



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES EN CONTRA DE
GLICOLÍPIDOS DE *Mycobacterium*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
YUKO NAKAMURA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUZ MARIA LÓPEZ MARÍN

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURÁN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m. 344162



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Producción de anticuerpos monoclonales en contra de glicolípidos de *Mycobacterium*”

realizado por Yuko Nakamura López

con número de cuenta 09710802-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Luz María López Marín

Propietario

Dr. Rafael S. Saavedra Duran

Propietario

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Suplente

Biól. Gonzalo Asariel Acero Galindo

Suplente

Biól. Luis José Delaye Arredondo

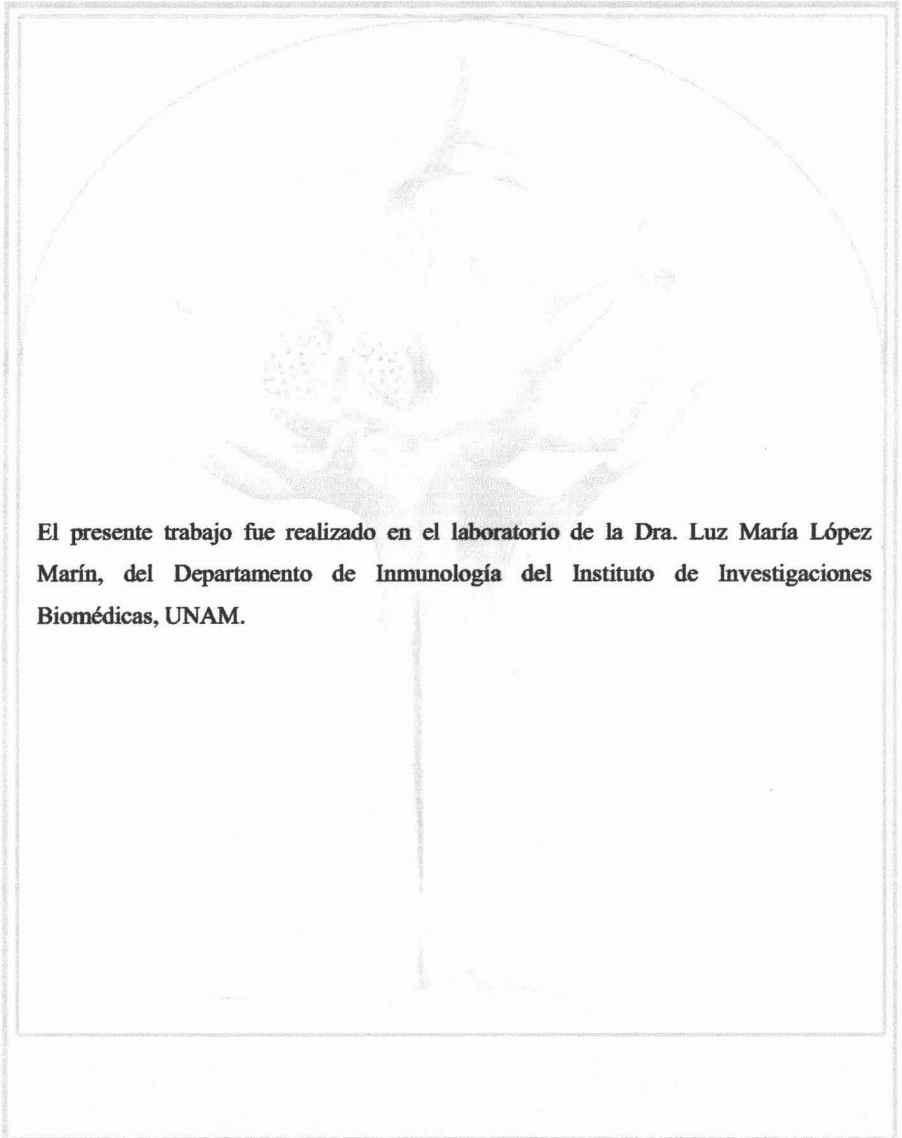
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Luz María López Marín, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luz María López Marín por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo y asesoría en la realización de esta tesis.

A la Biol. Erika Segura Salinas y al Biol. Exp. Gonzalo Acero Galindo, no sólo por su ayuda técnica en la realización de este trabajo, sino también por la amistad y el cariño que me han obsequiado.

Al Dr. Horacio Merchant Larios y al Tec. José Guadalupe Baltazar García, por su ayuda en el análisis de la población de liposomas por microscopía electrónica.

Al M. en C. José Prisco Palma Nicolás por todos sus consejos durante el desarrollo de mi tesis y su gran amistad.

A Yolanda Cervantes, Director Clinical R & D and Medical Affairs de Glaxo Smith Klane México, y a Adriana Benítez, Gerente Nacional de Vacunación de Becton Dickinson de México, por el apoyo brindado para la asistencia a algunos congresos relacionados con el área del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Elizabeth Ferreira Guerrero, Directora de Prevención de Micobacteriosis de la Secretaría de Salud, por los datos epidemiológicos proporcionados.

Al Dr. Jaime Mas Oliva y al Dr. Oscar Pérez Méndez, por compartir con migo sus conocimientos y abrirme las puertas de sus laboratorios para conocer un poco del mundo científico.

A todos los miembros del H. Jurado por la revisión del presente trabajo y sus consejos para el mejoramiento del mismo.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN202502) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM.

Con mi más grande respeto y profundo cariño, dedico esta tesis

A mis padres

Araceli López

Miguel A. Nakamura

*Que me han conducido por la vida con
amor y paciencia, hoy ven forjado un anhelo,
una ilusión y un deseo.*

*Gracias, por enseñarme lo que han recogido a
su paso por la vida, por compartir mis horas grises,
mis momentos felices, ambiciones, sueños e inquietudes.*

*Gracias, por ayudarme a salir adelante en la
adversidad, por guiarme por el sendero del bien
y otorgarme la mejor de las herencias, mis estudios.*

*No los defraudare los haré sentir orgullosos y
verán que todos sus sacrificios y tragos amargos
hoy son suave miel y podrán decir con la frente
muy alta... Ella es mi hija.*

A Miguelón, tenemos personalidades distintas, diferentes modos de ver la vida, siempre discutimos y vivir juntos es difícil, pero Te Quiero Mucho Hermanito.

A Mónica Narváez, mi gran amiga, quien siempre tiene las palabras para alegrar mi día.

À Ludwig Marpeaux, merci pour tous les bons moments partagés ; mon coeur est à toi.

A mis amigas de la preparatoria: Carolina Campuzano, Alejandra Arteaga, Marimar Azcoitia, Jessiele Cosdaya, Marcela Briceño, Liliana Gonzáles y Maribel Soto, a pesar de haber seguido caminos diferentes siempre estaremos juntas.

A mis amigos de la universidad: Etienne Rajchemberg, Lorena Mendiola, Josué Ramírez, Berenice Martínez, Raymundo Álvarez, Carmen González y Marco Álvarez, con los que compartí alegrías, tristezas, exámenes, practicas de campo, fiestas y ...

A mis amigos del laboratorio: Erika Segura, Prisco Palma, Gonzalo Acero, Erik González, Jorge Valencia, Mactzil Peto, Carla Aguirre, Patricia Sosa, Lucia Méndez, Leticia Kuri y Julia Torres, con quienes compartí grandes momentos dentro y fuera del laboratorio.

A todos, gracias por formar parte de mi vida.

中 村 優 子
ナカムラ ユウコ
なかむら ゆうこ

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	ix
Resumen	xi
I. Antecedentes	1
1.1. Tuberculosis	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.1.3. Micobacterias atípicas	2
1.1.4. Transmisión	4
1.1.5. Factores condicionantes del contagio	4
1.1.6. Epidemiología	5
1.1.7. Clasificación actual de la tuberculosis	8
1.1.8. Sintomatología	10
1.1.9. Desarrollo de la tuberculosis	11
1.1.10. Respuesta inmune a tuberculosis	12
1.1.11. Diagnóstico	15
1.1.12. Tratamiento	17
1.1.13. Prevención	19
1.2. Pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.2.1. PDIMs	22
1.2.2. Acil-trealosas	22
1.2.2.a. DAT	23
1.2.2.b. Sulfolípidos	23
1.2.2.c. TATs	24
1.2.3. DMT	25
1.2.4. LAM	26
1.3. Anticuerpos monoclonales	28
1.3.1. mAbs contra antígenos de <i>Mycobacterium</i>	28
1.3.2. Principio de la obtención de mAbs	29
II. Justificación	31
III. Objetivos	32
IV. Esquema metodológico	33

V. Metodología	34
5.1. Obtención de glicolípidos	34
5.1.1. Cultivo de micobacterias	34
5.1.2. Extracción de glicolípidos	34
5.1.3. Purificación de glicolípidos	34
5.1.3.a. Purificación de DAT	35
5.1.3.b. Purificación de TAT y DMT	35
5.2. Inducción de respuesta humoral en contra de glicolípidos	36
5.2.1. Inmunización con DAT en AIF	36
5.2.2. Inmunización con DAT incluido en liposomas	36
5.2.3. Infección con <i>Mycobacterium fortuitum</i>	37
5.3. ELISA con glicolípidos como antígenos	37
5.4. Fusión de células de bazo y células de mieloma	38
5.4.1. Preparación de células de bazo	38
5.4.2. Preparación de células de mieloma	38
5.4.3. Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal	39
5.4.4. Fusión celular	39
5.4.5. Selección de hibridomas	39
VI. Resultados	40
6.1. Purificación de glicolípidos	40
6.1.1. Purificación de DAT	41
6.1.2. Purificación de TAT y DMT	44
6.2. Inducción de respuesta humoral contra glicolípidos	47
6.2.1. Inmunización con DAT en AIF	47
6.2.2. Inmunización con DAT incluido en liposomas	48
6.2.3. Infección con <i>Mycobacterium fortuitum</i>	49
6.3. Producción de hibridomas	54
VII. Discusión	59
VIII. Conclusiones	61
IX. Referencias	62
X. Apéndice I. Medios de Cultivo	71
XI. Apéndice II. Soluciones	72

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
APC	Células presentadoras de antígenos
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
CFU	Unidades formadoras de colonias
CR	Receptores del complemento
DAT	2,3-di- <i>O</i> -aciltrealosa
DC	Células dendríticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMT	Dimicolato de trealosa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DPBS	Solución tamponada de fosfatos de Dubelco
ELISA	Inmunoensayo enzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
GPL	Glicopeptidolípidos
HAT	hipoxantina-aminopterina-timidina
HGPRT	Enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa
HT	hipoxantina-timidina
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón gamma
LAM	Lipoarabinomanano
mAbs	anticuerpos monoclonales
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
mAGP	Complejo peptidoglicano-arabinogalactano-micolatos
MDR	Resistente a múltiples drogas
MMT	Monomicolato de trealosa
MPI	Manosil-fosfatidil-mio-inositol
PBS	Solución tamponada de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDIMs	Dimiocerosatos de ftiocerol
PGL	Glicolípidos fenólicos
PPD	Derivado proteico purificado de <i>M. tuberculosis</i>
PTA	Ácido fosfotúngstico
Rf	Factor de retención

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmuno deficiencia adquirida
SL	Sulfolípido
SPA-R	Receptor de proteína surfactante A
TAT	2,3,6-tri- <i>O</i> -aciltrealosa
TATs	2,3,4-tri- <i>O</i> -aciltrealosa y 2,3,6-tri- <i>O</i> -aciltrealosa
TB	Tuberculosis
TGF- β	Factor transformador de crecimiento
TLC	Cromatografía de capa fina
TLR	Receptores tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de la tuberculosis y el microorganismo que, por sí solo, causa más muertes a nivel mundial cada año. Se estima que diariamente más de 20,000 personas desarrollan la tuberculosis activa y 5,000 mueren a causa de ella.

El género *Mycobacterium* es conocido por su alto contenido de lípidos. La pared celular de las micobacterias contiene lípidos unidos covalentemente y lípidos libres. El dimicolato de trealosa (DMT), la di-*O*-aciltrealosa (DAT) y la tri-*O*-aciltrealosa (TAT) son lípidos libres localizados en la parte externa de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Debido a su unión no covalente al peptidoglicano, estos glicolípidos pueden fácilmente interactuar con las células del hospedero localizadas en el foco de la infección alterando sus funciones. Estos lípidos han sido descritos como reactivos altamente específicos y sensibles para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

La detección de estos antígenos lipídicos con anticuerpos monoclonales podría ayudar a esclarecer su papel en la patogénesis micobacteriana, además de que serían una herramienta útil para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis.

Se ha demostrado que las características químicas y antigénicas del DAT, TAT y DMT purificadas de *M. tuberculosis* son similares a aquellas de una cepa de referencia de *M. fortuitum* la cual es menos patógena y tiene una tasa de crecimiento rápida. Por esta razón, para el presente trabajo, *M. fortuitum* se usó como fuente alterna de estos glicolípidos para la inducción de respuesta humoral en contra de estas moléculas con el fin de producir anticuerpos monoclonales.

La respuesta humoral a lípidos es difícil de obtener. En el presente trabajo, se obtuvieron títulos significativos de anticuerpos en contra de glicolípidos de micobacterias por infección, vía oral, con bacilos vivos de *M. fortuitum* en ratones C57BL/6. Con estos ratones se llevó a cabo el proceso de producción de anticuerpos monoclonales, fusionando células de bazo de ratón infectado y la línea celular de mieloma Sp2/0-Ag4. Se detectó reactividad ligeramente positiva en algunos hibridomas, pero desafortunadamente tanto las clonas reactivas como las no reactivas presentaron muerte celular.

I. ANTECEDENTES

1.1. Tuberculosis

1.1.1. Generalidades

El agente causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 1), fue descubierto en 1882 por el Dr. Robert Koch y desde 1921 se cuenta con una vacuna, pero a pesar de esto y de que existen medicamentos específicos contra la enfermedad, ésta aún constituye un gran problema mundial en materia de salud pública (Collins, 1998).



Figura 1. *M. tuberculosis*

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis (TB) a nivel global causa aproximadamente 2 millones de muertes anuales. Sin embargo, el 90% de las exposiciones a *M. tuberculosis* nunca se convierten en enfermedad, debido esto en parte a la variabilidad extensa en la bacteria. La forma más peligrosa de TB es causada por cepas resistentes a múltiples drogas (MDR).

La enfermedad tuberculosa es muy antigua y ha sido la responsable del mayor número de muertes en la historia de la humanidad. A pesar de encontrarnos en el siglo XXI, *M. tuberculosis* es el agente infeccioso más importante y causa más muertes que cualquier otro microorganismo por sí solo, incluyendo los agentes de la malaria y el cólera (Collins, 1998).

1.1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Entre las características del género *Mycobacterium* están las de ser gérmenes Gram (+), ácido alcohol resistentes, aerobios estrictos, muy sensibles a la luz y altamente resistentes a la desecación, tienen forma de bastones no móviles y miden de 0.2 a 0.6 μm de ancho y de 1 a 10 μm de largo. Dentro de este género, las especies que con más frecuencia afectan al hombre son las que constituyen el denominado complejo *M. tuberculosis* que engloba a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*, siendo el primero de ellos el agente más frecuente (Goodfellow y Magee, 1998). De las otras micobacterias, algunas especies como *M. kansasii* o *M. avium* intracelular han mostrado capacidad patogénica en determinadas situaciones las cuales se mencionan adelante.

El principal reservorio de *M. tuberculosis* lo constituye el ser humano. El ganado vacuno es, en la actualidad, el único reservorio animal de la infección humana, aunque tras la implantación de las técnicas de esterilización de la leche este problema quedó prácticamente eliminado en los países desarrollados.

1.1.3. Micobacterias atípicas

Existen muchos tipos de micobacterias. Algunas de estas micobacterias son similares a la que causa la tuberculosis; pueden causar infecciones con muchos de los síntomas de la tuberculosis. Aunque estas micobacterias son comunes, causan generalmente infección en gente con un sistema inmune deteriorado. Las bacterias infectan sobre todo los pulmones pero pueden también atacar los ganglios linfáticos, los huesos, la piel, y otros tejidos finos (Kumate *et al*, 2001).

Las más comunes son un grupo de micobacterias conocidas como complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Estas micobacterias son altamente resistentes a la mayoría de los antibióticos, incluyendo los usados para tratar tuberculosis. Las infecciones causadas por estas bacterias no son contagiosas.

La infección del pulmón causada por el complejo *M. avium* puede ocurrir en los hombres de mediana edad en los cuales sus pulmones han sido dañados por fumar por tiempo prolongado, o por una vieja infección de tuberculosis, bronquitis, enfisema, u otras enfermedades. La infección con esta micobacteria afecta con frecuencia a las personas con SIDA.

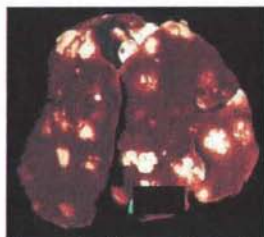


Figura 2. Nódulos producidos por tuberculosis en pulmón

La infección de ganglios linfáticos causada por el complejo *M. avium* (MAC) puede ocurrir en los niños, generalmente entre 1 y 5 años de edad. La infección es causada comúnmente cuando comen tierra o toman agua que está contaminada con micobacterias. Los antibióticos generalmente no curan la infección, ya que estas micobacterias desarrollan fácilmente una resistencia a los medicamentos (Cattoir, 2004), pero los ganglios linfáticos infectados se pueden quitar por cirugía.

Otras micobacterias crecen en piscinas y en los acuarios caseros y pueden causar desórdenes de la piel. Estas infecciones pueden ser eliminadas sin tratamiento. Sin embargo, las personas con infecciones crónicas necesitan generalmente de tratamiento con tetraciclina u otro antibiótico por 3 a 6 meses. Otro grupo de micobacterias de crecimiento rápido, *Mycobacterium fortuitum*, encontrada en tierra y agua, puede infectar heridas y piezas artificiales del cuerpo, como marcapasos o implantes de seno (Wallace *et al*, 1983; Clegg *et al*, 1983). También se han descrito infecciones posquirúrgicas en derivación ventrículo-peritoneal (Midani y Rathore, 1999); en general las infecciones a nivel de sistema nervioso central son raras. Los antibióticos y el retiro quirúrgico de las áreas infectadas curan generalmente la infección.

1.1.4. Transmisión

La fuente de contagio la constituye el enfermo bacilífero, con mayor capacidad de contagio en enfermos que eliminan bacilos detectables por baciloscopia frente a los que necesitan el cultivo para su identificación. Las formas cavitarias^φ son las que tienen mayor riesgo de transmisión, pero los casos inespecíficos con pocas manifestaciones clínicas presentan interés epidemiológico porque la fuente de infección activa suele mantenerse durante más tiempo (Tapia Conyer *et al*, 2004).

