



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE ANTÍGENOS/EPÍTOPOS
DE *Mycobacterium tuberculosis* CON VALOR PARA EL
DIAGNÓSTICO A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA
EXPRESADA EN FAGOS FILAMENTOSOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

JORGE MOISÉS VALENCIA DELGADILLO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN

MÉXICO, D.F.

Agosto, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de Febrero de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del alumno JORGE MOISES VALENCIA DELGADILLO con número de cuenta 95314268 con la tesis titulada "Identificación y estudio de antígenos/epitopos de *Mycobacterium tuberculosis* con valor para el diagnóstico a partir de una biblioteca genómica expresada en fagos filamentosos", realizada bajo la dirección de la DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN.

Presidente	DR. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ
Vocal	DRA. MARTHA TORRES ROJAS
Secretario	DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
Suplente	DR. KARÉN MANUCHARYAN AIRAPETIAN
Suplente	DR. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ GARCÍA

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

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a M., de Julio de 2008.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas – UNAM.

A los miembros del Comité Tutoral por su apoyo en el desarrollo de este trabajo:

Dra. Luz Maria López Marín

Dra. Martha Torres Rojas

Dr. Karen Manoutcharian

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por CONACyT (Proyecto 48509) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto PAPIIT IN218506).

Agradecimientos

A la Dra. Luz María López Marín por haberme aceptado en su laboratorio, guiado durante mi tesis y apoyado en los proyectos.

A la Dra. Martha Torres por haberme apoyado en todo el proyecto.

Al Dr. Karen Manoutcharian y la Dra. Goar Gevorgian por haberme transmitido tantas ideas.

M.C. Maria Elena Munguía por todo el trabajo de laboratorio.

M.C. Erika Segura por su ayuda en el desarrollo de las metodologías.

QFB Marcia García González por haberme apoyado dentro y fuera del laboratorio.

Biol D. Gonzalo Acero por toda la ayuda en todo momento.

Al Dr. Mancilla por compartirme sus experiencias.

Agradecimientos

Mis papas Jorge y Lupita por quererme y apoyarme.

A Erich por ser buen hermano.

Mi abuelita Margarita por decirme que siempre me distinga.

A mis amigos del laboratorio: Paulina, Juan Carlos, Kika, Lety, Mac, Alberto, Lucy, Karla, Marina, Aicram por todo, Agustín, Cesar-Claus-Grecia, Jorge, Dr. Jose, Julia, Vane.

A la M.C. Yuko, al Dr. Prisco y al Dr. Erik por el esclarecimiento científico.

Mis amigos de la Facultad de Ciencias, Blanca, Elia, Kendo, Baig, Felipe, Carlitos, Abril, Google, PubMed, Wiki, Fa, Car, Edgar, Sam, Héctor, Dr. Garzón. A tod@s mis ti@s y prim@s.

Mis amigos de la Escuela Nacional de Música, Quetzal, Emilio, Pavel, Juan Carlos, Abel, Jaime, a todos mis amigos del SOS, y amigos del CR CU 65554 Dist 4170.

Resumen

Identificación y estudio de antígenos/epítomos de *Mycobacterium tuberculosis* con valor para el diagnóstico a partir de una biblioteca genómica expresada en fagos filamentosos.

La tuberculosis (TB) permanece como una enfermedad importante y potencialmente fatal para humanos, y se estima que un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

El genoma de *M. tuberculosis* se terminó de secuenciar en 1998, y se sabe que el patógeno tiene 3924 genes que codifican para proteínas. Al 40% de los genes se les han atribuido funciones específicas, al otro 44% se le han asignado funciones hipotéticas, mientras que el 16% restante se desconoce su función, posiblemente porque estos corresponden a funciones específicas de micobacterias.

En este trabajo utilizamos la técnica de despliegue en fagos para construir una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* expresada en la proteína pVIII de fagos filamentosos M13.

La complejidad de esta biblioteca es de 9×10^5 . Utilizando el suero de un ratón infectado con *M. tuberculosis* se seleccionó una clona reactiva, la cual expresa parte de una proteína transportadora de una acil-transferasa cuyo aceptor es el meromicolato (un tipo de cadena hidrocarbonada de talla larga). Es la primera vez que se reporta el reconocimiento antigénico de esta enzima en un modelo de infección por *M. tuberculosis*, por lo que este hallazgo incita a la búsqueda de implicaciones que la expresión durante la infección de una proteína pudiera acarrear.

Esta biblioteca ofrece cambiar por la posibilidad de rastrear una gran cantidad de antígenos/epítomos de manera rápida y a bajo costo, tanto para diagnóstico como para vacunación.

Abstract

Study and identification of antigens/epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis from a genomic library expressed in filamentous phages.

Tuberculosis (TB) remains an important and potentially fatal infection in humans, and it is estimated that one-third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*.

The *M. tuberculosis* genome was completely sequenced in 1998, and it is known that the rod has 3924 genes that codify for proteins. Precise functions were attributed to 40% of the protein-coding genes; for 44%, some functional information was available, whereas no homology was found for the remaining 16%, which may be mycobacterial specific genes.

In this work we use the Phage Display technique in order to build a genomic expression library of *M. tuberculosis* expressed on the pVIII surface protein of M13 filamentous phages.

The complexity of this library is 9×10^5 . After biopannings using serum of an *M. tuberculosis*-infected mouse, one reactive clone was obtained, which expresses part of a meromycolate extension acyl carrier protein (a long hydrocarbonated chain). This is the first time this enzyme has been reported with antigenic function in a *M. tuberculosis* model, it is thus interesting to search whether this protein is an antigen with biological functions during infection.

This library gives the possibility to identify a vast amount of antigens/epitopes in a quickly and cost effective way, either for diagnostic or vaccination.

ÍNDICE

Portada	1
Agradecimientos	2
Resumen	6
Abstract	7
Antecedentes	8
Hipótesis	33
Objetivos	33
Justificación	34
Material y Métodos	35
Diseño Experimental	45
Resultados	46
Discusión y Conclusiones	56
Perspectivas	59
Abreviaturas	60
Referencias	61

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
CB	Carbenicilina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Short-Course</i>
DR-TB	Tuberculosis drogoresistente
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
kDa	Kilo Daltones
KM	Kanamicina
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	<i>Phosphate Búfered Saline</i>
PFU	Plaque forming unit
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PSA	Persulfato de Amonio
PVDF	Polyvinylidene fluoride
TB	Tuberculosis
TBE	TRIS-BORATE-EDTA
TBS	Tris Búfered Saline
TCR	Receptor de células T
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIS	(Tris [hydroxymethyl] aminomethane)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente drogoresistente

ANTECEDENTES

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, generalmente crónica, altamente contagiosa. Es causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La forma clínica más frecuente es la pulmonar, que se propaga por vía aérea a partir de individuos enfermos.

La tuberculosis, conocida como peste blanca o tisis, es una enfermedad antigua. Alrededor del siglo IV antes de Cristo, Hipócrates de Cos contribuyó creando a establecer el término "tisis" que quiere decir consunción o derretimiento. En 1882, Robert Koch reporta el cultivo exitoso del bacilo de la tuberculosis descubriendo así el agente etiológico de la enfermedad, además de una técnica de tinción para detectarlo.

También se han encontrado deformaciones óseas en fósiles de marsupiales que datan de hace más de 6 millones de años causadas posiblemente por la infección de este bacilo, así como lesiones en huesos de momias de la época predinástica de Egipto de más de 5400 años de antigüedad, mediante ensayos de PCR se logró confirmar que estos individuos estuvieron infectados por el bacilo causante de la tuberculosis (Crubezy et al., 1998; Zink et al., 2002; Zink et al., 2003).

Epidemiología de la tuberculosis

El bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* es uno de los patógenos que cobra más vidas humanas (Marques Gomes, 2004). Actualmente se estima que un tercio de la población mundial (alrededor de dos mil millones de personas) está infectados con *M. tuberculosis* (Fig. 1), lo que ha propiciado que la tuberculosis sea la principal

causa de muerte en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), quienes son altamente susceptibles a padecer la enfermedad (Collins, 1998).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que por causa de la tuberculosis se producen cerca de 2 millones de muertes al año, y que cada año entre 8 y 9 millones de personas desarrollan la enfermedad activa. Debido al descontrol de su propagación, la tuberculosis es el único padecimiento considerado por la OMS como una emergencia mundial (World Health Organization, 2007). El control de la dispersión de la tuberculosis es uno de los “Objetivos de Desarrollo del Milenio” de las Naciones Unidas y la OMS (Objetivo 6, Meta 8, Indicador 24), los cuales incluyen el reducir las tasas de infección antes del año 2015 (Stop TB Partnership and World Health Organization, 2006; Torres and Mujica, 2004).



Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en el 2005, (World Health Organization, 2007).

En México, el combate contra la tuberculosis ha estado enmarcado dentro del Programa Nacional de Salud de la Secretaría de Salud, implementado para reducir los rezagos en salud que afectan a los más pobres, especialmente las líneas fronterizas y las comunidades indígenas del sur del país (Fig. 2); (Secretaría de Salud, 2001).

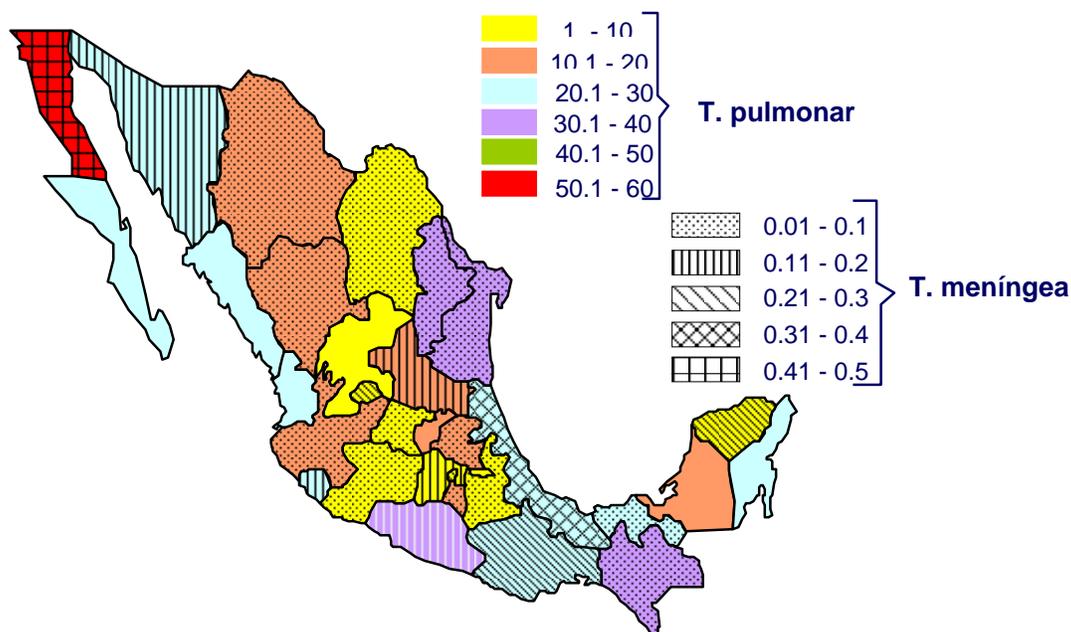


Figura 2. Incidencia estimada de tuberculosis pulmonar y meníngea en México, Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, (Secretaría de Salud, 2001).

Como en toda Latinoamérica, en México la tuberculosis es considerada como una enfermedad desatendida, se ha identificado en el país un subregistro de casos (Tapia et al., 1995), una incidencia mayor de la enfermedad en pacientes con diabetes mellitus, desnutrición y adicciones (Secretaría de Salud, 2001); además de la aparición de tuberculosis resistente y extremadamente resistente a los fármacos disponibles (World Health Organization, 2007). Entre los principales factores que impiden el control de la tuberculosis destacan la falta de métodos de diagnóstico, así como la baja eficacia de la vacuna actualmente disponible.

Propagación de la enfermedad de tuberculosis

Una persona con tuberculosis (TB) activa puede contagiar hasta 15 personas en un año con solo respirar cerca de ellas. Esto, aunado al incremento de cepas resistentes a fármacos anti-tuberculosis, la baja eficacia de las vacunas disponibles y la escasa confiabilidad en los métodos de diagnóstico actuales, han impedido el control de esta enfermedad.

El contagio puede ocurrir cuando una persona infectada genera aerosoles (que contienen bacilos) al momento de toser, estornudar o hablar. Estos bacilos entran a las vías aéreas superiores (faringe, cavidades nasales, laringe, tráquea parte superior), y posteriormente a las vías aéreas inferiores (tráquea parte inferior, bronquios, bronquiolos, alveolos pulmonares), en donde los bacilos son fagocitados por macrófagos alveolares infectando al individuo (Schlossberg, 1999).

En algunos casos esta enfermedad también puede diseminarse desde los pulmones hacia otros órganos del cuerpo como riñón o hígado, por medio del torrente sanguíneo o el sistema linfático (Cole et al., 2005).

Síntomas de la enfermedad

Los síntomas generales de esta enfermedad son fiebre, pérdida de peso, letargo, malestar general, sudoraciones nocturnas, dolor articular, inflamación abdominal, glándulas inflamadas, disnea (sensación de dificultad respiratoria), dolor retro esternal, y en caso de tuberculosis pulmonar se presenta tos, esputo (secreción pulmonar que se expulsa cuando se presenta tos profunda), desarrollo de granulomas (tumores granulares) en los tejidos infectados (Martini and Bartholomew,

1997), y hemoptisis (tos con sangre), lo cual es síntoma de destrucción pulmonar, y un mecanismo de diseminación de las bacterias a nuevos hospederos (Glickman and Jacobs, Jr., 2001). Estos signos y síntomas no son solo exclusivos de esta enfermedad.

Los pacientes portadores del bacilo que experimentan algún tipo de inmunosupresión pueden desarrollar más rápido la enfermedad activa y la destrucción progresiva de tejido pulmonar (Young and Robertson, 1998).

Diagnóstico

El bacilo *Mycobacterium tuberculosis* puede estar latente varios años en un individuo antes de generar la enfermedad (Parrish et al., 1998). Actualmente se cuenta con diferentes métodos de diagnóstico pero ninguno de ellos es totalmente efectivo. Por ejemplo la baciloscopía es uno de los métodos de diagnóstico utilizados para identificar tuberculosis activa. Este método se basa en buscar, a partir de muestras de esputo, bacilos ácido alcohol resistentes previamente teñidos con fucsina (tinción Ziehl-Neelsen) (Draper, 1998). Otro método consta de cultivar la muestra hasta por 8 semanas en medio Lowenstein-Jensen (o estándar de oro) para observar el crecimiento del bacilo. Estas técnicas han sido utilizadas durante más de 100 años (Seiler et al., 2003).

