.* 56(8): 1994-1998.
- 80.-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randal R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 81.-Lucas S.B. 1988. Histopathology of leprosy and tuberculosis-an overview. *Brit. Med. Bull.* 44(3): 584-599.
- 82.-Lu Melvin C., Lien M.H., Becker R.E., Heine H.C., Buggs A.M., Lipovsek D., Gupta R., Robbins P.W., Grossikinsky C.M.,

- Hubbard S.C. & Young R.A. 1987. Genes for immunodominant protein antigens are highly homologous in *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, and the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 55(10): 2378-2382.
- 83.-Malkovsky M.B., Loveland B., North M., Asherson G.L., Gao L., Ward P. & Fiers. 1987. Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* (London). 325: 262-265.
- 84.-Matsuo K., Yamaguchi R., Yamaguchi A., Tasaka H., Terasuka K. & Yamada T. 1990. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive  $\alpha$  antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect. Immun.* 58(2): 550-556.
- 85.-Mehra V., Sweetser D. & Young R.A. 1986. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 83: 7013-7017.
- 86.-Mescher M. F. & Strominger J.L. 1976. Purification and characterization of a Procaryotic Glycoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *J. Biol. Chem.* 251(7): 2005-2014.
- 87.-Milstein C., Clark M.R., Galfre G. & Cuello A.C. 1980. Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. *Immunology*. M. Fourgerau (ed). Academic Press. New York: 17-33.
- 88.-Minden P., Kelleher P.J., Freed J.H., Nielsen L.D., Brennan P.J., McPheron L. & McClatchy K. 1984. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with a monoclonal antibody to *M. bovis* BCG. *Infect. Immun.* 46(2): 519-525.
- 89.-Montaño L.F., Aburto A., Massó F., Rayón I. & Parra C. 1988. Predicción y respuesta a interleucina 2 por células periféricas mononucleares de pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30: 125-131.
- 90.-Moretta L., Webb S.R., Grossi C.E., Lydyard P.M. & Cooper M.D. 1977. Functional analysis of two human T cell subpopulations: help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J. Exp. Med.* 146(1): 184-200.
- 91.-Mor N., Goren M.B. & Crowle A.J. 1989. Enhancement of growth of *Mycobacterium lepraemurium* in macrophage by gamma interferon. *Infect. Immun.* 57(8): 2586-2587.
- 92.-Morris J.E., Ganeshkumar N., Song M. & McBride B. 1987. Identification and preliminary characterization of a *Streptococcus sanguis* fibrillar glycoprotein. *J. Bacteriol.* 169(1): 164-161.

- 93.-Müller I., Cobbold S.P., Waldmann H. & Kaufmann S.H.E. 1987. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective *in vivo* depletion of L3T4<sup>+</sup> and LyT-2<sup>+</sup> T cells. *Infect. Immun.* 55(9): 2037-2041.
- 94.-Nagai S., Matsumoto J. & Nagasuga T. 1981. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 31(1): 1152-1160.
- 95.-Najarian J.S. & Feldman J.D. 1961. Passive transfer of tuberculin sensitivity by tritiated thymidine-labeled lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 114: 779-789.
- 96.-Noordeen S.K. & Godal T. 1988. Introduction (tuberculosis and leprosy). *Brit. Med. Bull.* 44(3): 523-527.
- 97.-Ochoa J.L. & Kristiansen T. 1978. Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. *FEBS Letters.* 90(1): 145-148.
- 98.-Orme I.M. 1987. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138(1): 293-298.
- 99.-Orme I.M. 1987. Aging and immunity to tuberculosis: increased susceptibility of old mice reflects a decreased capacity to generate mediator T lymphocytes. *J. Immunol.* 138(12): 4414-4418.
- 100-Orme I.M. 1988. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance, in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect. Immun.* 56(12): 3310-3312.
- 101-Orme I.M. 1988. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 140(10). 3589-3593.
- 102-Osawa T. & Matsumoto G. 1972. Gorse (*Ulex europeus*) phytohemagglutinins. *Methods in Enzymol.* 28(B): 323-327.
- 103-Ottenhoff T.H., Klaster P.R., Ivanyi J., Elferink D.G., de Wit M.Y.L. & de Vries R.R.O. 1986. *Mycobacterium leprae*-specific protein antigens defined by cloned human helper T cells. *Nature (London).* 319: 66-68.
- 104-Parra C., Montaña L.F., Huesca M., Rayón I., Willms K. & Goodsaid F. 1986. Inhibition of mitogenesis induced by phytohemagglutinin and *lens culinaris* lectin in adherent-cell supernatants treated with protein extract of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 52(1): 309-313.
- 105-Pessolani M.C., Rumjanek F.D., Melo Marques M.A., Melo F. & Sarno E.N. 1989. Serological response of patients with leprosy to a 28 to 30 Kilodalton protein doublet from early