La principal vía de transmisión de la tuberculosis es la vía aérea a través de la producción de aerosoles al hablar, reír, estornudar y, sobre todo, al toser (Fig. 3). Sólo las gotas de 1 a 5 μm de diámetro tienen capacidad infectante, ya que pueden alcanzar los alveolos; el resto, son depositadas en las vías respiratorias altas y eliminadas por los mecanismos de defensa innatos (Tapia Conyer *et al*, 2004).

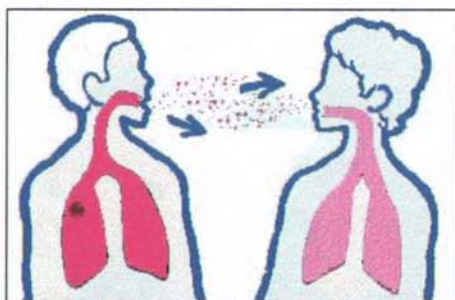


Figura 3. Transmisión de tuberculosis vía aérea

1.1.5. Factores condicionantes del contagio

- a) La capacidad infectante del individuo con tuberculosis, determinada a su vez por la extensión de la enfermedad, por el número de bacilos disponibles para la transmisión y por la capacidad del paciente para generar aerosoles.

^φ Cavidades presentadas por el reblandecimiento y licuamiento de los focos necróticos provocando que los bacilos se multipliquen.

- b) La intensidad y duración de la exposición, que explica el mayor riesgo de infección en los convivientes íntimos del paciente.
- c) El estado inmunitario del sujeto receptor, es decir, la capacidad bactericida innata de cada sujeto y la capacidad de desarrollar una inmunidad celular adecuada. De este último hecho se desprende la gran vulnerabilidad que presentan los pacientes con infección VIH frente al bacilo de Koch.
- d) La edad. El máximo riesgo de ser infectado ocurre durante los primeros cuatro años de vida; el 80% de las infecciones se producen antes de los 15 años y sólo un 5% se infectan entre los 25-50 años, de ahí la importancia del estudio y tratamiento preventivo en los convivientes menores de 20 años.

1.1.6. Epidemiología

Se calcula que están infectados por *M. tuberculosis* 1,700 millones de individuos en el mundo, lo que representa una tercera parte de la población mundial. Cada año se producen entre 8 y 10 millones de casos nuevos, con una prevalencia aproximada de 16-20 millones de enfermos (Global Tuberculosis Control, WHO Report 2005).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos ha comunicado que el aumento de casos de tuberculosis, a partir de mediados de los ochenta, es debido a la epidemia de SIDA. Se considera que 35% a 55% de los pacientes con SIDA manifiestan alguna forma de infección tuberculosa durante el transcurso de su enfermedad y en éstos el 5% de las micobacterias aisladas son *M. tuberculosis*, 90% *M. avium* serovar 1, 4 y 8. (CDC, 1989).

La OMS reportó que en el año 2003 hubo 8.8 millones de nuevos casos de TB (140/100000 habitantes), de los cuales 3.9 millones (62/100000) eran bacilíferos y 674000 (11/100000) estaban infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Fig. 4). Se estima

que en ese año, 1.7 millones de personas (28/100000) murieron de TB, de los cuales 229000 eran caso de coinfección por VIH (Global Tuberculosis Control, WHO Report 2005).

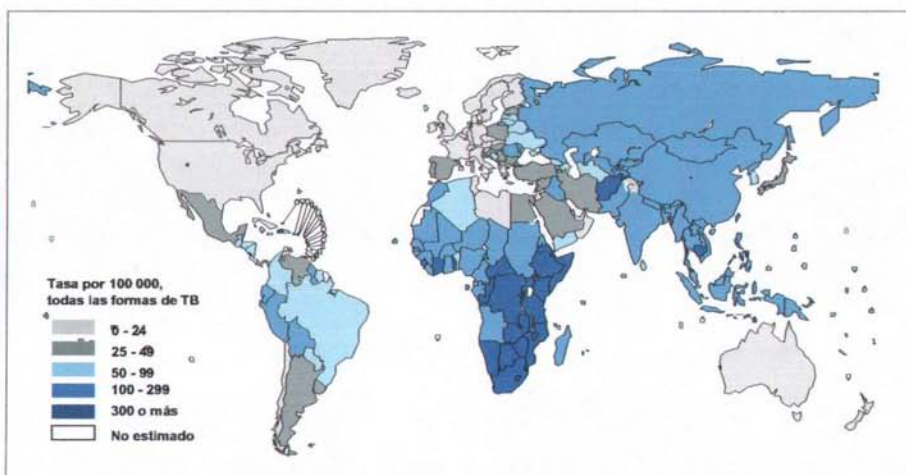


Figura 4. Mapa mundial de casos de tuberculosis en el 2003; tomado de Global Tuberculosis Control, WHO Report 2005.

La tasa de mortalidad por tuberculosis pulmonar muestra una tendencia descendente en el periodo analizado al pasar de 62 defunciones por 100,000 habitantes en 1931 a 2.8 en el año 2003, la reducción es del 95.5%. En relación con las muertes por otras formas de tuberculosis, en los años 1934 a 1939 se presentó un aumento significativo; después de 1939 a la fecha la mortalidad tiende a disminuir en forma sostenida (Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos, 1939-1974; Bases de datos de las defunciones, 1979-2003) (Fig. 5). Por otro lado, la incidencia de tuberculosis se ha mantenido alta en los últimos 20 años con un notable aumento entre los años 1994 a 1997 coincidiendo con el aumento de casos de SIDA en esos años, por lo que se puede establecer una relación directa entre la presencia de SIDA y el repunte de la tuberculosis (Anuarios de Morbilidad, 1984-2003) (Fig. 6).

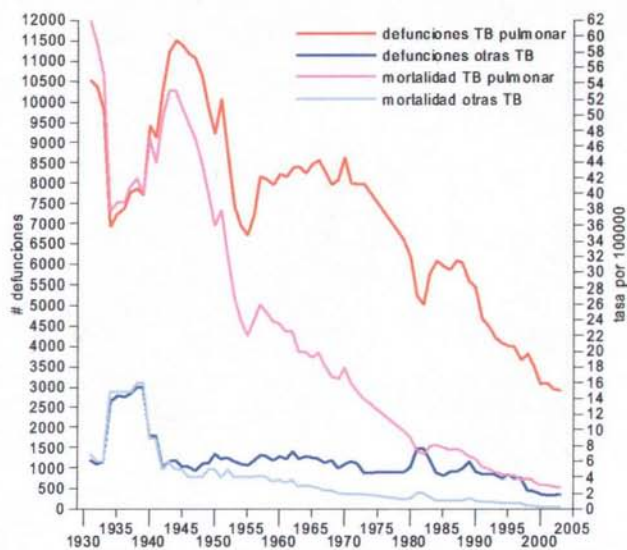


Figura 5. Defunciones y mortalidad por tuberculosis de 1931 a 2003

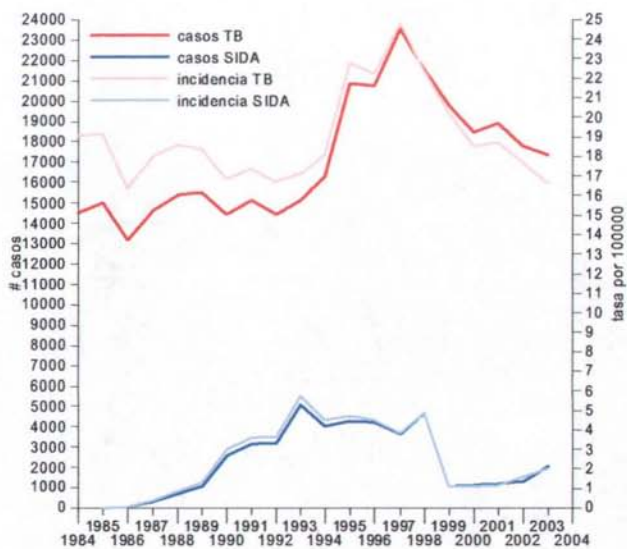


Figura 6. Casos nuevos de tuberculosis y SIDA de 1984 a 2003

En el año 2003 en México, se presentaron 15055 casos de tuberculosis pulmonar (14.4/100000), 165 casos de TB meníngea (0.2/100000) y 2109 casos de TB en otras formas (2/100000), dando un total de 17329 casos (16.6/100000). Según datos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, Baja California es el estado con mayor incidencia de TB pulmonar (41.62/100000), TB meníngea (0.61/100000) y TB en otras formas (5.49/100000); siguiéndole en incidencia de TB pulmonar Chiapas (30.78/100000), Tamaulipas (30.61/100000) y Guerrero (29.91/100000); en incidencia de TB meníngea, Baja California Sur (0.42/100000) y Veracruz (0.41/100000); y en incidencia de otras formas de TB, Nayarit (4.67/100000), Morelos (3.4/100000), Querétaro (3.37/100000) y Jalisco (3.31/100000) (Fig. 7) (Anuarios de Morbilidad, 1984-2003).

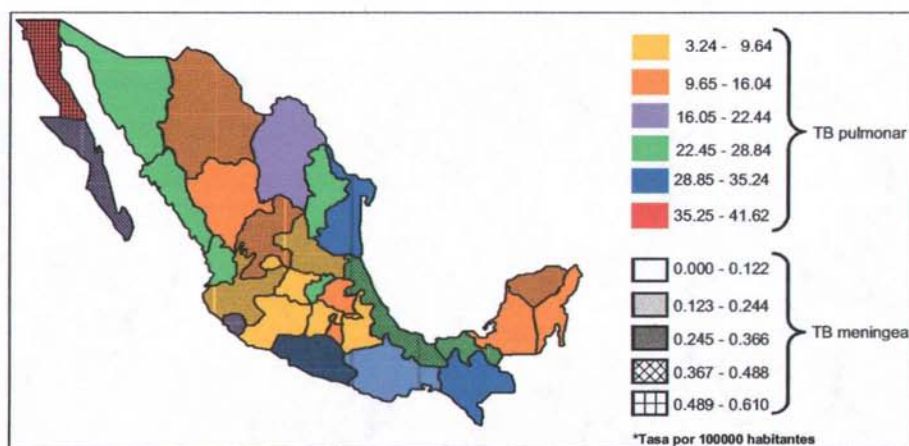


Figura 7. Mapa de incidencia de tuberculosis pulmonar y meníngea en México en el 2003.

1.1.7. Clasificación actual de la tuberculosis

Esta clasificación se basa en la relación hospedero-parásito descrita por la historia de exposición, infección y enfermedad, según lineamientos recomendados por el Comité para la Revisión de los Estándares de Diagnóstico de la Sociedad Torácica Americana y el CDC de Estados Unidos (American Thoracic Society, 2000).

Clase 0: No hay exposición al bacilo, no hay infección.

Son las personas sin antecedentes de exposición al bacilo y prueba tuberculínica negativa, habiendo descartado el efecto Booster⁴.

Clase 1: Exposición al bacilo, sin infección.

Sujetos con antecedentes de exposición al bacilo y prueba tuberculínica negativa. Si la exposición ha ocurrido en los últimos tres meses requiere seguimiento y posible quimioprofilaxis primaria en el caso de contactos íntimos.

Clase 2: Infección tuberculosa, sin enfermedad.

Cuando la prueba tuberculínica es positiva y la clínica y exploraciones complementarias no muestran hallazgos patológicos. En algunos casos estos pacientes requerirán quimioprofilaxis secundaria.

Clase 3: Tuberculosis (enfermedad) clínicamente activa.

Paciente con historia clínica y exploraciones complementarias que conducen al diagnóstico aunque el criterio definitivo lo constituye el aislamiento del bacilo de Koch.

Clase 4: Tuberculosis (enfermedad) sin actividad clínica

Son sujetos con historia previa de tuberculosis o lesiones radiológicas específicas estables y prueba tuberculínica positiva, en los que no se aísla el bacilo y no existe evidencia clínica y/o exploraciones complementarias que sugieran enfermedad activa.

Clase 5: Sospecha de tuberculosis.

Son pacientes con signos o síntomas que inducen a plantear el diagnóstico de tuberculosis. Están pendientes de completar el estudio. No deberían permanecer más de tres meses sin confirmar o descartar el diagnóstico.

⁴ Efecto amplificador del diámetro de la reacción luego de repetidas aplicaciones de la prueba de tuberculina; es una reactivación inmunológica en ausencia de nueva infección, provocada por el efecto de la primera aplicación de PPD sobre los linfocitos T de memoria (CD45+)

1.1.8. Sintomatología

Lo severo del toser, posiblemente con sangre presente, es la muestra clásica de la enfermedad. Los individuos también experimentan pérdida de peso (Fig. 8), falta de apetito, letargo, y fiebre. Es importante observar que una persona infectada con TB puede sentirse sana, pero tener una tos persistente.



Figura 8. Caso de tuberculosis aguda en una mujer de Etiopía en el 2000. Tomado de BBC News.

La infección por lo general se presenta lentamente. Los primeros síntomas son tos con espectoración. Mientras que progresa la infección, la persona puede escupir regularmente sangre y tener respiración agitada. Una radiografía de tórax puede revelar una infección. Sin embargo, el análisis del esputo tomado a una persona infectada es necesario para distinguir la infección de la tuberculosis. El tratamiento con los antibióticos a menudo no es eficaz, incluso cuando se utilizan en combinación varias drogas. Drogas más nuevas pronto estarán disponibles con las cuales se retrasará la progresión de tales infecciones en personas con SIDA u otras enfermedades que deterioran el sistema inmune. Los síntomas incluyen fiebre, anemia, desórdenes sanguíneos, diarrea, y dolor de estómago. Aunque los antibióticos pueden aliviar temporalmente síntomas, la infección a menudo es fatal a menos que la respuesta inmune del cuerpo mejore. Los casos leves en la gente sin SIDA pueden curarse sin el tratamiento (Holvey *et al*, 1974).

1.1.9. Desarrollo de la tuberculosis

La infección primaria ocurre cuando las partículas de polvo que contienen bacterias viables se ingieren y alojan en los pulmones. Tras la llegada de los gérmenes al espacio aéreo pulmonar se ponen en marcha los mecanismos de defensa con el fin de eliminarlos. Si la inhalación de bacilos es mínima, éstos son fagocitados y destruidos por los propios macrófagos pulmonares, sin desarrollarse la infección; por el contrario, si los macrófagos no pueden eliminar directamente los bacilos tuberculosos, éstos se multiplican en su interior, al mismo tiempo que se ponen en marcha diversos mecanismos de respuesta inmune celular. Los macrófagos estimulan a los linfocitos T que a su vez activan al macrófago y promueven su proliferación a partir de los monocitos reclutados de la sangre periférica. Con ello se origina un acúmulo de células mononucleadas alrededor del foco de infección que se transformarán en células epitelioides y algunas llegarán a formar células gigantes multinucleadas, conocidas como células de Langhans (Kobzik, 2000).

Esta formación se conoce como granuloma (Fig. 9) y se produce entre las tres y diez semanas después del contacto con el bacilo tuberculoso; la lesión aún no es visible radiológicamente, pero se acompaña de la aparición en sangre de linfocitos sensibilizados de forma específica, y por tanto, de la posibilidad de desarrollar respuestas inmunes localizadas como es el caso de la reacción tuberculínica. En su periferia se acumulan linfocitos mientras que el centro de la lesión puede presentar necrosis, conociéndose ésta como necrosis caseosa. Este foco, junto con los ganglios linfáticos vecinos afectados, forman el complejo tuberculoso primario (Kobzik, 2000).

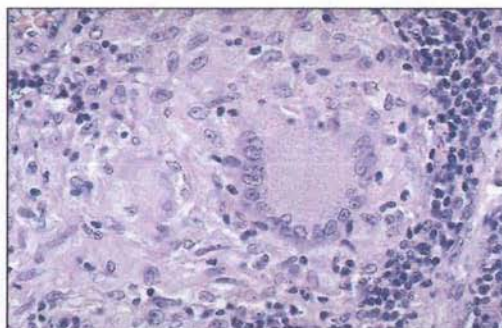


Figura 9. Granuloma de *Mycobacterium tuberculosis*

La infección pulmonar aguda sobreviene seguida de la destrucción masiva del tejido pulmonar y de la migración bacteriana a otras partes del cuerpo. La lesión puede afectar a un vaso sanguíneo y desde ahí propagarse hacia las zonas ricas en oxígeno como los vértices pulmonares, el parénquima renal o las epífisis de los huesos largos. En el 90% de los casos, los bacilos contenidos en estas lesiones quedarán en estado latente y no progresan hacia una enfermedad clínicamente aparente. Estos pacientes tienen una infección tuberculosa y pueden ser identificados fácilmente mediante una prueba de tuberculina positiva. En el 10% de casos restantes, se produce una progresión de la lesión, generalmente localizada en el pulmón, dando origen a la enfermedad tuberculosa, con manifestaciones clínicas, radiológicas y con presencia de bacilos en el esputo. La progresión a enfermedad tiene lugar en el 5% de los casos de forma temprana, durante los 5 años siguientes al contacto, mientras que en el otro 5% de los casos se produce un largo intervalo, en ocasiones de varias décadas, entre la infección y el desarrollo de la enfermedad (Kumate *et al*, 2001).

1.1.10. Respuesta inmune a tuberculosis

La principal defensa en el pulmón son los macrófagos alveolares, pero *M. tuberculosis* tiene una gran capacidad de sobrevivir y proliferar dentro de los macrófagos alveolares inactivos (Fig. 10) , ya que los macrófagos activos sí son capaces de matar a la bacteria. Entre los receptores implicados en la entrada de tuberculosis al macrófago están incluidos receptores del complemento CR1, CR3 y CR4, receptores de manosa y el receptor de proteína surfactante A (SPA-R) (Downing *et al.*, 1995). La unión de *M. tuberculosis* a CR3 por un mecanismo no opsónico, resulta en disminución o ausencia de estallido respiratorio; otra ventaja para el uso de CR3 por *M. tuberculosis* es que esta unión puede conducir a una respuesta inmune Th2 por la supresión de la producción de interleucina 12 (IL-12) por los macrófagos (Velasco-Velazquez *et al*, 2003).

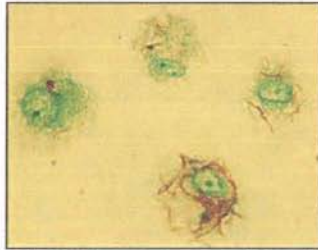


Figura 10. *M. tuberculosis* en macrófagos humanos

En la respuesta inmune hay una interacción entre macrófagos, linfocitos y *M. tuberculosis*. Los macrófagos tienen un papel central al producir una variedad de sustancias tóxicas las cuales están involucradas en matar a la micobacteria pero también pueden causar destrucción de tejido del hospedero. La secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es responsable de los efectos sistémicos como fiebre, pérdida de peso, etc.