De acuerdo con la OMS, una de las prioridades actuales consiste en contar con métodos efectivos para el rastreo de la enfermedad pulmonar activa, forma contagiosa responsable de la diseminación de la pandemia. Para hacer frente a los problemas de baja sensibilidad, tardanza o requerimientos de infraestructura costosa

inherentes a estas técnicas tradicionales, varios métodos alternativos se encuentran en estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los métodos actuales de diagnóstico de TB activa.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Radiografía de tórax	<ul style="list-style-type: none"> Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> Costo elevado Inespecífico Requiere infraestructura especializada Requiere personal capacitado 	(Bloom, 1994)
Baciloscopía	<ul style="list-style-type: none"> Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> Poco sensible Inútil para diagnóstico de TB extrapulmonar Necesidad de ser reproducido durante 3 días consecutivos Puede requerirse lavado gástrico o bronco aspiración Requiere de personal capacitado Exposición del personal al patógeno 	(Bloom, 1994; Warren et al., 2000)
Cultivo	<ul style="list-style-type: none"> Generalmente específico Posibilidad de ser combinado con pruebas de sensibilidad a fármacos 	<ul style="list-style-type: none"> Muy lento (4 a 12 semanas) Inútil para diagnóstico de TB extrapulmonar Exposición del personal al patógeno Posibilidad de falsos positivos Necesidad de infraestructura muy costosa Requiere de personal capacitado 	(Bloom, 1994; Burman et al., 1997)
PCR	<ul style="list-style-type: none"> Rápido Específico para bacilos del complejo <i>M. tuberculosis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> Costo elevado Poco sensible a partir de muestras biológicas Varios reportes sobre inespecificidad (para la sonda IS6110) Requiere de infraestructura especial Requiere personal capacitado 	(Bloom, 1994; Noordhoek et al., 1993)
Inmunodiagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> Rápido Posibilidad de ser realizado en sistemas que no requieren infraestructura especial ni capacitación Posibilidad de diagnóstico para tuberculosis extra pulmonares e infantil 	<ul style="list-style-type: none"> La sensibilidad no llega a ser total debido a casos con anergia Falta de disponibilidad de antígenos específicos y sensibles Diferencias en el reconocimiento de antígenos posiblemente asociados a factores genéticos en la población 	(Bloom, 1994; Bothamley et al., 1989; Chan et al., 2000; Daniel and Debanne, 1987)

Para rastrear la tuberculosis activa en amplias poblaciones se requiere de tecnologías accesibles, por lo que un método de diagnóstico sencillo, eficaz y de bajo costo ayudaría ampliamente a controlar esta enfermedad. Por ejemplo el inmunodiagnóstico es factible para ser un método de diagnóstico sencillo y de bajo costo capaz de cumplir con los estándares marcados por la OMS en cuanto a sensibilidad >70% de diagnóstico de enfermos (World Health Organization, 1997). Sin embargo, esta técnica está limitada por la baja disponibilidad de antígenos específicos que pueden obtenerse a partir de micobacterias cultivadas, especialmente por lo difícil de su cultivo y el riesgo de contagio existente durante el proceso de producción a gran escala debido a que *M. tuberculosis* tiene un tiempo de duplicación de más de 24 horas y es un patógeno de alto riesgo biológico.

Por otra parte, la detección de tuberculosis latente (en individuos que se encuentran infectados pero no enfermos) se realiza mediante la prueba de la tuberculina o prueba de Mantoux, la cual consiste en administrar intradérmicamente una solución isotónica estéril con proteínas purificadas derivadas del bacilo o PPD. Los dos tipos de PPD que se utilizan (RT 23 o CT 68) (Vijayan, 2002), se obtienen a partir de un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en un medio sintético (McEvoy, 1994).

Dicha reactividad resulta de una previa exposición a *M. tuberculosis*, pero también puede darse debido a la vacunación o exposición a micobacterias ambientales. En algunas ocasiones algunos pacientes que se realizan la prueba de PPD varias veces, pueden llegar a presentar un fenómeno de sensibilidad a dicha prueba, efecto booster (Menzies, 1999), y pacientes con depresión del sistema

inmune o dermatitis atópica pueden resultar en falsos negativos (Markowitz et al., 1993), siendo evidente la necesidad de métodos de detección más específicos

Tratamiento

Uno de los primeros fármacos anti-tuberculosis utilizados fue la estreptomina, descubierta por Waksman a finales de la Segunda Guerra Mundial (Neyra, 1957). Actualmente existe un programa diseñado por la OMS llamado DOTS por sus siglas en inglés (Directly Observed Treatment Short-Course) o TAES, en español (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado); (Small, 1999). Este tratamiento consta principalmente de la combinación de diferentes fármacos como Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Estreptomina y Etambutol, los cuales son administrados por un periodo de 6 meses. La OMS ha creado una organización llamada "STOP TB" la cual proporciona de manera gratuita (bajo ciertos lineamientos) tratamientos anti-tuberculosos a zonas de países en vías de desarrollo que tengan una alta tasa de incidencia.

La isoniacida es un fármaco que inhibe la síntesis de los ácidos micólicos de la micobacteria, los cuales son esenciales para la formación de su pared. Se sabe que la resistencia de la bacteria hacia este fármaco, está relacionada con la sobreexpresión del gene *inhA*, y la supresión del gene *katG* el cual codifica para la catalasa micobacteriana (enzima que degrada el peróxido y produce CO₂) (Morlock et al., 2003). La rifampicina es un antibiótico producido por *Streptomyces mediterranei* que tiene actividad biológica contra bacilos, cocos gram positivos y negativos. Este fármaco actúa uniéndose a la subunidad β de la polimerasa del ARN

bacteriano, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero. La bacteria adquiere resistencia cuando muta el gene *rpoB* de esa subunidad (Mariam et al., 2004).

En el caso del etambutol (EMB), éste actúa inhibiendo la polimerización de arabinogalactano y lipoarabinomanano (lípidos que forman parte la pared), siendo su principal blanco la arabinosiltransferasa. El EMB también favorece la acción de fármacos lipofílicos (como la rifampicina). La micobacteria se vuelve resistente a este fármaco cuando se produce una mutación en el gene *embB* el cual codifica la arabinosiltransferasa (Lety et al., 1997). La pirazinamida es un fármaco similar a la nicotinamida, estable, ligeramente hidrosoluble; es absorbido por los macrófagos ayudándolos a matar a los bacilos en un medio ácido (Wade and Zhang, 2004). En cambio la estreptomycin tiene una absorción deficiente por las células, por lo que su acción principal es en la parte extra celular.

Algunos de estos fármacos han comenzado a ser ineficientes en el tratamiento de la tuberculosis, debido a que en algunas ocasiones los pacientes abandonan su tratamiento favoreciendo la aparición de nuevas cepas multi-drogo resistentes. Por ejemplo la tuberculosis multi-drogo resistente (MDR-TB) es una forma de tuberculosis resistente a dos o más fármacos de primera línea (incluyendo isoniacida y rifampicina) mientras que la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB) es una forma de tuberculosis resistente a los fármacos de primera línea y a tres o más de segunda línea incluyendo fluoroquinolonas y uno de los tres fármacos inyectables como la amikacina (Raviglione and Smith, 2007).

La vacuna contra tuberculosis

En 1882, cuando se identificó el agente etiológico de la tuberculosis, se comenzaron a desarrollar diversos métodos para prevenir y tratar esta enfermedad. En 1921 Albert Calmette y su ayudante Camille Guérin, después de varios años de realizar cultivos sucesivos de una cepa del bacilo tuberculoso bovino, lograron atenuar su virulencia y comenzaron a probarla para protección, creando así la vacuna BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (Yamamoto and Yamamoto, 2007).

La eficacia de esta vacuna ha sido ampliamente cuestionada, estimándose una protección promedio de un 50% en contra de la TB pulmonar activa (Brewer, 2000). En el caso de tuberculosis meníngea en infantes, la vacuna tiene un alto índice de efectividad, pero está contraindicada en el caso de individuos infectados con VIH ya que se trata de una bacteria viva atenuada. Sin embargo, ningún otro método profiláctico ha sido desarrollado y la BCG es utilizada desde 1921, por lo que la implementación de nuevas vacunas que puedan ser utilizadas en la población en general, así como por individuos inmunosuprimidos es uno de los principales retos en la actualidad (Yamamoto and Yamamoto, 2007).

Respuesta inmune contra tuberculosis

Cuando un individuo se infecta con *M. tuberculosis*, generalmente se produce una respuesta inmune para formar granulomas que están constituidos principalmente de macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y monocitos con el fin de confinar a los bacilos patógenos. El individuo porta el bacilo de la tuberculosis pero sin presentar los síntomas de la enfermedad. A esto se le denomina tuberculosis latente (Chan and Kaufmann, 1994). En el caso de que el individuo por

alguna razón presente inmunosupresión, los bacilos de la tuberculosis proliferarán rápidamente por todo el organismo, y comenzará a presentar los signos y síntomas de la enfermedad activa convirtiéndose en un foco de infección (Tiruvilumala and Reichman, 2002).

Durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, los macrófagos fagocitan a los bacilos y procesan los antígenos en el fagolisosoma para posteriormente presentarlos por medio de MHC-II a linfocitos T CD4⁺, mientras que los antígenos que se encuentran en el citoplasma de las células infectadas son presentados por medio de MHC-I a linfocitos T CD8⁺ (Fig. 3) (Kaufmann, 2001). En presentación cruzada, una célula presentadora de antígeno fagocita a una célula infectada y presenta los antígenos del patógeno activando a linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

Recientemente se ha encontrado que moléculas CD1 pueden presentar antígenos de tipo no proteicos como lípidos, fosfolípidos, y lípidos isoprenoides (Sugita et al., 2004), abriendo un nuevo panorama en la inmunidad contra tuberculosis ya que estas moléculas pueden presentar algunos lípidos característicos del bacilo *M. tuberculosis* como el lipoarabinomano (Torrelles et al., 2004).

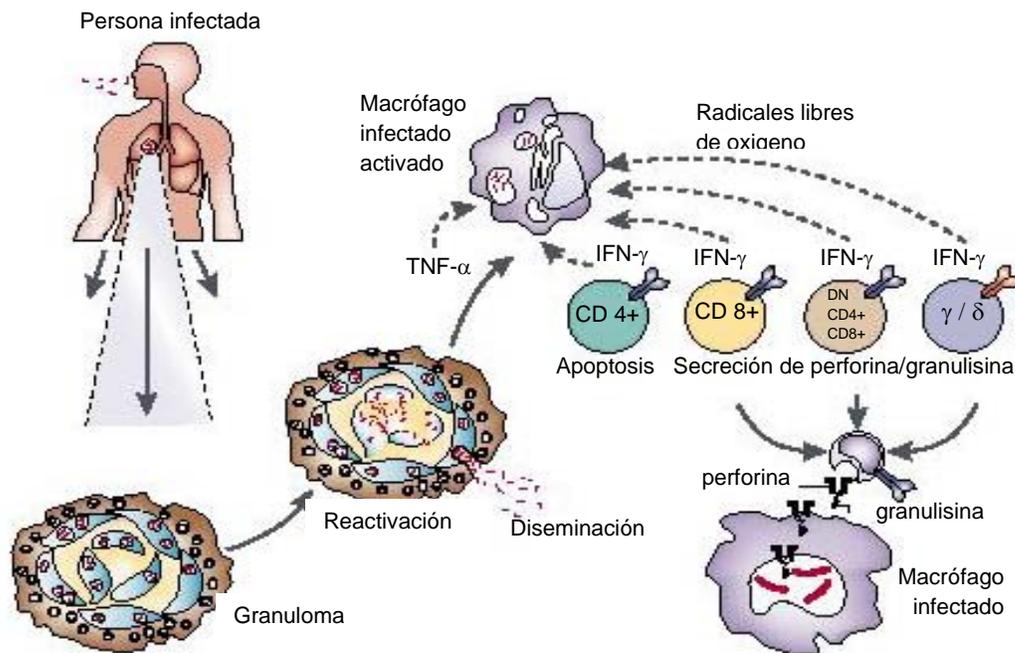


Figura 3. Respuesta inmune a *M. tuberculosis* adaptado de (Kaufmann, 2001).

La respuesta inmune protectora contra la tuberculosis se basa principalmente en la inmunidad mediada por una respuesta tipo Th1 (García-Sancho, 2001; Vanham et al., 1997). Algunos de los factores que participan en la respuesta tipo Th1 son las citocinas IL-12 y TNF- α provenientes de macrófagos y monocitos, y la IL-2 e IFN- γ de linfocitos T. Estas citocinas son esenciales para la activación de los mecanismos microbicidas de los macrófagos y la eliminación de los bacilos (Barnes, 1994). También se sabe que es importante la participación de citocinas de la respuesta inmune tipo Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), las cuales inhiben los efectos exacerbados de la respuesta Th1, evitando que ésta sea tan fuerte que genere necrosis y lesione al individuo (Demissie et al., 2004).

El bacilo tuberculoso emplea diferentes métodos para evitar que el sistema inmune lo destruya. En primer lugar el bacilo puede interactuar con la célula

hospedera (preferentemente macrófagos), mediante el uso de diversos receptores como los tipo "toll" (TLR) (Krutzik et al., 2001), receptores que promueven la fagocitosis como el receptor de manosa, CD14, receptores del complemento (CR1, CR3, CR4), receptores "scavenger", receptores de la fracción cristalizable de anticuerpos IgG (Fc γ Rs), (Ernst, 1998) y receptores de fibronectina.

Una vez fagocitado, algunos de los mecanismos que utiliza el macrófago para destruir al bacilo son: la generación de radicales libres de oxígeno para estallido respiratorio (Ismail et al., 2002) y la producción de intermediarios de nitrógeno reactivos vía L-arginina (Flynn and Chan, 2001a). Sin embargo, las cepas virulentas de *M. tuberculosis* son capaces de inhibir múltiples funciones del macrófago, como la maduración del fagosoma, la señalización por Ca²⁺ y fosfatidil inositol 3 cinasa así como rutas de apoptosis, entre otras (Koul et al., 2004).