- cultures of *Mycobacterium bovis* BCG. J. Clin. Microbiol. 27(10): 2184-2189.
- 106-Powell K.E. & Farer L.S. 1980. A rising age of the tuberculosis patient: A sign of success and failure. J. Infect. Dis. 142(6): 946-948.
- 107-Resnick M., Roguel-Resnick N., Bercovier H., Levy L., Toledo J. & Zipori D. 1990. Detection of interleukin-3 in the serum of mice infected with *Mycobacterium lepraemurium*. J. Infect. Dis. 162: 1202-1204.
- 108-Ridel P.R., Jamet P., Robin Y. & Bach M. 1986. Interleukin-1 released by blood-monocyte-derived macrophages from patients with leprosy. Infect. Immun. 52(1): 303-308.
- 109-Rook G.A.W., Steele J., Ainsworth M. & Champion B.R. 1986. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. Immunology. 59: 333-338.
- 110-Rook G.A.W. 1987. Progress in the immunology of the mycobacterioses. Clin. Exp. Immunol. 69: 1-9.
- 111-Rook G.A.W. 1988. Role of activated macrophages in the immunopathology of tuberculosis. Brit. Med. Bull. 44(3): 611-623.
- 112-Shinnick T.M. 1987. The 65 KDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J. bacteriol. 169(3): 1080-1088.
- 113-Sut A., Sirugue S., Sixou S., Lakhadar F., Tocanne J.F. & Lanéelle G. 1990. Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: Alteration of model and natural membranes. Biochemistry. 29: 8498-8502.
- 114-Takashima T. & Collins F.M. 1988. T-cell-mediated immunity in persistent *Mycobacterium intracellulare* infections in mice. Infect. Immun. 56(11): 2782-2787.
- 115-Toossi Z., Kleinhenz M.E. & Ellner J.J. 1986. Defective interleukin-2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. J. Exp. Med. 163: 1162-1172.
- 116-Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(9): 4350-4354.
- 117-Tsuyuguchi I., Kawasaki H., Takashima T., Tsuyuguchi T. & Kishimoto S. 1990. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex-induced suppression of T cell proliferation *in vitro* by regulation of monocyte accessory cell activity. Infect. Immun. 58(5): 1369-1378.

