



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
CIUDAD UNIVERSITARIA

CLONACION DEL GEN ESAT-6 DE *Micobacterium tuberculosis*, OBTENCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE (ESAT-6r) Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MAURICIO CASTAÑON ARREOLA

ASESOR: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL



MEXICO, D.F.,

281423



2000

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

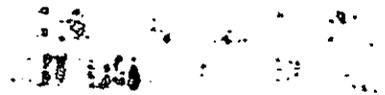
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente



Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Clonación del gen *esat-6* de *Mycobacterium tuberculosis*, obtención de la proteína recombinante (ESAT-6r) y producción de anticuerpos monoclonales" realizado por Mauricio Castañón Arreola

con número de cuenta 8800166-7, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dra. Yolanda López Vidal

Propietario

Dra. Margarita V. García Garduño

Propietario

Dr. Andrés Castell Rodríguez

Suplente

Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente

Dra. Rosaura Mayén Estrada

Edna Maria Suarez Diaz

Consejo Departamental de BIOLOGIA
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dedicatoria:

A mis padres

Y

amigos

INDICE

Índice.	1
Abreviaturas.	3
Indice de Figuras.	5
Indice de Tablas.	6
Resumen.	7
1.- Introducción.	9
1.1 Tuberculosis en el mundo.	9
1.2 Tuberculosis en México.	10
2.- Agente etiológico.	11
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.2 Características del cultivo.	13
2.3 Infección.	13
3.- Antígenos micobacterianos.	18
3.1 Proteínas de secreción.	18
3.2 ESAT-6.	20
4.- Anticuerpos.	25
4.1 Anticuerpos monoclonales.	28
4.2 Uso de anticuerpos monoclonales.	28
5.- Justificación.	31

6.- Objetivos.	32
6.1 Objetivos generales.	32
6.2 Objetivos particulares.	32
7.- Métodos.	33
7.1 Clonación de <i>esat-6</i>	33
7.1.1 Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ R _v	33
7.1.2 Extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i>	33
7.1.3 Amplificación del gen <i>esat-6</i> de <i>M. tuberculosis</i>	34
7.1.4 Purificación del producto de PCR del gen <i>esat-6</i>	35
7.1.5 Preparación del vector.	36
7.1.6 Preparación de células competentes.	37
7.1.7 Transformación de células competentes.	38
7.1.8 Identificación de clonas.	38
7.2 Producción de anticuerpos monoclonales.	39
7.2.1 Esquema general.	40
7.2.2 Inmunización de ratones BALB/c con ESAT-6r.	41
7.2.3 Titulación de anticuerpos en suero de ratón.	42
7.2.4 Fusión de células de mieloma y linfocitos B.	42
7.2.5 Clonación por dilución limitada.	44
8.- Resultados	46
9.- Discusión	55
10.- Conclusiones.	60
11.- Bibliografía.	61

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
BAAR	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Acido Etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a anticuerpo
ESTA-6	Antígeno Blanco de Secreción Temprana
g	Gravedades
H ₂ SO ₄	Acido Sulfúrico
HAT	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
Hib	Hibrimax
IFN-γ	Interferon gamma
IPTG	Isopropil-β-tiogalactósido
kDa	Kilodaltones
kpb	Kilopares de bases
LB	Luria Bertani
Mab	Anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mM	Milimolar
mpm	Marcador de peso molecular
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud

pb	Pares de bases
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Poli(etil)englicol
pH	Potencial de hidrógeno
pM	Picomolar
PPD	Derivado Proteico Purificado
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
TDM	Factor cordón
TE	Tris-EDTA
Th 1	Células T cooperadoras tipo 1
TSS	Solución de Transformación y Almacenaje
UV	Ultravioleta
μl	Microlitros
μm	Micrómetro

INDICE DE FIGURAS

1. Ubicación Taxonomica de <i>M. tuberculosis</i>	11
2. Fotomicrografia de barrido	12
3. Mecanismo de transmisión de <i>M. tuberculosis</i>	15
4. Mecanismos celulares en la infección por <i>M. tuberculosis</i>	17
5. Secuencia nucleotídica y polipeptídica de la proteína ESAT-6.	21
6. Mapa del operon que codifica para ESAT-6.	22
7. Esquema prototipo de un monómero de inmunoglobulina.	26
8. Mapa físico del vector PRO EX HT.	36
9. Esquema para la producción de anticuerpos monoclonales.	40
10. Electroforesis en gel de agarosa 2.0% (p PCR A, <i>esat-6</i>).	47
11. Electroforesis en gel de agarosa 2.0% (pPCR B purificado).	47
12. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% (Plásmidos).	47
13. Electroforesis en gel de agarosa 2.0% (pPCR <i>esat-6</i> de plásmidos).	48
14. Electroforesis en gel de acrilamida-SDS.	50
15. Inmunodot.	51
16. Inmunoblot.	52
17. Respuesta de anticuerpos en ratón por ELISA.	53

INDICE DE TABLAS

1. Regiones con mayor índice de tuberculosis.	10
2. Detección molecular del gen <i>esaf-6</i> en diversas cepas del género <i>Mycobacterium</i>	23
3. Características de las inmunoglobulinas de ratón.	27
4. Usos de los anticuerpos monoclonales.	29
5. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales.	41

RESUMEN

La tuberculosis causada por infección con *Mycobacterium tuberculosis* es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 1993 la OMS decretó un estado de emergencia global debido al resurgimiento de la enfermedad, diagnosticándose anualmente 10 millones de casos y tres millones de decesos a lo cual se agrega el resurgimiento de cepas farmaco resistentes y la estrecha asociación de esta enfermedad con las epidemias de VIH. Con la finalidad de controlar y erradicar la enfermedad, a nivel mundial se estimuló el desarrollo de investigaciones conducidas hacia el desarrollo de nuevas vacunas y/o fármacos antifímicos.

Una de las áreas de investigación que adquirió importancia es la determinación de los antígenos micobacterianos de importancia inmunológica como posibles candidatos para la creación de vacunas. La proteína de secreción temprana ESAT-6 es un antígeno inmunodominante que sólo se encuentra en bacilos del complejo *M. tuberculosis* y en algunas cepas ambientales, y cuenta con la peculiaridad de inducir una respuesta celular Th 1 como ha sido comprobado en modelos murinos y con muestras de humanos.

En el presente trabajo se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína de secreción temprana ESAT-6 de *M. tuberculosis* en un vector de expresión (PRO EX HT) y se transfectaron bacterias de *E. coli* para obtener el antígeno recombinante y producir anticuerpos monoclonales contra dicha proteína. La eficiencia de clonación en *E. coli* utilizando la estrategia de un solo paso propuesta por Chung et al. (1997) fue menor a la reportada posiblemente como efecto de una mala ligación del vector con el producto de clonación aunque

una de las transformantes obtenidas presentó el gen clonado (*esaf-6*) como se confirmó por PCR. La producción de la proteína recombinante no cambió al transfectar el vector clonado (*esaf-6r*) de la cepa de *E. coli* DH5 α a una *E. coli* XL1-Blue, teniendo un máximo de producción a las cuatro horas de inducción con IPTG. La purificación de la proteína ESAT-6r por afinidad a un agente quelante brinda un rendimiento bajo (aproximadamente 180 μ g/ml) debido al tamaño y características de la proteína y a la presencia de proteínas citosólicas de *E. coli* de mayor peso molecular y ricas en histidinas por lo que es necesario recurrir a procedimientos mas elaborados para obtener la proteína libre de impurezas y con un rendimiento mayor. La proteína recombinante se encontró mayoritariamente en el citosol y botón de lisados bacterianos y su identidad se confirmó mediante anticuerpos policlonales de ratón y humano, así como por el anticuerpo monoclonal desarrollado.

En este caso las características inmunogénicas de la proteína permitieron desarrollar el anticuerpo monoclonal E54 de isotipo IG_g, utilizando cantidades mínimas de antígeno (1 μ g/ml) que en la mayoría de los casos (75%) fue suficiente para desarrollar una posible respuesta Th 1 o celular.

La utilización de vectores comerciales de expresión para clonar genes de antígenos de importancia médica permite la obtención de estos en cantidades mayores y en menor tiempo, además de reducir el riesgo que implica trabajar con microorganismos patógenos como es el caso de *M. tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis en el Mundo

La tuberculosis es una enfermedad crónica causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, responsable mundialmente del mayor número de muertes que cualquier otra enfermedad infecciosa (27,33). La tuberculosis es, al parecer, tan antigua como el hombre, ya que en huesos de hombres de la edad de piedra y en algunas de las primeras momias egipcias se ha reconocido este padecimiento (40).

La organización mundial de la salud (OMS), estima que un tercio de la población mundial está infectado (aproximadamente 1.7 billones de personas), y que cada año 10 millones de personas desarrollan la enfermedad activa y 3 millones mueren. Esta situación se agrava por el surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a antifímicos y la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) (27).

La prevalencia de la tuberculosis en algunas regiones es inusitadamente alta, a lo cual influye la raza, el sexo, la edad del grupo poblacional y el perfil socioeconómico (17). En este sentido, es importante notar que la OMS informa que hay 13 países en los que se concentra el 75% de los nuevos casos de tuberculosis, entre los que encuentra a México (Tabla 1) (27).

Países con mayor incidencia de Tuberculosis

(75% de los casos reportados en el mundo)

Pakistán	Brasil
India	México
Bangladesh	Ex Unión Soviética
Tailandia	Etiopía
Indonesia	Zaire
Filipinas	Sudeste Africano
China	

Tabla. 1: Países considerados por la OMS como regiones de alto riesgo en las que se concentra el 75% de los casos de tuberculosis reportados en el mundo. WHO (25).

1.2 Tuberculosis en México

En México, la tuberculosis se presenta en zonas marginadas y urbanas. De acuerdo con los registros de la Secretaría de Salubridad la tasa de morbilidad se ha mantenido estable en los últimos años mostrando una incidencia de entre 12 y 15 mil casos anuales, lo que marca una disminución al compararlo con la incidencia registrada a principios de los años ochenta (32 mil casos) (26). En 1995, el gobierno de México en colaboración con la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) realizó un estudio a fondo en el que se estimó que se presentan 56,200 casos anualmente, de los que muchos posiblemente corresponden a casos mal diagnosticados o presentes en áreas alejadas sin facilidades para recibir servicios de salud (22).

La incidencia de tuberculosis informada por los sistemas de salud en el país sin considerar los datos encontrados en el estudio de 1995, es de aproximadamente 12,000 casos anuales, solo situándose por debajo de aquella de los países del sudeste asiático o el Africa subsahariana (33) y claramente superior a la reportada en los países desarrollados como los Estados Unidos (27).

2. Agente etiológico

El género *Mycobacterium* se ubica dentro del orden de los Actinomycetales, comprende 54 especies y únicamente el complejo *M. tuberculosis* resulta patógeno para el humano (Fig. 1) (17,46).

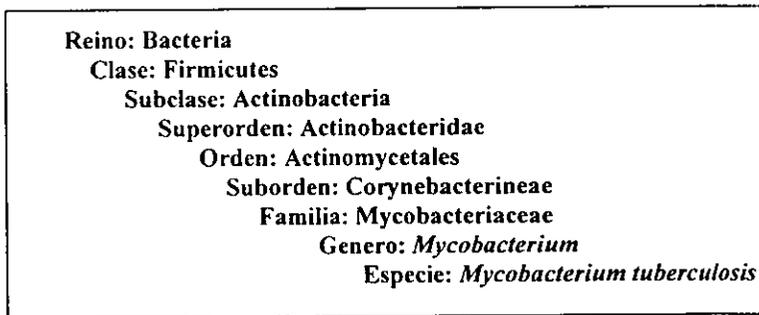


Fig. 1: Ubicación taxonómica de *Mycobacterium tuberculosis*. BLASTA.

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es un bacilo recto o ligeramente curvo, mide entre 0.3 y 0.6 μm de ancho y de 1 a 4 μm de largo y no es esporulado ni encapsulado. Los bacilos resultan difíciles de teñir con los colorantes de la tinción de Gram, sin embargo se les considera como gram positivos. Un rasgo distintivo de este género es su pared compuesta de tres capas que son: macromoléculas lipófilicas (aproximadamente el 60% del peso seco de la pared), los peptidoglucanos y los arabinogalactanos; estas capas están embebidas en una matriz compuesta principalmente por un esqueleto covalente de ácidos micólicos, azúcares neutros (arabinosa y galactosa) y peptidoglicana (8,12,47). Son bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) que en ocasiones tienen el aspecto de un rosario al teñirlos con la técnica de Ziehl-Neelsen para BAARs, (Fig. 1) lo cual se debe al gran número de vacuolas y a su contenido de polifosfato (9,49).