Estudios recientes han demostrado que existe un efecto sinérgico entre el bacilo de *M. tuberculosis* y el VIH, ya que se ha demostrado que hay un incremento en la replicación y la mutación del virus, principalmente en la secuencia V3 de la glicoproteína 120. Esto probablemente se deba a que *M. tuberculosis* incrementa la expresión en macrófagos del co-receptor de superficie CXCR4 (CD184) por lo cual el virus prefiere utilizar este co-receptor sobre CCR5 (CD159) de linfocitos T, facilitando la entrada del virus a macrófagos (Hoshino et al., 2004). También se ha observado un aumento exacerbado en la susceptibilidad contra la tuberculosis en individuos infectados con el VIH (inmunosupresión), ya que la inmunidad contra *M. tuberculosis* es principalmente mediada por células T CD4⁺ (Pacheco, 2000).

Las células T γ/δ también juegan un papel importante durante una infección con *M. tuberculosis*. Estos linfocitos expresan un receptor de células T (TCR) constituido por una cadena “ γ ” y una cadena “ δ ” a diferencia del TCR α/β de linfocitos cooperadores CD4⁺ o citotóxicos CD8⁺. Los linfocitos T γ/δ tiene una distribución anatómica selectiva principalmente en pulpa roja del bazo y criptas intestinales, y reconocen fosfoantígenos de manera independiente a moléculas presentadoras MHC (Chen, 2005).

Los linfocitos T γ/δ actúan como reguladores previniendo autoinmunidad o participando tanto en la respuesta inmune innata como la adquirida. En humano la subclase de linfocitos T V γ 9/V δ 2 es capaz de reconocer el metabolito “4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate” presente en diversas bacterias como *M. tuberculosis* (Martino et al., 2007). En modelos de primates infectados con micobacterias se ha demostrado que la ruta y la dosis son importantes en la regulación de linfocitos T γ/δ (Chen, 2005).

Otro factor importante de la enfermedad de tuberculosis es la latencia, cuando una persona entra en contacto con el bacilo *M. tuberculosis*, ésta puede destruir el bacilo inmediatamente, puede infectarse y desarrollar la enfermedad o puede infectarse sin presentar los síntomas o ser transmisor de la enfermedad (Flynn and Chan, 2001b) y se ha demostrado que el bacilo puede permanecer viable en un estado de letargo por varios años dentro del granuloma (Manabe and Bishai, 2000).

Características del bacilo

A este bacilo se le dio el nombre de *Mycobacterium* ya que cuando se cultiva *in vitro*, forma colonias parecidas a los micelios de algunos hongos (Fig. 4), y *tuberculosis* por que el sistema inmune forma pequeños granulomas o tubérculos constituidos principalmente de macrófagos alrededor del bacilo para intentar aislarlo (Fig. 5), (Orme, 1995).



Figura 4. Colonias del bacilo de *M. tuberculosis* (Johns Hopkins University, 2008).

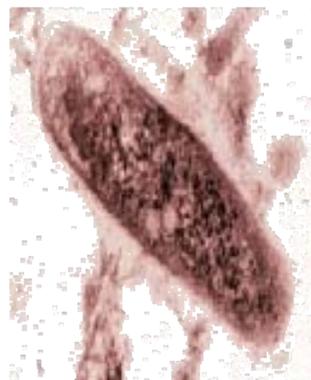


Figura 5. Bacilo de *M. tuberculosis* (Wadsworth Center, 2008).

La mayoría de las micobacterias son organismos saprófitos de vida libre que pueden encontrarse en una amplia variedad de ambientes, algunas de las especies de interés clínico son *M. bovis*, *M. leprae* y *M. tuberculosis* (Goodfellow and Magee, 1998).

La de las principales características que le confieren resistencia al género *Mycobacterium* es su pared celular, ésta es hasta mil veces más impermeable a solutos hidrofílicos que la pared de *Escherichia coli*, lo que la hace resistente a deshidratación, a la absorción de ciertos antibióticos y a daños por ácidos y bases fuertes (Draper, 1998).

La pared se divide en cuatro secciones: zona externa de grosor variable, zona transparente al paso de electrones, zona densa al paso de electrones y membrana plasmática. En la zona densa al paso de electrones encontramos peptidoglicano y arabinogalactano, en la zona transparente al paso de electrones se encuentran lípidos, como los ácidos micólicos (estos últimos responsables principales de la impermeabilidad de la pared), y en la zona externa de grosor variable se encuentran

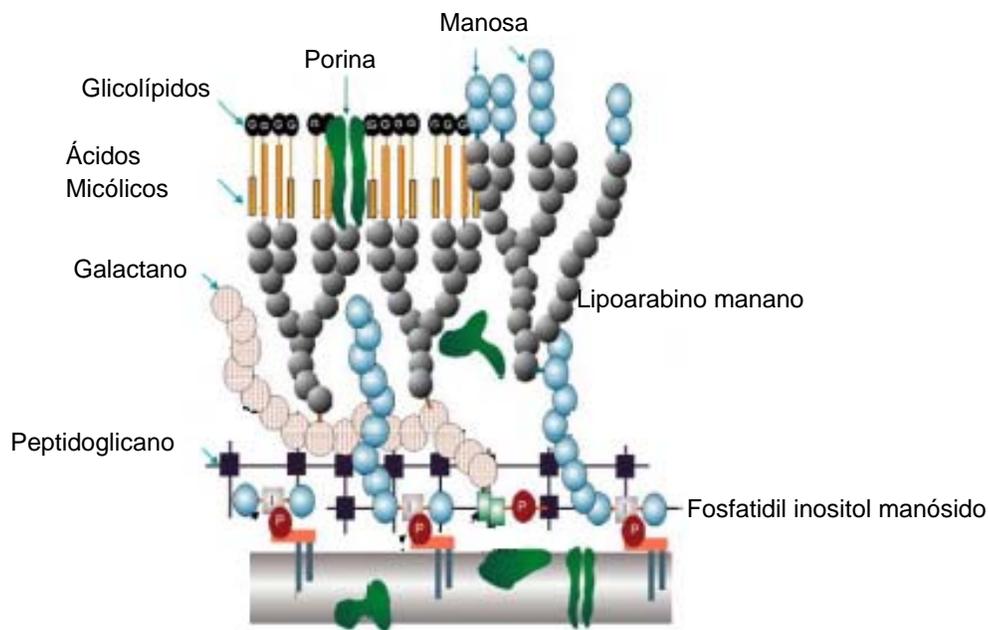


Figura 4. Modelo de la pared celular de *Mycobacterium* (Quesniaux et al., 2004).

polisacáridos, lípidos y proteínas (Fig.4); (Crick et al., 2001).

El genoma de *M. tuberculosis*

El genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv fue secuenciado en su totalidad en 1998 (Cole et al., 1998) y se le han hecho anotaciones posteriormente. El bacilo contiene 3924 genes que codifican para diversas proteínas. Al 40% de los genes se han atribuido funciones específicas sin ninguna ambigüedad, al otro 40% se le han asignado funciones hipotéticas, y el porcentaje restante corresponde a secuencias que solo están presentes en *M. tuberculosis*. La secuenciación del genoma del bacilo tuberculoso ha facilitado en gran medida la investigación en tuberculosis. Por ejemplo, se han podido clonar y expresar nuevos antígenos o epítomos (Ben et al., 2005; De Groot et al., 2005), o se han sintetizado péptidos a fin de identificar proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* con potencial para diagnóstico y/o para vacunación (Cockle et al., 2002). Sin embargo, al sesgar la búsqueda de antígenos para un determinado tipo de proteínas, como en los casos anteriores, puede perderse la información de antígenos valiosos.

Aunque algunos antígenos parecen candidatos prometedores para el diagnóstico o vacunación contra tuberculosis, como los antígenos Ag85, ESAT-6 y CFP-10 (Ben et al., 2005; Ravn et al., 2005), la heterogeneidad de la respuesta inmune hacia la tuberculosis en la población humana hace necesaria la búsqueda e identificación de nuevos antígenos específicos para poder incrementar la sensibilidad del diagnóstico y la capacidad protectora de una vacuna. En este sentido sería sumamente útil disponer de herramientas que permitan la identificación de múltiples antígenos o epítomos del genoma completo de *M. tuberculosis*.

Aplicación de fagos

A principios del siglo XX, mientras se desarrollaban cultivos con bacterias, se realizaron las primeras observaciones que demostraban la existencia de algún tipo de agente con capacidad infectiva que no era retenido por los filtros de porcelana y formaba placas en los cultivos de bacterias. Frederick Twort en 1915 fue uno de los primeros en referirse a este agente bacteriolítico; posteriormente, en 1917, Félix d'Herelle observó que estas zonas claras (llamadas placas) se debían a que las bacterias estaban muertas por dicho factor patógeno al cual le dio el nombre de "Bacteriófago" (Duckworth, 1976).

Los bacteriófagos, comúnmente llamados fagos, comenzaron a tomar importancia para tratar infecciones de origen bacteriano ya que de manera natural colonizan estos nichos (Gaidelyte et al., 2007). Estas características hicieron que varios científicos se dedicaran a investigar más acerca de las propiedades de estos virus de bacterias. Actualmente se han identificado micobacteriofagos capaces de lisar al bacilo *M. tuberculosis* (Peng et al., 2006).

Una de las limitantes de estos tratamientos recae en que cada tipo de fago es específico para ciertas cepas por lo que un diagnóstico preciso resultaba imprescindible, otro de los problemas a principios del siglo XX, era la poca información de la que se disponía acerca de la biología de los fagos, por lo que era sumamente complejo escalar los procesos de producción (Pennazio, 2006).

En 1930 se realizaron grandes avances sobre el conocimiento de los fagos, se demostró en varias especies de fago sus propiedades antigénicas y en 1940 con

la utilización del microscopio electrónico Ruska obtiene las primeras imágenes de un fago, seguido de Anderson y Luria (Pennazio, 2006), desde entonces se han realizado más de cinco mil observaciones de fagos al microscopio electrónico (Ackermann, 2006).

A finales de la segunda guerra mundial, con la aparición de los primeros fármacos, los fagos fueron rápidamente olvidados. Sin embargo la falta de distribución de antibióticos en Europa del Este favoreció que estos tratamientos continuaran siendo utilizados esporádicamente en diversos países como la ex Unión Soviética.

Existe una gran diversidad de tipos de fagos, por ejemplo fagos líticos de enterobacterias como el T2, T4 o T7, los cuales infectan diferentes cepas de *E. coli* (Steven et al., 1990), el fago P22 que infecta bacterias de *Salmonella*, el fago $\Phi 6$, que infecta bacterias de *Pseudomonas* o el Phi-X174, que fue éste uno de los primeros organismos secuenciado completamente (Brussow and Hendrix, 2002). También existen fagos temperados que pueden integrarse al genoma de la bacteria y replicarse en cada una de sus divisiones o usar una ruta lítica como el fago lambda.

Existen otro tipo de fagos no líticos (que infectan bacterias *E. coli*) como el M13, este fago es de tipo filamentosos y tiene un DNA circular de cadena sencilla de 6.4 Kb, que codifica 11 diferentes tipos de proteínas. Este fago tiene diversas proteínas de superficie, como la pIX, pVI o pIII que se expresan de 3-5 copias y la

pVIII que se expresa alrededor de 2700 veces por partícula de fago (Fig. 5) (Vispo and Puchades, 2001).

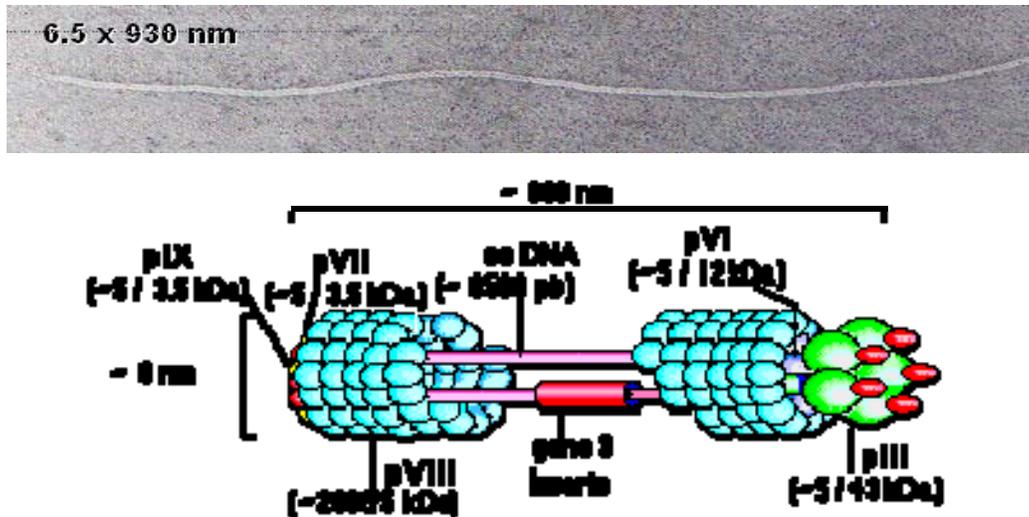


Figura 5. Micrografía y esquema de un fago M13 (Kay et al., 1996).

Fue hasta la década de los setenta que se comenzaron a utilizar los fagos como posibles herramientas de biología molecular, con la utilización de fagos M13 como vehículos para clonar y secuenciar fragmentos de DNA.

A mediados de los ochenta, George Smith demostró que se pueden utilizar estos fagos para generar bibliotecas con información genética, esto lo hizo mediante la clonación de un fragmento de la enzima Eco RI en la proteína de superficie pIII de un fago filamentoso M13 (Smith, 1985), y a principios de los noventa se generaron las primeras bibliotecas de péptidos expresados en fagos, las cuales se utilizan para identificar ligandos específicos (Cwirla et al., 1990).

Estos experimentos dieron la pauta para el desarrollo del Phage Display o Despliegue en Fago, tecnología con la cual se pueden expresar diferentes moléculas unidas a las proteínas de superficie de fagos, siendo las proteínas pIII y pVIII las más utilizadas para fusionar péptidos (Fig. 6). Con este sistema es posible construir bibliotecas con una diversidad de hasta $\sim 1 \times 10^{10}$. Esta tecnología puede ser aplicada en diferentes áreas, como la identificación de interacciones ligando-receptor, la búsqueda de regiones antigénicas/inmunogénicas, y la identificación de mimótopos de motivos antigénicos y/o inmunogénicos, entre otras (Tabla 2).