Los granulomas se forman cuando la micobacteria no puede ser eliminada totalmente, esto como respuesta del hospedero para limitar la diseminación de la infección. El estado de la micobacteria en el centro del granuloma no es claro, ya que es incapaz de replicarse pero puede sobrevivir en un estado latente.

La respuesta inmune celular contra infecciones de tuberculosis incluye una red celular compleja bidireccional e interacciones de citocinas (Fig. 11). Entre las citocinas más conocidas se encuentran las de tipo Th1 (IL-2, IL-12, INF- γ) las citocinas de tipo Th2 (IL-10 e IL-4) y las citocinas proinflamatorias (TNF- α y TGF- β). Se ha observado que aunque los linfocitos T CD4⁺ tiene un papel clave, como es de esperarse para la infección intrafagosomal, también es importante la función de linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$ (Trucksis, 2000). La respuesta celular ha sido estudiada usando modelos murinos pero se han encontrado diferencias entre el modelo y la respuesta del humano a estas infecciones. La acción de IFN- γ en los modelos murinos es la inducción de óxido nítrico sintetasa, produciendo principalmente óxido nítrico, el cual juega un papel importante en la destrucción de la micobacteria en ratones, pero la importancia de estos mecanismos en humanos es controversial (Barnes *et al*, 1993).

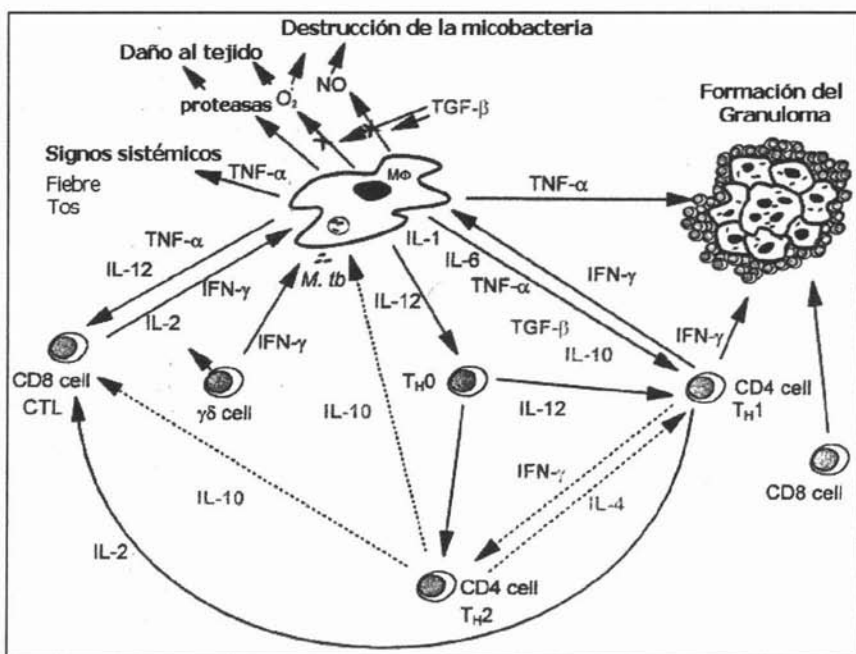


Figura 11. Modelo de la respuesta inmune celular contra tuberculosis. Tomado de Trucksis, 2000.

El papel de las células dendríticas (DC) durante la respuesta inmune a *M. tuberculosis* ha sido estudiada recientemente. Experimentos en ratones demostraron que las DC son las células responsables de activar la respuesta inmune temprana *in vivo* a *M. tuberculosis*. Se ha demostrado que las DC son células huésped de las micobacterias y juegan un papel exclusivo en la estimulación de la respuesta celular T (Jaio *et al*, 2002).

El sistema clásico para la presentación de antígenos a células T vía MHC clase I y II es complementada por moléculas de la familia CD1. El humano expresa 5 diferentes genes de CD1: CD1a, CD1b, CD1c que comprenden el grupo I CD1; CD1d y CD1e son miembros del grupo II CD1. El grupo I CD1 son expresados en timocitos corticales y en células presentadoras de antígenos (APC) como células de Langerhans y DC (Lawton y Kronenberg, 2004). Algunos estudios han establecido que el grupo I CD1 presentan

glicolípidos, abundantes constituyentes de la pared celular de diferentes especies micobacterianas incluyendo *M. tuberculosis*, a distintos grupos de células T (Schaible *et al*, 2000).

1.1.11. Diagnóstico

Existen diferentes métodos de diagnóstico para tuberculosis activa, de los cuales la baciloscopía y el cultivo son los de mayor uso. La baciloscopía es el estudio microscópico de la secreción bronquial que permite la rápida visualización de las micobacterias mediante el uso de varias técnicas de tinción que se basan en las propiedades ácido-alcohol-resistentes del bacilo el cual retiene ciertos colorantes a pesar de ser tratados con alcohol y ácidos. En este hecho se basa la técnica de Zhiel-Nielsen, en la que se emplea como colorante fucsina fenicada calentada, decolorada con ácido-alcohol y contrateñida con azul de metileno. La tinción de Kinyoun es similar, pero no utiliza el calor para favorecer la captación de la tinción. Las técnicas fluorocrómicas con auramina-rodamina se basan en el mismo principio básico, pero permiten una más rápida y más cómoda visualización de las micobacterias que muestran una fluorescencia amarilla anaranjada cuando se observan con microscopio de campo oscuro (Fig. 12). Con cualquiera de estas técnicas, las micobacterias se observan como un bacilo de menos de 0.5 mm de diámetro que puede formar parejas o grupos característicos de unos pocos microorganismos en forma de cuerdas. La principal desventaja es la baja sensibilidad para el diagnóstico (30-70%), además de que este método es inútil para diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, y la necesidad de ser reproducido durante tres días consecutivos, y tampoco permite la identificación de la especie que está infectando (Heifets y Good, 1994).



Figura 12. *M. tuberculosis* teñida con auramina-rodamina

El cultivo es generalmente específico, pero exige un tiempo muy prolongado de entre 4 a 12 semanas, utilizando los medios de cultivos selectivos Löwenstein-Jensen (Fig. 13) y Middlebrook. Al igual que la baciloscopía, el cultivo es inútil para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar, y en este caso necesita de una infraestructura costosa, además que hay la posibilidad de encontrar resultados falsos positivos (Heifets y Good, 1994).



Figura 13. *M. tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen

Otro método de diagnóstico es por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual la hibridación con sondas de DNA o RNA permite la rápida identificación de la especie de micobacteria aislada en cultivo con una sensibilidad del 95% y especificidad del 98%, pero es poco sensible a partir de muestras clínicas presentando una sensibilidad del 48-53%, la especificidad es de aproximadamente 95% (American Thoracic Society, 2000). Su costo es elevado y requiere de infraestructura especial (Heifets y Good, 1994).

En el caso de la tuberculosis latente, la única prueba actual de uso generalizado es conocida como la prueba de la tuberculina, que se utiliza para medir hipersensibilidad de tipo retardado⁸⁹. La tuberculina, una mezcla de proteínas extraídas de *M. tuberculosis*, se inyecta en un individuo vía subcutánea. Si en el área se observa una reacción inflamatoria localizada en un plazo de 1-3 días, los resultados se consideran tuberculina-positivos. La induración y el edema indica que la persona se ha expuesto al organismo, pero puede no

⁸⁹ Reacción inflamatoria inducida por citocinas secretadas por linfocitos Th1 activados previamente por contacto con el o los antígenos, caracterizada por el acumulo de macrófagos y células T al foco infeccioso; este acumulo junto con el fibrinógeno que sale a tejido y se convierte en fibrina hacen que el tejido se hinche y se vuelva duro (induración). Los síntomas comienzan 25 hrs después del contacto secundario con el antígeno pero es mayor a las 48-72 hrs.

tener la enfermedad (Fig. 14). Para la mayoría de los individuos, la protección inmune ganada contra una exposición anterior es de por vida.



Figura 14. Persona tuberculina-positiva

1.1.12. Tratamiento

Los fármacos antituberculosis destruyen a la micobacteria o inhiben su multiplicación, deteniendo así la progresión de la tuberculosis y previniendo la mayoría de complicaciones de la enfermedad primaria. Los medicamentos antituberculosis poseen tres propiedades fundamentales en grados diferentes: su capacidad bactericida, su capacidad esterilizante y su capacidad de prevenir la resistencia.

La isoniacida y la rifampicina son los bactericidas más potentes, activos contra todas las poblaciones de bacilos de tuberculosis. La pirazinamida y la estreptomina tienen también propiedades bactericidas contra ciertas poblaciones de bacilos. La pirazinamida es activa en medio ácido contra los bacilos que se encuentran en el interior de los macrófagos. La estreptomina es activa contra los bacilos en fase de multiplicación extracelular rápida. El etambutol y la tioacetazona son medicamentos bacteriostáticos que se asocian a medicamentos bactericidas más potentes para evitar la emergencia de bacilos resistentes (World Health Organization, 2003).

En la tabla 1 se presentan los medicamentos antituberculosis esenciales, su modo de acción, la dosis recomendada, y los efectos secundarios más habituales de estos medicamentos.

Tabla 1. Medicamentos antituberculosis esenciales (World Health Organization, 2003; American Academy of Pediatrics, 2001).

Fármaco (Abreviatura)	Acción	Dosis recomendada (mg/kg)			Reacciones adversas
		Diaria	3 veces por semana	2 veces por semana	
Isoniacida (H)	bactericida	5	10	15	Ligera elevación de enzimas hepáticas, neuritis periférica, hipersensibilidad
Rifampicina (R)	bactericida	10	10	10	Color naranja de las secreciones o de la orina, vómito, hepatitis, reacciones semejantes a influenza, trombocitopenia; los anticonceptivos orales pueden ser ineficaces
Pirazinamida (Z)	bactericida	25	35	50	Efectos hepatotóxicos, hiperuricemia
Estreptomina (S)	bactericida	15	15	15	Efectos tóxicos auditivos y vestibulares, efectos nefrotóxicos, erupción cutánea
Etambutol (E)	bacteriostático	15	30	45	Neuritis óptica (generalmente reversible), disminución de la discriminación del color verde-rojo, alteraciones gastrointestinales, hipersensibilidad
Tioacetazona (T)	bacteriostático	2.5	No corresponde		Nauseas, vómito, diarrea, erupciones cutáneas; es altamente tóxico en individuos con VIH

Para el tratamiento de la tuberculosis crónica y casos de tuberculosis con cepas MDR se utilizan fármacos de segunda generación. El régimen del tratamiento debe incluir al menos la combinación de 4 medicamentos; en una fase inicial de mínimo 6 meses la cual se continúa con una fase de sostén de 12 a 18 meses (World Health Organization, 2003). En la tabla 2 se muestran los medicamentos antituberculosis de segunda generación, su modo de acción, dosis recomendada y los efectos secundarios a estos fármacos.

Tabla 2. Medicamentos antituberculosis de segunda generación (World Health Organization, 2003; American Academy of Pediatrics, 2001).

Fármaco de 2ª generación (Abreviatura)	Acción	Dosis diaria recomendada			Reacciones adversas
		Promedio (mg/kg)	Mínima (mg)	Máxima (mg)	
amikacina (Am)	bactericida	15	750	1000	Efectos ototóxicos y nefrotóxicos
capreomicina (Cm)	bactericida	15	750	1000	Efectos ototóxicos y nefrotóxicos
ciprofloxacina (Cx)	bactericida	10-20	1000	1500	Efecto sobre el cartilago en crecimiento, alteraciones gastrointestinales, erupción cutánea, cefalea
cicloserina (Cs)	bacteriostático	10-20	500	750	psicosis, cambios de personalidad, convulsiones, erupción cutánea
etionamida (Et)	bactericida	10-20	500	750	Alteraciones del tracto gastrointestinal, efectos hepatotóxicos, reacciones de hipersensibilidad
kanamicina (Km)	bactericida	15	750	1000	Efectos tóxicos auditivos y vestibulares, efectos nefrotóxicos
ofloxacina (O)	bactericida	7.5-15	600	800	Efecto sobre el cartilago en crecimiento, alteraciones gastrointestinales, erupción cutánea, cefalea
ácido paramino salicílico (PAS)	bacteriostático	150	8 g	12 g	Alteraciones del tracto gastrointestinal, hipersensibilidad, efectos hepatotóxicos
protionamida (Pt)	bactericida	10-20	500	750	Alucinaciones, depresión, hipoglicemia, hipotiroidismo, hepatitis, alteraciones menstruales, impotencia, cefalea, neuropatía periférica

1.1.13. Prevención

Ciertos individuos están predispuestos a la infección por distintos factores, como desequilibrios hormonales, el envejecimiento, la desnutrición y la infección con VIH. Actualmente, la OMS propone programas diseñados para supervisar la medicación evitando

así la aparición de más cepas MDR. La vacuna de la tuberculosis, conocida como bacilo Calmette-Guérin (BCG) (Fig. 15) puede prevenir la extensión de la tuberculosis y de la meningitis tuberculosa en niños. Pero la vacuna no protege necesariamente contra la tuberculosis pulmonar.

Factores limitantes para el control de la tuberculosis son vacunas de pobre eficacia, falta de un diagnóstico rápido y el desconocimiento de los mecanismos de patogenia del bacilo tuberculoso.



Figura 15. Vacuna BCG

1.2. PARED CELULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*

La pared celular de las especies micobacterianas consisten no sólo de peptidoglicanos, sino también de un gran número de glicolípidos. La presencia de estos lípidos hacen a la bacteria impermeable. Las propiedades de la pared celular se atribuyen al complejo peptidoglicano-arabinogalactano-micolatos (mAGP), que es un polímero formado por unidades de lípidos, azúcares y aminoácidos. Unido al peptidoglicano por medio de enlaces fosfodiéster hay un polisacárido ramificado llamado arabinogalactano, cuyo extremo distal está esterificado con ácidos micólicos (ácidos grasos de alto peso molecular) con tamaño y características únicas en las micobacterias. Este complejo mAGP forma el esqueleto de la pared celular. Asociado a este esqueleto existen una gran cantidad de lípidos y glicolípidos libres, los cuales no están ligados covalentemente (Fig. 16) (Bersa y Chatterjee, 1994).

La pared celular rica en lípidos de la micobacteria tiene ciertas propiedades que la defienden de los procesos microbicidas del hospedero, lo cual puede contribuir a su

capacidad de sobrevivir en los macrófagos inactivos. Se sabe que los lípidos de la pared celular micobacteriana se producen en abundancia durante la infección y que algunos de estos lípidos se pueden difundir hacia las membranas e insertarse en ellas (Beatty *et al.*, 2000), lo cual podría alterar la organización lipídica de las membranas de la célula hospedera y por lo tanto el funcionamiento de éstas.

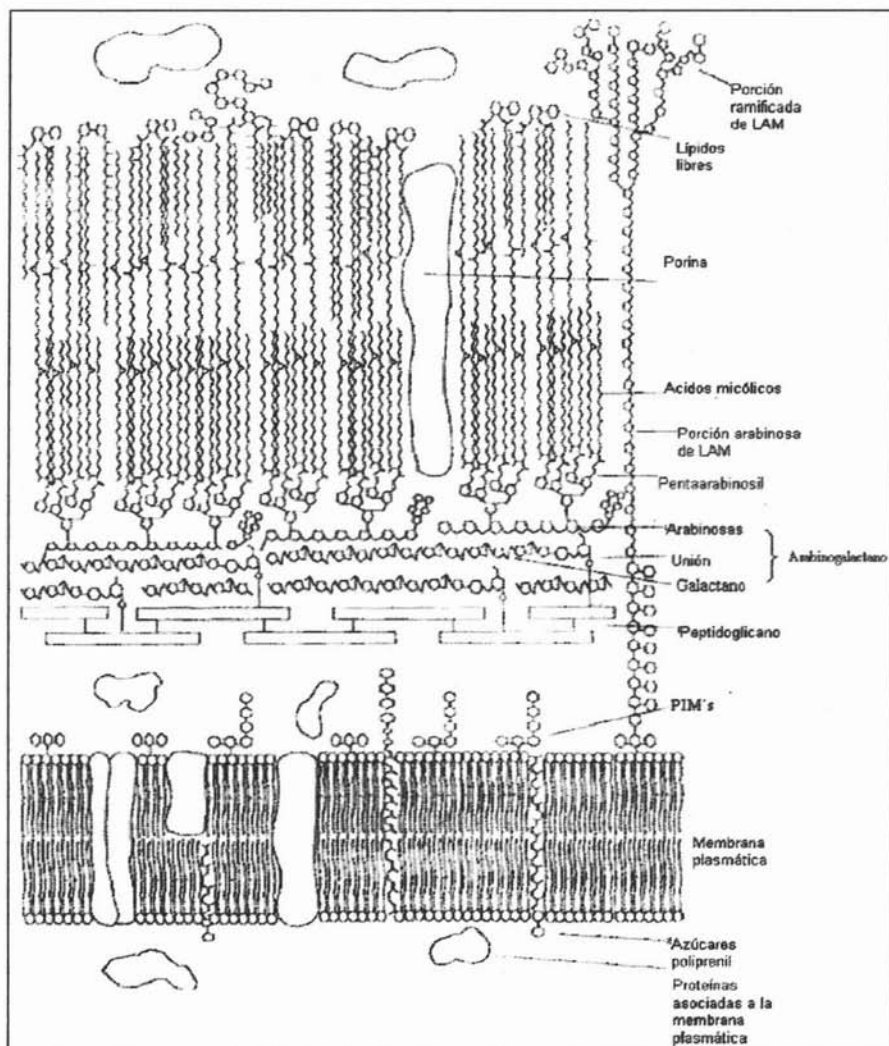


Figura 16. Esquema de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

Entre las funciones que se pueden ver alteradas encontramos la permeabilidad de las membranas, lo cual disminuye o incrementa la permeabilidad pasiva al agua o moléculas solubles, la rigidez membranal, también puede cambiar la polaridad o hidrofobicidad de la superficie al introducirse un gran número de carbohidratos diferentes a los normalmente presentes. Estos efectos pueden así mismo alterar el reconocimiento entre células (macrófagos y linfocitos), la fusión de membranas como es la formación del fagolisosoma, la transferencia de electrones en mitocondria y en la membrana plasmática, la concentración iónica de los organelos y el pH (Beatty *et al*, 2000).