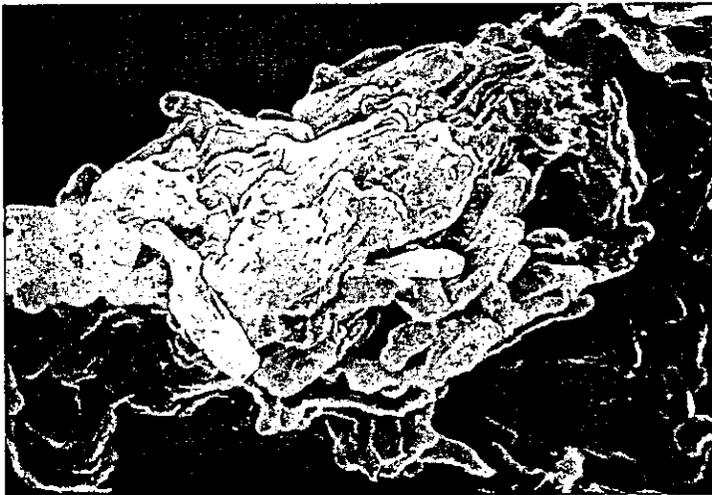


Fig. 2: Fotomicrografía de barrido. Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv en el que se observa la formación de cordones. Instituto Pasteur (Colección fotográfica).

2.2 Características del cultivo

M. tuberculosis es un microorganismo aerobio obligado que crece en medios sintéticos muy sencillos que tienen aspargina como fuente de nitrógeno, glicerol como fuente de carbono, citrato de magnesio, sulfato de potasio y fosfato. El pH óptimo para su crecimiento es de 7 y el aumento de la tensión de CO₂ se refleja en un aumento en la velocidad de duplicación pero, cualquier reducción en la tensión de oxígeno representa una disminución en su tasa de duplicación que es de 24 horas y se requieren de 3-4 semanas en incubación a 37° C para obtener un cultivo visible (34,49).

La morfología colonial de *M. tuberculosis* se identifica fácilmente por el aspecto rugoso de sus colonias de crecimiento disgonico que tienen una coloración blanquecina o amarillo mate y, por sus propiedades bioquímicas: niacina (+), reducción de nitratos a nitritos (+), catalaza (+ a 20° C y - a 68° C), sensibilidad a 500mg/ml de ácido p-nitrobenzòico, ureasa (+), crecimiento en hidrazida de ácido-2-tiofenocarboxílico (1mg/ml) y arilsulfataza (-) (8,17,46).

2.3 Infección

La tuberculosis es una enfermedad de transmisión aérea causada por una repetida exposición al bacilo *M. tuberculosis* el cual es transportado en microgotas menores a 5 µm de diámetro (27) expulsadas al toser por un individuo con tuberculosis pulmonar activa en fase cavitaria. A estos pacientes se les considera bacilíferos y son potencialmente infectantes al estar constantemente expulsando bacilos viables. La transmisión por objetos contaminados (fomites) es muy rara.

El reservorio natural de *M. tuberculosis* es el hombre pero, también se ha descrito la infección en algunos vertebrados superiores como primates, perros, gatos, bovinos y otros animales que se encuentran en contacto constante con el hombre (46,47,51). De igual forma existe la infección de humanos por especies de micobacterias atípicas que se piensa exclusivamente infectaban otros animales.

Se estima que únicamente el 10% de las personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrolla la enfermedad en alguna etapa de su vida, debido a la capacidad del huésped de controlar la infección, que eventualmente puede ser reactivada al presentarse otros trastornos y/o enfermedades (Ej. diabetes mellitus, depresión, desnutrición, infección por el virus del VIH, etc.) que debilitan el sistema inmunológico e incrementan las posibilidades de desarrollar la enfermedad.

El mecanismo de infección en humanos (Fig. 3) se da por la inhalación de una pequeña cantidad de bacilos virulentos y viables contenidos en los núcleos de microgotas, que pasan por el árbol bronquial y se implantan en los espacios alveolares donde son fagocitados por los macrófagos alveolares. Dentro de los macrófagos pueden suceder dos eventos:

- 1) Destrucción de los bacilos por los macrófagos alveolares
- 2) Una porción del inóculo resiste la destrucción intracelular por mecanismos aún no definidos pero que pueden estar en relación con el bloqueo de la fusión de las vesículas fagocíticas con los lisosomas o previniendo la acidificación del fagolisosoma mediante la inhibición de la bomba de protones intermembranal. Otra causa de resistencia es la citotoxicidad de algunos de los componentes de la pared micobacteriana.

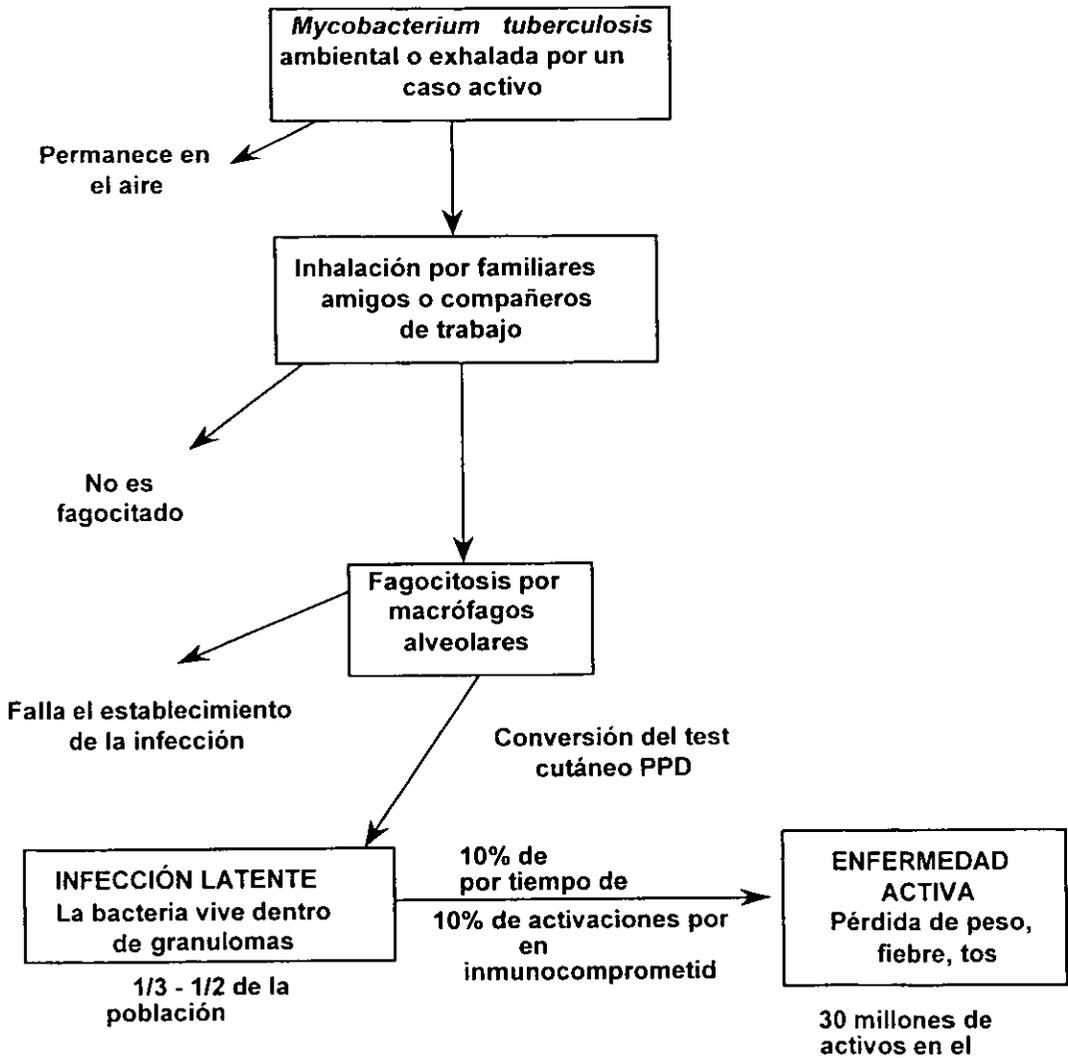


Fig. 3: Esquemización del mecanismo de transmisión de *Mycobacterium tuberculosis*. En el diagrama se muestran las etapas que siguen a la infección hasta el establecimiento de la enfermedad activa. WHO (25).

El estado anterior marca el inicio de la infección que continúa con la reproducción de los bacilos dentro del macrófago y su posterior diseminación a otros macrófagos, iniciándose una respuesta inflamatoria local que lleva a la formación de una lesión denominada tubérculo constituido por macrófagos que tienen el aspecto de células epiteliales por lo que se les denomina epiteloideas; éste puede cubrirse por fibroblastos y formar así el centro caseoso cuyo centro se necrosa. La posterior licuefacción del centro caseoso extiende la infección a los bronquios adyacentes entre los que hay necrosamiento y formación de cavidades en las que los bacilos se diseminan a otras partes del pulmón y hacia el exterior incluidos en el esputo (12).

La adquisición de resistencia al desarrollo de la infección eventualmente puede llevar a la calcificación de los tubérculos (12,28,43).

Ocasionalmente los bacilos se pueden diseminar indirectamente por el canal linfático a nódulos linfáticos regionales y luego por torrente circulatorio hacia cualquier parte del cuerpo o, directamente por la erosión de un tubérculo adyacente a un vaso pulmonar, desarrollándose a corto plazo una infección tuberculosa progresiva que puede llegar hasta los huesos, aparato genito-urinario, ganglios, meninges, etc. y extenderse a los tejidos adyacentes.

Después de la infección al paso de 4 a 6 semanas se desarrolla una respuesta inmune (adquisición de inmunidad post-infección) que se asocia generalmente a una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada hacia algunos de los antígenos micobacterianos. La adquisición de resistencia está mediada por los linfocitos T que al ser activados por ciertos antígenos específicos, pueden limitar la replicación de los bacilos (Fig. 4) al activar a su vez a otros macrófagos que fagocitan más rápidamente y destruyen a los bacilos.

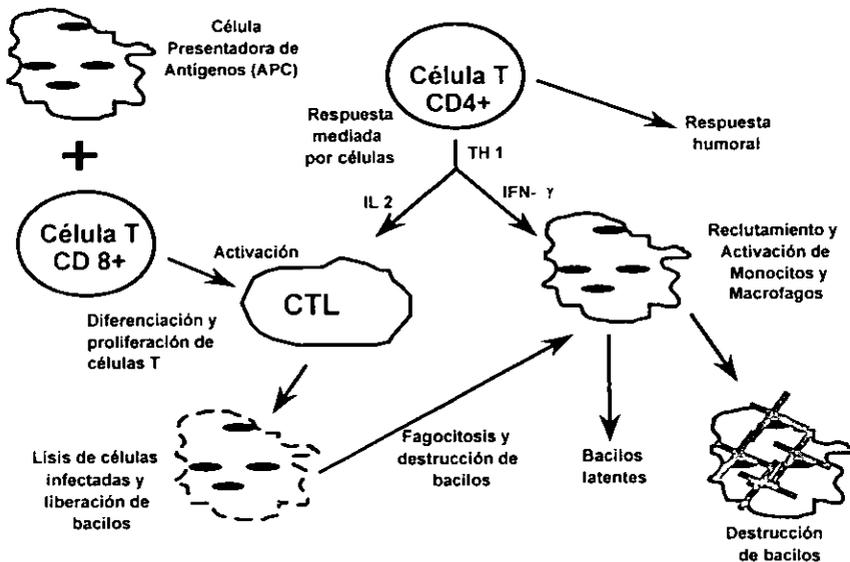
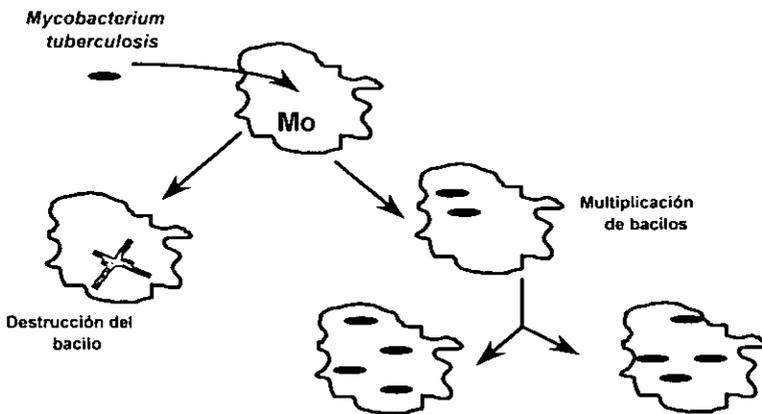


Fig. 4: Mecanismos celulares que pueden participar en el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. En el panel superior se muestra el caso en que se establece la infección y se desarrolla la enfermedad. En el panel inferior se esquematiza el mecanismo de activación que conduce a la eliminación del bacilo. Youmans (51).

3. ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS

M. tuberculosis presenta una multiplicidad de antígenos de diversas características químicas, encontrándoseles tanto en la pared celular del bacilo como en el citosol. Diversos estudios han mostrado la inmunoreactividad de los lípidos, polisacáridos y componentes proteicos de las micobacterias, algunos de los cuales tienen funciones inmunosupresoras, de inducción de formación de granulomas, activadores de macrófagos, tóxicos y adyuvantes (9,10).

Históricamente, los antígenos micobacterianos se han clasificado de acuerdo a su procedencia o a sus características inmunológicas. Los antígenos pueden presentarse como polisacáridos combinados con proteínas o lípidos y por proteínas combinadas con lípidos (14). Aproximadamente el 25% de la pared micobacteriana está compuesta por lípidos libres de los que destacan dos grandes grupos: a) Micósidos (péptidos lipídicos glucositados), y b) Ésteres de teralosa (el más importante es el factor cordón o TDM). Los antígenos proteicos juegan un papel muy importante en el desarrollo de la respuesta inmune y en particular aquellos que son producidos por las células viables, siendo los más importantes las proteínas de choque térmico o estrés (ampliamente conservadas entre los distintos organismos) y las proteínas de secreción (14, 52).

3.1 Proteínas de secreción

Los estudios realizados durante las últimas dos décadas han mostrado que las proteínas secretadas activamente por *M. tuberculosis* son antígenos inmunodominantes protectores o potenciales reactivos de diagnóstico para la detección temprana de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (30).

Entre los antígenos con mayor relevancia en la investigación por su utilidad en el tratamiento, prevención o detección de la tuberculosis están las proteínas secretadas al medio de cultivo, ya que tienen una función importante en la respuesta inmune del individuo. La gran mayoría de las proteínas son secretadas por el microorganismo en el curso de la infección dentro del fagosoma en los macrófagos. Es así como las proteínas están disponibles para su presentación por las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). La actividad de ésta presentación se asocia a diferentes formas de respuesta inmune dependiendo de las características bioquímicas del antígeno y de los linfocitos con los que interacciona (32, 42).

Las proteínas de secreción obtenidas por filtrado de cultivos de *M. tuberculosis* han sido la fuente antigénica más estudiada en la última década y, con la aplicación de técnicas electroforéticas e inmunológicas (44), se han distinguido más de 150 antígenos individuales que han sido utilizados en estudios en los que evalúa su capacidad protectora para su integración en una vacuna de subunidades proteicas (37,46). La abundancia y las características inmunogénicas de cada antígeno son variables, encontrándose proteínas muy abundantes como son las proteínas de 30 y 32 kDa (23) y otras proteínas apenas son detectables por técnicas muy sensibles y de potencial inmunogénico como es el caso de la proteína de ESAT-6 (2,25,48).

La secreción de proteínas de *M. tuberculosis*, experimentalmente muestra una cinética que distingue tres grupos de proteínas que son: las activamente secretadas por los bacilos durante los primeros días de cultivo y que presentan un patrón bien definido demostrado por Andersen y col. 1991 (44); las proteínas asociadas a la pared que se desprenden gradualmente y finalmente, las proteínas que aparecen en estadios tardíos de crecimiento por la liberación de proteínas solubles en la lisis bacteriana (3,35).

El análisis de las proteínas de secreción estudiadas se clasifican en tres principales categorías: a) el uso de formas nativas en fracciones complejas o purificadas mediante técnicas cromatográficas clásicas o columnas inmunoabsorbentes con anticuerpos monoclonales (Mab), b) antígenos recombinantes expresados en *E. coli* o micobacterias atípicas y c) péptidos sintéticos (22,29). Algunas proteínas se han empleado en modelos animales y en los humanos demostrando ser capaces de inducir estimulación de células T y la producción de citocinas protectoras.

Los modelos experimentales murinos (1,24,25) aportan evidencias de que las proteínas de secreción temprana producen una respuesta de células T-cooperadoras clase 1 (Th 1) dirigida a diferentes antígenos, pero mayoritariamente a los de bajo peso molecular (fracciones de 5-12kDa y de 25-35kDa) (1), brindando una eficacia protectora comparable a la vacuna viable de BCG. Como se demuestra en los modelos experimentales murinos, si se utilizan las proteínas de mayor abundancia en el sobrenadante de cultivo de *M. tuberculosis* para inmunizar a los animales, se logra una disminución en la morbilidad y mortalidad de éstos.

3.3 ESAT-6

En 1995, Peter Andersen (2) basándose en la posible interacción de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* con los macrófagos y células T durante la infección, analizó una poza fraccionada de proteínas de secreción con la finalidad de determinar antígenos que estimularan a las células T de memoria durante la infección con *M. tuberculosis*. Esto lo condujo a la identificación de una proteína de bajo peso molecular a la que denominó ESAT-6 (Fig. 5) (por sus siglas en inglés Early Secreted Antigenic Target y por su peso molecular de 6-

kDa), que es un antígeno de células T capaz de inducir una respuesta de tipo Th 1 o protectora con una gran producción de Interferón gamma (IFN- γ) (2).

```
C ATG ACA GAG CAG CAG TGG AAT TTC GCG GGT ATC GAG GCC GCG
GCA AGC GCA ATC CAG GGA AAT GTC ACG TCC ATT CAT TCC CTC CTT GAC GAG
GGG AAG CAG TCC CTG ACC AAG CTC GCA GCG GCC TGG GGC GGT AGC GGT TCG
GAG GCG TAC CAG GGT GTC CAG CAA AAA TGG GAC GCC ACG GCT ACC GAG CTG
AAC AAC GCG CTG CAG AAC CTG GCG CGG ACG ATC AGC GAA GCC GGT CAG GCA
ATG GCT TCG ACC GAA GGC AAC GTC ACT GGG ATG TTC GCA TAG GGC
```

Fig. 5: Secuencia nucleotídica y polipeptídica de la proteína ESAT-6 reportada por Sorensen *et al.*(45).

La proteína de ESAT-6 es una proteína de 95 aminoácidos que es secretada tempranamente al medio de cultivo, codificada por un gen de 285 pares de bases (Fig. 6) el cual se encuentra dentro de un operón en el que esta proteína se cotranscribe junto con otra proteína de bajo peso molecular (10 kDa) denominada *lhp* que, a diferencia de ESAT-6, es reconocida principalmente por antisueros de pacientes leproso y lepromatosos. Ambas proteínas se detectan en el sobrenadante del medio de cultivo de *M. tuberculosis* se postula la interacción de una con la otra o bien, que estas poseen funciones análogas para el bacilo ya que no son indispensables para la supervivencia del microorganismo ya que el operón está ausente en la cepa vacunal de *M. bovis* BCG (5,20).

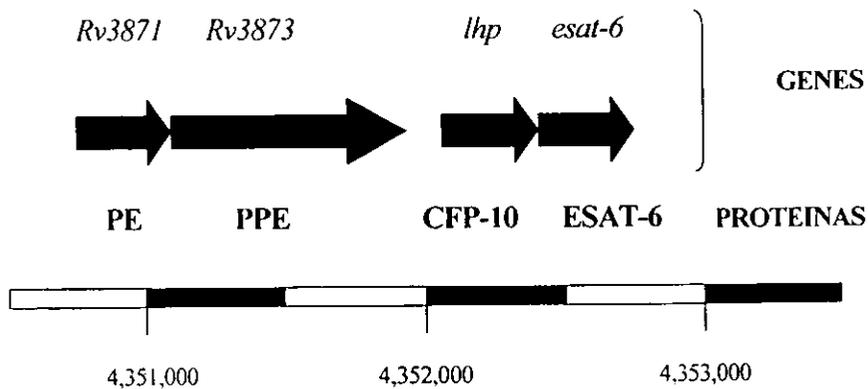


Fig. 6: Mapa físico del operón que codifica para la proteína de ESAT-6. En la figura se muestran los genes deletados en la región DR1 en las cepas de *M. bovis* BCG y las proteínas para las cuales codifican dichos genes. Berthet *et al.* (6).

En el género *Mycobacterium* se inició la búsqueda de ESAT-6 por pruebas de biología molecular y se encontró el gen en las cepas de *M. tuberculosis* de referencia y aislamientos clínicos; así como en *M. bovis* y en cepas del complejo *M. tuberculosis*: *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. africanum* y *M. flavescens*. (Tabla 2) (22).

Cepas y especies	Resultados de:	
	Southern blott	PCR
<i>M. tuberculosis</i>		
H37Rv	+	+
Erdman	+	+
H37Ra	ND	+
<i>M. bovis</i>		
Subcepas de BCG:		
Danish 1331	-	-
Tokyo	-	-
Glaxo	-	-
Pasteur	-	-
Tice	-	-
Moreau	-	-
Russia	-	-
MNC 27	+	+
<i>M. africanum</i>	ND	+
<i>M. leprae</i>	-	-
<i>M. avium</i>	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	+
<i>M. marinum</i>	+	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
<i>M. intracellulare</i>	-	-
<i>M. fortuitum</i>	-	-
<i>M. xenopi</i>	-	-
<i>M. flavescens</i>	+	+
<i>M. szulgai</i>	+	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-
<i>M. tuberculosis</i>		
10 Aislamientos clínicos (Dinamarca)	ND	+
10 Aislamientos clínicos (Tanzania)	ND	+
<i>M. bovis</i>		
10 Aislamientos clínicos (Dinamarca)	ND	+

Tabla. 2: Detección molecular del gen *esat-6* en diversas cepas del genero *Mycobacterium*. Positivo (+), Negativo (-), No determinado (ND). Harboe *et al.* (22).

Sorensen (45), en los estudios de caracterización de la proteína de ESAT-6, encontró que ésta se presenta en la forma de 6 kDa y de un complejo tetramérico de 24 kDa pero sin tener alguna función definida este último. ESAT-6 presenta un punto isoeléctrico en el intervalo de pH 4 a 4.5 que no se atribuyen a la glucosilación de la proteína, además de que carece de una secuencia líder para su exportación (45).

Los modelos animales muestran que durante la infección en bovinos, ESAT-6 es la proteína que mayoritariamente se reconoce por células T, a las tres semanas de la infección, alcanzando su máximo a las 5 semanas; esta respuesta proliferativa va acompañada de una pronunciada producción de IFN- γ que no se compara a la alcanzada por el estímulo de células mononucleares de sangre periférica con otros antígenos inmunodominantes, en el curso de la infección; el reconocimiento de ESAT-6 decrece a partir de la sexta semana pero mantiene un nivel equiparable al alcanzado por las distintas proteínas de secreción inmunogénicas estudiadas (ej. Antígeno 85A) (38).

Por su especificidad e inmunogenicidad, a ESAT-6, se le considera como un candidato importante para el desarrollo de una vacuna de subunidades proteica o, como un elemento útil en el diagnóstico de la tuberculosis. Pollock y cols. en 1997 (39), demostraron que ESAT-6 es capaz de inducir la producción de grandes cantidades de IFN- γ *in vitro* en bovinos infectados y no en bovinos reactivos a PPD (derivado proteico purificado) por exposición a micobacterias no tuberculosas.

El gen que codifica para ESAT-6 está ausente en más del 90% de las micobacterias no tuberculosas (39). Estudios posteriores identificaron los epítomos reconocidos en ESAT-6 por las células T estimuladas en la infección, entre los más inmunodominantes están los epítomos localizados en las regiones amino y

carboxilo terminal; péptidos sintéticos de estos epitopos son capaces de inducir la mayor respuesta en ensayos inmunoproliferativos *in vitro* para células de murinos y de pacientes con tuberculosis pulmonar (7,15,21,31).