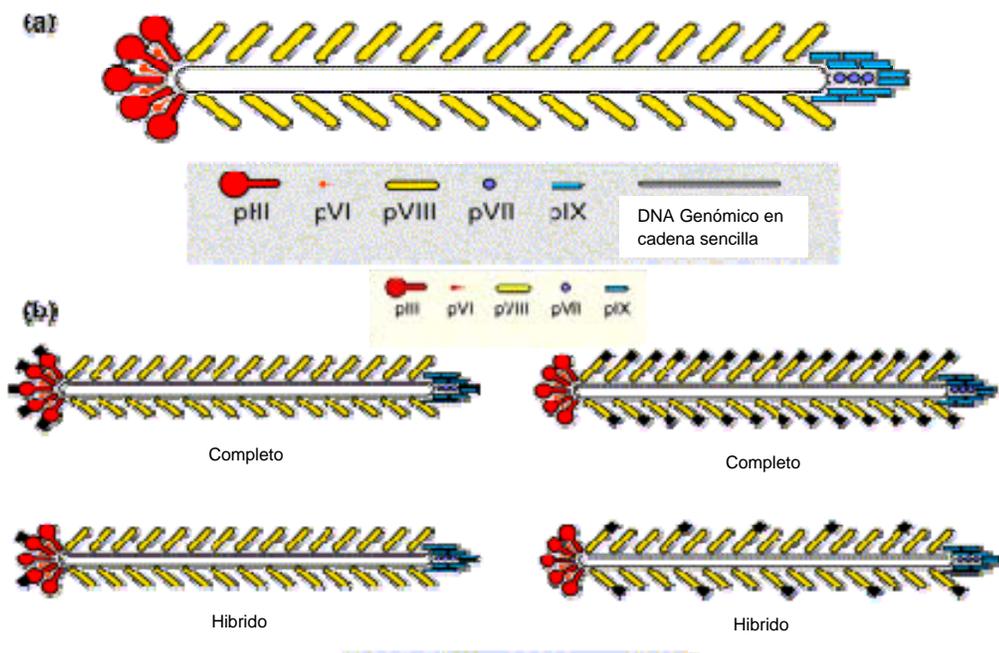


Figura 6. Expresión en diferentes proteínas de superficie. Fago M13 wild type (a); despliegue en proteína pIII (b); despliegue en proteína pVIII (c).

Tabla 2. Diferentes aplicaciones del Phage Display (Smothers et al., 2002).

Tipo de biblioteca	Aplicación
Péptidos	Interacciones proteína – péptido, DNA, RNA, glicolípidos, etc. Identificación de sitios específicos de unión para Diagnóstico Receptores agonistas o antagonistas Inhibición de enzimas Mimetismo o identificación de epítomos Determinación de sustratos específicos de proteasas Diseño de vacunas Identificación de marcadores específicos de células o tejidos
Fragmentos de anticuerpos	Identificación de sitios específicos para Terapia y diagnóstico humano Receptores agonistas o antagonistas Inhibición de enzimas Identificación de marcadores específicos de células o tejidos
Bibliotecas de cDNA Bibliotecas de DNA genómico	Identificación de complejos proteicos naturales Determinación de sustratos específicos de enzimas Interacciones proteína – proteína y epítomos Cambios de función en proteínas como: Incremento en la afinidad de pegado Alteraciones de especificidad de pegado Alteración en la especificidad de la enzima al sustrato Cinética enzimática

Actualmente se dispone de bibliotecas comerciales de péptidos al azar, y es relativamente sencillo construir bibliotecas específicas tanto en longitud de péptidos expresados, complejidad y origen del DNA (bibliotecas de péptidos al azar, DNA genómico, cDNA o fragmentos de anticuerpos Fab o scFv) fusionadas a algunas de las proteínas de la superficie del fago.

Las ventajas de la tecnología de despliegue en fagos son: su sencillez en su proceso de elaboración, el procesamiento simultáneo de una gran variedad de moléculas, su alto rendimiento sin la necesidad de utilizar áreas de bioseguridad, en el caso de expresar proteínas de patógenos, costos de producción relativamente bajos (ya que se utilizan reactores para infectar bacterias *E. coli*, cuya infección no es lítica, facilitando así el proceso de purificación).

Los péptidos expresados en este sistema pueden ser de diversos tamaños (desde 5 amino ácidos hasta 60 kDa), además de que los fagos tienen gran capacidad inmunogénica sin el uso de adyuvante y son resistentes al calor (hasta 70° C), a solventes orgánicos, urea y ácidos, facilitando su transporte (Smith and Petrenko, 1997). Por otra parte se sabe que los fagos pueden ser procesados y presentados tanto por la vía del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) o clase II (MHC-II), lo que le da una gran capacidad de presentar diversos tipos de antígenos (Gaubin et al., 2003), pudiendo favorecer la polarización de la respuesta inmune hacia tipo Th1 (respuesta principal ante patógenos intracelulares) o tipo Th2 (respuesta principal hacia patógenos extracelulares).

Las características de esta tecnología abren la posibilidad de poder desarrollar fármacos o identificar inmunógenos a corto plazo, los cuales pueden ser administrados junto con el fago o sintetizar por separado los péptidos para su administración (Sergeeva et al., 2006).

Aparte de las características antes mencionadas se ha observado en ensayos de inmunización de cerdos que los fagos pueden autopropagarse pasando de un individuo previamente inmunizado a otro que comparta su entorno (Manoutcharian et al., 2004). También se ha observado en ensayos con ratones que los fagos tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Frenkel and Solomon, 2002).

El sistema de fagos también se ha utilizado en el campo de la nanotecnología (Petty et al., 2007; Sarikaya et al., 2003). Mediante este sistema se han expresado péptidos en la proteína VIII del fago afines a precursores de nanocristales de ZnS y CdS, capaces de dirigir el ordenamiento de puntos cuánticos (Mao et al., 2003).

En el caso de *M. tuberculosis*, se han descrito bibliotecas de expresión en diversos sistemas, por ejemplo se han construido bibliotecas de expresión de DNA de antígenos o DNA genómico en sistemas que utilizan fagos lambda. Estos sistemas tienen la desventaja de que los fagos son líticos y para realizar las bioselecciones generalmente se tienen que realizar preabsorciones del suero con bacterias *E. coli* (Bisen et al., 2003; Lim et al., 2000). También se han construido bibliotecas de DNA genómico clonadas en vectores de expresión eucarionte para inmunizar ratones y realizar retos; en estos ensayos se ha sugerido la presencia de genes que codifican para proteínas importantes en la inmunidad contra Tb, pero sin

llegar a identificarlas puntualmente (Hernandez et al., 2006; Talaat and Stemke-Hale, 2005).

En este trabajo nos propusimos construir una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* en fagos filamentosos M13, e identificar a partir de ella nuevos antígenos para diagnóstico de tuberculosis activa. En esta biblioteca, los antígenos son desplegados en fagos, al ser expresados de manera recombinante en proteínas de superficie (pIII o pVIII) de fagos filamentosos M13.

La disponibilidad de tal biblioteca permitiría, a futuro, no solo la identificación de antígenos útiles para diagnóstico de tuberculosis activa, sino también de tuberculosis latente o para vacunación, además de auxiliar en la identificación de nuevas proteínas, cuya expresión en sistemas convencionales apareciera afectada.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente para el diagnóstico de TB se cuenta con diferentes métodos, como la prueba de PPD, el cultivo o la baciloscopía; sin embargo ninguno de ellos es totalmente efectivo, por lo que un método de inmunodiagnóstico sería más sencillo y barato.

Se han encontrado antígenos que son prometedores candidatos para el diagnóstico de tuberculosis activa, entre ellos, los antígenos Ag85, ESAT-6 y CFP-10 (Ben et al., 2005; Ravn et al., 2005), pero debido a la heterogeneidad de la respuesta inmune humoral, se requiere la identificación de nuevos antígenos específicos para poder incrementar la sensibilidad del diagnóstico (Abebe et al., 2007).

En este proyecto pretendemos identificar nuevos antígenos así como sus epítomos mediante la construcción y rastreo de una biblioteca genómica de *M. tuberculosis*. La construcción se realizará en fagos M13, sistema que ha sido descrito tanto para la expresión de epítomos B que son utilizados para inmunodiagnóstico (Kouzmitcheva et al., 2001; Robles et al., 2005), como para la inducción de respuesta inmune celular (Manoutcharian et al., 2004). El rastreo de clonas de fagos reactivas a anticuerpos será realizado utilizando sueros de ratón Balb/c infectado con *M. tuberculosis* (Hernandez-Pando et al., 1996), de manera que puedan captarse antígenos/epítomos que induzcan una respuesta humoral aunque solo sean expresados durante una infección. Con esta estrategia también es posible identificar antígenos T, por lo que adicionalmente planteamos la posibilidad de utilizarlos como subunidades de vacunación.

HIPÓTESIS

Mediante la técnica de despliegue en fagos, es posible construir una biblioteca genómica para expresar e identificar antígenos del bacilo *M. tuberculosis*.

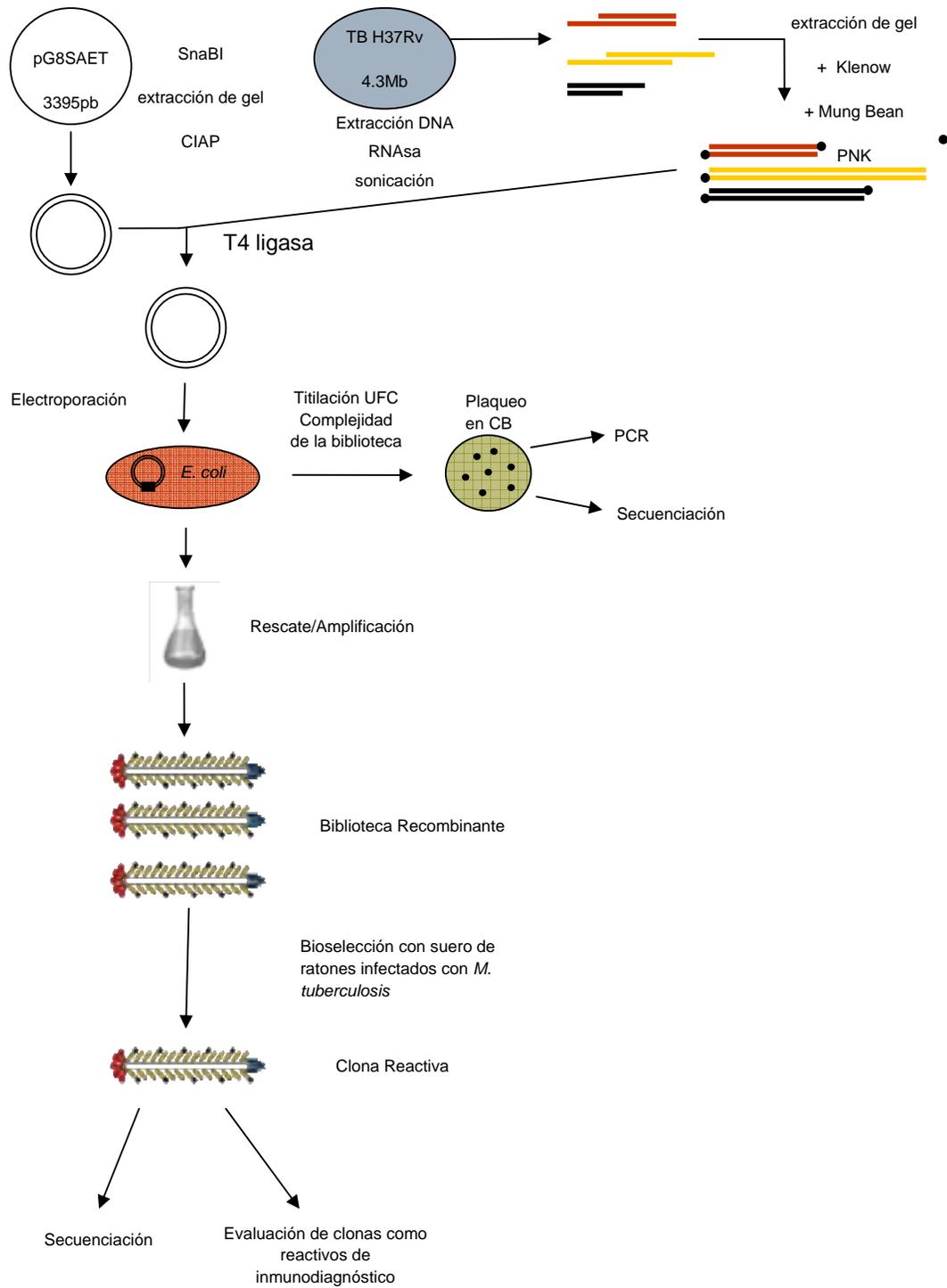
OBJETIVO GENERAL

Identificar antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando una biblioteca genómica expresada en fagos filamentosos y evaluar su utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Construcción de una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* expresada en la proteína pVIII del fago M13.
- 2.- Realizar una bioselección utilizando la biblioteca construida y suero de un ratón infectado con *M. tuberculosis*.
- 3.- Identificar las secuencias de los insertos de las clonas reactivas y evaluar la reactividad de las clonas obtenidas contra sueros de individuos con tuberculosis activa.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

El suero de ratón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv fue generosamente donado por el Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Cultivo de *M. tuberculosis*, extracción de DNA y preparación vector e insertos

Se cultivó la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv por 4 semanas, a 37°C en medio Sauton enriquecido con glucosa y piruvato al 5% (Kitaura et al., 2000) en condiciones de bioseguridad. Las colonias de *M. tuberculosis* se colectaron en búfer Tris-EDTA (pH=8.0) y se incubaron 20 minutos a 80 °C, posteriormente se incubó con lisozima 2 horas a 37 °C, y después con SDS y proteinasa K 20 minutos a 65 °C, para agregarles una mezcla de CTAB-NaCl. La precipitación del DNA se llevó a cabo utilizando cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Hosek et al., 2006). El DNA se trató con RNAsa, y se purificó usando el kit “Wizard plus SV minipreps, Promega™”, posteriormente se sonicó 25 veces en intervalos de 25 segundos. Los fragmentos sonicados de DNA se eluyeron de un gel de agarosa 0.8% en la región de 100 – 500 pb mediante el kit “Wizard plus SV minipreps, Promega™” y posteriormente fueron tratados con la enzima Klenow (Promega™) y Mung Bean (Fermentas™) para generar extremos romos. Por otra parte, el vector fagémido pG8SAET (donado por el Dr. Lars Frykberg, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala) fue digerido con la enzima de restricción *Sna*BI (New England Biolabs™) y defosforilado con fosfatasa alcalina (CIAP, Amersham Pharmacia Biotech™) para evitar su recircularización.