Las características tan especiales de la pared celular micobacteriana con su gran contenido de lípidos polares y apolares dan bases para relacionarlos con la virulencia y patogenicidad de la bacteria. Los principales lípidos apolares encontrados en *M. tuberculosis* son los triacilglicéridos, los cuales son reservas de energía y están generalmente contenidos en vacuolas intracelulares.

2.1. PDIMs

El componente apolar mayor de las vacuolas de la pared celular es la familia de las ceras denominadas dimicocerosatos de ftiocerol (PDIMs); éstos son compuestos de ácidos micocerósicos esterificados (Fig. 17) con dioles de cadena larga denominados ftioceroles (Minnikin *et al.*, 1991).

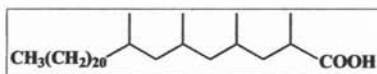


Figura 17. Ácido micocerósico

1.2.2. Acil-trealosas

Los mayores componentes de lípidos polares libres son las trealosas aciladas las cuales difieren considerablemente de los patrones de acilación por trealosa y en contenido de ácidos grasos. Estos componentes incluyen las acil-trealosas neutras y los sulfátidos, que son aciltrealosas ácidas por su contenido en sulfato (Brennan, 1988).

2.2.a. DAT

La 2,3-di-O-aciltrealosa (DAT) es un glicolípido relativamente polar de *M. tuberculosis* localizado hacia la parte externa de la pared celular, que contiene una combinación de ácidos grasos de cadena lineal con micocerosatos de 21 a 25 átomos de carbono (Fig. 18) (Besra *et al.*, 1992). Recientemente se ha reportado que este glicolípido inhibe la proliferación celular de linfocitos en modelos murinos (Saavedra *et al.*, 2001).

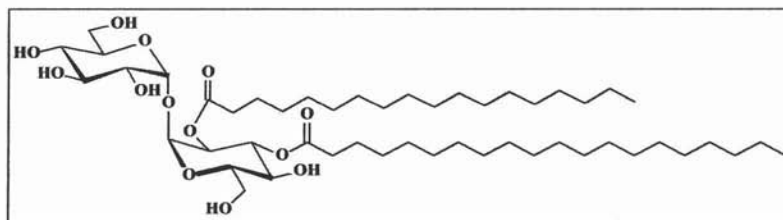


Figura 18. 2,3-di-O-aciltrealosa

1.2.2.b. Sulfolípidos

Los sulfolípidos (Fig. 19) de *M. tuberculosis* son los componentes más característicos de la pared celular de cepas virulentas (H37Rv y Erdman) de *M. tuberculosis* y no son comúnmente encontrados en cepas atenuadas de *M. tuberculosis*. Estos sulfolípidos son de la familia de ésteres de trealosa-2-sulfato (Rivera-Marrero *et al.*, 2002). Los principales ácidos grasos esterificados para una variedad de posiciones de trealosa son los tioceránicos, hidroxitioceránicos y palmitato o ácido graso esteárico. Estos glicolípidos se les ha asociado como factor de virulencia ya que se ha demostrado que la inactivación del gen *mmpL8* de *M. tuberculosis*, determinante para la biosíntesis del sulfolípidos SL-1, conduce a la generación de un fenotipo atenuado claramente menos virulento en el modelo murino (Domenech *et al.*, 2004). También se ha propuesto su participación en mecanismos de activación y señalización celular de neutrófilos y macrófagos (Brozna, 1991).

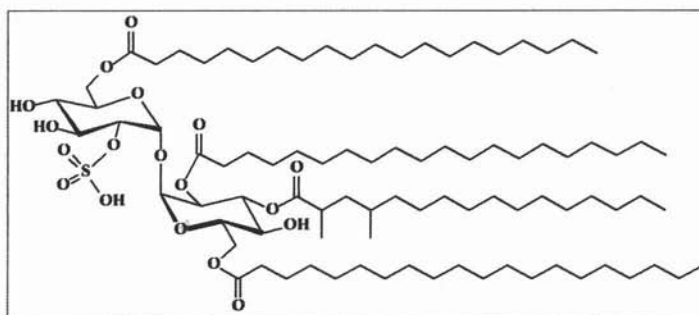


Figura 19. Estructura representativa de los sulfolípidos

2.2.c. TATs

Las triacil trealosas (TATs) (Fig. 20) son glicolípidos presentes en el complejo *M. tuberculosis*, así como en *M. fortuitum*. Contienen ácidos grasos α,β -no saturados específicos del bacilo de Koch, con sustituyentes fitenoil, una familia de multimetilos ramificados con 25 y 27 átomos de carbono en *M. tuberculosis*; y en *M. fortuitum* posee 19 átomos de carbono (Muñoz *et al*, 1997). Además *M. fortuitum* sintetiza 2,3,4-tri-acil-trealosa y 2,3,6-tri-acil-trealosa mientras que *M. tuberculosis* sólo expresa la última.

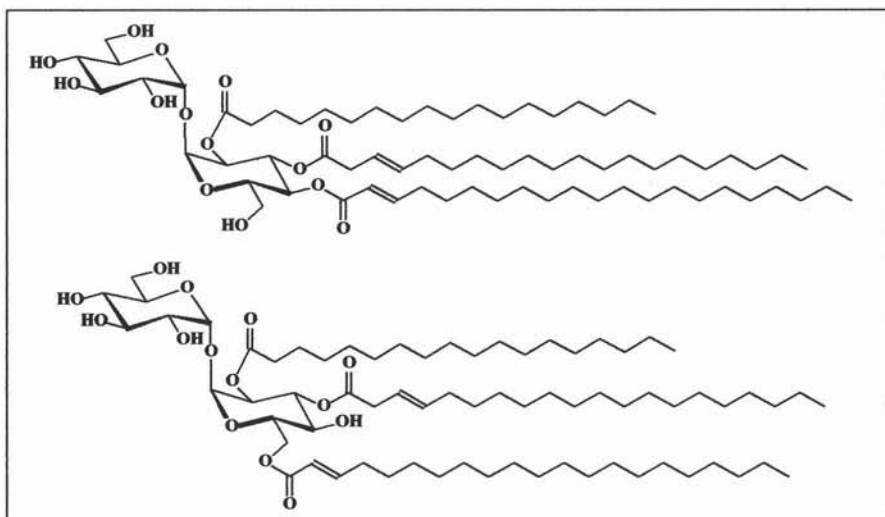


Figura 20. Triacil trealosas de *M. fortuitum*. (a) 2,3,4-tri-acil-trealosa. (b) 2,3,6-tri-acil-trealosa.

1.2.3. DMT

El 6,6'-dimicoloil- α -D-trealosa (dimicolato de trealosa, DMT) (Fig. 21), llamado también “factor cuerda” es un glicolípido asociado a la pared celular del género *Mycobacterium*, y a otros taxa como *Corynebacterium* y *Nocardia*. Probablemente es el lípido mejor estudiado en las micobacterias, y a la fecha se han reportado propiedades inmunológicas como la inducción de IL-4, IL-6 e IL-10 después de la exposición de células de ratón al DMT, así como la influencia en el macrófago para la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-8) (Indrigo *et al*, 2003); también se ha visto la inducción de anticuerpos contra los ácidos micólicos más que contra los carbohidratos del DMT, esto en modelos de conejo y confirmado con sueros de pacientes humanos infectados con *M. tuberculosis* (Pan *et al*, 1999).

Al DMT se le considera un poderoso inmuno estimulante, y se ha visto que induce la expresión de IL-12 e INF- γ (Oswald *et al*, 1997). Se ha visto que sobre regula la expresión del MHC clase II y de CD1d1 en macrófagos, lo cual incrementa la producción de células Th1, con lo cual se ha propuesto el usar DMT como adyuvante en una vacuna (Ryll *et al*, 2001). El DMT puede directamente inducir quimiocinas requeridas para la agregación inicial de células así como las citocinas necesarias para la estabilización y activación de la formación del granuloma (Ryll *et al*, 2001a). También se ha visto implicada en la angiogénesis a través de la inducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-8 (Saita *et al*, 2000).

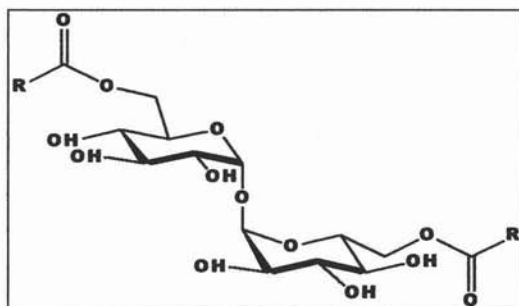


Figura 21. 6,6'-dimicolato de trealosa. R son los residuos de ácidos micólicos

1.2.4. LAM

Los lipoarabinomananos (LAM) son lipoglicanos de la superficie de la micobacteria y aparecen como las moléculas no peptídicas más potentes en la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Nigou *et al.*, 2003), y como moléculas que probablemente contribuyen a la persistencia del bacilo.

Los LAM son moléculas anfipáticas que presentan una estructura tripartita que incluye un ancla de manosil-fosfatidil-myo-inositol (MPI), un esqueleto de polisacáridos compuesto de D-manano y D-arabinano, y finalmente capuchones* (Chatterjee *et al.*, 1998). De acuerdo con la estructura del capuchón se definen tres tipos de LAM (Fig. 22): ManLAM, PILAM y AraLAM; ManLAM se ha descrito en micobacterias de crecimiento lento, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG; los PILAM fueron encontrados en micobacterias de crecimiento rápido, *M. smegmatis* y *M. fortuitum*; AraLAM es descrito en *M. chelonae* (Guerardel *et al.*, 2002). ManLAM y PILAM tienen un amplio espectro de actividades inmunomodulatorias (Tabla 3), también pueden modular funciones del macrófago como la producción de citocinas (Nigou *et al.*, 2003).

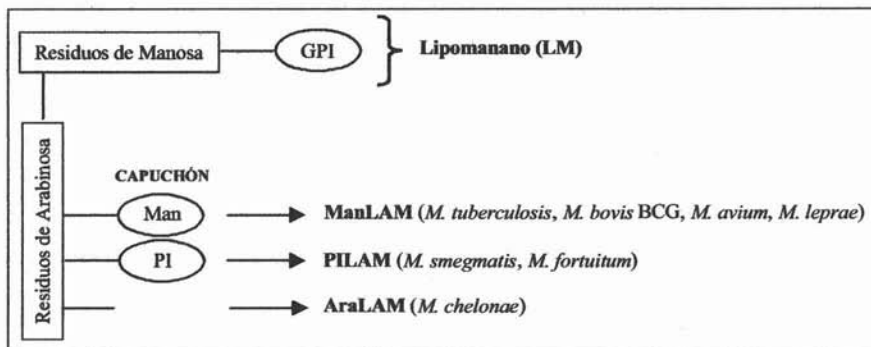


Figura 22. Representación esquemática del LAM.

* Residuos de manosa, de fosfatidil inositol o arabinosa que se encuentran en la parte más externa del LAM.

Tabla 3. Sumario de las actividades biológicas del LAM. Tomado de Nigou *et al*, 2003.

ManLAM	PILAM
<i>Receptores/blancos del hospedero</i>	
MR, SP-A, SP-D, MBP, DC-SING	CD14
Integración directa en membrana plasmática	Integración directa en membrana plasmática
<i>Modulación de funciones del macrófago</i>	
Supresión de proliferación de células T dependiente de MΦ	Activación de MΦ via TLR2
Inhibición de la activación de MΦ mediada por INF-γ	Estimulación de la producción de nitratos y óxido nítrico por el MΦ
Inactivación de radicales libres de oxígeno potencialmente citotóxicos	Inducción de la expresión de PTX3
Inhibición de apoptosis de MΦ inducida por M. tuberculosis al alterar la señalización celular dependiente de Ca ²⁺	Inducción de apoptosis
Promoción de la supervivencia de MΦ por la fosforilación de Bad a través de la ruta de fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt	
Activación de fosfotirosina fosfatasa SHP-1	
Inducción de la sintasa inducible del óxido nítrico (INOS)	
Estimulación de la actividad de la matriz metaloproteínasa-9 (MMP-9)	
<i>Modulación de secreción de citocinas</i>	
Inhibición de la producción de IL-12 y TNF-α por THP-1 y células dendríticas humanas	Estimulación de la secreción de TNF-α e IL-12 por MΦ
	Estimulación de la secreción de IL-1 por monocitos
	Estimulación de la secreción de quimiocinas: IL-8, Gro-α, MCP-3, y los productos de los genes <i>JE</i> y <i>KC</i>
<i>Estimulación de linfocitos T</i>	
Estimulación de linfocitos T αβ CD4 ⁺ CD8 ⁻ via presentación por CD1b y CD1c	

1.2. Anticuerpos monoclonales (MABS)

1.3.1. mAbs contra antígenos de *Mycobacterium*

Las micobacterias producen una gran variedad de glicolípidos que se localizan en la pared celular; estas moléculas representan potenciales factores de virulencia ya que interactúan con las células inmunes del hospedero y contribuyen a la patogenicidad de la bacteria. Se ha reportado que glicolípidos característicos de *M. tuberculosis* como DAT, TAT y DMT brindan una alta eficacia para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (Chan *et al*, 2000). Además, se han realizado estudios sobre la respuesta humoral contra glicolípidos como DAT, DMT, SL-1 y PGL en modelos murinos, en los cuales se ha logrado producir anticuerpos contra estos (Cardona *et al*, 2002).

La purificación y caracterización de los glicolípidos de *Mycobacterium* como antígenos, llama la atención para su uso en el serodiagnóstico de la tuberculosis y el estudio de la patogénesis de esta enfermedad. El microanálisis de glicolípidos es facilitado con la utilización de anticuerpos monoclonales los cuales son específicos para secuencias y estructuras bien establecidas. Estos anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos se usan para la clonación y caracterización de los genes responsables de la expresión del antígeno (Cho *et al.*, 1992).

Anticuerpos monoclonales contra numerosos antígenos de *Mycobacterium* han sido producidos y usados para la clonación y caracterización de los genes responsables para la expresión de los antígenos. Entre estos anticuerpos se encuentra el producido contra el glicolípidos fenólico (PGL-Tb) el cual ha sido usado en la detección de antígeno en muestras clínicas (Cho *et al*, 1992). Otros anticuerpos se han generado contra glicopeptidolípidos (GPL) (Nishimori *et al*, 1987; Kolk AHJ *et al*, 1989), y un gran número contra proteínas, como las de 71, 65, 38, 23, 19, 14, 12, 28, 35 kD (Damiani *et al*, 1988; Rumshlag *et al*, 1990); también se han desarrollado anticuerpos contra lipoarabinomano y arabinogalactano (Cho *et al*, 1990; Glatman-Freedman *et al*, 1996; Olds *et al*, 1987); se han generado anticuerpos monoclonales contra la pared celular de *M. tuberculosis* y *M. avium* (Match *et al*, 1988; Wagner *et al*, 1992)

1.3.2. Principio de la obtención de mAbs

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son anticuerpos con una única especificidad, son obtenidos por la inmortalización de células B *in vitro*, las cuales contienen un gen particular de anticuerpo para producir una población de células idénticas (Zola, 2001; Nelson *et al*, 2000). En 1975 George Köhler y Cesar Milstein desarrollaron una técnica para la producción de mAbs a través de la fusión de células B de bazo con células de mieloma, a la célula resultante de esta fusión se le llama hibridoma. Desde entonces la técnica del hibridoma se ha convertido en uno de los pilares de la biotecnología con un gran impacto en la biología, medicina e industria (Milstein, 1999). Los mAbs son muy útiles en investigación básica y han facilitado el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico para los componentes del suero y del tejido fino y los agentes infecciosos (Pirofski *et al*, 1990).

El proceso para la generación de hibridomas en esencia comprende cinco pasos: inmunización, fusión, selección, screening y caracterización (Fig. 23). Los protocolos de inmunización varían dependiendo de la naturaleza del antígeno. La fusión se realiza mezclando células de bazo de un ratón inmunizado con células de mieloma, a la mezcla se añade polietilenglicol el cual estimula una fusión pasiva haciendo que las células se peguen y excluyendo el agua del ensamblaje (Zola, 2001).

Las células de mieloma usadas para la fusión presentan una deficiencia en la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT), lo que significa que estas células son incapaces de usar la vía alterna para la biosíntesis de purinas, característica esencial para el proceso de selección post-fusión. La ruta de novo para la biosíntesis de nucleótidos puede ser bloqueada con aminopterina; después de la fusión las células se siembran en medio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) en el cual sólo los hibridomas célula B-mieloma crecerán.

Cuando se observan colonias visibles en los cultivos es tiempo para probar el sobrenadante y su contenido de anticuerpos que generalmente va de 1-5µg/ml; cultivos negativos son eliminados y los positivos se clonan para garantizar que los anticuerpos provienen de una

sola célula (Zola H, 2001). Otro factor desafortunado es que algunos hibridomas son inestables y las células pierden la capacidad para producir anticuerpos (Nelson *et al*, 2000).

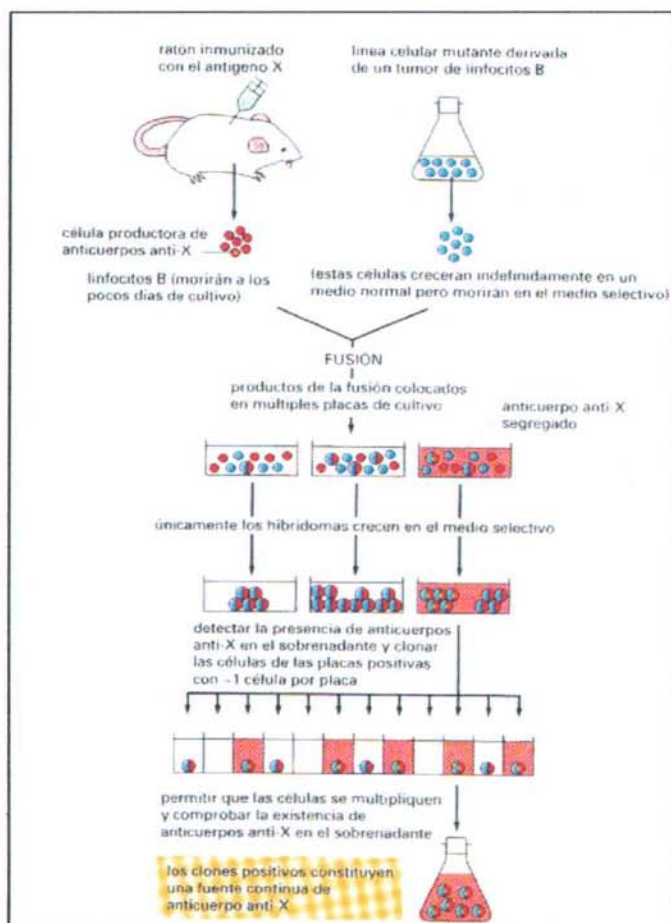


Figura 23. Esquema para la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Tomado de Alberts *et al*, 1996.