4. ANTICUERPOS

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son un tipo de glucoproteínas producidas por células plasmáticas derivadas de linfocitos B desarrollados en órganos especializados como el bazo, los ganglios linfáticos, bolsa de Fabricio y la médula ósea (20).

Los anticuerpos se producen como respuesta a un estímulo antigénico que conduce a la diferenciación de linfocitos en varias clonas celulares (linfocitos B), que producen anticuerpos particulares que pueden ser caracterizados por su isotipo y subtipo. Cada anticuerpo posee un sitio de unión específico al antígeno denominado epitopo; este sitio de reconocimiento se localiza en la región hipervariable de la molécula (Fig. 7) (20).

En 1975, Klinman y Press (34,50) estimaron que en un ratón BAALB/c se encuentran 200 millones de linfocitos B, de los que un 5 a un 20% de ellos muestran un clonotipo que se refleja en los anticuerpos policlonales detectados en el suero de estos y cualquier otro vertebrado.

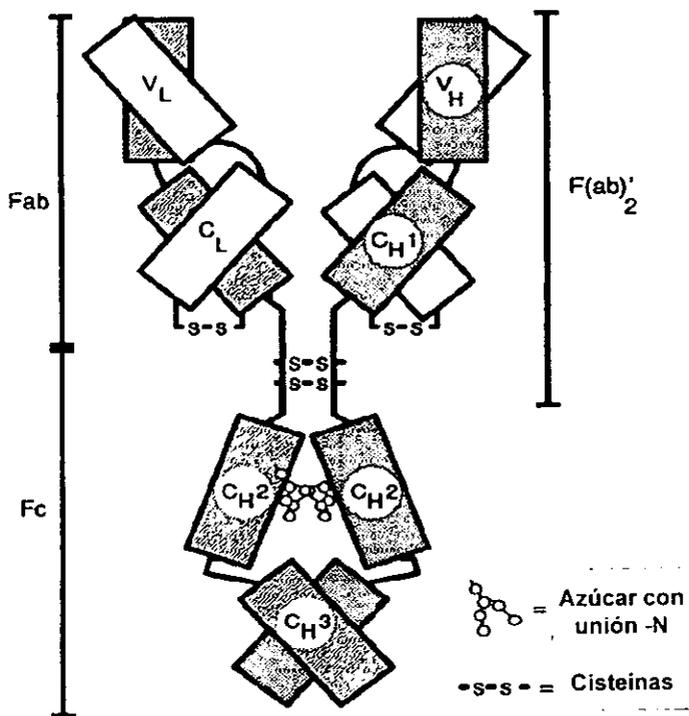


Fig. 7: Prototipo de un monómero de inmunoglobulina. Cada caja simboliza un dominio de la inmunoglobulina tanto para la cadena pesada (oscuro) como para la ligera (claro). Los carbohidratos conservados se representan en los dominios CH₂, algunas inmunoglobulinas están glucosiladas en sitios adicionales de la molécula. Los dominios se encuentran asociados de forma dimerica (VH/VL, CH₁/CL, CH₃/CH₃) excepto los dominios CH₂.

Las inmunoglobulinas pueden ser divididas en cinco clases o isotipos principales: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA; cada isotipo tiene propiedades distintivas, estructurales y biológicas (Tabla 3).

	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
Concentración sérica	0.1-1.0 mg/ml	1-10 µg/ml	3-20 mg/ml	0.1-1 µg/ml	1.0-3.0 mg/ml
Mr	900 000	180 000	160 000	190 000	170 000-500 000
Cadenas pesadas	µ	δ	γ	ε	α
Cadena pesada Mr					
Secretoria	80 000	65 000	55 000	80 000	70 000
Membranal	84 000	70-75 000	65 000	?	
Cadenas ligeras	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ	κ ο λ
Subclases	I	I	4	I	I
Carbohidratos	9-12%	12-15%	2-3%	12%	7-11%
Grupos prostéticos (forma secretada)	Cadena J				Cadena J componente secretor
Citotoxicidad mediada por complemento	+	-	G1 débil o - otros +	-	-
Transporte placentario	-	-	+ En todas las subclases	-	-
Vida media en suero	1 día	< 1 día	G1, G2a, G3 4 días G2b 2 días	> 1 día	1 día
Propiedades especiales	Primer Ac en la mayoría de las respuestas	Principalmente en la superficie de linfocitos. En suero en menor cantidad	En suero en mayor cantidad, rara vez unida a linfocitos	En suero está en menor cantidad, unida a mastocitos. Responsable de reacciones alérgicas, histamina y serotonina.	Mayor componente en secreciones.

Tabla. 3: Características de las diferentes inmunoglobulinas de ratón. Goding (18).

El isotipo al que pertenece cada anticuerpo está determinado por sus cadenas pesadas, así IgM, IgD, IgG, IgE e IgA poseen cadenas pesadas µ, δ, γ, ε y α respectivamente. Existen además dos tipos de cadenas ligeras, la Kappa y

Lambda que se encuentran en la molécula del anticuerpo pero nunca ambas en la misma molécula (20).

4.1 Anticuerpos monoclonales

La producción de anticuerpos monoclonales se lleva a cabo mediante la obtención de clonas artificiales como hibridomas que son cultivados masivamente *in vitro* (Fig. 9).

En 1975, Cesar Milstein y Georges Kolher desarrollaron una técnica fácil para producir anticuerpos que reconocen un solo epítoto; esta consistió en fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratón previamente inmunizado con un antígeno particular (29).

El resultado de los experimentos de Milstein y Kolher son células híbridas o hibridomas, que producen anticuerpos específicos y que pueden ser mantenidas como "líneas celulares inmortales" mediante las técnicas de cultivo de tejidos clásicas. La obtención de estas líneas incluye una selección con medios que contienen precursores de ácidos nucleicos (Timidina, Aminopterina e Hipoxantina) que inhiben el desarrollo de las células no híbridas (34).

4.2 Uso de anticuerpos monoclonales

La obtención de anticuerpos monoclonales representa un adelanto tecnológico muy importante ya que se obtienen anticuerpos específicos para un epítoto en grandes cantidades y de forma relativamente pura, aumentando la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos.

Gracias a los avances en las tecnología de producción de anticuerpos, actualmente se pueden obtener anticuerpos monoclonales biespecíficos por fusión de dos líneas de hibridomas productoras de anticuerpos (41,50).

Los anticuerpos monoclonales no se aplican únicamente en inmunoensayos (Tabla 4) sino también en terapia como lo es el OKT3 que interactúa con el complejo receptor de células T, utilizándose como inmunosupresivo al rechazo de injertos. Otro tipo de anticuerpos se utiliza en el tratamiento de septicemias y ciertos tipos de enfermedad (13,20).

APLICACIONES DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
Inmunoensayos
Detección de cáncer
Seguimiento de terapia con fármacos
Pruebas de alergia y del embarazo
Pruebas de Diagnóstico
Endocrinología
Hematología
Infectología
Patología
Investigación Médica
Estudios de reproducción humana
Operación del sistema nervioso central
Inmunopatogénia de diversos microorganismos

Tabla. 4: Usos de los anticuerpos monoclonales. Yelton *et al.* (50).

La aplicación más amplia de los anticuerpos monoclonales es la que se tiene en el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, principalmente en la detección del embarazo, infecciones, seguimiento de drogas terapéuticas, detección de células tumorales y determinación de la compatibilidad de órganos y tejidos para trasplantes.

Actualmente, se han desarrollado las inmunotoxinas que no son sino anticuerpos combinados a drogas principalmente utilizadas en el tratamiento del cáncer.

JUSTIFICACION

La alta incidencia de tuberculosis en nuestro país y la reemergencia global de la enfermedad, sumados a la carencia de vacunas y reactivos diagnósticos seguros y específicos promueven la investigación de nuevos reactivos específicos y sensibles, que permitan diferenciar a la población vacunada, de la expuesta y de la enferma activamente.

El riesgo que implica el trabajar con cepas de *M. tuberculosis* para obtener antígenos y validarlos inmunológicamente es afectado por la tasa de crecimiento de éste microorganismo que es de 4-7 semanas. Las estrategias usadas para obtener proteínas recombinantes mediante técnicas de clonación molecular con rendimientos mayores en tiempos menores y sin riesgos de infección, posibilitan su investigación para definir qué componentes bacterianos son candidatos para su diagnóstico, elaboración de vacunas y seguimiento del tratamiento con antimicrobianos nuevos y eficientes.

La obtención de anticuerpos monoclonales contra la proteína de secreción temprana ESAT-6 permitirá definir su uso diagnóstico y la función de esta proteína durante la enfermedad pulmonar.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Obtener la forma recombinante de la proteína de secreción temprana ESAT-6 de *M. tuberculosis* para la producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína ESAT-6r.

6.1 Objetivos particulares

Clonar el gen que codifica para la proteína de ESAT-6 de *M. tuberculosis*.

Inducir la expresión del gen clonado en una cepa de *E. coli*.

Purificación de la proteína recombinante de ESAT-6 (ESAT-6r).

Producir anticuerpos monoclonales contra la proteína de ESAT-6r.

7. METODOS

7.1 CLONACIÓN DE *esat-6*

7.1.1 Cultivo de *M. tuberculosis* H₃₇R_V

Para el cultivo del microorganismo se utilizó la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H₃₇R_V en buffer de fosfatos salino (PBS) y glicerol al 5%, misma que se resuspendió y se inoculó en 250 ml de caldo de cultivo de Proskauer y Beck donde se incubó por cuatro semanas a 37°C con 85% de humedad y 5% de CO₂. Los microorganismos se cosecharon mediante filtración con una membrana Millipore de 0.22 µm y un embudo de Buckner, recuperando los bacilos en un volumen de 5 ml de SSI (Solución Salina Isotónica). Es importante mencionar que todo el proceso se llevó a cabo en una campana de bioseguridad. Al cultivo obtenido se le dividió en dos partes iguales, una parte se utilizó para su almacenamiento por congelación directa a -70 °C y la otra, para la extracción de ADN inactivando previamente a las bacterias con fenol al 5%.

7.1.2 Extracción de DNA cromosomal de *M. tuberculosis*

El cultivo de *M. tuberculosis* H₃₇R_V se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se adicionó la solución de lisis que contiene lisozima (1 mg/ml) posteriormente se agregó proteinasa K (10 mg/ml) para lisar los protoplastos y se extrajo el ADN con fenol-cloroformo (1:1) recuperándose la fase acuosa donde se encuentra el ADN. A la fase recuperada se le adicionaron tres volúmenes de alcohol isoamílico frío con el que se incubaron por 20 min a -

20°C después de los cuales se concentró el ADN precipitado por centrifugación (5 min a 14,000 rpm), la pastilla se lavó tres veces con 500 µl de etanol al 70% frío. La pastilla obtenida en el último lavado se resuspendió en 50 µl de H₂O estéril y se le adicionó ARNasa (1 mg/ml) para finalmente reprecipitar el ADN con etanol absoluto frío y resuspenderlo en H₂O para PCR.

7.1.3 Amplificación del gen *esat-6* de *M. tuberculosis*

Para la amplificación del gen *esat-6* se utilizaron los iniciadores que reconocieron las secuencias del gen reportadas en 1995 por Sorensen *et al.* (45), así como otros modificadas por la adición en sus extremos 5' y 3' las secuencias de corte específicas para Eco RI y Hind III, respectivamente, como se muestra a continuación:

Iniciador sentido con secuencias de corte para Eco RI

5'-AAGCTTGCCCTATGCGAACATCCC-3'

Iniciador antisentido con secuencia de corte para Hind III

5'-GAATTCATGACAGAGCAGCAGTG-3'

La PCR utilizó independientemente ambos pares de iniciadores en 50 µl de la mezcla de reacción que consistió de Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, 200 pM de cada iniciador y 1.5 U de Taq ADN polimerasa. La mezcla de reacción se cubrió con 50 µl de aceite mineral y se le adicionaron 100 pg de ADN cromosomal de *M. tuberculosis* H₃₇R_V desnaturalizado a 94°C por 5 min y

amplificando en treinta ciclos constituidos de 94 °C por 1.5 min, 50°C por 1.5 min y 72 °C por 1.5 min.