Construcción de la biblioteca

La construcción de la biblioteca de DNA genómico de *M. tuberculosis* se inició con la clonación de los insertos obtenidos en el sitio *Sna*BI del vector pG8SAET utilizando una proporción molar 1:5 vector-inserto mediante la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs™). Posteriormente, el producto de la ligación fue purificado mediante columna (Kit Wizard plus SV minipreps, Promega™) y se electroporó en 45 µl de bacterias *E. coli* TG1 usando el electroporador Gene Pulser II System (2.5 kV, 25 µF, 400Ω); (Bio-Rad, Labs, Hercules™, CA, USA) en cubetas de 2 mm. Las electroporaciones se realizaron utilizando 1 ml de medio SOC por cada reacción las cuales se colectaron en un tubo de 50 ml, incubándose a 37 °C por 1 hr sin agitación. Se plaquearon alícuotas del cultivo sobre agar LB/ cb (1 µl por cada ml de medio de una solución 50mg/ml) para determinar el número de transformantes y la complejidad de la biblioteca, y se guardó una alícuota de 700 µl de células transformadas en glicerol al 30% para congelarlas a -70°C (Jacobsson et al., 2003).

Para determinar el tamaño de los insertos, se realizó un PCR, a partir del DNA de la colonia bacteriana. En esterilidad se tomaron dos muestras con un palillo de cada colonia, una de ellas se estrió en una caja con LB/cb y la otra se resuspendió en 20 µl de agua estéril. Esta última se calentó por 10 minutos a 100 °C y se centrifugó 5 minutos a 13200rpm, del cual se tomó 5 µl y se agregó 1 µl del oligonucleótido sintético 5' 5YSAET (GGAAAAACATTTATTCAATTCGTAAGTAG) 25 pmol/µl; 1µl del oligo 3' F8 (GACAATGACAACAACCATCGCCCACGCATA) 25 pmol/µl; y 0.5 µl de la enzima Taq polimerasa (Altaenzymes™). El ciclo de temperaturas fue el siguiente: [94 °C 30seg]; [94 °C 30seg, 60 °C 30seg, 70 °C 1 min] 20 ciclos; [72 °C 1 min]. Una vez terminada la PCR, se analizó 2µl del medio de

reacción en un gel de agarosa al 0.8% en TBE 1x, a 100 volts, alrededor de 45 minutos.

Para la amplificación, se tomaron 500 μ l del sobrenadante de las células transformadas y se les agregó 5 μ l de fago *helper* M13KO7 (Invitrogen™) y se incubó 30 min. 37 °C sin agitación y 30 min. 37 °C en agitación a 250rpm. Posteriormente se agregaron 4.5 ml de 2xYT (50 μ g/ml cb/kb), se incubó toda la noche a 37 °C en agitación (200rpm). Al día siguiente se centrifugó 20 min. a 5000 rpm 4 °C, y se tomaron 3.4 ml por cada clona para agregarles 600 μ l de PEG/NaCl (20% p/v PEG 800, 2.5M NaCl) incubándose 1 hr en hielo. Enseguida se centrifugó 10 min a 14000rpm 4 °C; se descartó el sobrenadante, el sedimento fue resuspendió en 1.2 ml de TBS, se le agregó PEG/NaCl y se incubó 1 hr en hielo. A continuación, se centrifugó 10 min 14000rpm 4 °C y la biblioteca en fagos resultante se resuspendió en TBS.

ELISA de Proteínas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

En una placa para ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark™) se depositó 0.5 μ g de extracto total de proteínas de *M. tuberculosis* diluidas en 100 μ l/pozo de búfer de carbonatos, y se incubó toda la noche a 4 °C. Los posos se lavaron 5 veces con 200 μ l (PBS-Tween 20 al 0.2%) y se le agregó a cada pozo 200 μ l de PBS-BSA 2% e incubó 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente y se incubó con el suero del ratón infectado con *M. tuberculosis* diluido 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600 (en PBS-BSA al 1%, Tween 20 al 0.1%) 1hr 37 °C. Se lavó nuevamente y se incubó con anti IgG H+L de ratón conjugado a la fosfatasa (Sigma, St. Louis USA™), dilución 1:5000 (en 100 μ l de PBS-BSA al 1% Tween 20

0.1%), 1 hora a 37°C. Se lavó y agregó 100µl de 4-nitrofenilfosfato (a 1mg/ml en solución amortiguadora de dietanolamina). Se incubó a 37°C protegido de la luz el tiempo necesario para obtener la reacción colorimétrica. La densidad óptica fue leída a 405 nm y los resultados fueron graficados (Crowther, 2001).

Bioselección de la biblioteca con suero de ratón infectado con *M. tuberculosis*

Para identificar clonas reactivas, se realizó una bioselección utilizando una placa de ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark™). Cuatro pozos se cubrieron con 100µl de anti IgG de ratón (gamma) (0.5 µg/pozo) (Zymed, South San Francisco, CA, USA™) dilución 1:200 PBS, 1 hr. 37°C. Se lavó 10 veces con 200µl PBS-Tween20 0.3%, e incubó con 100µl de PBS-BSA 2% 1 hr. 37°C. Se realizaron 10 lavados con 200µl PBS-Tween20 0.3%. Posteriormente se agregó 100µl de suero de ratón Balb/c infectado con *M. tuberculosis* 1:100 PBS-BSA 1%, Tween20 0.1%, e incubó 1 hr 37°C. La placa se lavó 10 veces con 200µl de PBS-Tween20 0.3%. Se agregaron 100 µl/pozo de una solución de 2×10^{11} partículas de fagos /ml de la biblioteca en 450µl de PBS-BSA 0.1%, Tween20 0.1% e incubó toda la noche 4°C. Se lavó 10 veces con solución fría, y se agregó a cada pozo 100µl de trietilamina (0.1M), e incubó 30 min a temperatura ambiente. El eluido fue colectado y se le agregó 200µl de Tris-HCl (1M, pH 7.4). Los fagos eluidos fueron propagados en células *E. coli* TG1 y se rescataron usando el fago *helper* M13KO7 (como se describió previamente). En total se realizaron tres rondas de bioselección.

Después de cada ronda de bioselección, se procedió a determinar el número de fagos eluidos. Después de cada ronda se hicieron diluciones seriadas 1:10 en medio de cultivo 2xYT, a partir de los fagos eluidos de las bioselecciones anteriores.

Después de la última dilución, se agregaron los fagos a 200 ml de bacterias TG-1 (de un cultivo de toda la noche, $DO_{600} \sim 0.5$), e incubaron 45min 37 °C, posteriormente se inoculó en cajas Petri con medio LB/cb y se deja incubando toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se determinó el título.

Mega Selección

Con los fagos obtenidos de la tercera ronda se procedió a la selección de clonas reactivas. Se sensibilizó una placa de ELISA (Nunc Maxi Sorp, Denmark™) con 100µl de suero anti IgG de ratón (0.3 µg/pozo) en búfer de carbonatos 1hr 37 °C. Se hicieron 4 lavados con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.2%, enseguida se bloqueó con PBS-Leche 2% e incubó 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó y en la mitad de los pozos se depositaron 100 µl por pozo de suero pre inmune de ratón 1:200 y en la otra mitad 100 µl de suero de ratón infectado con *M. tuberculosis* 1:800 en PBS- Leche 2% Triton X-100 0.2%. Se incubó toda la noche a 4 °C.

En otra placa de ELISA estéril de 96 pozos se agregó a cada pozo 125 µl de 2xYT/cb (placa de de cultivo). De la caja Petri previamente incubada con los fagos de la tercera ronda utilizada para cuantificar el título, se seleccionaron colonias al azar se sembraron por separado en cada pozo de la placa de ELISA con el medio, y se incubó 4hrs 37 °C 250rpm.

Al término de la incubación se realiza una caja maestra, en otra placa de ELISA estéril de 96 pozos con 125 µl 2xYT/Cb por pozo mojando las puntas de una

pipeta multicanal en la placa de cultivo y enjuagándolas en la caja maestra, incubándose toda la noche 30 °C 250rpm. Al día siguiente se agregó 62.5 µl de glicerol/pozo y se guardó la caja a -80 °C.

Una vez realizada la caja maestra, se le agregó a cada pozo de la placa de ELISA de cultivo 2×10^7 /20 µl de fago Helper M13KO7 (Invitrogene™) e incubó 30 min sin agitación 37 °C y posteriormente 30 min con agitación 37 °C. Enseguida se centrifugó a 10min. 2500 rpm 4 °C. Se retiró el sobrenadante con pipeta (inclinando la placa sin mover la punta de lugar) y se le agregó 150 µl de 2xYT/ Cb/ Km por pozo e incubó toda la noche a 30 °C en agitación 250rpm. Al día siguiente, se centrifugó a 3000 rpm/10min/4 °C y se tomó 100 µl de cada clona; a esta alícuota se agregó 100 µl de PBS 2x Leche 4% Triton X-100 0.4% y se incubó 30 min. a temperatura ambiente.

La placa que se dejó sensibilizando toda la noche con los sueros, se lavó 4 veces con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.2% y se le agregó 100 µl por pozo (inmune y preinmune) de una dilución 1:1 de los fagos preincubados en PBS 2x Leche 4% Triton X-100 0.4% e incubó toda la noche 4 °C. Al día siguiente se retiraron los fagos y se lavó la placa (una vez manualmente con 200 µl de PBS-Tween 20 al 0.2% y 4 veces con 400 µl PBS-Tween 20 al 0.2%). Posteriormente se agregó un anticuerpo anti-M13 (Zymed™) 1:2000, en PBS- Leche 2% Triton X-100 0.2% y se incubó 1 hora 37 °C. Se lavó la placa y se le agregó 100 µl de anticuerpo anti conejo H+L conjugado HRP 1:5000 en PBS Leche 2% Triton X-100 0.2% e incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó la placa y se reveló con 100µl de ABTS incubándola 10 min 37 °C y se leyó 405 nm.

ELISA con suero de ratón infectado con *M. tuberculosis*

Una vez identificada la clona positiva se comprobó su reactividad mediante un ELISA. Para esto, se depositó 100µl de la clona 2G (1×10^{10} por pozo) diluidos en PBS-leche 2% Triton X-100 0.2% en una placa de ELISA (Nunc Maxi Sorp, DenmarkTM) y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó 4 veces con 400 µl de PBS-Tween 20 al 0.2%. Una vez realizado el lavado se bloqueó con PBS-leche 2% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó y se le agregó el suero de ratón infectado con *M. tuberculosis* diluido 1:800 en PBS-leche 2% Triton X-100 0.2%. Se incubó 1 hr a 37 °C y 1 hr a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado y se depositó el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado HRP 1:5000 en PBS-Leche 2% Triton X-100 0.2% y se incubó 1 hora 25 °C. Se lavó la placa y se reveló incubando con 100µl de ABTS por 15 minutos 37 °C al abrigo de la luz. La lectura se realizó a 405nm.

ELISA con suero de ratón para determinar subclases de anticuerpos

Se depositó 100µl de la clona 2G (1×10^{10} por pozo) diluida en PBS-leche 2% Triton X-100 0.2% y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con 400 µl de PBS-Tween 20 al 0.2% 4 veces. Una vez realizado el lavado se bloqueó con 200 µl PBS-leche 2% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se le agregó 100 µl por pozo del suero de ratón infectado con TB diluido 1:800 en PBS-leche 2% Triton X-100 0.2% y se incubó 1 hr a 37 °C y 1 hr a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado y se depositaron 100 µl por pozo de los anticuerpos (IgG2a (Th1) o IgG1 (Th2), 1:2500 conjugado con HRP en PBS-leche 2% Triton X-100 0.2%) y se incubó 1hr 37 °C. Se lavó la placa y se reveló con 100µl de ABTS 15 minutos a 37 °C al abrigo de la luz, midiendo la reacción a 405 nm.

Ensayos de ELISA con sueros de pacientes con tuberculosis

Para detectar anticuerpos específicos capturados por los fagos presentes en los sueros de pacientes con tuberculosis, se agregó 1×10^{10} fagos de la clona 2G en 100 μ l de PBS (pH 7.4) por pozo en una placa (Nunc Maxi Sorp, DenmarkTM) y se incubó toda la noche a 4 °C. Después se lavó y bloqueó con 200 μ l de PBS-BSA 2%. Posteriormente se lavó de nuevo y se le agregó 100 μ l del suero de cada paciente o los sueros de individuos sanos, diluidos 1:800 en PBS-leche 2% Triton X-100 0.2% y se incubó 1hr 37 °C. Se lavó la placa y se agregó 100 μ l el anticuerpo conjugado HRP anti IgG (H+L) de humano 1:5000 en PBS Leche 2% Triton X-100 0.2% y se incubó 1 hora a 25 °C. A continuación se lavó la placa y se le agregó 100 μ l del sustrato para peroxidasa ABTS (ZymedTM). La absorbancia se midió a 405 nm utilizando un lector de ELISA Opsys MR Microplate Reader (Dynex TechnologiesTM).

Secuenciación del DNA de cadena sencilla de los fagos

Se purificó el DNA de cadena sencilla de la clona que resultó positiva de la bioselección con suero de ratón inmunizado con *M. tuberculosis* y/o en los ensayos de ELISA con sueros de pacientes con tuberculosis. Se tomó 1 ml de sobrenadante de la primera centrifugación del proceso de amplificado de cada clona, se agregaron 400 μ l PEG/NaCl, y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min. Después se centrifugó por 10 min. 13200rpm, y se desechó el sobrenadante. Se agregó 200 μ l de búfer de yodo 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 4M Yoduro Sódico, para resuspender el residuo, posteriormente se agregó 500 μ l de etanol absoluto, se mezcló e incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 10 min. 13200rpm, se descartó el sobrenadante y se agregó 200 μ l etanol 70%. Se centrifugó 1 min. Finalmente el sedimento se resuspendió en 15.5 μ l de H₂O

bidestilada. Para verificar la presencia de DNA, se tomaron 2µl de la muestra y se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

La secuenciación del DNA de los fagos seleccionados se realiza mediante el uso del kit "T7 Sequenase versión 2.0 Quik-Denature plasmid sequencing" (Amersham Life Science, OH™) y dATP α -³⁵S según instrucciones del proveedor usando un oligo basado en el vector pG8SAET. Se incuban 10 min. a 37°C con 1.5µl de primer, 2µl de "plasmid reaction búfer" y 12.5 ml de DNA purificado de cada uno de las clonas (0.5-3 µl de DNA). Se incubó en hielo 10 min y se agregó 1µl de DTT (dithiothreitol) 0.1M, 2µl de *labeling mix* (dNTPs de G, T, C; 7.5mM c/u), 0.5µl de dATP α -³⁵S (3.75×10^{-13} µCi), y 1µl de enzima (4 unidades de polimerasa), se incubó 5 min. 37°C. En 4 tubos se agregó por cada reacción 2.5µl de dNTPs (80µM) nucleótidos análogos de terminación (G, A, T y C), a los cuales se agregó 4.5µl de la mezcla anterior incubandolos 5 min. a 37°C. A cada tubo se agregó 4µl de solución stop y se incubó 3 min. 75°C. Se agregó 6 µl de cada una de las muestras en los carriles de un gel de poliacrilamida al 8%; el cual se corrió 4.5 hrs. a 1800 Volts, el gel se secó en un secador de geles durante 60 min a 80°C. Se transfirió a un cassette en donde se expuso en una placa de rayos X por 72 hrs. Posteriormente se reveló la placa y se realizó la lectura para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos expresados en los insertos de los fagos.