II. JUSTIFICACIÓN

Los glicolípidos libres de *Mycobacterium tuberculosis* sobresalen por diversas características: (1) poseen estructuras químicas originales que los hace únicos inclusive dentro del género *Mycobacterium*, (2) hay cada vez mayores evidencias de su posible papel en la patogenia de la enfermedad, (3) su especificidad y antigenicidad los convierten en potentes herramientas para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

El estado de conocimientos actual sobre los glicolípidos del bacilo tuberculoso y su papel en la patogenia de la enfermedad es aún incipiente. A pesar de la gran riqueza y variedad de lípidos de *Mycobacterium*, pocas son las moléculas grasas hasta ahora descritas por su capacidad de activar o modular la respuesta inmune del huésped. Más deficientes son aún los estudios que aborden los mecanismos de acción de glicolípidos con la célula huésped. En particular, muchos estudios celulares han sido facilitados por la disponibilidad de anticuerpos monoclonales en contra de los glicolípidos lipoarabinomanano y fosfatidilinositolmanósido, los cuales representan los lípidos libres mayormente estudiados en *Mycobacterium*. No existen, en cambio, anticuerpos monoclonales que puedan servir como herramienta de estudio para glicolípidos libres característicos de *M. tuberculosis* y restringidos a esta especie. Por otro lado, estos glicolípidos libres específicos del bacilo tuberculoso se han identificado como inductores de respuesta humoral muy específica en individuos con tuberculosis activa, por lo que la disponibilidad de anticuerpos monoclonales en contra de estos compuestos sería sumamente útil para fines de inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

La inducción de respuesta humoral en contra de compuestos lipídicos ha sido un factor limitante para la producción de anticuerpos monoclonales anti-lípidos, no solamente en el caso de *Mycobacterium* sino de manera general. Se sabe que la infección en el modelo murino con *Mycobacterium tuberculosis* resulta en una respuesta humoral en contra de glicolípidos libres, por lo que buscar estrategias para la inducción de esta con los lípidos purificados o tomados de especies micobacterianas menos patógenas es factible.

III. OBJETIVOS

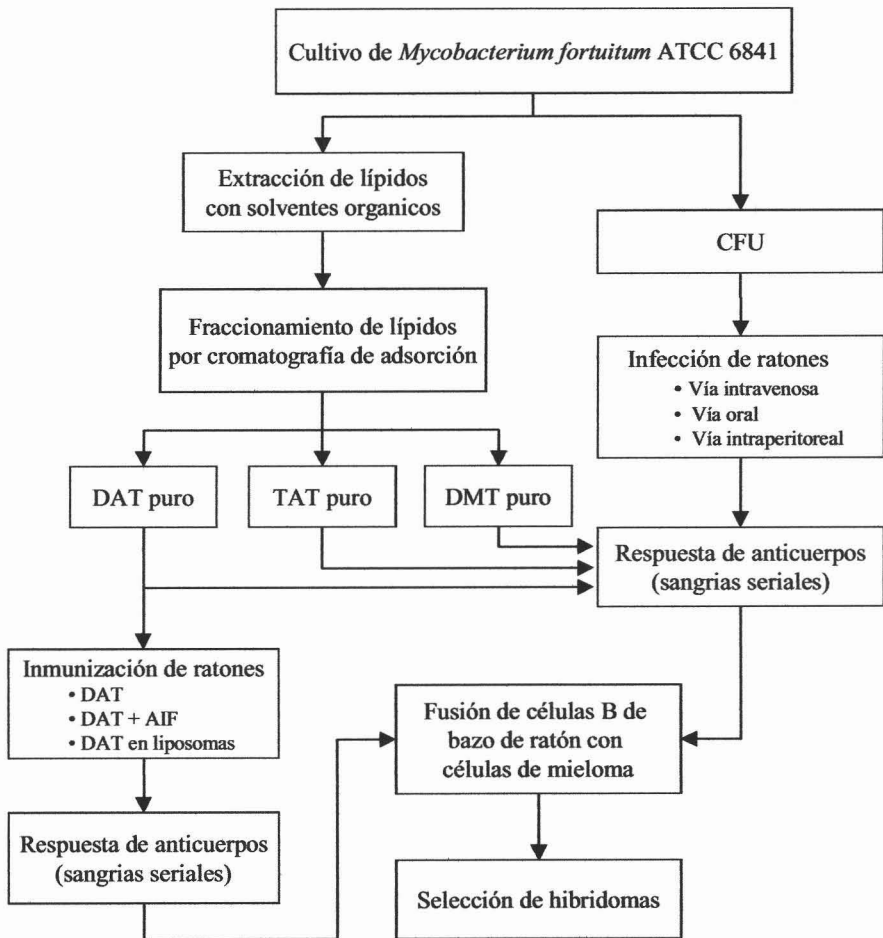
General

- Producir anticuerpos monoclonales en contra de glicolípidos libres basados en trealosas, característicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Particulares

- Purificar glicolípidos característicos de *Mycobacterium tuberculosis* a fin de utilizarlos como inmunógenos y como herramientas para el análisis de respuesta humoral en ratón.
- Producir respuesta humoral en ratón en contra de glicolípidos basados en trealosas (acil-trealosas y micoloil-trealosas), característicos de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Producir y seleccionar hibridomas productores de anticuerpos anti-glicolípidos de *Mycobacterium tuberculosis*.

IV. ESQUEMA METODOLÓGICO



V. METODOLOGÍA

5.1. OBTENCIÓN DE GLICOLÍPIDOS

5.1.1. Cultivo de micobacterias

Se usó la cepa ATCC 6841 de *Mycobacterium fortuitum* (conocida por compartir con *M.tuberculosis* los glicolípidos DAT, TAT y DMT). Las bacterias se cultivaron en medio Sauton a una temperatura de 37°C, por un periodo aproximado de 2 semanas.

5.1.2. Extracción de glicolípidos

Una vez que las bacterias alcanzaron un desarrollo adecuado se separaron del medio de cultivo por filtración. Las células recuperadas se colocaron en una mezcla de cloroformo-metanol (1:2, v/v) por una semana. El extracto obtenido se filtró y el residuo celular se colocó en una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v) por 1 hr en baño María a 50°C; los extractos se reunieron, fueron secados y concentrados en un rotavapor. Estos extractos fueron lavados por el método de Folch empleando una mezcla de cloroformo-metanol-agua (4:2:1, v/v/v). La fase orgánica se colectó y se secó con el rotavapor (Büchi R-114). De esta forma se obtuvo el extracto lipídico total (Escamilla *et al.*, 1996).

5.1.3. Purificación de glicolípidos

El extracto lipídico total se fraccionó en columnas de Florisil con cloroformo e incrementando la concentración de metanol en cloroformo (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 y 24 %). El análisis de las fracciones se hizo por cromatografía de capa fina (TLC) en placas de vidrio con sílica gel; en esta placa también se utilizaron estándares de DAT, TAT y DMT debidamente caracterizados con los que se cuenta en el laboratorio. Para la visualización de los glicolípidos, la placa se reveló con una solución de antrona y se calentó a 110°C durante 5 min (Saavedra *et al.*, 2001). Las fracciones que contenían los glicolípidos de interés se juntaron y se pasaron por otra columna de Florisil para un fraccionamiento más fino; al

igual que con la primera columna se usó como eluyente cloroformo; se incrementó la concentración de metanol (2, 4, 6, 8, 10 y 15 %) y las fracciones se analizaron por TLC.

5.1.3.a. Purificación de DAT

Las fracciones enriquecidas con DAT se sometieron a una precipitación con metanol frío para separar monomicolato de trealosa, de polaridad semejante pero diferente solubilidad. Se continuó con la purificación, corriendo el DAT en placas preparativas con cloroformo-metanol-agua (60:12:2, v/v/v); las placas se revelaron con rodamina, los glicolípidos se visualizaron con UV, el DAT se recuperó raspando la placa y pasándolo por una columna de sílica eluyendo con cloroformo-metanol (80:20, v/v). Para la purificación final se emplearon cartuchos Sep-Pak de sílica gel; para la activación del cartucho se eluyeron 6 volúmenes del cartucho con cloroformo. Una vez activada la columna, se depositó la muestra (aprox. 5mg) sobre el soporte. Los compuestos no deseados se eluyeron con cloroformo, y los compuestos de interés se obtuvieron incrementando la polaridad del eluyente, el cual es una mezcla de cloroformo-metanol de la siguiente forma: cloroformo-metanol (100, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12 y 86:14, v/v). Posteriormente, cada fracción fue analizada por TLC y las fracciones que contenían DAT libre de contaminantes fueron conservadas.

5.1.3.b. Purificación de TAT y DMT

Las fracciones enriquecidas con TAT y DMT se sometieron a precipitación con acetona fría ya que estos glicolípidos coeluyen a partir de columnas de adsorción en florisil. Después de las precipitaciones se corrieron los compuestos por cromatografías en placa preparativa con cloroformo-metanol (90:10, v/v); las placas se revelaron con rodamina, los glicolípidos se visualizaron con UV, los productos de interés se recuperaron raspando la placa y se pasaron por una columna de sílica eluyendo con cloroformo-metanol (90:10, v/v).

5.2. INDUCCIÓN DE RESPUESTA HUMORAL EN CONTRA DE GLICOLÍPIDOS

5.2.1. Inmunización con DAT en AIF

Ratones BALB/c y C57BL/6 fueron inmunizados con 200 µg de DAT en 50 µl de adyuvante incompleto de Freund (AIF) (Sigma Chem) y 50 µl de PBS, por ratón, subcutáneamente y dando 3 refuerzos con 10 días de diferencia entre cada refuerzo. Los ratones fueron sangrados al día 10, 20, 30 y 60 post-inmunización, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 3. Esquema de inmunización y sangrado de ratones

Día 0	200 µg de DAT en 50 µl de PBS + 50 µl AIF
Día 10	Primer sangrado 200 µg de DAT en 50 µl de PBS + 50 µl AIF
Día 20	Segundo sangrado 200 µg de DAT en 50 µl de PBS + 50 µl AIF
Día 30	Tercer sangrado
Día 45	100 µg de DAT en 50 µl de PBS + 50 µl AIF
Día 69	Cuarto sangrado

5.2.2. Inmunización con DAT incluido en liposomas

El DAT fue incluido en liposomas para la inmunización de ratones BALB/c y C57BL/6, utilizando el método de deshidratación-rehidratación; 50 mg de 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina y 25 mg de colesterol se disolvieron en 5 ml de cloroformo. Se disolvieron 8 mg de DAT en una pequeña cantidad de cloroformo y se añadió a la solución con colesterol, los solventes se evaporaron con rotavapor (Büchi R-114); se resuspendieron en PBS y se formaron los liposomas a medida que se fue sonicando (Cole Parmer Instrument, 4710) (Hiromatsu *et al.*, 2002). Para determinar la población de liposomas que se tenía, los liposomas fueron analizados por microscopía electrónica con tinción negativa de la siguiente manera: se colocó una gota de la muestra en rejillas de cobre cubiertas con membrana de formvar, se dejó sedimentar y se eliminó el sobrenadante, se añadió una gota de acetato de uranilo al 2.5% o ácido fosfotúngstico (PTA) al 2% pH 7.2 para la tinción, se dejó un minuto y se lavó con agua destilada para eliminar exceso de contraste (New, 1990);

las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010) a los aumentos 15K, 25K y 40K. Se inmunizaron ratones BALB/c y C57BL/6 con 200µg de DAT incluido en los liposomas en 100µl de PBS, vía intraperitoneal, y dando 3 refuerzos con 10 días de diferencia entre cada refuerzo. Los ratones fueron sangrados a los 10, 20, 30 y 60 días post-inmunización.

5.2.3. Infección con *Mycobacterium fortuitum*

Se hizo un cultivo de *M. fortuitum* en medio Sauton 0.05% Tween 80 hasta alcanzar una D.O. de 0.8 a 600 nm (aprox. 5 días). Se lavó el cultivo una vez con PBS-0.05% Tween 80, y dos veces con PBS. Se eliminaron agregados bacterianos por centrifugación durante 10 min a 200g, recuperando el sobrenadante, se homogeneizó con jeringa de insulina y se congeló en alícuotas de 2 ml a -70°C. Se realizó una cuenta de unidades formadoras de colonias (CFU) en medio 7H10 y se ajustó la suspensión bacteriana a una concentración de 3×10^7 CFU/ml en PBS. Para la infección se inyectaron, vía intravenosa, 100 µl de la suspensión bacteriana a cada ratón (Saito & Tasaka, 1969; Tomioka *et al*, 1990; Lui *et al*, 2003). Los ratones fueron sangrados a los 10, 20, 40, 60 y 190 días post-infección. Los ratones C57BL/6 fueron re infectados con 3×10^6 bacterias por ratón al día 190 y fueron sangrados 10, 20 y 30 días post- re infección.

5.3. ELISA CON GLICOLÍPIDOS COMO ANTÍGENOS

Para la determinación de anticuerpos anti-glicolípidos circulantes en el suero de los ratones, inmunizados e infectados, se utilizó un inmunoensayo enzimático (ELISA). Los glicolípidos purificados se disuelven en una mezcla hexano-etanol (1:1, v/v) a una concentración de 10 µg/ml. De esta solución se toman 100 µl y se depositan en placas de microtitulación de poliestireno (Poly sorb, Nunc). Se deja secar durante toda la noche a 37°C. Los pozos fueron saturados con 200 µl de una solución al 2% (w/v) de albúmina sérica bovina (BSA) en una solución de fosfato salino (PBS) a 37°C por 1 hr Se lavó 4 veces con PBS (Escamilla *et al.*, 1996). Se agregaron 100 µl de suero diluidos 1:300 o en diluciones sucesivas 1:300 hasta 1:30000, en PBS-BSA 0.3%. Se dejaron incubando toda la

noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS, se agregaron 100 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP conjugate, ZYMED), diluido 1:5000 en 0.3% de BSA en PBS; y se incubó a temperatura ambiente por 2 hrs. Después de cuatro lavados con PBS, se agregaron 100 µl de una solución de sustrato (ABTS single solution, Zymed). Después de 30 min de incubación a 37°C, la absorbancia fue leída a 405 nm con un lector de microplacas. Los resultados son expresados como densidad óptica (D.O.).

5.4. FUSIÓN DE CÉLULAS DE BAZO Y CÉLULAS DE MIELOMA

Cuando se obtuvo un título alto de anticuerpo circulante (1:3000) contra los glicolípidos, el bazo fue removido y las células fueron fusionadas con células de mieloma, usando polietilenglicol como agente fusionante (Kohler y Milstein, 1975), de acuerdo con el siguiente protocolo.

5.4.1. Preparación de las células de bazo

Se sacrificó al ratón por dislocación cervical, se extrajo el bazo y se colocó en una caja petri estéril que contenía 10 ml de medio DMEM sin suero fetal bovino (SFB). Las células de bazo se obtuvieron por perfusión. La suspensión celular resultante se colocó en un tubo, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y se lavaron las células 2 veces con medio DMEM sin suero. Posteriormente se resuspendieron las células en 10 ml del mismo medio y se contaron las células.

5.4.2. Preparación de células de mieloma

La línea celular de mieloma empleada fue la Sp2/0-Ag4. Se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio DMEM completo con 10% de SFB a 37°C con 5% de CO₂.

El día de la fusión las células fueron resuspendidas y colocadas en un tubo y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. Se lavaron las células con medio DMEM sin suero al mismo

tiempo que las células de bazo. Las células de mieloma se resuspendieron en 10 ml de DMEM sin suero y fueron contadas.

5.4.3. Obtención de macrófagos de cavidad peritoneal

Los macrófagos se obtuvieron un día antes de la fusión celular. A los ratones una vez sacrificados, se les inyectaron 5 ml de DPBS estéril vía intraperitoneal. Se insertó en el peritoneo una aguja de calibre 186-38mm y el líquido se colectó en tubos cónicos, éstos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, el sobrenadante se eliminó y los macrófagos se resuspendieron en medio HAT; posteriormente fueron sembrados en cajas de cultivo de 96 pozos (Falcon 3072, Becton Dickinson).

5.4.4. Fusión celular

Se mezclaron las células de bazo con las de mieloma en una relación 5:1, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 0.5 ml de la solución de polietilenglicol 50% (PEG 1550, Serva) agitando durante 90 seg; se agregaron 0.5 ml de medio sin suero sin dejar de agitar, se añadieron sucesivamente volúmenes dobles de medio en intervalos de 90 seg hasta completar un total de 8 ml. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min se retiró el sobrenadante y se diluyeron las células en 10 ml de DMEM con 10% de SFB y se incubó por 2 hrs a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se centrifugó y se diluyó en medio HAT y se distribuyeron las células en placas de 96 pozos que contenían macrófagos peritoneales murinos obtenidos 1 día antes.

5.4.5. Selección de hibridomas

El cultivo con células crecidas fue examinado para la presencia de anticuerpos contra DAT, TAT y DMT por medio de un ELISA donde se utiliza a los glicolípidos como antígenos como se describió en el punto 3, con la variante de que se usaron 100 μ l de los sobrenadantes frescos de hibridomas sin diluir en cada pozo; como control positivo se usó suero del último sangrado post-infección y como control negativo el suero pre-infección; la placa se incubó durante toda la noche a 4°C.

VI. RESULTADOS

6.1. Purificación de Glicolípidos

Se cultivó *M. fortuitum* de la cepa ATCC 6841 en medio Sauton. De las células recuperadas se extrajeron los lípidos totales con mezclas de cloroformo-metanol.

Para el fraccionamiento de los extractos totales de lípidos, se empacaron columnas con Florisil Merck (0,150-0,255 mm). Se usó como eluyente cloroformo y se incrementó la concentración de metanol. Cada una de las fracciones obtenidas fue analizada por TLC (Fig. 24) y los glicolípidos fueron identificados por su corrimiento cromatográfico ($R_{f_{DAT}}=0.49$; $R_{f_{TAT}}=0.69$; $R_{f_{DMT}}=0.85$; en el sistema de solventes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (60:16:2, v/v/v)). Las fracciones 1 y 2 sólo contenían grasas; a partir de la fracción 5 y hasta la fracción 10 contienen TAT y DMT, y las fracciones 13 y 14 contienen DAT semipuro.