Los productos de la PCR (pPCR) se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio (Br-Et) para determinar la presencia de la banda correspondiente al gen amplificado.

7.1.4 Purificación de productos de PCR

Los pPCR se purificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Con luz ultravioleta de onda corta se observó el gel sobre una placa cromatográfica y se cortó la banda que corresponde al tamaño molecular del gen previamente reportado.

Las bandas del ADN en el gel se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se adicionaron 500 µl de la solución de ácido acético/EDTA, se incubó por 24 h en agitación y el ADN se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm por 5 min; el sobrenadante se colectó en tubos estériles (200 µl por tubo) y se le adicionó 400 µl de etanol absoluto frío incubándose a -20 °C por 30 min.

El ADN precipitado se recuperó mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min. Los precipitados se resuspendieron en 100 µl de TE (Tris/EDTA) y se formó una poza de las muestras; se adicionó un décimo de volumen de acetato de amonio 3 M, se mezcló y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por 20 min a -20 °C para precipitar el ADN. Finalmente, se centrifugó la muestra por 15 min a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado se resuspendió en 50 µl de TE que se cuantificó por espectrometría de luz UV.

7.1.5 Preparación del vector

Para la clonación del gen *esaf-6* se usó el vector (Fig. 8) de expresión ProEX HT c (Gibco BRL). Un μg del vector y 1 μg del pPCR purificado, se digirieron de forma independiente con las endonucleasas de restricción siguiendo las recomendaciones del proveedor (Boehringer mannheim).

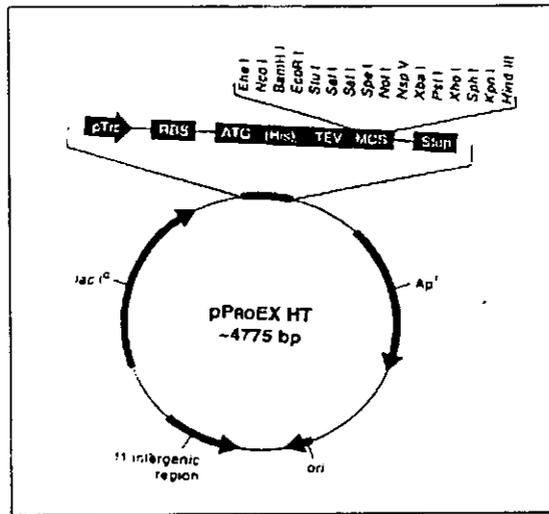


Fig. 8: Mapa físico del vector PRO EX HT. Gen I del operón de lactosa para inducción con IPTG (IaqIg). Gen de resistencia a ampicilina (Apr), Origen de replicación de pBR322 (ori). Origen de replicación del bacteriófago F1 (F1 intergenic region), Promotot (pTcr), Secuencia del iniciador M13/pUC (RBS), Codón de inicio (ATG), secuencia de polihistidinas (his), Secuencia de corte para la proteasa TEV (TEV), Sitio de clonación múltiple (MCS), Codón de terminación (Stop).GIBCO-BRL.

Al término de la digestión se adicionaron 2.2 μl de acetato de sodio 5.5 M y 75 μl de etanol absoluto frío; se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. El ADN se

concentró por centrifugación (14,000 rpm por 10 min) y se lavó tres veces con etanol al 70%.

El precipitado se secó a temperatura ambiente y resuspendió en agua de Milli Q estéril a volumen final de 20 μ l obteniendo una concentración final de ADN de 50 ng/ μ l. Para ligar el gen *esat-6* al vector de expresión se tomaron 150 ng del gen y 50 ng del vector previamente digeridos para su ligación con 1 U de T4 ADN ligasa en un volumen de 20 μ l. La reacción se incubó por 60 min. a 23 °C. Finalmente se hizo una dilución 1:5 obteniendo una concentración de productos de 500 pg/ μ l.

7.1.6 Preparación de células competentes

Para la obtención de las células competentes en un solo paso se utilizó el protocolo descrito por Chung y cols. en 1989 (11).

En la transformación con el vector clonado se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α resembrando ésta en placas con medio Luria-Bertani (LB) para obtener colonias independientes. Una de las colonias se pasó a 10 ml de caldo LB que se incubó en agitación (200 rpm) a 37 °C toda la noche; este cultivo inicial se utilizó como semilla para inocular 100 ml de caldo LB que se incubó bajo las mismas condiciones hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.3-0.4 a 600 nm.

El cultivo se centrifugó por 10 min a 5 000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en 5 ml de caldo LB fresco. Se realizó una suspensión homogénea que fue fraccionada en tubos estériles (100 μ l por tubo) a los que posteriormente, se les adicionó un volumen igual de la solución TSS 2x (Transformation and storage solution) previamente

enfriada (4°C), con la que se mezcló suavemente y se congeló en hielo seco/etanol absoluto para su almacenamiento a -70°C.

7.1.7 Transformación de células competentes

Un vial de células competentes se descongeló y se le adicionó 1 µl (500 ng) del producto de ligación, se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a 4°C. Terminado el periodo de incubación se adicionaron 800 µl de caldo LB a temperatura ambiente enriquecido con glucosa 20 mM y se incubó en agitación (200 rpm) durante 1 h a 37 °C.

El cultivo se seleccionó en placas petri con medio LB-Agar + 100 µg/ml de ampicilina depositando 100 µl por placa y extendiendo éste en toda la superficie con perlas de vidrio estériles. Las placas se incubaron a 37 °C por 16 h.

Las colonias transformadas se recuperaron en tubos con 10 ml de caldo LB + ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron bajo las condiciones de agitación previamente señaladas por 24 hrs. Una parte del cultivo se utilizó para inocular cajas individuales de medio con antibiótico y la otra se usó en la extracción de plásmidos para la determinación de la presencia del gen clonado.

7.1.8 Identificación de clonas.

De cada cultivo se tomaron 1.5 ml para realizar la extracción del plásmido por la técnica del Mini Prep de lisis alcalina. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 seg, el sobrenadante se decantó para resuspender el paquete bacteriano en 100 µl de TE. En esta solución se incubó durante 5 min. Al término,

se adicionaron 200 μ l de una solución de lisis (SDS/NaOH), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min, posteriormente se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 3 M y se homogeneizó en vortex por 2 seg dejando la mezcla en reposo por 5 min.

Los viales se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 min y el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo con una micropipeta sin la toma de partículas grandes (proteínas precipitadas). A cada tubo se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó a -20°C para precipitar el ADN concentrado por centrifugación (5 min a 14,000 rpm). El precipitado se lavó tres veces con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el plásmido en 20 μ l de TE.

Los plásmidos obtenidos se analizaron por un lado en gel de agarosa al 1.2% teñido con Br-Et y por el otro, se montó una PCR con las condiciones anteriormente señaladas.

La expresión de la proteína recombinante ESAT-6r se indujo con isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) en caldo de cultivo que se dejó crecer a saturación obteniéndose así la mayor biomasa posible. Las bacterias se lisaron por medio mecánico al pasarlas a través de una prensa francesa y el extracto obtenido se pasó por una columna de afinidad a un agente quelante (Ni^{++}). En esta columna se interaccionan los grupos imidazol de las histidinas de la proteína recombinante (his) con las cargas del Ni^{++} .

La expresión de la proteína recombinante se monitoreó en electroforesis SDS-PAGE, así como la pureza de la misma.

7.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (Mab)

7.2.1 Esquema general

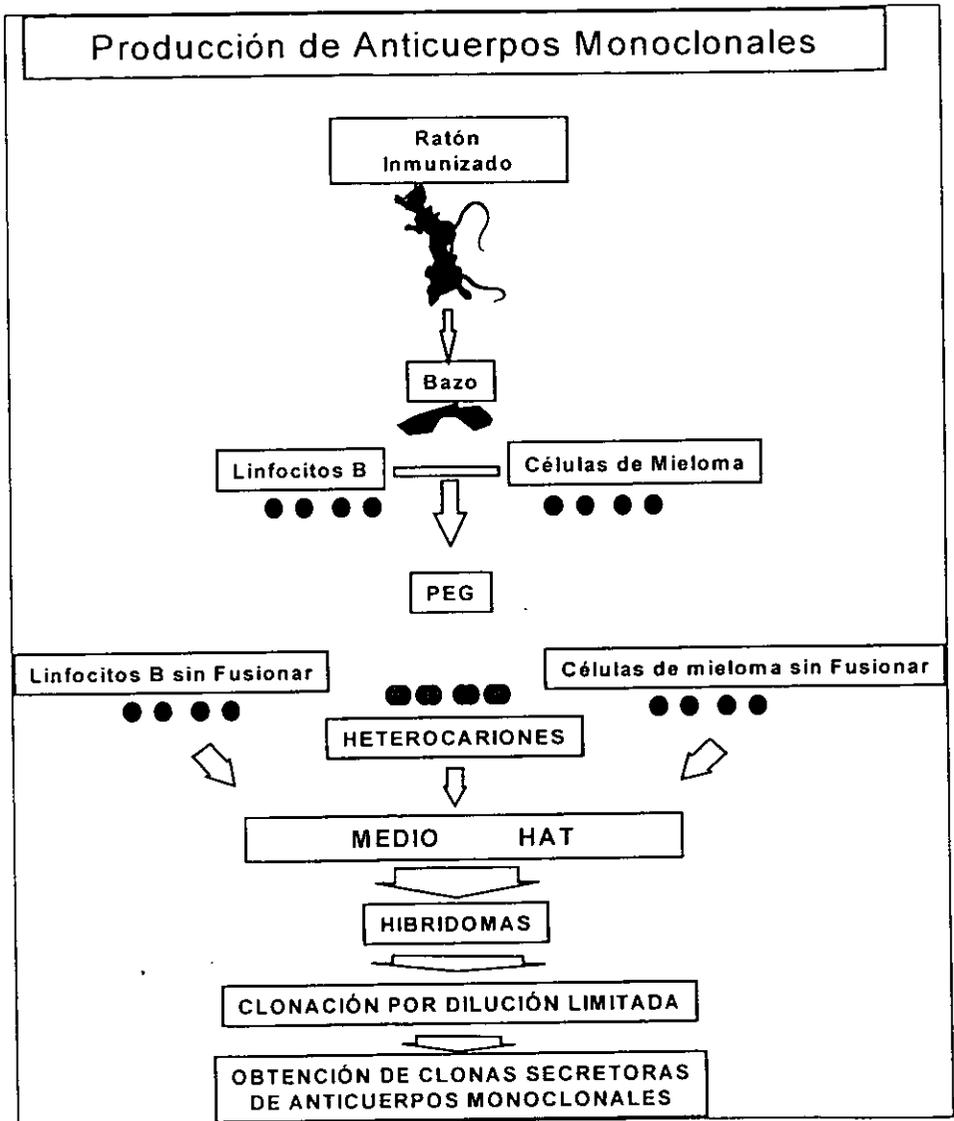


Fig. 9: Esquema para la producción de anticuerpos monoclonales.

7.2.2 Inmunización de Ratones BALB/c con ESAT-6r

En el ensayo se utilizó un lote de cuatro ratones BALB/c libres de patógenos de cuatro semanas. El esquema de inmunización (Tabla 5) consistió de cuatro dosis de 1 μg de proteína ESAT-6r administradas con intervalos de siete días.

Inmunización	Vía	Dosis
Primera	Intraperitoneal	1 μg /adyuvante incompleto de Freund's
Segunda	Intravenosa	1 μg /SSI
Tercera	Intravenosa	1 μg /SSI
Cuarta	Intravenosa	1 μg /SSI

Tabla. 5: Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales

Previo a cada inmunización se sangró a cada ratón con un capilar heparinizado mediante punción suborbital, la sangre obtenida se centrifugó independientemente a 10,000 rpm por 5 min para obtener el suero que fue recolectado en viales estériles y almacenado a -70°C hasta su uso posterior.

El suero obtenido se utilizó para seleccionar por ELISA al ratón que desarrolló mejor título de anticuerpos; a este animal se le adicionó un refuerzo más tres días antes de realizar la fusión celular.

7.2.3 Titulación de Anticuerpos en suero de ratón

Una placa de soporte con 96 pozos se sensibilizó con la proteína ESAT-6r (1 µg/ml) en solución de carbonatos depositando 100 µl por pozo. La placa se incubó a 37°C por 60 min después de los cuales se hicieron tres lavados con PBS-Tween (PBS-T). Se decantó el líquido y se bloquearon los pozos con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 1% con la que se incubó por 1 h a 37°C.