Análisis de similitud de secuencias

Se utilizó el módulo de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) del programa BioEdit para determinar la similitud de los aminoácidos expresados en las clonas reactivas con las diferentes bases de datos disponibles para confirmar que estas secuencias pertenecen a *M. tuberculosis* y determinar la región que está siendo expresada. También se identificó la región expresada en la estructura tridimensional de la proteína mediante el programa Swiss-Pdb viewer (Guex and Peitsch, 1997).

RESULTADOS

Obtención y fragmentación de DNA de *M. tuberculosis*

El bacilo de *M. tuberculosis* H37Rv se cultivó por 4 semanas, a 37°C en medio Sauton enriquecido con glucosa y piruvato al 5%. El DNA genómico de *M. tuberculosis* fue extraído por medio de la técnica fenol-cloroformo y fragmentado por sonicación para obtener fragmentos de DNA que fueron posteriormente eluidos de un gel de agarosa al 0.8% (Fig. 7).

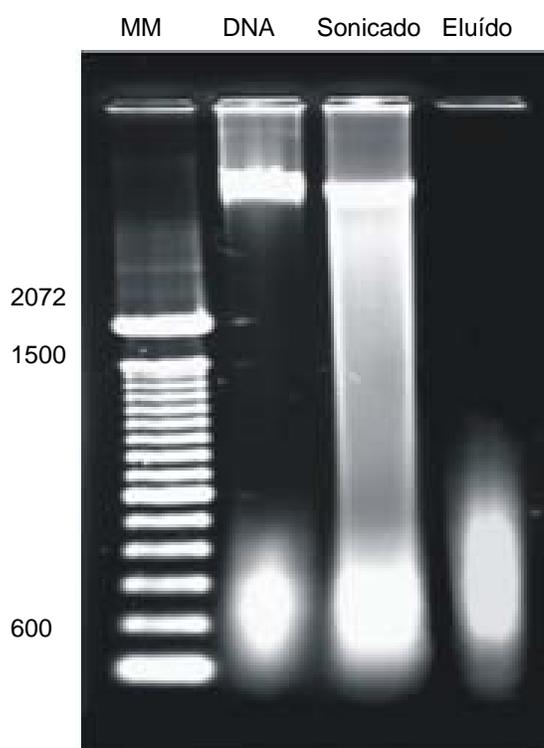


Figura 7. Purificación y fragmentación de DNA de *M. tuberculosis*, de izquierda a derecha se muestra en el gel de agarosa, el marcador molecular MM (pb), DNA genómico, DNA genómico después del tratamiento de sonicación y elución del sonicado.

Obtención de insertos de DNA de *M. tuberculosis* y purificación del vector

Los fragmentos de DNA eluidos se trataron con las enzimas Klenow y Mung Bean para generar extremos romos. Se utilizó el vector pG8SAET para poder expresar los antígenos/epítomos de *M. tuberculosis* fusionados a la proteína de superficie pVIII del fago M13, este vector fue digerido en el sitio SnaB1 ($TAC\downarrow GTA$) y eluído de un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente se trató con la enzima CIAP para eliminar los fósforos terminales y evitar que se ligara sobre sí mismo (Fig. 8).

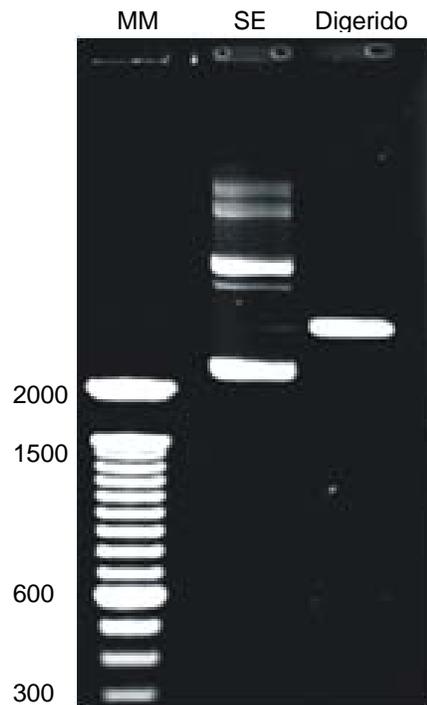


Figura 8. Purificación del vector pG8SAET, de izquierda a derecha se muestra en el gel de agarosa, marcador molecular (MM), vector pG8SAET súper enrollado y pG8SAET digerido con SnaB1.

Construcción y determinación de la complejidad de la biblioteca

Teniendo listo el vector y los insertos, se realizaron diversos ensayos de clonación en los cuales se transformaron bacterias *E. coli* (TG1) por electroporación y se plaquearon en cajas con LB agar adicionado con carbenicilina para seleccionar aquellas que incorporaron al fagémido. El crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) demostró que la transformación de *E. coli* fue exitosa. Algunas de estas UFC fueron seleccionadas al azar para purificar su DNA y realizarles un análisis de los productos amplificados. Par esto se realizó una PCR utilizando los cebadores sintéticos pySAET y F8, específicos para el vector pG8SAET, con lo cual se comprobó la existencia de fragmentos insertados en el vector.

Una vez estandarizado el método de clonación a 1:10 vector inserto en radio molar, se procedió a construir la biblioteca realizando 14 ligaciones simultáneas, las cuales se concentraron y purificaron con el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean Up System” de Promega™. Se transformaron bacterias *E. coli* TG1 por electroporación (en total 25 electroporaciones). Todas las ligaciones se colectaron en un “pool”, se guardaron bacterias transformadas en glicerol a -80 °C, asimismo, se tomó una muestra para titular y determinar la complejidad de la biblioteca, la cual se aproximadamente de 9×10^5 . Por otra parte se tomaron diez colonias, las cuales se analizaron por PCR para determinar el tamaño de los insertos clonados los cuales van de 100 – 400 pb (Fig. 9).

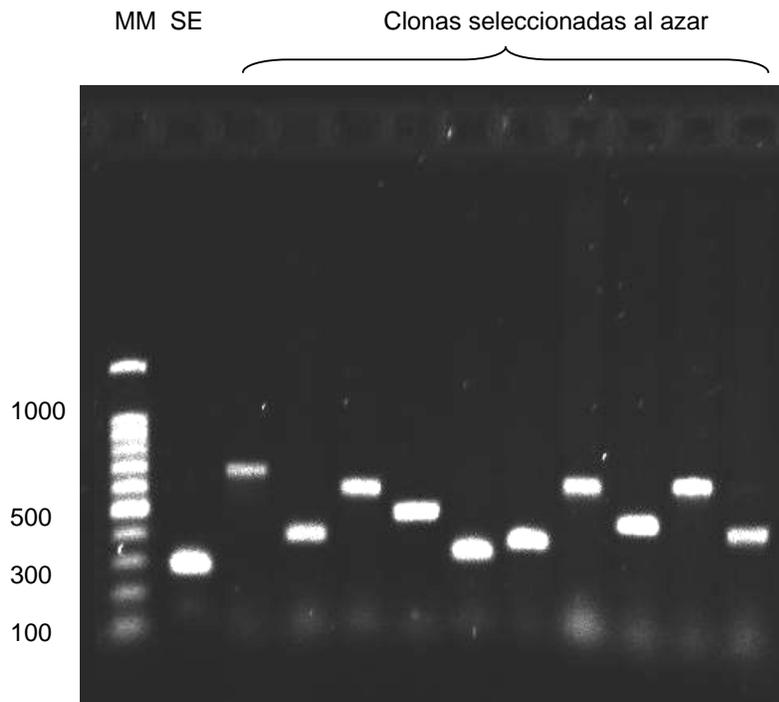


Figura 9. Determinación del tamaño de las clonas obtenidas de la biblioteca por PCR de colonia. De izquierda a derecha se muestra en el gel de agarosa el marcador molecular, vector pG8SAET como control, y diez unidades formadoras de colonia seleccionadas al azar.

Del resto de las transformantes se utilizó una parte para purificar plásmido por medio del kit "Plasmid Midiprep" Quiagen™ y el resto para realizar el rescate utilizando el fago helper M13KO7 seguido de la precipitación y purificación de los fagos recombinantes por medio de PEG/NaCl, obteniendo así la biblioteca genómica de *M. tuberculosis*.

Bioselección mediante un suero de ratón infectado con *M. tuberculosis*

Posteriormente se realizaron las bioselecciones utilizando un suero de un ratón infectado con *M. tuberculosis*, lo que permitiría el rastreo con anticuerpos producidos durante la infección. Esta estrategia permite la posibilidad de identificar antígenos que no hayan sido precisamente detectados, o incapaces de producirse *in vitro* (Fig. 10).

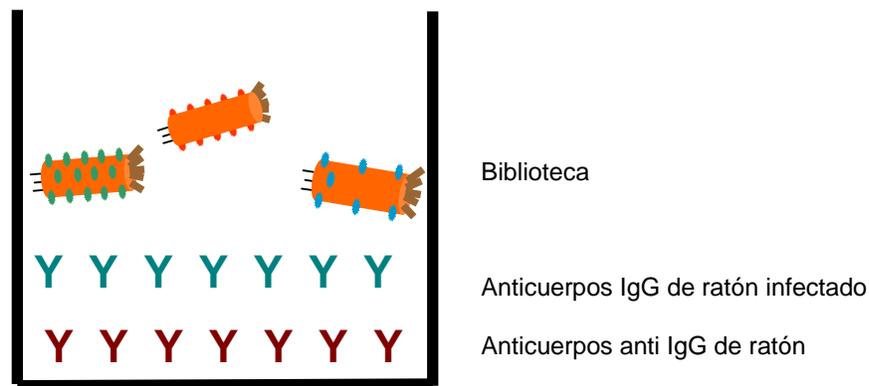


Figura 10. Representación esquemática del formato de bioselección.

Después de realizar 3 rondas de bioselección, el eluido de la última ronda fue cultivado en placa conforme al protocolo y se seleccionaron 90 clonas al azar. La reactividad de estas clonas fue probada mediante un mega selección. En este ensayo se encontraron tres clonas altamente reactiva al suero de ratón (Fig. 11),

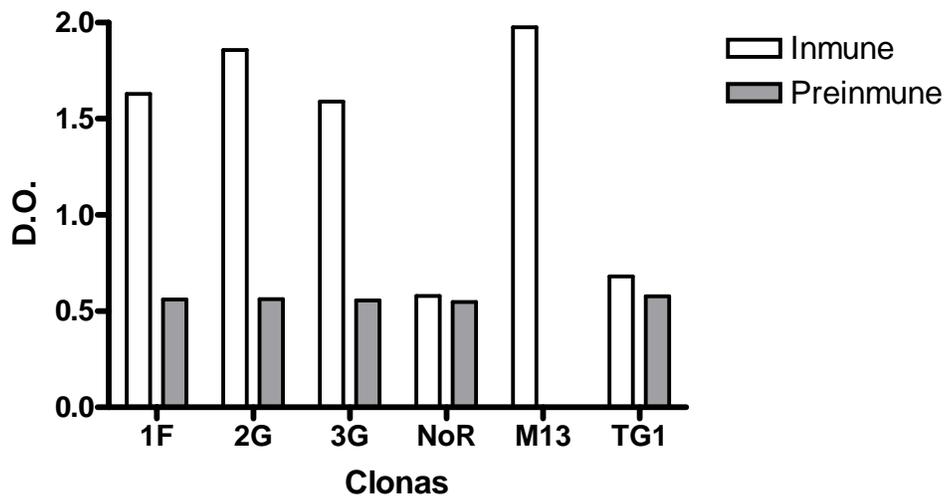


Figura 11. Determinación de la reactividad de 3 clonas seleccionadas contra suero de ratón infectado con *M. tuberculosis* mediante ELISA, (solo se muestran la clonas reactivas: 1F, 2G y 3G) clona no relacionada (NoR), anticuerpo anti M13 con clona no relacionada (antiM13) y medio de cultivo (TG1).

Determinación de la secuencia expresada en las clonas reactivas

Una vez identificadas las clonas reactivas, se infectaron bacterias *E. coli* y se purifico el plásmido, el cual se secuenció para determinar el péptido que está siendo expresado por la clona. Con la secuencia determinada de cada una de las clonas, se pudo observar que las tres expresaban el mismo inserto. Este inserto fue analizado mediante el programa Blast del NCBI, determinándose que corresponde a una región de una proteína reportada con función transportadora de acil-meromicolatos de *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998) con una identidad de 100% a nivel de amino ácidos y nucleótidos (Fig. 12).

Posteriormente se buscó la estructura tridimensional de la proteína transportadora de acil-meromicolatos (Wong et al., 2002) en la base de datos de Swiss-PDB, y se determinó la región correspondiente al inserto expresado de la clona reactiva 2G (Fig. 13).

```
>|gb|CP000611.1| D Mycobacterium tuberculosis H37Ra, complete genome
Length=4419977

Features in this part of subject sequence:
  meromycolate extension acyl carrier protein AcpM

Score = 274 bits (148), Expect = 7e-71
Identities = 148/148 (100%), Gaps = 0/148 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      CGGCGTCAAGATCCCCGACGAGGACCTCGCCGGTCTGCGTACCGTCGGTGACGTTGTTCGC 60
            |||
Sbjct 2527837 CGGCGTCAAGATCCCCGACGAGGACCTCGCCGGTCTGCGTACCGTCGGTGACGTTGTTCGC 2527896

Query 61     CTACATCCAGAAGCTCGAGGAAGAAAACCCGGAGGCGGCTCAGGCGTTGCGCGCAAGAT 120
            |||
Sbjct 2527897 CTACATCCAGAAGCTCGAGGAAGAAAACCCGGAGGCGGCTCAGGCGTTGCGCGCAAGAT 2527956

Query 121    TGAGTCGGAGAACCCCGATGCCGTTGCC 148
            |||
Sbjct 2527957 TGAGTCGGAGAACCCCGATGCCGTTGCC 2527984
```

Figura 12. Análisis bioinformático en Blast de la secuencia expresada en la clona reactiva 2G.