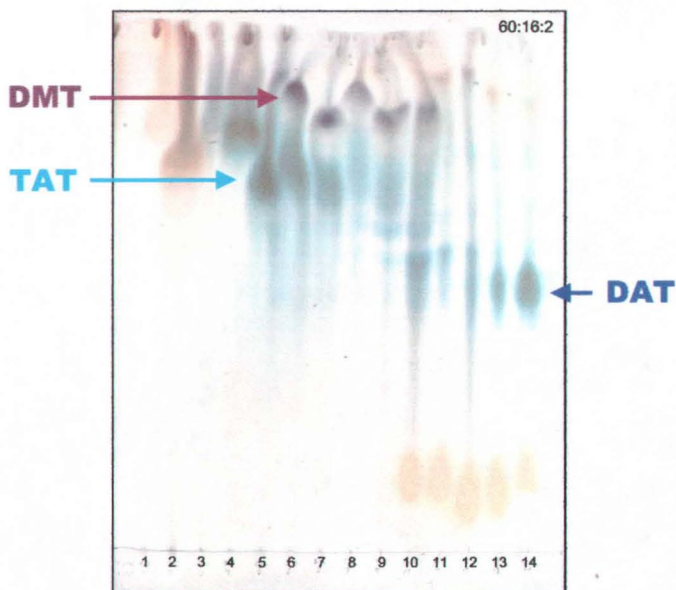


Figura 24. TLC analítica de las fracciones obtenidas del fraccionamiento en la columna con Florisil Merck (0,150-0,255 mm); la placa fue corrida en una solución de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (60:16:2, v/v/v). Al DAT, TAT y DMT, identificados por su corrimiento cromatográfico (Rf). Placa revelada con antrona 0.2% en H_2SO_4 .

6.1.1. Purificación de DAT

Al igual que para la purificación de TAT y DMT, se reunieron las fracciones de primera columna que contenían DAT y se empacó una segunda columna con Florisil 100-200 mesh. En esta segunda columna, el DAT se obtiene a una concentración de 8% de metanol en cloroformo. La figura 28 es una placa analítica (TLC) corrida en una solución de cloroformo:metanol:agua (60:16:2, v/v/v), en la que se muestra que las fracciones que contienen este glicolípido tienen menos grasas.

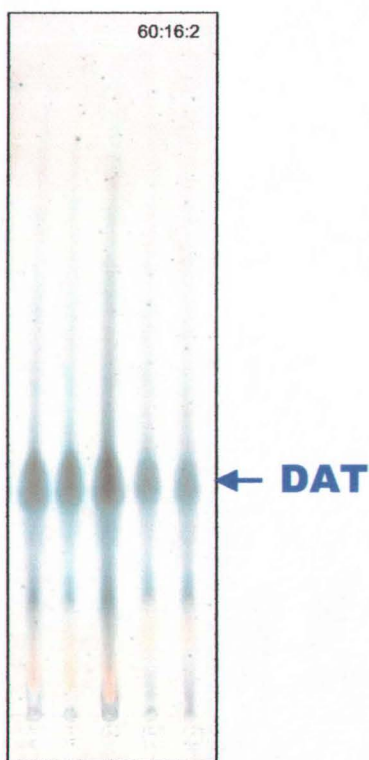


Figura 28. TLC analíticas de las fracciones enriquecidas en DAT obtenidas de la segunda columna con Florisil 100-200 mesh. Placa corrida en una solución de CHCl_3 :MeOH:H₂O (60:16:2, v/v/v) y revelada con antrona 0.2% en H₂SO₄. El Rf es el esperado para el DAT.

Las fracciones de segunda columna que contenían DAT se reunieron y precipitaron con metanol frío con el fin de separar al DAT del monomicolato de trealosa (MMT). En la figura 29 se muestra el análisis por TLC del precipitado, en el cual queda contenido el MMT, y el sobrenadante en el cual queda el DAT con algunas impurezas.



Figura 29. TLC analítica de los productos obtenidos por precipitación con metanol frío; la placa fue corrida en una solución de CHCl_3 : MeOH : H_2O (60:16:2, v/v/v) y revelada con antrona 0.2% en H_2SO_4 . En el precipitado (p) se observa el MMT, y en el sobrenadante (s) el DAT enriquecido con otros lípidos. El R_f para los glicolípidos fue el esperado.

El DAT obtenido de la precipitación con metanol se eluyó de placas preparativas de sílica gel para la purificación final del DAT. Finalmente, el lípido se pasó por cartuchos Sep-pak de sílica gel, usando concentraciones crecientes de metanol en cloroformo. En la figura 30 se muestra un análisis por TLC de las fracciones de esta última cromatografía, en la que podemos observar al DAT puro.

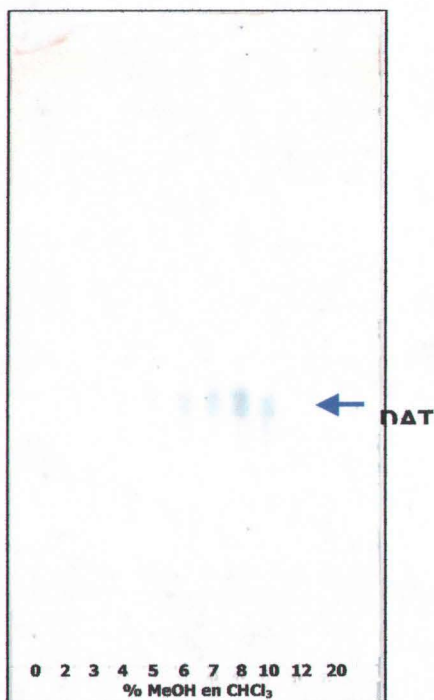


Figura 30. TLC analítica de fracciones obtenidas de la cromatografía de adsorción usando cartuchos Sep-pak de sílica gel (paso final de la purificación de DAT). La placa fue corrida en una solución de CHCl_3 :MeOH:H₂O (60:16:2, v/v/v) y revelada con antrona 0.2% en H₂SO₄. El DAT fue identificado por su $R_f=0.49$.

6.1.2. Purificación de TAT y DMT

Se reunieron las fracciones de la primera columna que contenían TAT y DMT. Se hizo una segunda purificación de los glicolípidos por columnas con Florisil 100-200 mesh, para un fraccionamiento más fino y eliminar grasas. En la figura 25 se muestran las fracciones obtenidas, a una concentración de 6% de metanol en cloroformo; estas fracciones fueron analizadas por TLC, en la que se observa que las fracciones de TAT y DMT contenían menos grasas. En el sistema de solventes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (90:10, v/v), los R_f esperados son: $R_{f\text{DMT}}=0.46$ y $R_{f\text{TAT}}=0.42-0.34$.

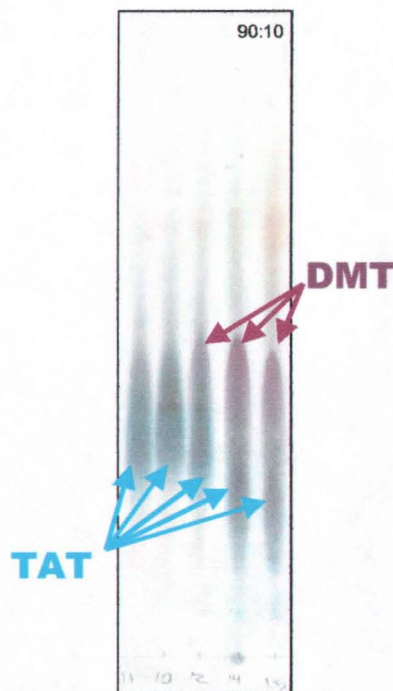


Figura 25. TLC analítica de las fracciones obtenidas en la segunda columna con Florisil 100-200 mesh. Fracciones enriquecidas en TAT y DMT. Placa corrida en una solución de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (90:10, v/v) y revelada con antrona 0.2% en H_2SO_4 .

Con el fin de separar el TAT y DMT, las fracciones se reunieron y precipitaron en acetona fría. En el sobrenadante quedó el TAT y en el precipitado el DMT; estas fracciones fueron analizadas por TLC. En la figura 26a se observan los 3 homólogos de TAT que tienen *M. fortuitum*, y en la figura 26b se observa al DMT puro. Las fracciones que contienen TAT se eluyeron en placas preparativas para separar los homólogos de este glicolípido y una vez separados se analizaron por TLC (Fig. 27).

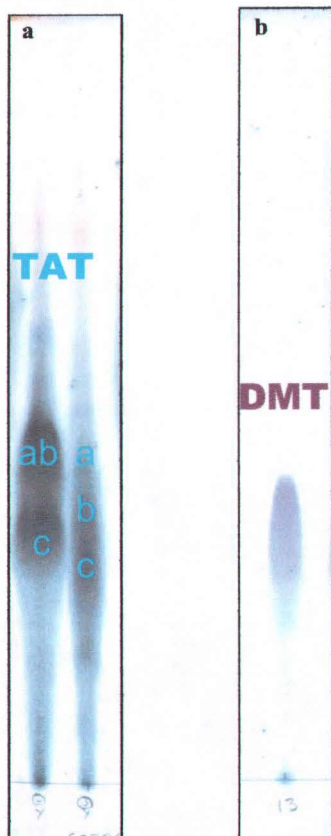


Figura 26. TLCs analíticas de sobrenadantes (a) que contienen TAT, y de los precipitados (b) con DMT, después de la precipitación con acetona; placas corridas en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (90:10,v/v), revelada con antrona 0.2% en H_2SO_4 . El Rf es el esperado para los glicolípidos.

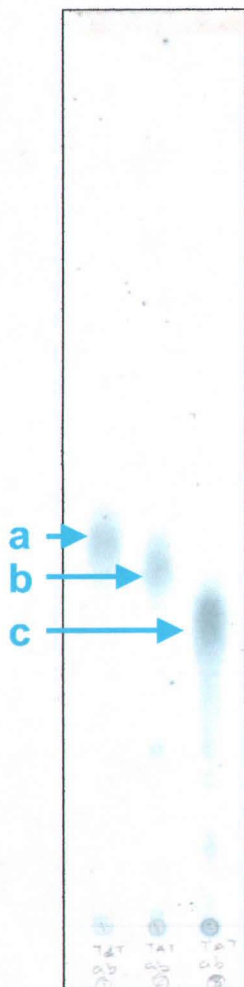


Figura 27. TLC analítica de las fracciones de TAT separadas por cromatografía en placas preparativas; placa corrida en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (90:10,v/v) y revelada con antrona 0.2% en H_2SO_4 . El R_f es el esperado para cada uno de los homólogos del glicolípido TAT.

6.2. INDUCCIÓN DE RESPUESTA HUMORAL CONTRA GLICOLÍPIDOS

No se ha reportado un modelo de inmunización para la inducción de una respuesta humoral contra glicolípidos en ratones, por lo cual se decidió utilizar diferentes estrategias como: la inmunización con glicolípidos en adyuvante, técnica muy utilizada para la inducción de anticuerpos contra proteínas; la inmunización con glicolípidos incluido en liposomas, técnica con la cual Hiromatsu y colaboradores indujeron respuesta inmune celular, en cobayos, contra lípidos micobacterianos (Hiromatsu *et al*, 2002).

Se ha visto que en pacientes con tuberculosis hay producción de anticuerpos clase IgG contra glicolípidos de *M. tuberculosis* (Simonney *et al*, 1997); por este motivo se decidió estimular la producción de anticuerpos mediante infección con *Mycobacterium*; se usó *M. fortuitum*, patógeno oportunista de rápido crecimiento, ya que esta especie comparte con *M. tuberculosis* los glicolípidos DAT, TAT y DMT.

6.2.1. Inmunización con DAT en AIF

Para la inmunización se usaron dos cepas distintas de ratones, BALB/c y C57BL/6. Se utilizaron dos controles por cepa de ratón, y se inmunizaron cuatro ratones de cada cepa con DAT en adyuvante incompleto de Freund (AIF), siguiendo el esquema de inmunización de la tabla 4.

Se determinaron los niveles de anticuerpos en un ELISA. Como puede observarse en la figura 31 no hay reactividad diferencial hacia el lípido entre los animales control y los inmunizados. Tampoco se observó ninguna diferencia cuando los sueros fueron evaluados de manera individual (resultados no mostrados). Por lo tanto la inmunización de ratones con este esquema de inmunización no proporcionó resultados satisfactorios para la inducción de anticuerpos en contra de glicolípidos.

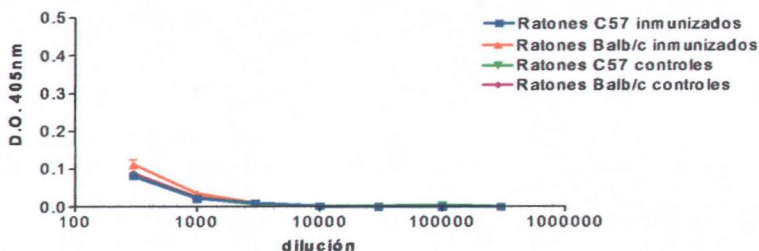


Figura 31. Determinación de anticuerpos anti-DAT por ELISA.

6.2.2. Inmunización con DAT incluido en liposomas

El DAT fue incluido en liposomas según la técnica de deshidratación-rehidratación. Con el fin de hacer una evaluación cualitativa de la presencia de liposomas, antes de inmunizar, se observó una muestra por microscopía electrónica, teñida con acetato de uranilo o PTA. En la figura 32 se observa la gran variedad de liposomas en los que se agregó el DAT como son: unilaminares, multilaminares, y lo que parecen ser micelas, por su tamaño. Se decidió utilizar esta preparación sin purificar puesto que el objetivo de este trabajo no es determinar cual de estas estructuras es mejor adyuvante.

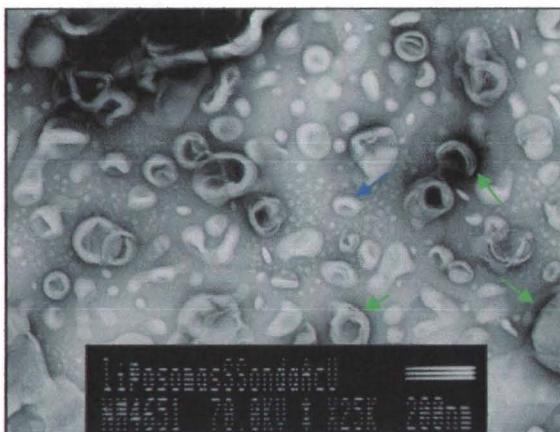


Figura 32. Liposomas vistos a un aumento de x25k, en tinción de acetato de uranilo, en la cual se observan la población de liposomas en la que va incluido el DAT; aproximadamente 1 cm equivale a 200 nm; con la flecha azul se indica un liposoma unilaminar, y con las flechas verdes liposomas multilaminares.

Para la inmunización con DAT incluido en liposomas se siguió el mismo esquema que se describe en la tabla 4. Los ratones control se inmunizaron con liposomas sin glicolípido. Se midió la reactividad de los sueros contra DAT por ELISA. En la figura 33 se muestra la reactividad del conjunto de sueros de los grupos de ratones inmunizados con DAT incluido en liposomas. Como se puede observar tampoco hay reactividad diferencial hacia el DAT entre los grupos control y los inmunizados.

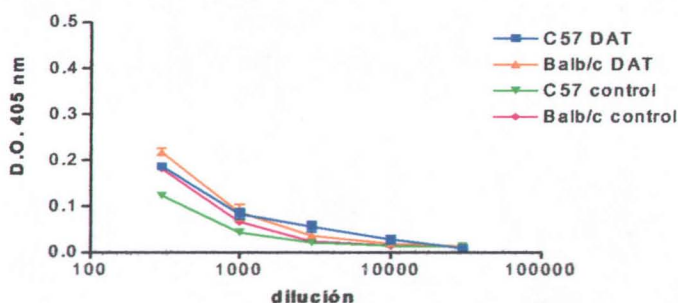


Figura 33. Respuesta serica a DAT en ratones inmunizados con DAT en liposomas.

6.2.3. Infección con *Mycobacterium fortuitum*

Se infectaron 5 grupos de ratones BALB/c, con 5 ratones en cada grupo, según se describe en la tabla 5; por otro lado, se infectó un grupo de 5 ratones C57BL/6 por vía oral con una dosis de 3 millones de bacilos. Se colectaron los sueros de los ratones antes de la infección (como control negativo), y también a los 10, 20 y 40 días post-infección. Se hicieron ELISAs para monitorear la reactividad de estos sueros, diluidos 1/300, contra distintos glicolípidos libres compartidos por *M. tuberculosis* y *M. fortuitum*. Como antígenos para estos ELISAs se usaron una fracción que contenía DAT, y otra que contenía TAT y DMT (Fig. 34).

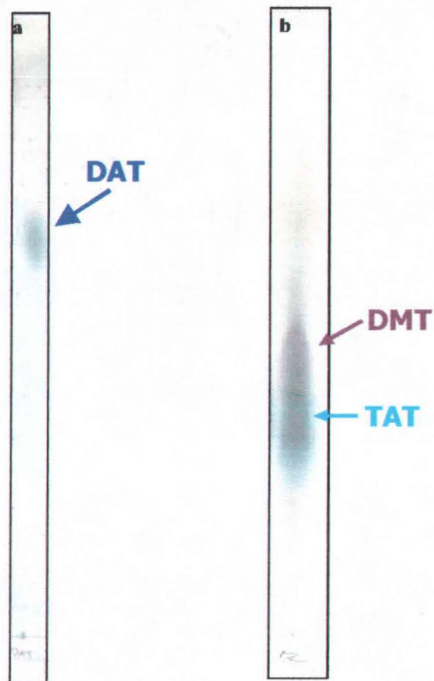


Figura 34. Análisis de los lípidos de *M. fortuitum* utilizados como antígenos a fin de rastrear respuesta serológica en los ratones infectados. a, DAT. b, DMT + TAT.

Tabla 5. Grupos de ratones BALB/c infectados, vía y cantidad de bacterias utilizadas para la infección.

	Dosis	Vía
Grupo 1	3×10^6 bacterias en $100 \mu\text{l}$	Intravenosa
Grupo 2	3×10^6 bacterias en $100 \mu\text{l}$	Oral
Grupo 3	3×10^6 bacterias en $100 \mu\text{l}$	Intraperitoneal
Grupo 4 ¹	5×10^6 bacterias en $100 \mu\text{l}$	Oral
Grupo 5	5×10^6 bacterias en $100 \mu\text{l}$	Intraperitoneal

¹ Uno de los ratones de este grupo murió a los 10 días post-infección

En la figura 35 podemos observar los resultados del ELISA de los sueros de los ratones infectados, probados contra dos diferentes antígenos. No hay reconocimiento diferencial hacia el DAT entre los sueros control y los post-infección en ninguno de los grupos de ratones BALB/c infectados. Se probó la reactividad de los sueros contra lípidos totales, y tampoco se tuvo una reactividad positiva; los ratones BALB/c, en las condiciones de infección utilizados, fueron incapaces de generar respuesta humoral en contra de glicolípidos.