Se eliminó la solución de bloqueo y se adicionaron 100 µl del suero de ratón diluido 1:100 con el que se dejó a 37°C por 90 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T y se adicionaron 100 µl del anticuerpo conjugado en dilución 1:2000; la placa se incubó por 60 min bajo las mismas condiciones y se lavó nuevamente para finalmente añadir un volumen igual de sustrato con el que se dejó por 10 min o hasta observar la reacción colorida que se paró con 50 µl de H₂SO₄.

La placa se leyó a la longitud de 492 nm.

7.2.4 Fusión de células mielomatosas y linfocitos B

El ratón seleccionado por la prueba de ELISA se anestesió en cámara de éter, se sangró a blanco por punción cardíaca y se sacrificó por dislocación cervical.

El animal se cubrió con una solución de etanol (70%)/glutaraldehído (2%) y se dejó por 15 min para eliminar cualquier microorganismo presente en el pelaje del animal.

Trabajando en un área estéril se expuso la cavidad peritoneal y con ayuda de unas pinzas y tijeras se extrajo el bazo que se depositó en una caja de Petri con 10 ml de medio RPMI-1640. La placa se introdujo en una campana de flujo laminar y se maceró el órgano por fricción contra una malla de acero.

El macerado se recuperó en un tubo cónico de 15 ml en el que se dejó reposando por 10 minutos al término de los cuales se recuperó en otro tubo el 95% del sobrenadante en el que encontramos linfocitos en suspensión; éstos fueron centrifugados en refrigeración a 1,200 rpm por 10 min.

El paquete celular se lavó y resuspendió en medio RPMI-1640 fresco. Este paso se repitió tres veces.

Las células hiperinmunes de ratón se pasaron a un tubo de 50 ml y se mezclaron con 1×10^7 células de mieloma Px63Ag8.653, se centrifugaron a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante para resuspender el paquete celular con el agente fusógeno polietilenglicol 4000 (PEG 4000) adicionando este de forma gradual: 1 ml durante el primer minuto, se agitó por 90 seg en baño metabólico a 37°C; manteniendo en una suave agitación se adicionó 1 ml de solución salina durante 30 seg y en los siguientes 30 seg se agregaron 3 ml más; se llevó a 20 ml en 2 min y en cinco minutos más se aforó al volumen final de 50 ml en el que se mantuvieron por 10 min.

Las células se centrifugaron bajo las condiciones antes señaladas y el paquete celular se resuspendió suavemente en medio RPMI-1640+10% SFB; se centrifugó nuevamente y se resuspendieron las células en 50 ml de Medio RPMI suplementado con 10% de hibrimax (Hib) e Hipoxantina, Timidina y Aminopterina (HTA) (medio RPMI-Hib-HTA).

La suspensión celular se distribuyó en placas de cultivo de 96 pozos que contenía células nodrizas de timo y se dejaron incubando por cinco días a 37°C con 5% de CO₂ y 85% de humedad. En el día seis se adicionaron 100 µl de medio RPMI-Hib-HAT; al octavo día se cambiaron 50 µl con el que se mantuvieron por 5 días más, cambiándose al doceavo día 100 µl de medio por RPMI-Hib-HT.

El medio retirado del cultivo se utilizó para realizar el escrutinio por ELISA de los pozos que contenían hibridomas productores de anticuerpos.

Los pozos seleccionados se pasaron a placas de 24 pozos con 1 ml de medio RPMI-Hib hasta tener un cultivo confluyente que se usó para clonar por dilución limitada.

7.2.5 Clonación por dilución limitada

La obtención de Mab se hizo basándose en el estadístico desarrollado por Poisson (18), según el cuál al depositar 0.8 células por pozo brinda la probabilidad de obtener un 30% de pozos con un solo hibridoma y así tener una clona productora de MAb propiamente dicho.

Para realizar la dilución se resuspendió el cultivo expandido y se tomó una muestra para hacer un conteo de células y obteniéndose el porcentaje de viabilidad de éstas usando la técnica de exclusión por tinción con azul de tripano. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer y con el porcentaje de viabilidad se determinó la cantidad de hibridomas viables por ml de cultivo.

Con el resultado anterior se calculó la dilución necesaria para tener ocho células por ml con lo que al depositar 100 µl de esta dilución en los pozos de las

placas, se garantizó que un porcentaje de los pozos tubieran una sola célula viable. En las placas previamente se depositaron 100 000 timocitos que funcionaron como células alimentadoras.

Las placas se incubaron por cinco días en medio RPMI-Hib-HTA y se realizó un cambio a medio suplementado sin la sal de Aminopterina. El medio se cambió cada 5 días y después del tercer cambio (20 días) se realizó un escrutinio por ELISA para identificar los pozos en los que hubo producción de MAb, expandiendo las clonas con títulos más altos.

8. RESULTADOS

El cultivo confluyente de la cepa de *M. tuberculosis* se obtuvo después de 21 días de incubación, al término se cosechó y se colectó el sobrenadante de cultivo y el paquete bacteriano del que extrajo ADN con fenol-cloroformo.

El ADN extraído tuvo una concentración de 47 a 72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el cuál cuando fue observado en gel de agarosa al 0.8% teñido con Br-Et, apareció como una banda de ADN única (figura no mostrada), que corresponde al ADN cromosomal de la micobacteria con un peso molecular previamente descrito de 4 500 kpb (45).

El ADN purificado se utilizó para la amplificación del gen *esat-6* (Fig. 10) de acuerdo a las condiciones previamente señaladas (45) (producto A) y con los nuevos iniciadores modificados que incluyeron los sitios de corte para las enzimas de restricción Eco R I y Hind III (producto B).

Los pPCR A y B amplificados por ambas estrategias corresponden a fragmentos de ADN de 302 pb y 308 pb respectivamente. Estos se analizaron en gel de agarosa al 2.0% teñido con Br-Et. Posteriormente, el pPCR B que contenía las secuencias de oligonucleótidos para la digestión enzimática se eluyó de un gel de poliacrilamida al 10% obteniendo el gen amplificado libre de los subproductos de la PCR (Fig. 11).

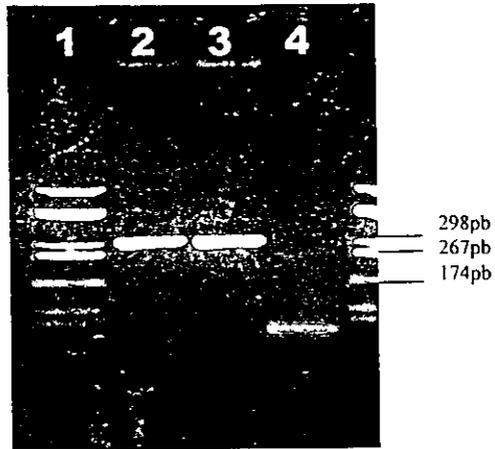


Fig. 10: Electroforesis en gel de agarosa 2.0%. Carriles: 1) y 4), Marcador de peso molecular. 2) y 3) productos de PCR A (pPCR) de *esat-6*.

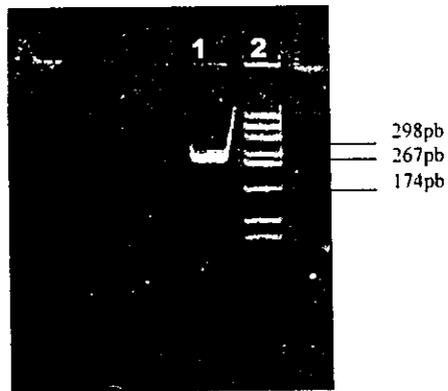


Fig. 11: Electroforesis en gel de agarosa 2%. Carriles: 1) pPCR B purificado (*esat-6*), 2) mpm.

Sólo el pPCR B que incluyó las secuencias de reconocimiento para las enzimas Eco R1 y Hind III fue utilizado para la construcción del plásmido recombinante que se desarrolló para la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α por tratamiento químico con DMSO y sales de magnesio.

Las *E. coli* transformadas fueron seleccionadas en placas de agar-LB con ampicilina (100 μ g/ml) obteniendo 16 colonias (nueve en un ensayo y siete en otro). De las 16 *E. coli* transformadas se recuperaron sólo 15 plásmidos que mostraron: 14 un peso molecular de 10,000 pb y uno el tamaño molecular de 5,000 pb (no mostrado). De estas clonas se seleccionó la del peso esperado y el control con el plásmido sin clonar y realizó la extracción de plásmidos en tres eventos independientes no encontrándose diferencia en los perfiles correspondientes a cada cepa (Fig. 12).

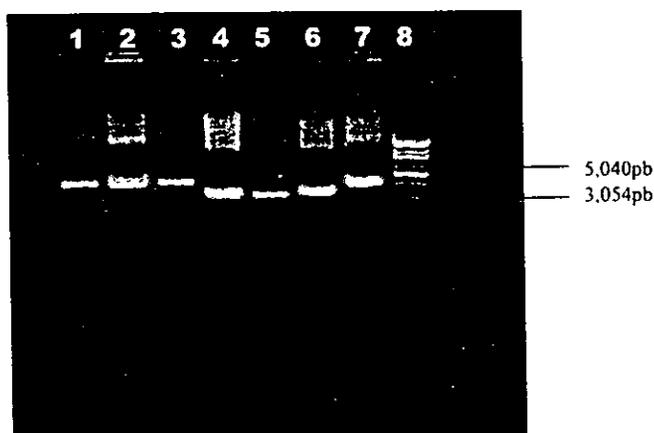


Fig. 12: Electroforesis en gel de agarosa 1.2%. Carriles: 1) a 3) Clona con el perfil electroforético esperado 4) a 6) Control del plásmido sin clonar 7) Control de la primera clonación 8) mpm.

La *E. coli* transformada con el plásmido de 5,000 pb se creció masivamente y se purificó el plásmido confirmándose la presencia del inserto mediante PCR (Fig. 13) utilizando los dos juegos de iniciadores antes mencionados, con la obtención de un fragmento de 302 y otro de 308 pb.

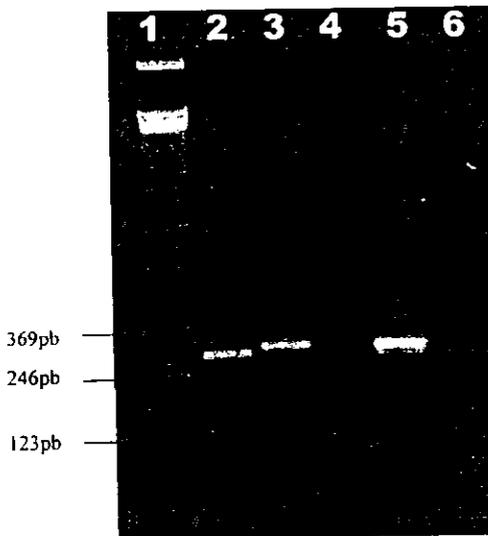


Fig. 13: Electroforesis en gel de agarosa al 2.0%. Carriles: 1) mpm; 2) y 3) pPCR *esat-6* de ADN de plasmido (2juegos de iniciadores); 4) Control negativo; 5) pPCR *esat-6* de ADN de *M. tuberculosis* (Control positivo) y 6) pPCR *esat-6* de otra clona del plásmido.

Una vez confirmada la presencia de *esat-6* en el plásmido se llevó a cabo la expresión de la proteína ESAT-6r de la clona seleccionada por su inducción en

los cultivos con IPTG 1 mM durante tres hs. Al término, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 17% al lisado bacteriano y se tiñó con plata, detectándose la expresión de una proteína de aproximadamente 10 kDa, que corresponde a ESAT-6r. Para mejorar el rendimiento se purificó el plásmido de esta clona y se transformó bajo las mismas condiciones una cepa de *E. coli* XL1-blue en la que se detectó la sobreexpresión de la proteína en el corrimiento electroforético (Fig. 14).