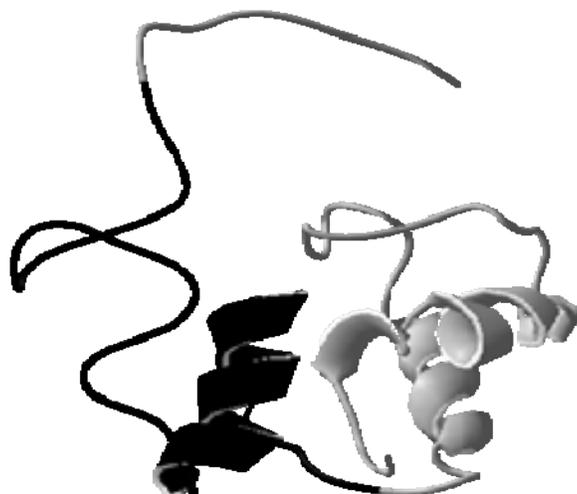


Figura 13. Estructura tridimensional de la proteína transportadora de acil-meromicolatos, en negro se marca la región correspondiente al inserto expresado en el fago.

Predicción teórica de él/los posible(s) epítopo(s) B

Una vez identificada la secuencia del inserto que es expresada por la clona, se determinó por diversos algoritmos bioinformáticos el posible epítopo (determinante antigénico) de células B dentro de la secuencia. A continuación se muestra la tabla con el método utilizado y la posible secuencia del epítopo (Tabla 3).

Tabla 3. Predicción *in silico* de los probables epítomos B

Algoritmo utilizado	Posible Epítopo B
Aproximación general	LAGLRTVGDVVAYIQK
Redes Neuronales	DLAGLRTVGDVVAYIQKLEE AYIQKLEEEENPEAAQALRAK
Hidrofobicidad	QKLEEEENPEAAQ IESENPDAV
Flexibilidad	AKIESEN
Accesibilidad	YIQKLEEEENPEAAQ RAKIESENPDA
Superficie Expuesta	QKLEEEENP
Polaridad	GVKIDEDLA YIQKLEEEENPEAA LRAKIESENP

Determinación de la reactividad de la clona obtenida

Con la clona seleccionada se realizó otro ELISA para confirmar su reactividad con suero de ratón infectado con *M. tuberculosis* (Fig. 14).

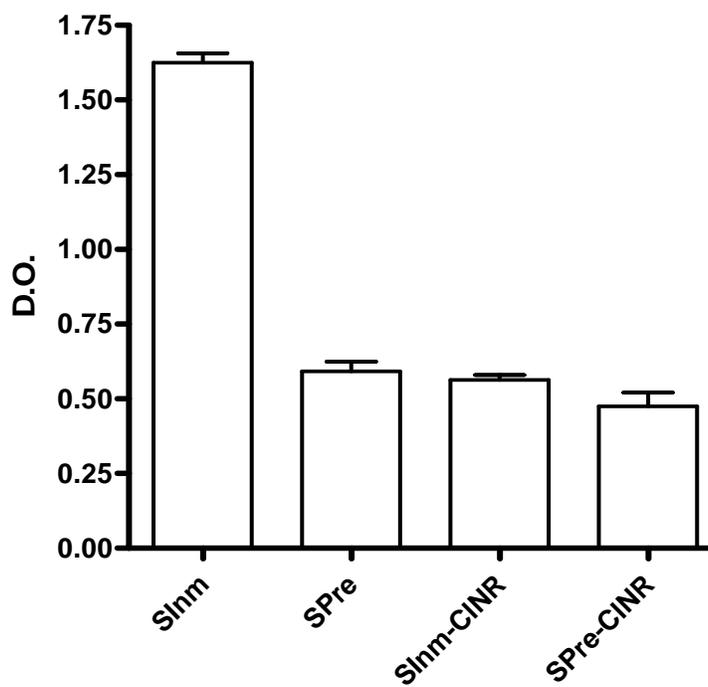


Figura 14. Determinación de la reactividad de la clona 2G mediante ELISA. Clona 2G con suero inmune (SInm), clona 2G con suero pre inmune (SPre), como control se utilizó una clona no relacionada con suero inmune (SInm-CINR) y preinmune (SPre-CINR).

Determinación de subclase de anticuerpos reconocidos por la clona

De igual forma se realizó un ensayo de ELISA para determinar la subclase de anticuerpos que reconocen la clona, en este ensayo se usaron anticuerpos anti IgG1 (respuesta inmune tipo Th2) e IgG2a (respuesta inmune tipo Th1) con lo cual se pudo observar que la clona es reconocida principalmente por anticuerpos IgG1, los cuales se pueden correlacionar con una respuesta inmune de tipo Th2 (Fig. 15) (Maassen et al., 2003).

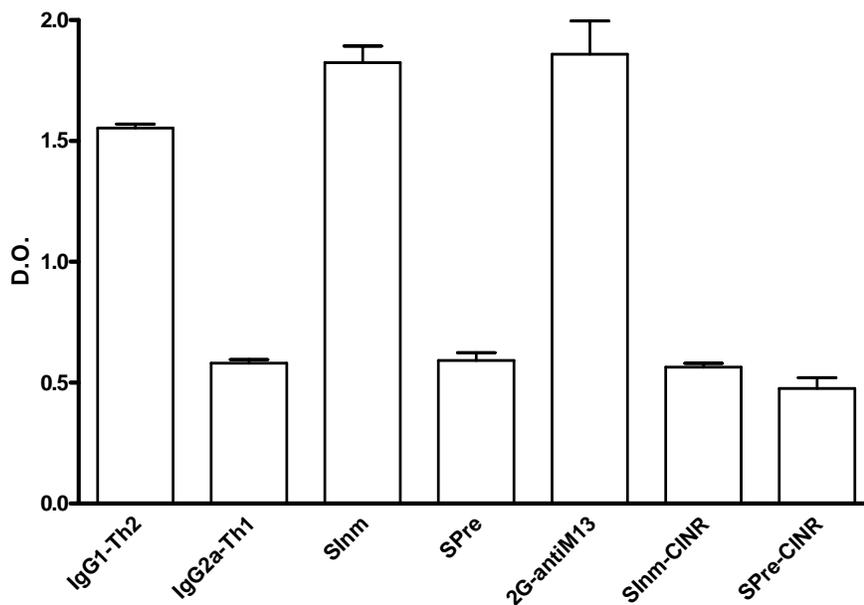


Figura 15. Determinación de la subclase de anticuerpos que reconoce la clona 2G mediante ELISA. De derecha a izquierda se muestra la clona 2G con anticuerpo anti-IgG1 (IgG1-Th2), la clona 2G con anti-IgG2a (IgG2a-Th1), como controles se utilizó la clona 2G con suero inmune, revelado con anti-IgG (SInm), y con suero preinmune con anti-IgG (SPre). También se incluyó un control de la clona 2G con anticuerpo anti-M13 (2G- antiM13), una clona no relacionada con suero inmune (SInm-CINR) y la misma clona no relacionada con suero preinmune (SPre-CINR).

Conclusiones

La tuberculosis es una enfermedad neumopática que afecta a gran parte de la población mundial, por lo que se necesita un método de diagnóstico accesible, sencillo y eficaz para rastrear esta enfermedad en amplias poblaciones, tanto en su forma activa como latente.

Los métodos de diagnóstico actuales como la prueba de PPD, el cultivo o la baciloscopía son poco prácticos y carecen de eficacia, por lo que la implementación de un método alternativo que sea sencillo y de bajo costo, como el inmunodiagnóstico, es una prioridad. Es factible que, identificándose los antígenos idóneos, el inmunodiagnóstico sea capaz de cumplir con los estándares marcados por la OMS en cuanto a sensibilidad (de al menos un 70%), y contribuir así para un mejor control de la enfermedad.

Actualmente se han propuesto varios antígenos como candidatos para el diagnóstico de tuberculosis, entre ellos las proteínas denominadas Ag85, ESAT-6 y CFP-10; sin embargo, las pruebas realizadas muestran que la heterogeneidad de la respuesta inmune humoral es muy amplia. Por esta razón, se requiere la identificación de nuevos antígenos/epítomos específicos los cuales ayuden a incrementar la sensibilidad del diagnóstico tanto de tuberculosis activa como latente.

El despliegue en fagos ofrece la capacidad de procesar y probar una gran cantidad de antígenos/epítomos al mismo tiempo, por lo que es ideal para encontrar moléculas relevantes para el desarrollo de un método de diagnóstico e incluso sub unidades de vacunación.

En este trabajo se describe la primera biblioteca de expresión del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* desplegada en fagos. La biblioteca contiene fragmentos proteicos del bacilo insertados en la proteína de superficie pVIII del fago filamentoso M13. Expresa potencialmente decenas de miles de fragmentos proteicos del bacilo, incluyendo probablemente aquellos que no han logrado ser expresados en cultivos *in vitro*, del patógeno. En efecto, aun cuando muchos de las clonas contendrían fragmentos que se encuentran fuera del marco de lectura de *M. tuberculosis*, se tiene una probabilidad de 1/18 para que los insertos sean traducidos como proteínas correspondientes al bacilo. Con una complejidad de la biblioteca estimada de 9×10^5 , se obtendrían un total de 5×10^4 clonas que están en marco de lectura correcta respecto a *M. tuberculosis*. Si se considera que el rango promedio de los insertos clonados en el vector es de 200pb, una biblioteca con una complejidad de 5×10^4 estaría expresando 1×10^7 pb por lo que, teóricamente, todo el genoma de *M. tuberculosis* (4.4 Mega bases) estaría siendo expresado en este sistema de fagos.

Utilizando la biblioteca construida, identificamos un nuevo antígeno de *M. tuberculosis*. El antígeno es el fragmento de una proteína cuya secuencia lo define como una acil-transferasa de ácidos grasos de gran longitud de *Mycobacterium*, y fue identificado por afinidad de la clona que lo expresa hacia anticuerpos presentes en un animal con infección activa de *M. tuberculosis*. Podemos deducir que esta proteína, implicada en la biogénesis de la pared celular, es sintetizada en el contexto de una infección.

El sistema de despliegue en fagos utilizado en este proyecto ha sido descrito previamente para otros organismos tanto para la expresión de epítomos B que son

utilizados para inmunodiagnóstico (Kouzmicheva *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2005), como para la inducción de respuesta inmune celular (Gaubin *et al.*, 2003, Manoutcharian *et al.*, 2004).

Es interesante ahora investigar si el antígeno identificado, ya sea en el contexto de fago o en forma libre, es capaz de discriminar entre individuos con tuberculosis activas e individuos sanos o con otros tipos de afecciones pulmonares (infecciosas o crónico-degenerativas).

En el marco de este trabajo nos enfocamos a buscar clonas con potencial diagnóstico para tuberculosis activa, realizando una bioselección con un suero de ratón infectado con *M. tuberculosis*. Sin embargo, la biblioteca construida hará posible el desarrollo de otros tipos de trabajos, tales como identificación de reactivos de diagnóstico para tuberculosis latente, o de inmunógenos para vacunación, contribuyendo así a solucionar dos de los principales problemas actuales para el control de la tuberculosis: falta de diagnóstico y baja eficacia en la vacunación.

Perspectivas

Dentro de las perspectivas proponemos realizar ensayos de ELISA con sueros de pacientes infectados con tuberculosis, e individuos sanos a fin de determinar la utilidad de la clona identificada como reactivo de diagnóstico. Proponemos también la identificación de clonas adicionales mediante bioselecciones con anticuerpos específicos contra antígenos ya identificados de *M. tuberculosis*.

Un punto importante será el evaluar alternativas para utilizar como reactivos de diagnóstico los antígenos de *M. tuberculosis* identificados con la metodología y biblioteca planteados en este trabajo. Dichas alternativas comprenderían el uso de los antígenos libres de fago (sintéticos), así como la inclusión de procedimientos de pre-adsorción de sueros con fagos nativos.

Finalmente, planeamos utilizar la biblioteca aquí construida para un tamizaje que permita la identificación de antígenos inductores de activación linfocitaria (inmunógenos potencialmente protectores). Estos ensayos podrían ser realizados utilizando monocitos de sangre periférica de pacientes infectados con tuberculosis e individuos primo-infectados sanos para cuantificar la producción (y en su caso el tipo) de interleucinas (INF- γ , TGF- β , TNF), pudiendo así determinar su papel como inductores de respuesta celular e identificar posibles antígenos de células T, como componentes de una vacuna.

Referencias

- Abebe,F., Holm-Hansen,C., Wiker,H.G., and Bjune,G. (2007). Progress in serodiagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *Scand. J Immunol.* 66, 176-191.
- Ackermann,H.W. (2006). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.*
- Barnes,P.F. (1994). T-cell response and cytokines. ASM Press U.S.A.), pp. 417-435.
- Ben,A.Y., Shashkina,E., Johnson,S., Bifani,P.J., Kurepina,N., Kreiswirth,B., Bhattacharya,S., Spencer,J., Rendon,A., Catanzaro,A., and Gennaro,M.L. (2005). Immunological characterization of novel secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 61, 139-146.
- Bisen,P.S., Garg,S.K., Tiwari,R.P., Tagore,P.R., Chandra,R., Karnik,R., Thaker,N., Desai,N., Ghosh,P.K., Fraziano,M., and Colizzi,V. (2003). Analysis of the shotgun expression library of the Mycobacterium tuberculosis genome for immunodominant polypeptides: potential use in serodiagnosis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10, 1051-1058.
- Bloom,B.R. (1994). Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control. Blackwellpublishing, American Society for Microbiology).
- Bothamley,G.H., Beck,J.S., Schreuder,G.M., D'Amaro,J., de Vries,R.R., Kardjito,T., and Ivanyi,J. (1989). Association of tuberculosis and M. tuberculosis-specific antibody levels with HLA. *J. Infect. Dis.* 159, 549-555.
- Brewer,T.F. (2000). Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 31 *Suppl* 3, S64-S67.
- Brussow,H. and Hendrix,R.W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108, 13-16.
- Burman,W.J., Stone,B.L., Reves,R.R., Wilson,M.L., Yang,Z., el-Hajj,H., Bates,J.H., and Cave,M.D. (1997). The incidence of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 155, 321-326.
- Chan,E.D., Heifets,L., and Iseman,M.D. (2000). Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber. Lung Dis.* 80, 131-140.
- Chan,J. and Kaufmann,S. (1994). Immune mechanisms of protection. ASM Press U.S.A.), pp. 389-415.