- 118-Urlike Beisiegel., Medizinsche K., Poliklinik U.K. & Eppendorf K. 1986. Protein Blotting. Electrophoresis. 7: 1-18.
- 119-Valone S.E., Rich E.A., Wallis R.S. & Ellner J.J. 1988. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and micobacterial antigens. Infect. Immun. 56(12): 3313-3315.
- 120-Van Schooten W.C.A., Ottenhoff T.H.M., Klaster P.R., Thole J., De Vries R.R.P. & Kolk A.H.J. 1988. T cell epitopes on the 36 K and 65 K *Mycobacterium leprae* antigens defined by human T cell clones. Eur. J. Immunol. 18: 849-854.
- 121-Verbon A., Kuijper S., Jansen H.M., Speelman P. & Kolk A.H.J. 1990. Antigens in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis*: epitopes defined by monoclonal al human antibodies. J. Gen. Microbiol. 136: 955-964.
- 122-Wadee A.A., Cohen J.D. & Rabson A.R. 1987. Gamma interferon reverses inhibition of leukocyte bactericidal activity by a 25-Kilodalton fraction from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 55(11): 2777-2782.
- 123-Wheeler P.R. & Rattedge. 1988. Metabolism in *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis* and other pathogenic mycobacteria. Brit. Med. Bull. 44(3): 541-561.
- 124-Wietzerbin J., Lederer F. & Petit J.F. 1975. Structural study of the poly- L-glutamic acid of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, strain Brevannes. Bioch. Bioph. Res. Commun. 62: 246-252.
- 125-Wiker H.G., Nagai K.S. & Harboe M. 1990. Evidence for three separate genes encoding the proteins of the Mycobacterial antigens 85 complex. Infect. Immun 58(1). 272-274.
- 126-Workshop. 1986. Results of a World Health Organization-sponsored workshop to characterize antigens recognized by *Mycobacterium*-specific monoclonal antibodies. Infect. Immun. 51(2): 718-720.
- 127-Workshop. 1988. Summary, conclusions, and recomendations from the international workshop on "research towards global control and prevention of tuberculosis: with an emphasis on vaccine development. J. Infect. Dis. 158 (1): 248-253.
- 128-Wu Hunter S., Gaylord H. & Brennan P. 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysacharide antigens from the leprosy and tubercule bacilli. J. Biol. Chem. 261(26): 12345-12351.
- 129-Yelton D.E. & Scharff M.D. 1981. Monoclonal antibodies; a powerful new tool in biology. Ann. Rev. Biochem. 50: 657.

- 130-Young D.B. 1988. Structure of mycobacterial antigens. Brit. Med. Bull. 44(3): 562-583.
- 131-Young D.B., Kent L., Rees A., Lamb J., & Ivanyi J. 1986. Immunological activity of a 38 KDa protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 54(1): 177-183.
- 132-Young D.B., Lathigra R., Rees A., Lamb J.H.C & Lamb J.R. 1987. The 65 KDa antigen of mycobacteria-a common bacterial protein? Immunol. Today. 8(7): 215-219.
- 133-Young D.B., Lathigra R., Hendrix R., Sweetser D. & Young R.A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4267-4270.
- 134-Young R.A., Mehra V., Sweetser D., Buchanan T., Curtiss J.C., Davis R.W. & Bloom B.R. 1985. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. Nature (London). 316: 450-452.
- 135-Younger J. & Salvin S.B. 1973. Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. J. Immunol. 111: 1914-1922.
- 136-Walker L. & Cowrie D.B. 1981. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. Nature (London). 293: 69-70.
- 137-Watson., Hopkins., Roberts., Steitz. & Weiner. 1977. Recombinant DNA at work. Molecular Biology of the gene. vol. I cap. 19: 595-618.
- 138-Weinberg A., Basham T.Y. & Merigan T.C. 1986. Regulation of guinea-pig immune functions by interleukin-2: critical role of natural killer activity in acute HSV-2 genital infection. J. Immunol. 137: 3310-3317.
- 139-Zanetta J.P., Breckenridge W.C. & Vicendon G.J. 1972. Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetic derivatives. J. Chromatog. 69: 291-304.
- 140-Zenteno E., Maldonado G., Ortega M., Ortiz R., Montaña L.F., Debray H. & Montreuil J. 1990. Sugar specificity of the erythroagglutinin from *phaseolus coccineus* var. alubia. Lectins, Biology, Bioch.-Clin.Chem.; Vol 8. T.C. Bog-Hansen A. Kallikorm Eds. Sigma Library, St. Louis Mo. USA. En prensa.