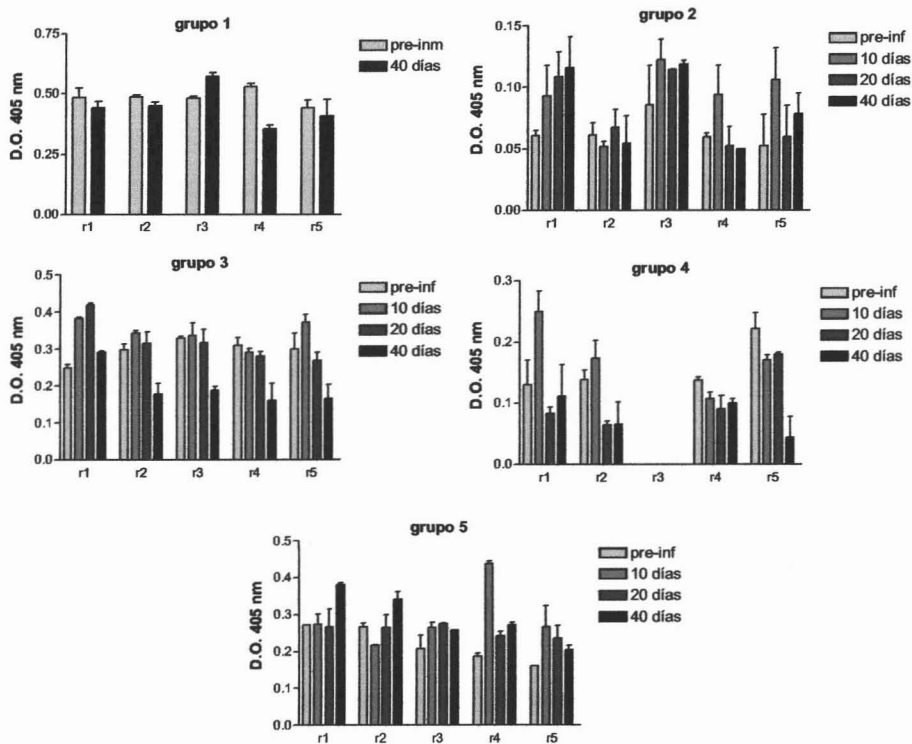


Figura 35. ELISAs de los sueros de los ratones BALB/c infectados con *M. fortuitum*, utilizando DAT como antígeno. Los grupos corresponden a los tratamientos descritos en la tabla 5. r: ratones individuales de cada grupo.

En contraste con estos resultados en los ratones C57BL/6 se observó una respuesta humoral hacia el lípido por lo cual se continuó con los sangrados hasta los 5 meses post-infección (Fig. 36), observándose un aumento en el título de anticuerpos contra los glicolípidos de interés.

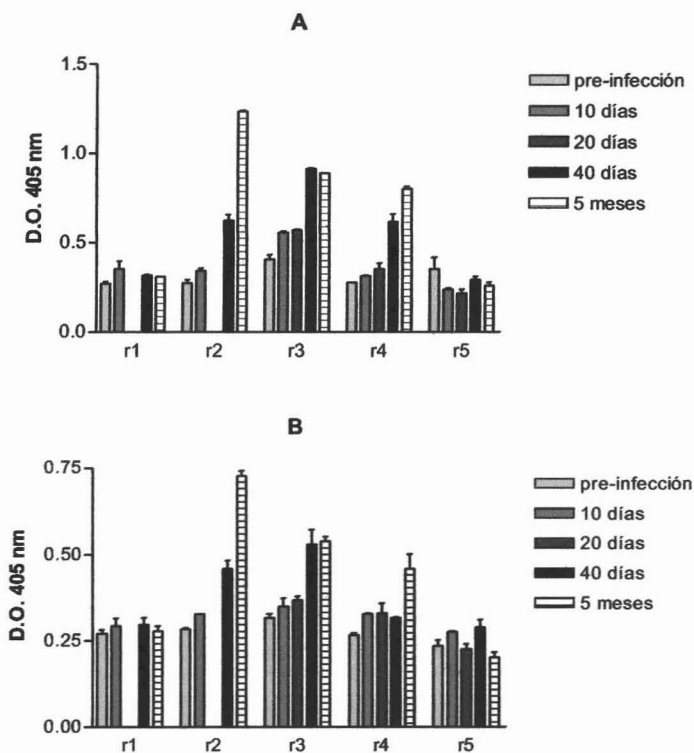


Figura 36. ELISAs de los sueros de los ratones C57BL/6 infectados con *M. fortitum* a diferentes tiempos post-infección; dilución de los sueros 1/200. Los ratones 2, 3 y 4 son los que presentaron una mejor respuesta de anticuerpos IgG contra los glicolípidos de interés. A, resultado del ELISA de los sueros usando como antígeno TAT+DMT. B, ELISA con DAT como antígeno.

Después de estos resultados se decidió reinfectar a los ratones nuevamente con 3 millones de bacterias y nuevamente se tomaron muestras a los 5, 10 y 20 días post-reinfección (Fig. 37). Se decidió comenzar la fusión de los bazos de estos ratones con células de mieloma para la producción de hibridomas ya que se alcanzó un título máximo de 1/3000, que en el caso de antígenos lipídicos puede considerarse aceptable.

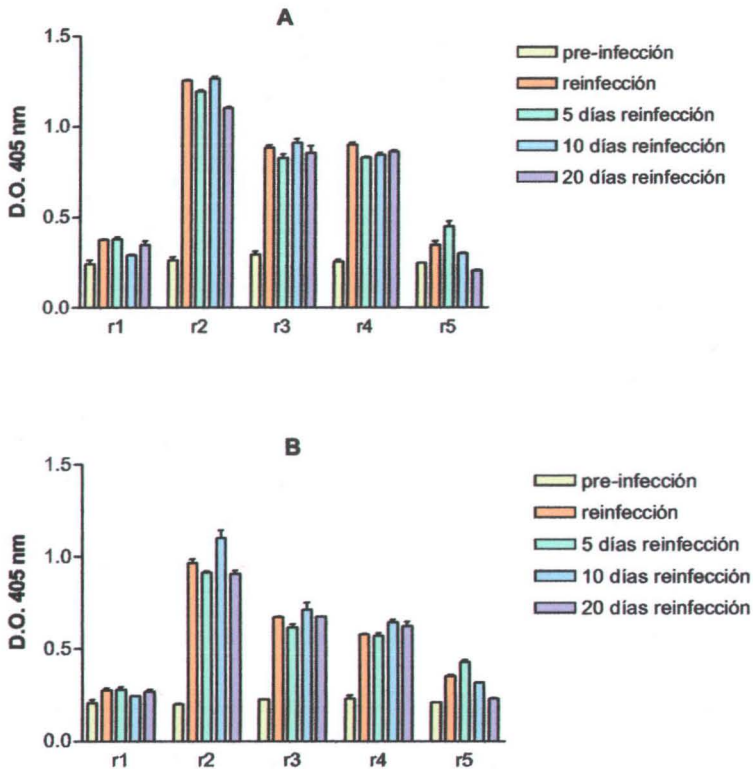


Figura 37. ELISAs de los sueros de los ratones C57 después de la reinfección con la *M. fortuitum*. Dilución de los sueros 1/200. A, el resultado del ELISA usando como antígeno TAT + DMT. B, ELISA usando como antígeno DAT.

En la figura 38 se muestra la titulación del suero de uno de los ratones C57BL/6 (ratón 2, r2), en contra de los antígenos lipídicos Se hicieron diluciones desde 1/100 hasta 1/30000 utilizando como antígeno DAT, TAT + DMT, y DAT + TAT + DMT. Considerando como título la dilución en donde una diferencia de 0.2 unidades de D.O. entre los sueros pre-infección y post-infección, el suero del ratón 2 (r2) presentó un título igual a 1/3000.

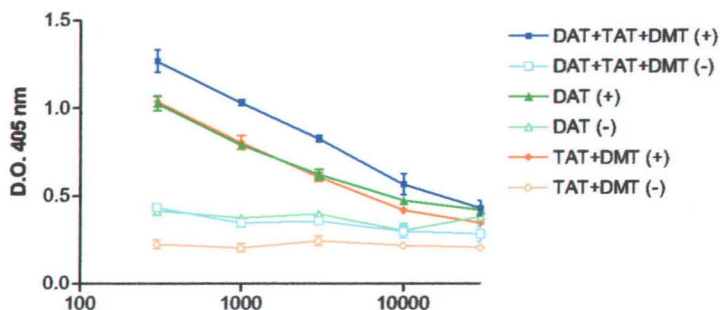


Figura 38. Titulación de suero del ratón 2 (r2) re infectado con *M. fortuitum*. El suero negativo (-, pre-infección) y suero positivo (+, post-reinfección).

6.4. PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS

Para la producción de hibridomas se utilizó uno de los ratones C57BL/6 re infectados con *M. fortuitum* (r2), el cual tuvo los títulos de anticuerpos más altos contra los glicolípidos de interés. Antes de la fusión de los bazos de este ratón se hizo una titulación de los sueros contra DAT, TAT y DMT diluyéndolos en medio de cultivo, a fin de adaptar el ensayo para la medición de respuesta de los anticuerpos secretados por los hibridomas en el sobrenadante del medio de cultivo. Al modificarse el ELISA, la sensibilidad del método resultó seriamente afectada disminuyéndose la respuesta a una tercera parte de la obtenida en el ensayo anterior (Fig. 39).

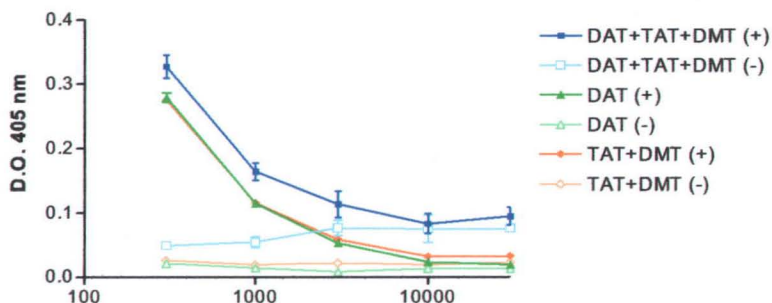


Figura 39. ELISA de los sueros del ratón 2 C57, utilizando lípidos como antígeno y el suero diluido en medio de cultivo. Suero negativo (-, pre-infección) y suero positivo (+, post-reinfección), diluidos en medio de cultivo, contra las fracciones de DAT, DMT y TAT.

A pesar de la disminución de la sensibilidad del método, se decidió realizar la fusión de células de bazo del ratón 2 con células de mieloma. Para este ensayo se utilizaron la mitad de células de bazo, y el resto se conservaron en congelación. Luego de observar crecimiento de hibridomas (Fig. 40) se hizo un ELISA de los sobrenadantes para la detección de anticuerpos contra los glicolípidos de interés. Como antígenos se utilizaron una mezcla de DAT, TAT y DMT; en la figura 41 se presentan las gráficas de los ELISAs realizados con los sobrenadantes de los pozos que presentaron crecimiento. Como control positivo se usó el suero del ratón post-infección diluido 1/1000, y como control negativo el suero pre-infección, también diluido 1/1000.

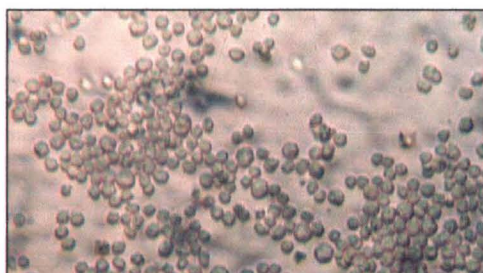
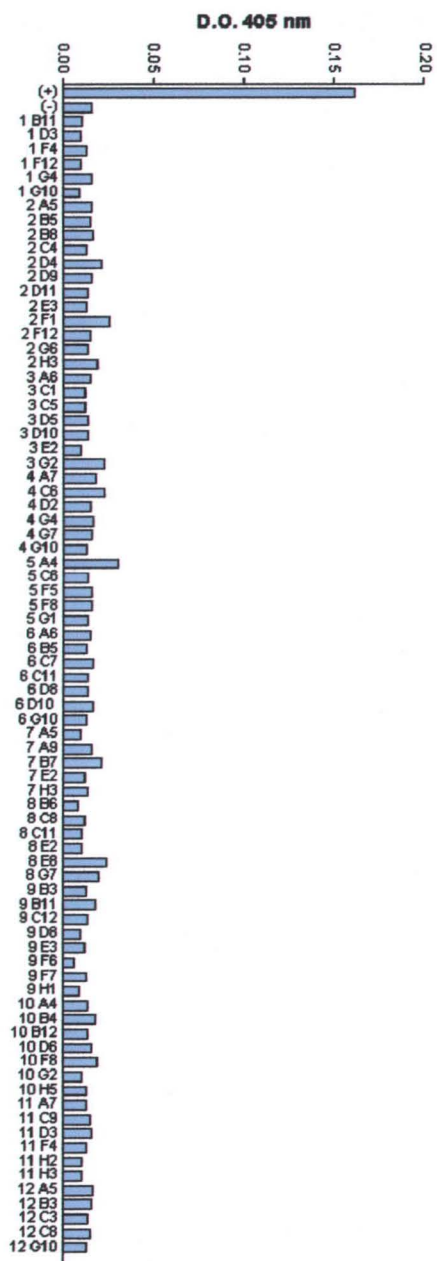


Figura 40. Fotografía de un pozo con crecimiento de hibridomas (10x)

Figura 41. ELISA de los hidrdomas de la primera fusión de bazo de ratón infectado.



Al no encontrar clonas positivas en la primera fusión, se hizo una segunda fusión con las células de bazo del ratón 2 que fueron conservadas en congelación. De esta fusión se obtuvieron algunas clonas con reactividad diferencial con respecto al control negativo aunque sin alcanzar la reactividad del control positivo (Fig.42).

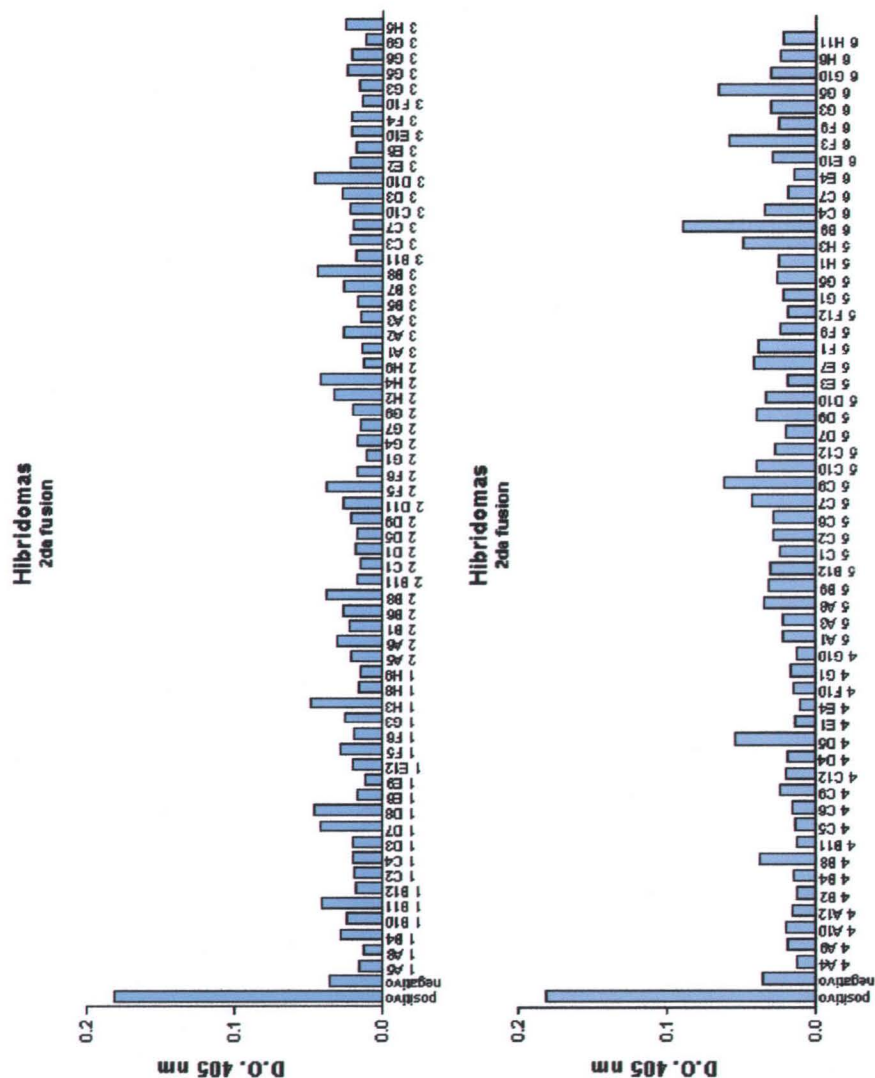


Figura 42. ELISA de los hibridomas de la segunda fusión de bazo de ratón re infectado (r4).

Desafortunadamente todos los hibridomas sufrieron muerte celular por lo que no fue posible continuar con el siguiente paso del proceso de producción de anticuerpos monoclonales (clonación por dilución limitante). Se realizó una tercera fusión con células de bazo del ratón 4 (r4), sin embargo por problemas similares de muerte celular no se consiguió el crecimiento de hibridomas.

VII. DISCUSIÓN

El diagnóstico de la tuberculosis se basa en la confirmación de *M. tuberculosis* por microscopía y cultivo. El primer método es muy rápido pero no es muy sensible, y el segundo es sensible pero toma mucho tiempo para desarrollarse y requiere de personal especializado. Por lo tanto se requiere de métodos específicos y sensibles para la identificación de *M. tuberculosis*, por ejemplo usando métodos inmunológicos.

Las micobacterias producen una gran variedad de glicolípidos localizados en la capa externa de la pared celular. Estas moléculas representan factores potenciales de virulencia porque interactúan con las células del hospedero y contribuyen a la patogenicidad de la bacteria (Beatty *et al*, 2000). Estos componentes han sido estudiados como moléculas blanco para la serología en humanos.

Se han descrito muchos anticuerpos monoclonales para *M. tuberculosis*. Sólo dos de estos mAbs han sido reportados como específicos para *M. tuberculosis*, y algunos se han reportado como específicos para el complejo *M. tuberculosis* (Schoningh *et al*, 1990).

Un punto clave para la producción de mAbs es la inducción de anticuerpos contra el antígeno de interés. Para la inducción de una respuesta humoral es difícil el comparar una respuesta a antígenos peptídicos y antígenos lipídicos porque el número de epítopes disponibles probablemente sea diferente en las dos situaciones. También es importante poner atención en la naturaleza del antígeno el cual probablemente pueda carecer de propiedades estimulantes para el linfocito, por ejemplo su naturaleza química o la repetitiva exposición en la parte externa de la pared celular.