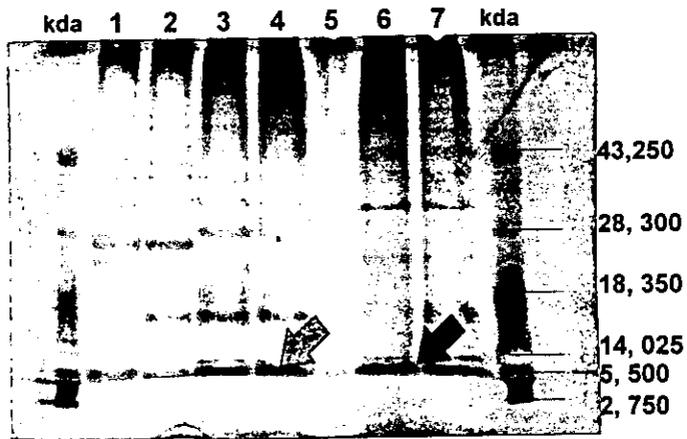


Fig. 14: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 17% teñido con plata. La cepa *E. coli* XL1-Blue fue inducida con concentraciones 0.6 mM y 1.0 mM de IPTG. Carriles: 1 y 2 Control sin inducir; 3 y 4 XL1-Blue inducida (0.6 mM); 6 y 7 XL1-Blue inducida (1.0 mM); kDa) Marcador de peso molecular.

Posteriormente se probaron las muestras de sobrenadante y fracciones del lisado bacteriano para determinar en cual de estas se localiza la proteína (Fig. 15) detectándose reacción positiva en el botón y en el lisado pero no en el sobrenadante del caldo de cultivo.

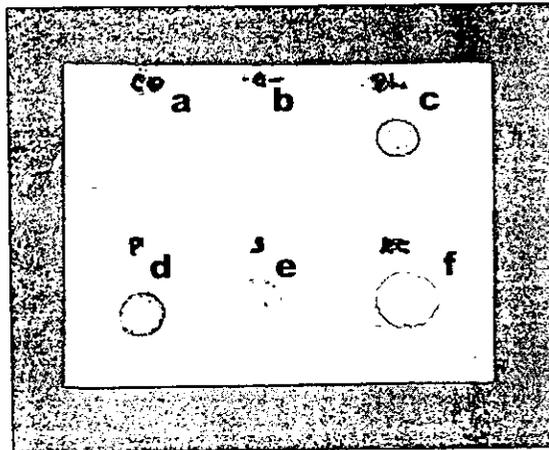


Fig. 15: Inmunodot. En la membrana se depositaron muestras de las diferentes preparaciones de la bacteria transformada. a) Lisado *E. coli* sin transformar; b) Control negativo; c) Lisado de *E. coli* transformada; d) Botón del lisado bacteriano; e) sobrenadante del lisado bacteriano; f) Proteínas filtradas de cultivo de *M. tuberculosis*.

El rompimiento bacteriano se logró al 100% a partir de un concentrado bacteriano de 10 veces por la aplicación de 12,000 g de presión en la prensa francesa. Mediante centrifugación se eliminaron los restos celulares de la pared y membrana bacterianos, con el sobrenadante se corrió una electroforesis de acrilamida al 17% que fue transferida a nitrocelulosa par determinar la reactividad

de la banda de 10 kDa con sueros de ratón hiperimmune y de pacientes positivos a ESAT-6 (Fig. 16). A partir de este sobrenadante se inició la purificación de la proteína ESAT-6r por columna de afinidad de Níquel (Ni^{++}) en la que se obtuvo un rendimiento de 178.82 $\mu g/ml$.

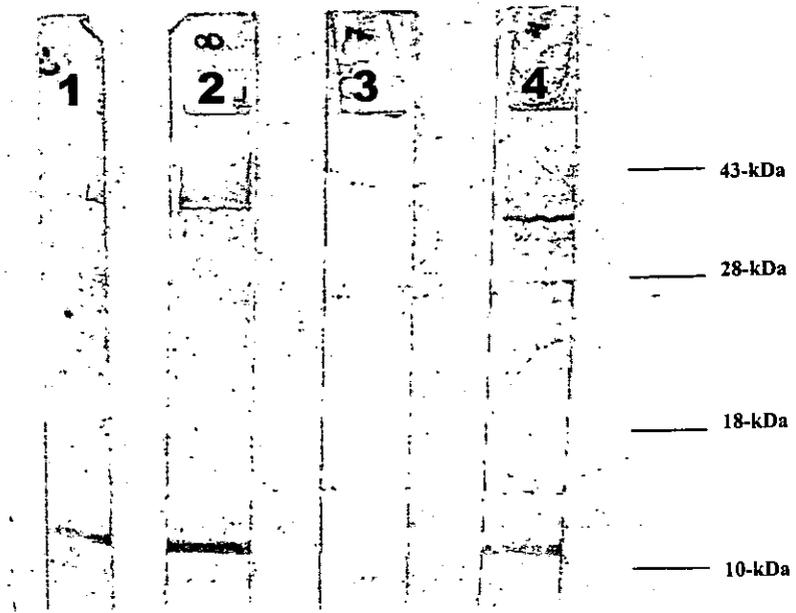


Fig. 16: Inmunoblot. El sobrenadante de los lisados separado por SDS-PAGE Se probó con sueros de ratón (2), de paciente con tuberculosis (1), sobrenadantes concentrados de cultivo de los hibridomas producidos (4). 3) Sobrenadante de lisado de la bacteria sin transformar (control negativo).

En el perfil electroforético de la ESAT-6r purificada por afinidad se detectó mas de una banda proteica, siendo las más abundantes las de pesos moleculares

mayores al esperado, por lo que se purificó posteriormente por electroelusión en donde se encontró un el perfil de electroforesis con una banda de 10 kDa correspondiente a la proteína de ESAT-6r.

La producción de anticuerpos monoclonales se logró inmunizando cuatro ratones hembras BALB/c libres de patógenos de 5 semanas de edad con la proteína ESAT-6r en 4 ocasiones con intervalos de 1 semana. Los ratones inmunizados fueron evaluados semanalmente para la producción de anticuerpos séricos contra ESAT-6r por ELISA encontrando un ratón (Fig. 17) en el que se observó un incremento en el título de anticuerpos. A este se le aplicó un refuerzo por las vías intraperitoneal e intravenosa tres días antes de sacrificarlo para realizar la fusión celular con polietilenglicol entre linfocitos B del bazo y células neoplásicas cultivadas *in vitro*.

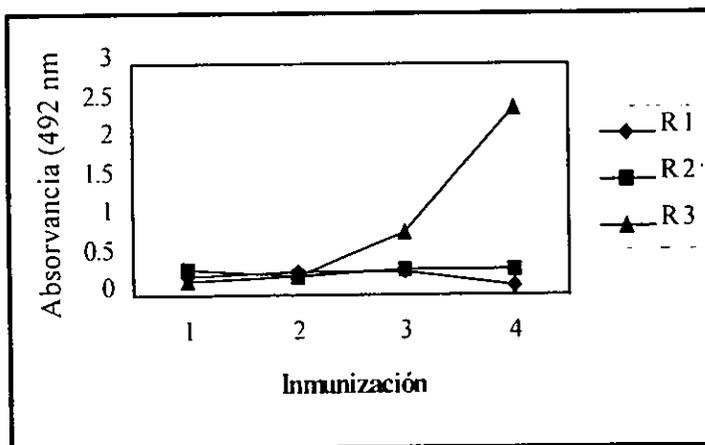


Fig. 17: Respuesta de anticuerpos por ELISA. El suero obtenido de los ratones antes de cada inmunización se evaluó por ELISA en dilución 1:100 encontrándose producción de anticuerpos contra ESAT-6r en un solo organismo.

Quince días después de que se realizó la fusión los cultivos fueron observados con el microscópico invertido y se encontró un 60% de células híbridas o hibridomas (células con características de mieloma y linfocitos B). De éstos, se encontraron títulos de anticuerpos contra ESAT-6r por ELISA en 11 hibridomas teniendo que los valores mayores fueron de 0.581, 0.734, 0.601, 0.556, aunque, algunos se perdieron.

Las células híbridas seleccionadas E2, E10, I93 y D44 se expandieron a un volumen mayor para su clonación por dilución limitada. Al término de la primera clonación por dilución limitada solo se expandieron las clonas con los mayores títulos de anticuerpos contra ESAT-6r por ELISA para su segunda clonación. De éstas se seleccionó la clona D44 para su propagación y obtención de anticuerpos del sobrenadante de cultivo que se concentró por liofilización 10 veces.

El isotipo del anticuerpo monoclonal contra la ESAT-6r se determinó por el kitpaquete comercial Mose mONOb ID kit HRP (ZYMED) basado en la prueba de ELISA y se encontró que corresponde al isotipo IGg₁. El anticuerpo monoclonal D44 reconoció a la proteína de ESAT-6 tanto en su forma nativa (de sobrenadante de cultivo de *M. tuberculosis* H₃₇R_v) como en la forma recombinante obtenida por la prueba de ELISA.

9. DISCUSION

Debido al resurgimiento mundial de la tuberculosis actualmente se ha fomentado la investigación dirigida hacia el desarrollo de nuevas vacunas, así como de pruebas de diagnóstico para la tuberculosis activa. Un punto central de investigación es la elucidación de antígenos inmunodominantes con importancia en la infección y que son reconocidos por las células T del sistema inmune durante la misma.

Un grupo de antígenos de gran importancia es el constituido por las proteínas de secreción que como ha sido demostrado en modelos murinos y bovinos son reconocidas por los linfocitos T al inicio de la infección permitiendo establecer una respuesta protectora y controlar la infección (2,4,6,35). Recientemente esta hipótesis ha sido sustentada por las investigaciones en modelos animales en los que se ha comprobado la eficiencia de vacunas compuestas por subunidades de proteínas filtradas de cultivos de *M. tuberculosis* (1,24,25).

Diversos estudios han demostrado la importancia de los antígenos de secreción de bajo peso molecular (35), entre éstos la proteína de secreción temprana ESAT-6 que es reconocida en las fases tempranas de la infección (36) en diversos modelos animales y con resultados similares en ensayos *in vitro* con muestras de humanos (33). ESAT-6 se define como una proteína con múltiples epítomos reconocidos por diversas especies que desarrollan la tuberculosis así como por distintas poblaciones humanas.

La amplificación del gen *esat-6* solo se consiguió a partir del ADN extraído de la cepa H₃₇R_V de *M. tuberculosis* como previamente se ha descrito (35).

Las secuencias de corte para endonucleasas de restricción que flanquean los extremos del gen amplificado proporcionan la orientación de inserto en la construcción del plásmido PRO EX HT c obtenido con el que se transformó a las *E. coli* DH5 α tratadas con DMSO y magnesio para que fueran competentes. De las 16 clonas seleccionadas con ampicilina se comprobó la presencia del plásmido por lisis alcalina encontrándose en solo 15 de ellas de las que 14 presentaron un peso molecular de aproximadamente 10 kb y finalmente una clona en la que se encontró el plásmido con el tamaño esperado de 5 000 pb.

La amplificación del gen de ESAT-6 clonado a partir del pPCR del gen *esat-6* amplificado con base en la secuencia de ácidos nucleicos reportada por P. Andersen sólo produce una banda de peso molecular igual al previamente descrito, sólo siendo un poco mayor el que se utilizó para clonar debido a que incluía la presencia de secuencias reconocidas por las endonucleasas de restricción Eco RI y Hind III. Esta amplificación sugirió la presencia del gen *esat-6* en el plásmido transformado.

La expresión de la proteína se comprobó en geles de poliacrilamida al 17% en los que se observó el incremento en el colorante retenido en la banda correspondiente a 10 kDa representante de la sobreexpresión de la proteína. Posiblemente este aumento en el peso molecular de la proteína que anteriormente se describió como de 6 kDa fue debido a la adición de una secuencia de polihistidinas en la región amino de la proteína recombinante para facilitar su purificación con columnas de afinidad a níquel.

La proteína ESAT-6r únicamente se encontró en los lisados bacterianos y no en el sobrenadante de cultivo de *E. coli*, a diferencia de que la proteína ESAT-6 en su forma nativa es secretada al medio de cultivo por *M. tuberculosis*, a pesar de que el análisis de la secuencia del operon no muestra una secuencia de exportación por lo que aun se está estudiando el mecanismo que ESAT-6 utiliza para ser secretada.

La purificación de la proteína se llevó a cabo después de determinar el tiempo de inducción de la proteína encontrándose que este fue de dos horas, en donde se empezó a detectar la proteína con un intervalo de tres horas en las que se observó claramente su inducción.