- Chen,Z.W. (2005). Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections. *Clin. Immunol.* 116, 202-207.
- Cockle,P.J., Gordon,S.V., Lalvani,A., Buddle,B.M., Hewinson,R.G., and Vordermeier,H.M. (2002). Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect. Immun.* 70, 6996-7003.
- Cole,S.T., Brosch,R., Parkhill,J., Garnier,T., Churcher,C., Harris,D., Gordon,S.V., Eiglmeier,K., Gas,S., Barry,C.E., III, Tekaia,F., Badcock,K., Basham,D., Brown,D., Chillingworth,T., Connor,R., Davies,R., Devlin,K., Feltwell,T., Gentles,S., Hamlin,N., Holroyd,S., Hornsby,T., Jagels,K., Krogh,A., McLean,J., Moule,S., Murphy,L., Oliver,K., Osborne,J., Quail,M.A., Rajandream,M.A., Rogers,J., Rutter,S., Seeger,K., Skelton,J., Squares,R., Squares,S., Sulston,J.E., Taylor,K., Whitehead,S., and Barrell,B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Cole,S.T., Davis Eisenach,K., McMurray,D., and Jacobs,W.R.J. (2005). Tuberculosis and the tubercle bacillus.
- Collins,F.M. (1998). Mycobacterial pathogenesis: a historical perspective. *Front Biosci.* 3, e123-e132.
- Crick,D.C., Mahapatra,S., and Brennan,P.J. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* 11, 107R-118R.
- Crowther,J.R. (2001). *The Elisa Guidebook (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press Inc.).
- Crubezy,E., Ludes,B., Poveda,J.D., Clayton,J., Crouau-Roy,B., and Montagnon,D. (1998). Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C. R. Acad. Sci. III* 321, 941-951.
- Cwirla,S.E., Peters,E.A., Barrett,R.W., and Dower,W.J. (1990). Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 6378-6382.
- Daniel,T.M. and Debanne,S.M. (1987). The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 1137-1151.

De Groot,A.S., McMurry,J., Marcon,L., Franco,J., Rivera,D., Kutzler,M., Weiner,D., and Martin,B. (2005). Developing an epitope-driven tuberculosis (TB) vaccine. *Vaccine* 23, 2121-2131.

Demissie,A., Abebe,M., Aseffa,A., Rook,G., Fletcher,H., Zumla,A., Weldingh,K., Brock,I., Andersen,P., and Doherty,T.M. (2004). Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2. *J. Immunol.* 172, 6938-6943.

Draper,P. (1998). The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci.* 3, D1253-D1261.

Duckworth,D.H. (1976). "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriol. Rev.* 40, 793-802.

Ernst,J.D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66, 1277-1281.

Flynn,J.L. and Chan,J. (2001a). Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 93-129.

Flynn,J.L. and Chan,J. (2001b). Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* 69, 4195-4201.

Frenkel,D. and Solomon,B. (2002). Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 5675-5679.

Gaidelyte,A., Vaara,M., and Bamford,D.H. (2007). Bacteria, phages and septicemia. *PLoS ONE.* 2, e1145.

García-Sancho,F.M. (2001). Respuesta immune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 14, 114-128.

Gaubin,M., Fanutti,C., Mishal,Z., Durrbach,A., De,B.P., Sartorius,R., Del,P.G., Guardiola,J., Perham,R.N., and Piatier-Tonneau,D. (2003). Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. *DNA Cell Biol.* 22, 11-18.

Glickman,M.S. and Jacobs,W.R., Jr. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 104, 477-485.

- Goodfellow,M. and Magee,J.G. (1998). Mycobacteria I, Basic Aspects. In Taxonomy of mycobacteria, Chapman & Hall Medical Microbiology Series, New York.), pp. 1-71.
- Guex,N. and Peitsch,M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Hernandez,Y.L., Corona,D.Y., Rodriguez,S.S., Infante Bourzac,J.F., Sarmiento,M.E., Arzuaga,N.O., Maceo,E.C., Diaz,D., Diaz,R., and Dominguez,A.A. (2006). Immunization of mice with a Mycobacterium tuberculosis genomic expression library results in lower bacterial load in lungs after challenge with BCG. *Tuberculosis (Edinb.)* 86, 247-254.
- Hernandez-Pando,R., Orozcoe,H., Sampieri,A., Pavon,L., Velasquillo,C., Larriva-Sahd,J., Alcocer,J.M., and Madrid,M.V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89, 26-33.
- Hosek,J., Svastova,P., Moravkova,M., Pavlik,I., and Bartos,M. (2006). Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinari Medicina* 51, 180-192.
- Hoshino,Y., Tse,D.B., Rochford,G., Prabhakar,S., Hoshino,S., Chitkara,N., Kuwabara,K., Ching,E., Raju,B., Gold,J.A., Borkowsky,W., Rom,W.N., Pine,R., and Weiden,M. (2004). Mycobacterium tuberculosis-induced CXCR4 and chemokine expression leads to preferential X4 HIV-1 replication in human macrophages. *J. Immunol.* 172, 6251-6258.
- Ismail,N., Olano,J.P., Feng,H.M., and Walker,D.H. (2002). Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 111-120.
- Jacobsson,K., Rosander,A., Bjerketorp,J., and Frykberg,L. (2003). Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biol. Proced. Online.* 5, 123-135.
- Johns Hopkins University. The Center for Tuberculosis Research Laboratory. 2008.
Ref Type: Internet Communication
- Kaufmann,S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* 1, 20-30.
- Kay,B.K., Winter,J., and McCafferty,J. (1996). Phage Display of Peptides and Proteins A Laboratory Manual. Academic Press USA).

- Kitaura,H., Ohara,N., Naito,M., Kobayashi,K., and Yamada,T. (2000). Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*. *APMIS* 108, 558-564.
- Koul,A., Herget,T., Klebl,B., and Ullrich,A. (2004). Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 189-202.
- Kouzmitcheva,G.A., Petrenko,V.A., and Smith,G.P. (2001). Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 8, 150-160.
- Krutzik,S.R., Sieling,P.A., and Modlin,R.L. (2001). The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 104-108.
- Lety,M.A., Nair,S., Berche,P., and Escuyer,V. (1997). A single point mutation in the embB gene is responsible for resistance to ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2629-2633.
- Lim,R.L., Tan,L.K., Lau,W.F., Ming,M.C., Dunn,R., Too,H.P., and Chan,L. (2000). Cloning and expression of immunoreactive antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 7, 600-606.
- Maassen,C.B., Boersma,W.J., van Holten-Neelen,C., Claassen,E., and Laman,J.D. (2003). Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. *Vaccine* 21, 2751-2757.
- Manabe,Y.C. and Bishai,W.R. (2000). Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. *Nat. Med* 6, 1327-1329.
- Manoutcharian,K., az-Orea,A., Gevorkian,G., Fragoso,G., Acero,G., Gonzalez,E., De,A.A., Villalobos,N., Gomez-Conde,E., and Scitutto,E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 11-24.
- Mao,C., Flynn,C.E., Hayhurst,A., Sweeney,R., Qi,J., Georgiou,G., Iverson,B., and Belcher,A.M. (2003). Viral assembly of oriented quantum dot nanowires. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 6946-6951.
- Mariam,D.H., Mengistu,Y., Hoffner,S.E., and Andersson,D.I. (2004). Effect of rpoB mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1289-1294.

- Markowitz,N., Hansen,N.I., Wilcosky,T.C., Hopewell,P.C., Glassroth,J., Kvale,P.A., Mangura,B.T., Osmond,D., Wallace,J.M., Rosen,M.J., and Reichman,L.B. (1993). Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Ann. Intern. Med.* 119, 185-193.
- Marques Gomes,M.J. (2004). [Tuberculosis. Future perspectives]. *Rev. Port. Pneumol.* 10, 135-144.
- Martini,F.H. and Bartholomew,E.F. (1997). *Essentials of anatomy and physiology.*
- Martino,A., Casetti,R., Sacchi,A., and Poccia,F. (2007). Central memory Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes primed and expanded by bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells kill mycobacterial-infected monocytes. *J Immunol.* 179, 3057-3064.
- McEvoy,G.K. (1994). *Drug information 94.* Bethesda MD:American Society of Hospital Pharmacists 1631-1636.
- Menzies,D. (1999). Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 159, 15-21.
- Morlock,G.P., Metchock,B., Sikes,D., Crawford,J.T., and Cooksey,R.C. (2003). *ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3799-3805.
- Neyra,J. (1957). Sala Santa Rosa del Hospital Dos de Mayo. Cincuenta años de Tisiología en el Perú. *Revista Peruana de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias* 17, 348-352.
- Noordhoek,G.T., van Embden,J.D., and Kolk,A.H. (1993). Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of Mycobacterium tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 329, 2036.
- Orme,I. (1995). *Inmunity to Mycobacteria.* Springer–Verlag R.G. Landes Company), pp. 3-70.
- Pacheco,J.D. (2000). Algunas consideraciones sobre la tuberculosis en el SIDA: aspectos más relevantes. *Rev Fac Med UNAM* 43, 49-51.
- Parrish,N.M., Dick,J.D., and Bishai,W.R. (1998). Mechanisms of latency in Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol.* 6, 107-112.

- Peng,L., Chen,B.W., Luo,Y.A., and Wang,G.Z. (2006). Effect of mycobacteriophage to intracellular mycobacteria in vitro. *Chin Med J (Engl.)* 119, 692-695.
- Pennazio,S. (2006). The origin of phage virology. *Riv. Biol.* 99, 103-129.
- Petty,N.K., Evans,T.J., Fineran,P.C., and Salmond,G.P. (2007). Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol.* 25, 7-15.
- Quesniaux,V., Fremont,C., Jacobs,M., Parida,S., Nicolle,D., Yeremeev,V., Bihl,F., Erard,F., Botha,T., Drennan,M., Soler,M.N., Le,B.M., Schnyder,B., and Ryffel,B. (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes. Infect.* 6, 946-959.
- Raviglione,M.C. and Smith,I.M. (2007). XDR tuberculosis--implications for global public health. *N. Engl. J. Med.* 356, 656-659.
- Ravn,P., Munk,M.E., Andersen,A.B., Lundgren,B., Lundgren,J.D., Nielsen,L.N., Kok-Jensen,A., Andersen,P., and Weldingh,K. (2005). Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 12, 491-496.
- Robles,Y., Gonzalez,E., Govezensky,T., Mungia,M.E., Acero,G., Bobes,R.J., Gevorkian,G., and Manoutcharian,K. (2005). Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. *Clin. Immunol.* 116, 265-270.
- Sarikaya,M., Tamerler,C., Jen,A.K., Schulten,K., and Baneyx,F. (2003). Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat. Mater.* 2, 577-585.
- Schlossberg,D. (1999). Tuberculosis and nontuberculous Mycobacterial infections.
- Secretaría de Salud (2001). Programa de Acción: Tuberculosis.
- Seiler,P., Ulrichs,T., Bandermann,S., Pradl,L., Jorg,S., Krenn,V., Morawietz,L., Kaufmann,S.H., and Aichele,P. (2003). Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. *J. Infect. Dis.* 188, 1326-1331.
- Sergeeva,A., Kolonin,M.G., Molldrem,J.J., Pasqualini,R., and Arap,W. (2006). Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1622-1654.

Small,P.M. (1999). Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS. Plenary lecture given at the 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Bangkok, Thailand, 23-26 November 1998. Directly observed therapy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3, 949-955.

Smith,G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

Smith,G.P. and Petrenko,V.A. (1997). Phage Display. *Chem. Rev.* 97, 391-410.

Smothers,J.F., Henikoff,S., and Carter,P. (2002). Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries. *Science* 298, 621-622.

Steven,A.C., Greenstone,H., Bauer,A.C., and Williams,R.W. (1990). The maturation-dependent conformational change of the major capsid protein of bacteriophage T4 involves a substantial change in secondary structure. *Biochemistry* 29, 5556-5561.

Stop TB Partnership and World Health Organization (2006). The global plan to stop TB 2006-2015.

Sugita,M., Cernadas,M., and Brenner,M.B. (2004). New insights into pathways for CD1-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 90-95.

Talaat,A.M. and Stemke-Hale,K. (2005). Expression library immunization: a road map for discovery of vaccines against infectious diseases. *Infect. Immun.* 73, 7089-7098.

Tapia,C.R., Ruiz,M.C., and Ferreira,G.E. (1995). Epidemiología de la tuberculosis en México. In *Temas de Medicina Interna: Tuberculosis.*, Interamericana McGraw-Hill), pp. 761-788.

Tiruvilumala,P. and Reichman,L.B. (2002). Tuberculosis. *Annu. Rev. Public Health* 23, 403-426.

Torrelles,J.B., Khoo,K.H., Sieling,P.A., Modlin,R.L., Zhang,N., Marques,A.M., Treumann,A., Rithner,C.D., Brennan,P.J., and Chatterjee,D. (2004). Truncated structural variants of lipoarabinomannan in *Mycobacterium leprae* and an ethambutol-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 279, 41227-41239.

Torres,C. and Mujica,O.J. (2004). [Health, equity, and the Millennium Development Goals]. *Rev. Panam. Salud Publica* 15, 430-439.

Vanham,G., Toossi,Z., Hirsch,C.S., Wallis,R.S., Schwander,S.K., Rich,E.A., and Ellner,J.J. (1997). Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/energy. *Tuber. Lung Dis.* 78, 145-158.

Vijayan,V.K. (2002). Clinical aspects of tuberculosis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 17, 96-100.

Vispo,N.S. and Puchades,Y. (2001). Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biología Aplicada* 135-147.

Wade,M.M. and Zhang,Y. (2004). Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 53, 769-773.

Wadsworth Center. Thin section transmission electron micrograph of *Mycobacterium tuberculosis*. 2008.

Ref Type: Internet Communication

Warren,J.R., Bhattacharya,M., De Almeida,K.N., Trakas,K., and Peterson,L.R. (2000). A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 161, 1559-1562.

Wong,H.C., Liu,G., Zhang,Y.M., Rock,C.O., and Zheng,J. (2002). The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol. Chem.* 277, 15874-15880.

World Health Organization (1997). Tuberculosis Diagnostics Workshop: Product Development Guidelines.

World Health Organization (2007). Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing.

Yamamoto,S. and Yamamoto,T. (2007). Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60, 331-336.

Young,D.B. and Robertson,B.D. (1998). Approaches to combat tuberculosis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 650-652.

Zink,A.R., Grabner,W., Reischl,U., Wolf,H., and Nerlich,A.G. (2003). Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol. Infect.* 130, 239-249.

Zink,A.R., Reischl,U., Wolf,H., and Nerlich,A.G. (2002). Molecular analysis of ancient microbial infections. *FEMS Microbiol. Lett.* 213, 141-147.