Se ha reportado la producción de anticuerpos anti-glicolípidos de la pared de *M. tuberculosis* en un modelo de infección vía aerosoles (Cardona *et al*, 2002), pero este trabajo muestra una respuesta humoral pobre y sólo se detectaron anticuerpos tipo IgM contra DAT y SL-1.

En el presente trabajo se logró inducir una respuesta humoral IgG contra tres glicolípidos característicos de *M. tuberculosis* (DAT, TAT y DMT). El obtener una respuesta humoral óptima fue muy difícil y solo se logró por infección con células de *M. fortuitum* vivas vía oral. Los síntomas reportados anteriormente en ratones infectados con *M. fortuitum*, como la enfermedad de “giro” (spinning) (Saito y Tasaka, 1969) no fue observada en ningún ratón.

Una vez obtenido un título de anticuerpos adecuado, tomando en cuenta las características de nuestros antígenos, se decidió comenzar con la fusión. Los hibridomas se crecieron en medio HAT con kanamicina, al mismo tiempo se hicieron cultivos para verificar si el bacilo permanecía en bazo. Los hibridomas crecieron muy lentamente y en el proceso otros murieron, posiblemente por la toxicidad de la kanamicina.

Aunque debido a estos eventos no logramos clonar hibridomas productores de anticuerpos anti-glicolípidos, el presente trabajo sienta las bases para la inducción de una respuesta humoral de IgG en contra de glicolípidos característicos de *M. tuberculosis*.

Posiblemente la infección de los ratones con una dosis mayor de bacterias permitirá la obtención de títulos de anticuerpos superiores que faciliten la clonación de los hibridomas.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvo respuesta humoral en ratón contra glicolípidos *M. tuberculosis* estandarizando un modelo de infección con *M. fortuitum*, lo cual resulta sumamente útil ya que no requiere instalaciones con bioseguridad nivel 3 como ocurre con *M. tuberculosis*.
- ❖ A pesar de haber encontrado una buena respuesta humoral con el modelo de infección, vía oral, no fue posible obtener los anticuerpos monoclonales debido a la muerte celular de los hibridomas.

IX. REFERENCIAS

- ❖ Aguilar L, Ortega-Pierres G, Campos B, Fonseca R, Ibáñez M, Wong C, Farfan N, Naciff JM, Daetzel MA, Dedman JR, Baeza I. 1999. Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic. *J Biol Chem.* 274(36):25193-25196.
- ❖ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1996. *Biología molecular de la célula*. Tercera edición. Ediciones Omega. Barcelona. p. 200.
- ❖ American Academy of Pediatrics. 2001. Tuberculosis. En: Pickering LK, editor. *Red Book 2000: Informe del Comité de Enfermedades Infecciosas*. 25ª edición. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics. pp. 764-790.
- ❖ American Thoracic Society. 2000. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1376-1395.
- ❖ Anuario de Morbilidad. 1984-2003. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. (www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html).
- ❖ Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. 1939-1963. Movimientos de la Población. Dirección General de Estadística. Secretaría de la Economía Nacional. México.
- ❖ Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. 1970. Movimientos de la Población. Dirección General de Estadística. Secretaría de Industria y Comercio. México.
- ❖ Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. 1972-1974. Movimientos de la Población. Dirección General de Estadística. Secretaría de Programación y Presupuesto. México.

- ❖ Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. 1993. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infection and Immunity*. 61(8):3482-9.
- ❖ Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. 2000. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic*. 1:235-247.
- ❖ Besra GS, Bolton RC, McNeil MR, Ridell M, Simpson KE, Glushka J, van Halbeck H, Brennan PJ, Minnikin DE. 1992. Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 31:9832-9837.
- ❖ Bersa GS, Chatterjee D. 1994. Lipids and Carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control*, edited by Bloom BR. ASM Press, Washington, DC. pp. 285-306.
- ❖ Brennan PJ. 1988. *Mycobacterium* and other actinomycetes. In C, Ratledge and S. G. Wilkinson, editors. *Microbial Lipids*, Vol. 1. Academic Press. London. 251-278.
- ❖ Brozna JP, Horan H, Rademacer JM, Pabst KM, Pavst MJ. 1991. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. *Infection and Immunity*. 59:2542-2548.
- ❖ Cardona PJ, Julian E, Valles X, Gordillo S, Muñoz M, Luquin M, Vusina V. 2002. Production of Antibodies against Glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall in Aerosol Murine Models of Tuberculosis. *Scand J Immunol*. 55:639-645.
- ❖ Cattoir V. 2004. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. *Ann Biol Clin*. 62(4):405-413.
- ❖ CDC.1989. Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus Infection: Recommendation of the Advisory Committee for the Elimination of Tuberculosis (ACET). *MMWR* 236-250.

- ❖ Chatterjee D, Khoo KH. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*. 8:113-120.
- ❖ Cho SN, Shin JS, Daffé M, Chong Y, Kim SK, Kim JD. 1992. Production of monoclonal antibody to a phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* and its use in detection of the antigen in clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 30:3065-3069.
- ❖ Cho SN, Shin JS, Kim JD, Chong Y. 1990. Production of monoclonal antibodies to lipoarabinomannan-B and use in the detection of mycobacterial antigens in sputum. *Yonsei Med J*. 31(4):333-338.
- ❖ Clegg HW, Foster MT, Sanders WE Jr, Baine WB. 1983. Infection due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex after augmentation mammoplasty: clinical and epidemiologic features. *J Infect Dis*. 147(3):427-33.
- ❖ Collins FM. 1998. Mycobacterial Pathogenesis: A Historical Perspective. *Front Biosci*. 3:e123-132.
- ❖ Damiani G, Bianco A, Beltrame A, Vismara D, Mezzopreti MF, Colizzi V, Young DB, Bloom BR. 1988. Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies to 28-, 35-, and 65-kilodalton Proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. May:1281-1287.
- ❖ Domenech P, Reed MB, Dowd CS, Manca C, Kaplan G. 2004. The Role of MmpL8 in Sulfatide Biogenesis and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 279(20):21257-21265.
- ❖ Downing JF, Pasula R, Wright JR, Twigg HL, Martin WJ. 1995. Surfactant protein A promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci*. 92:4848-4852.
- ❖ Escamilla L, Mancilla R, Glender W, López-Marín LM. 1996. *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 154:1864-1867.

- ❖ Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma JP, Espitia C, Manoutcharian K, Lopez-Marin LM. 2005. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem J.* 15;387(Pt 2):411-417.
- ❖ Glatman-Freedman A, Martin JM, Riska PF, Bloom BR, Casadevall A. 1996. Monoclonal Antibodies to Surface Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and Their Use in a Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay for Detection of Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* Nov: 2795-2802.
- ❖ Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2005. Geneva. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2005.349).
- ❖ Goodfellow M, Magee JG. 1998. Taxonomy of Mycobacteria. *Mycobacteria, Volume I: Basic Aspects*, edited by Gangadharam PRJ, Jenkins PA. Chapman and Hall Medical Microbiology Series. New York. pp 1-71.
- ❖ Guerardel Y, Maes E, Ellass E, Leroy Y, Timmerman P, Besra GS, Locht C, Strecker G, Kremer L. 2002. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*, presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains. *J Biol Chem.* 277(34):30635-30648.
- ❖ Heifets LB, Good RC. 1994. Current Laboratory Methods for the Diagnosis of Tuberculosis. *Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control*, edited by Bloom BR. ASM Press, Washington, DC. pp. 85-110.
- ❖ Hiromatsu K, Dascher CC, LeClair KP, Sugita M, Furlong ST, Brenner MB, Porcelli SA. 2002. Induction of CD1-restricted immune responses in guinea pigs by immunization with mycobacterial lipid antigens. *J Immunol.* 169:330-339.
- ❖ Holvey DN, Talbott JH, Alpert E, Bondy PK, Huth EJ, Keefer CS, Kratz AM, Richards DW, Sebrell WH, Welt LG. 1974. Enfermedades Causadas por Micobacterias. *El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica*. Merck Sharp and Dohme Research Laboratories. New Jersey. pp. 116-128.

- ❖ Indrigo J, Hunter RL Jr, Actor JK. 2003. Cord factor trehalose 6,6'-dimyolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology*. 149(Pt 8):2049-2059.
- ❖ Jiao X, Lo-Man R, Guernonprez P, Fiette L, Dériaud E, Burgaud S, Gicquel B, Winter N, Leclerc C. 2002. Dendritic Cells Are Host Cells for Mycobacteria In Vivo That Trigger Innate and Acquired Immunity. *J Immunol*. 168:1294-1301.
- ❖ Kobzik L. 2000. El Pulmon. En: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editores. *Patología Estructural y Funcional*. Sexta Edición. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 754-757.
- ❖ Kohler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256:495-497.
- ❖ Kolk AHJ, Evers R, Groothuis DG, Bilis H, Kuijper S. 1989. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Specific Serotypes of *Mycobacterium avium* and the *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* Complex. *Infection and Immunity*. Aug:2514-2521.
- ❖ Kumate J, Gutierrez G, Muñoz O, Santos JI. 2001. Tuberculosis e Infecciones por Micobacterias Atípicas. *Manual de Infectología Clínica*. Mendez Editores. México. pp. 121-136.
- ❖ Lawton AP, Kronenberg M. 2004. The Third Way: Progress on pathways of antigen processing and presentation by CD1. *Immunol Cell Biol*. 82(3):295-306.
- ❖ Liu K, Yu J, Russell DG. 2003. *pckA*-deficient *Mycobacterium bovis* BCG shows attenuated virulence in mice and in macrophages. *Microbiology*. 149:1829-1835.
- ❖ López-Marín LM, Lanéelle MA, Promé D, Lanéelle G, Promé JC, Daffé M. 1992. Structure of a novel sulfate-containing mycobacterial glycolipid. *Biochemistry*. 33:11106-11111.

- ❖ Mauch H, Brehmer W, Sonneborn HH, Horn J, Wagner S. 1988. Monoclonal antibodies selectively directed against the cell wall surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 26(9):1691-1694.
- ❖ Medina-Flores Y, Correa-Beltrán MD, Vaughan-Figueroa JG, Morales-López Z, Medina-Escutia ME, Mandujano-Martínez A. 1997. Manual de procedimientos de laboratorio del INDRE, Anticuerpos Monoclonales, editado por A. Escobar Gutiérrez. INDRE, México. 48 pp.
- ❖ Midani S, Rathore MH. 1999. *Mycobacterium fortuitum* infection of ventriculoperitoneal shunt. *South Med J.* 92(7):705-7.
- ❖ Milstein C. 1999. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *BioEssays.* 21:966-973.
- ❖ Minnikin DE. 1991. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. *Res Microbiol.* 142:423-427.
- ❖ Muñoz M, Lanéelle A, Luquin M, Torrelles J, Julián E, Ausina V, Daffé M. 1997. Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters.* 157:251-259.
- ❖ Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Giannopoulos K, Murria PG. 2000. Demystified Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 53:111-117.
- ❖ New RRC. 1990. Characterization of liposomes. *Liposomes a practical approach*, edited by RRC New. IRL Press at Oxford University Press, New York. pp. 105-161.
- ❖ Nigou J, Guilleron M, Puzo G. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie.* 85:153-166.
- ❖ Nishimori K, Yugi H, Naiki M, Sugimura T, Tanaka Y, Nonomura I, Yokomizo Y, Kubo S. 1987. Production and Characterization of Serovar-Specific Monoclonal Antibodies to Serovars 4, 8, and 9 of *Mycobacterium intracellulare*. *Infection and Immunity.* Mar: 711-715.

- ❖ Olds GR, Sanson AJ, Daniel TS. 1987. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5 Epitopes by Using a Panel of 19 Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol.* Mar: 471-475.
- ❖ Oswald IP, Dozois CM, Petit JF, Lemaire G. 1997. Interleukin-12 synthesis is a required step in trehalose dimycolate-induced activation of mouse peritoneal macrophages. *Infection and Immunity.* 65(4):1364-9.
- ❖ Pan J, Fujiwara N, Oka S, Maekura R, Ogura T, Yano I. 1999. Anti-cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) IgG antibody in tuberculosis patients recognizes mycolic acid subclasses. *Microbiol Immunol.* 43(9):863-9.
- ❖ Pirofski L, Casadevall A, Rodriguez L, Zuckier LS, Scharff MD. 1990 Current state of the hybridoma technology. *J Clin Immunol.* Nov;10(6 Suppl):5S-14S.
- ❖ Ryll R, Watanabe K, Fujiwara N, Takimoto H, Hasunuma R, Kumazawa Y, Okada M, Yano I. 2001. Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect.* 3(8):611-9.
- ❖ Ryll R, Kamazawa Y, Yano I. 2001a. Immunological Properties of Trehalose Dimycolate (Cord Factor) and Other Mycolic Acid-Containing Glycolipids. *Microbiol Immunol.* 45(12):801-811.
- ❖ Rivera-Marrero CA, Ritzenthaler JD, Newburn SA, Roman J, Commings RD. 2002. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 148:783-792.
- ❖ Rojas-Espinosa O, Luna-Herrera J, Arce-Paredes P. 1999. Recognition of phenolic glycolipid-I (*Mycobacterium leprae*) and sulfolipid-I (*M. tuberculosis*) by serum from Mexican patients with leprosy or tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 3(12):1106-1112.
- ❖ Rumschlag HS, Yakus MA, Cohen ML, Glickman SE, Good RC. 1990. Immunologic Characterization of a 35-kilodalton Recombinant Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* Mar: 591-595.

- ❖ Saavedra R, Segura E, Leyva R, Esparza LA, López-Marín LM. 2001. Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin Diag Lab Immun.* 8:1081-1088.
- ❖ Saita N, Fujiwara N, Yano I, Soejima K, Kobayashi K. 2000. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infection and Immunity.* 68(10):5991-7.
- ❖ Saito H, Tasaka H. 1969. Comparison of the pathogenicity for mice of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus*. *J Bacteriol.* 99(3):851-855.
- ❖ Schaible UE, Hagens K, Fischer K, Collins HL, Kaufmann SH. 2000. Intersection of group I CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. *J Immunol.* 164(9):4843-52.
- ❖ Schoningh R, Verstijnen CP, Kuijper S, Kolk AH. 1990. Enzyme immunoassay for identification of heat-killed mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes and derived from early cultures. *J Clin Microbiol.* 28(4):708-13.
- ❖ Simonney N, Molina JM, Molimard M, Oksenhendler E, Lagrange PH. 1997. Circulating immune complexes in human tuberculosis sera: demonstration of specific antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* glycolipid (DAT, PGLTb1, LOS) antigens in isolated circulating immune complexes. *Eur J Clin Invest.* 27(2):128-34.
- ❖ Tapia Conyer R, Sart E, Kuri P, Ruiz-Matus C, Velásquez O, et al. 2003. Tuberculosis. En: Tapia Conyer R, editor. *El Manual de Salud Pública.* México. Intersistemas. pp. 861-882.
- ❖ Tomioka H, Sato K, Saito H. 1990. Effect of ofloxacin combined with *Lactobacillus casei* against *Mycobacterium fortuitum* infection induced in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 34(4):632-636.

- ❖ Trucksis M. 2000. *Mycobacterium* infections. *Persistent Bacterial Infection*, edited by J. P. Nataro, M.J. Baser, and S. Cunningham-Rundles. ASM Press, Washington, D.C. pp. 327-336.
- ❖ Velasco-Velazquez MA, Barrera D, Gonzalez-Arenas A, Rosales C, Agramonte-Hevia J. 2003. Macrophage-*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb Pathog.* 35(3):125-31.
- ❖ Wagner S, Klause U, Mauch H. 1992. Production and analysis of specific monoclonal antibodies against the cell wall of *Mycobacterium avium*. *Med Microbiol Immunol.* 181(1):25-33.
- ❖ Wallace RJ Jr, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. 1983. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis.* 5(4):657-79.
- ❖ Zola H. March 1999. Monoclonal Antibodies. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.

X. APÉNDICE I. MEDIOS DE CULTIVO

1. BACTERIOLÓGICOS

a. Medio mínimo Sauton

Citrato Fierro y Amonio	0.05 g
Sulfato de Magnesio	0.5 g
Fosfato Monopotasico	0.5 g
Ácido citrico	2.0 g
Asparagina	4.0 g
Glicerol	60.0 g
H ₂ O cbp	1 L

b. Medio sólido 7H10 Middlebrook (Difco, Becton Dickinson) preparado según especificaciones comerciales.

2. CELULARES

- ❖ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) preparado de acuerdo a las instrucciones del distribuidor.

Suplementos	Medio Completo	Medio HAT	Medio HT
aa no esenciales (100x) (Gibco)	1%	1%	1%
Piruvato de Na (100x) (Gibco)	1%	1%	1%
Glutamina (100x) (Gibco)	1%	1%	1%
Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco)	10%	10%	10%
Hipoxantina-Timidina	-	1%	1%
Aminopterina	-	1%	-
Estreptomicina-Penicilina (100x) (Gibco)	-	1%	1%
Kanamicina	-	1%	-
DMEM	87%	84%	85%

Hipoxantina-Timidina

Se disolvieron 136.1 mg de hipoxantina (Sigma) y 37.8 mg de timidina (Sigma) en 100 ml de agua Mili Q. Se calentó una hora a 45°C con agitación. Se esterilizó por filtración (Filtros Millex-GV 0.22µm, Millipore) y se guardo en alícuotas a -20°C.

Aminopterina

Se disolvieron 10 mg de Aminopterina (Sigma) en 45ml de agua Mili Q, se añadieron 0.568 ml de NaOH 1N. Se ajustó a 56.8 ml y se agregaron 0.568 ml de HCl 1N. Se esterilizó por filtración y se guardo en alícuotas a -20°C.

XI. APÉNDICE II. SOLUCIONES

PBS

KH ₂ PO ₄	1 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
pH	7.4

DPBS

KH ₂ PO ₄	1.2 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
NaCl	138 mM
KCl	2.7 mM
pH	7.4

Polietilenglicol al 50%

Se esterilizaron 4 g de PEG 1550 (Serva) a 120°C por 20 min. Se dejó enfriar y se agregaron 4 ml de medio RPMI sin suero. Se mezcló perfectamente y se guardó a 4°C. Al momento de usarse se ajustó el pH a 7.8-8 con NaOH 0.1N estéril.

Antrona

Esta solución se preparó al 0.2% de antrona (Sigma) en ácido sulfúrico.

Rodamina

Se preparó rodamina B (Sigma) al 0.25% en PBS.