La purificación de la proteína ESAT-6r se realizó en varios pasos. El primero fue utilizando una columna de afinidad a agente quelante (Ni^{++}) aprovechando la existencia de una sección de polihistidinas en la proteína recombinante, pero los resultados mostraron la unión inespecífica de otras proteínas abundantes de mayor peso molecular que también tienen un alto contenido de histidinas en su secuencia de aminoácidos como se ha descrito para algunas bacterias.

La segunda estrategia de purificación consistió en electroeluir la proteína a partir de geles de poliacrilamida en los que se extrajo la banda correspondiente a ESAT-6r. La identidad de la proteína se determinó por el peso molecular y por el reconocimiento con anticuerpos séricos de ratones BALB/c libres de patógenos inmunizados con la proteína ESAT-6r, así como con anticuerpos séricos de un paciente con tuberculosis al que previamente se la había determinado el reconocimiento de esta proteína por ELISA. El rendimiento de ESAT-6r purificada por esta técnica es claramente menor al obtenido por purificación por técnicas clásicas de cromatografía pero se compensa por la pureza de esta.

La inmunización a ratones BALB/c con 1 μg de la proteína ESAT-6r por dosis en cuatro intervalos de siete días produjo un claro ascenso en el título de anticuerpos policlonales de un ratón concluyéndose que el esquema de inmunización tuvo un bajo rendimiento (25%). El que los otros ratones no produjeran anticuerpos quizá fue debido a las características del antígeno que esencialmente desencadena una respuesta inmune celular y no humoral.

Antes de iniciar la fusión celular el ratón fue reinmunizado tres días antes a fin de estimular a las células linfoides del bazo utilizado obteniéndose un 30-60% de células híbridas como se observó en el análisis microscópico aunque con títulos de anticuerpos ligeramente por encima del valor de corte establecido en el ensayo de ELISA. Algunas de estas células híbridas posteriormente se perdieron por la reversión de las características o "pérdida del cromosoma" como regularmente se le conoce, reduciéndose la cantidad de clonas productoras de anticuerpos en un 3 - 4% del total de las células híbridas obtenidas inicialmente.

La producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína de ESAT-6r se realizó por el aumento en la masa celular de los hibridomas expandidos lo que aconteció de forma lenta, quizá por la falta de moléculas inductoras en el suero con el que se suplementó el medio de cultivo o por las características propias del hibridoma.

La distribución de las clonas en las placas de cultivo muestra que proceden de la distintas células progenitoras, por lo que en otras clonas se podría esperar un isotipo distinto al obtenido en la clona con la que se trabajó IGg₁.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos podrían ser utilizados para la preparación de columnas de inmovilización en la purificación de la proteína recombinante y la investigación de ésta en el desarrollo de nuevas vacunas

proteicas, como se ha observado en ensayos con modelos murinos en los que se encuentran valores similares de protección a los obtenidos con la vacuna de BCG y con las proteínas de secreción administradas con un adyuvante. Otra de las posibles aplicaciones para ESAT-6r es en el diagnóstico de la enfermedad activa, ya que se reconoce en las primeras fases de la infección y es exclusiva del complejo *M. tuberculosis* no encontrándose por pruebas moleculares en las subcepas vacunales de BCG (22) en las que hay una ausencia de aproximadamente 10 kpb distribuidas en distintas regiones entre las que se encuentra el codón que incluye al gen *esat-6*, con lo que se evita la reactividad cruzada del PPD en sujetos sanos vacunados con BCG.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- 1.- El uso de vectores comerciales para la clonación de proteínas de importancia inmuntológica permite reducir el tiempo necesario para obtener estos antígenos, con mayores rendimientos.
- 2.- La utilización de bacterias de crecimiento rápido como *E. coli* para obtener proteínas recombinantes reduce el tiempo y el riesgo que implica trabajar con *M. tuberculosis*.
- 3.- La purificación a gran escala de la proteína recombinante ESAT-6r requiere un proceso mas elaborado para eliminar las impurezas encontradas en la purificación por agente quelante.
- 4.- La utilización de 1 µg de ESAT-6r para cada inmunización fué suficiente para desarrollar una respuesta humoral e incrementar su producción.
- 5.- El procedimiento clásico para la producción de anticuerpos monoclonales permanece como una herramienta práctica en la producción de reactivos de importancia biomédica.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen P. 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted Mycobacterial proteins. **Infect Immun.** 62(6):2536-2544.
2. Andersen, P., A. B. Andersen, A. L. Sorensen and S. Nagai. 1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Immunol.** 154:3359-3372.
3. Andersen, P., D. Askagaard, L. Ljungqvist, J. Bennedsen, and I. Heron. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. **Infect Immun.** 59(6):1905-1910.
4. Bassey, E. O. E., P. F. Life, D. Catty, J. S. H. Gaston, D. S. Kumararatne. 1996. T-cell response to mycobacterial protein: a comparative study of tuberculous and control immunoblots of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG. **Tubercle and Lung Dis.** 77: 146-153.
5. Boesen, H., B. Nybo J., T. Wilcke and P. Andersen. 1995. Human T-cell response to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** 63(4):1491-1497.
6. Berthet, F. X., P. B. Rasmussen, I. Rosenkrands, P. Andersen and B. Gicquel. 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). **Microbiology.** 144:3195-3203.
7. Brandt, L., T. Oettinger, A. Holm, A. B. Andersen and P. Andersen. 1996. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **The J Immunol.** 157:3527-3533.
8. Calderón, A. y J. M. Arbos. **Manual de Técnicas en Microbiología.** Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda, Madrid. pp: 117.
9. Collins, F. M. 1982. The Immunology of Tuberculosis. **Am Rev Resp Dis.** 125:42-49.
10. Chaparas, S. D. 1982. The Immunology of Mycobacterial Infection. **CRC Crit Rev Microbiol.** 9:139-92.

11. Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc Natl Acad Sci USA**. **86**:2172-2175
12. Dannenberg, A. M. 1989. Immune Mechanism in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis. **Rev Infect Dis**. **11**(supl2):s369-s378.
13. De Young, G. H. 1986. Monoclonal antibodies: promises fulfilled. **High Technol**. February:33-41.
14. Dearborn, E. and C. H. Krrkpatrick. 1986. State of the art: The Immunology of Mycobacterial Disease. **Am Rev Respir Dis**. **134**:1062-1070.
15. Eelhay, M. J., T. Oettinger and P. Andersen. 1998. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. **Infect Immun**. **66**(7):3454-3456.
16. Freeman, B. A., 1989. **Micribiología de Burrows**. Interamericana. pp: 691-715.
17. Garcia-Ramos, E., Tay-Zavala, J., Rodríguez-Quintanilla, M. A., López-Martínez, R., Romero-Cabello, R., Gutierrez-Quiroz, M. 1987. **Microbiología y Parasitología Medicas**. Méndez Editores. pp: 1.320-1.344.
18. Global Tuberculosis Programme. **Anual Report 1997**. Country profiles: México.
19. Goding, J. W. 1986. **Monoclonal Antibodies. Principes and practice**. Academic Press, San Diego, USA. pp: 1-53.
20. Gonzales, L. A., A. W. Knappe, K. D. Kelsey and V. H. Raff. 1991. Comparative protective activity of human monoclonal and hyperimmune policlonal antibody against group B *Streptococci*. **J Infect Dis**. **163**:792-798.
21. Harboe, M., A. S: Malin, H. S: Dockrell, H. G: Wiker, G. Ulvund, A. Holm, M. C. Jorgensen and P. Andersen. B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**. **66**(2):717-723.
22. Harboe, M., T. Oettinger, H. Gotten W., I. Rosenkrands and P. Andersen. 1996. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. **Infect Immun**. **4**(1):16-22.

23. Harth, G., B.-Y. Lee and M. A. Horwitz. 1997. High-Level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic *Mycobacteria* of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. **Infect Immun.** **65**(6):2321-2328.
24. Haslov, K., A. Andersen, S. Nagai, A. Gottschau, T. Sorensen and P. Andersen. 1995. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** **63**(3):804-810.
25. Horwitz, M. A., B.-W. E. Lee, B. J. Dillon and G. Harth. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci.** **92**:1530-1534.
26. <http://who.int/gtb/publications>
27. <http://www.niaid.nih.gov>
28. Kaufmann, S. E. 1989. In vitro Analysis of the Cellular Mechanisms Involved in Immunity to Tuberculosis. **Rev Infect Dis.** **11**(supl2):s448-s484
29. Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. **Nature.** **256**:495-497.
30. Letter to the editor. 1986. Results of a World Health Organization-Sponsored workshop to characterize antigens recognized by *Mycobacterium*-specific monoclonal antibodies. **Infect Immun.** **51**:718-720.
31. Lodam, A. N., M. V. R. Reddy and B. C. Harinath. 1998. Immunodiagnosis of pulmonary tuberculosis by concomitant detection of antigen and antibodies of excretory-secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. **J Biosci.** **23**(1):19-23.
32. López-Antuñaño, F. J. 1997. Usos y efectos del bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (vacunación con BCG). **Actualizaciones. INNSZ.** **2**:165-172
33. Meléndez-Herrada, E., Y. López-Vidal, S. Ponce de León, M. Singh, P. Ravn, A. Cravioto and E. Sada. Cellular and humoral response to synthetic peptides and recombinant proteins of ESAT-6 and 38 kDa from *Mycobacterium tuberculosis* in a group of Mexican tuberculosis patients and their household contacts. **Submit to press in Tubercu Lung Dis.**
34. Milstein, C. and G. Galfré. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. **Methods Enzymol.** **92**: part E, pag 42-44.

35. Nagai, S., H. Gotten W., M. Harboe and M. Kinomoto, 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** **59**(1):372-382.
36. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. **National Institutes of Health**. March 1997. Bethesda, M. D. 20892.
37. Oftung, F., H. G. Wiker, A. Deggerdal and A. S. Mustafa*. 1997. A novel Mycobacterial antigen relevant to cellular immunity belongs to a family of secreted lipoproteins. **Scand J Immunol.** **46**:445-451.
38. Pollock, J. M. and P. Andersen. 1997. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. **Infect Immun.** **65**(7):2587-2592.
39. Pollock, J. M. and P. Andersen. 1997. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent Mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. **The J Infect Dis.** **175**:1251-1254.
40. Rastogi, N., J. McFadden, T. H. M. Ottenhoff and Willen van Eden. 1992. First International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections: A summary. **Clin Infect Dis.** **14**:308-12.
41. Ratafia, M. 1987. Mammalian cell culture: Worldwide activities and markets. **Biol Technol.** **5**:692-694.
42. Roberts, A., D. M. G. Sonnenberg, D. J. Ordway, S. K. Furney, P. J. Brennan, J. T. Belisle and I. M. Orme. 1995. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology.** **85**:502-508.
43. Smith, D. W. and E. H. Wiegand. 1989. What Animal Models can Teach us About the Pathogenesis of Tuberculosis in Humans. **Rev Infect Dis** **11**(supl2):s385-s393.
44. Sonnenberg, M. G. and J. T. Belisle. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. **Infect Immun.** **65**(11):4515-4524.
45. Sorensen, A. L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen and A. B. Andersen. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** **63**(5):1710-1717.

46. Wayne L. G. and G. P. Kubica, in Sneath P. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. C. Holt. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Willian & Wilkins. Baltimore. pp: 1436-1457.
47. Weissler, J. C. 1993. Southwestern Internal Medicine Conference: Tuberculosis-Immunopathogenesis. **Am J Med Sci**. **305**(1):52-65.
48. Weldingh, K., I. Rosenkrands, S Jacobsen, P. B. Rasmussen, M. Elhay and P. Andersen. Two-dimwnsional electrophoresisi for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. **Infect Immun**. **66**(8):3492-3500.
49. Wheeler, P. R. and C. Rafiedge. 1998. Metabolism in *Mycobacteriun leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* and other Pathogenic Mycobacteria. **B Med Bull**. **44**:517-561.
50. Yelton, D. E. and Scherff, M. D. 1981. Monoclonal antibodies: A powerful a new tool in biology and medecine. **Am Rev Biochem**. **50**:657-680.
51. Youmans, G. P. 1979. **Tuberculosis**. W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp: 20-41.
52. Young, D. V., S. H. E. Kaufmann, P. W. M. Hermans and J. E. R. Thole. 1992. Mycobacterial protein antigens: a compilation. **Mol Microb**. **6**(2):133-145.