



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**EVALUACIÓN DE MIMÓTOPOS
PEPTÍDICOS COMO REACTIVOS PARA
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE
TUBERCULOSIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MACTZIL PETO PINEDA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Luz María López Marín del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Agradezco a los miembros del H. Jurado por sus comentarios y críticas respecto al trabajo.

Dra. Luz María López Marín

Dra. Leticia Moreno Fierros

M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras

Biol. Antonio Muñoz

M en C. Eric Monroy Perez

A la Dra. Luz por brindarme el apoyo y las facilidades para que este trabajo se llevara a cabo.

A la Biol. Erika Segura Salinas y al Biol. Gonzalo Acero Galindo gracias por el apoyo y la amistad brindada.

Al Dr. César González Bonilla y la Dra. Guadalupe García Elorriaga del Centro Médico la Raza, al Dr. Walter Glender del Hospital General de México, por los sueros donados de pacientes con TB pulmonar activa utilizados en este estudio.

Esta tesis fue realizada con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la U.N.A.M. en el programa de apoyo a la investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto N° IN218506).

A mi familia por el apoyo, a mis padres en especial a mi madre gracias por la confianza y el apoyo brindado sabes que te AMO.

A mis hermanos (Genny Yanira, Bianca, Henry y Axel) gracias por apoyarme y formar parte de mi vida los QUIERO. Gracias a Bianca por apoyarme y motivarme a salir adelante todos los días.

A mis tíos, sobrinos y primos.

A la señora Adela Palacios, Don José Nolasco y Carlos Nolasco, gracias por el apoyo brindado.

A mis amigos del laboratorio y amigos de la carrera gracias por compartir estos momentos.

ÍNDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	6
I.1. Tuberculosis	6
I.1.1. Historia de la TB	6
I.1.2. TB: agente causal	8
I.1.3. La pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
I.1.4. Transmisión de <i>M. tuberculosis</i>	11
I.1.5. Signos y síntomas	12
I.1.6 Características clínicas de <i>M. tuberculosis</i>	12
I.1.7 Tratamientos antituberculosos	13
I.1.8 Respuesta inmune en TB	15
I.2. Epidemiología	17
I.2.1 Problemática a nivel mundial	17
I.2.2 Problemática en México	18
I.3. Métodos de diagnóstico	19
I.3.1 Diagnóstico de TB latente	20
I.3.2 Diagnóstico de TB activa	21
I.4. Antígenos de <i>M. tuberculosis</i> útiles para inmunodiagnóstico	24
I.5. LAM (Lipoarabinomanano)	25
II. ANTECEDENTES	26
II.1. Mimótopos de carbohidratos	26
II.1.2. Despliegue de péptidos en fagos	27
II.1.3. Antecedentes del estudio	31

II.1.3.1. Dodecapéptidos que mimetizan LAM	31
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVO GENERAL	34
VI. OBJETIVO PARTICULARES	34
VII. MATERIAL Y METODOLOGÍA	35
VII.1. Muestras biológicas	35
VII.2. Propagación de fagos	35
VII.3. Titulación de las clonas	35
VII.4. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos	36
VII.5. Análisis de la reactividad de sueros humanos con el antígeno nativo	37
VII.6. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos sintéticos	38
VII.7. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos sintéticos irradiados con luz ultravioleta	38
VII.8. Péptido sintético	39
VII.9. Biotinilación de un péptido mimótopo	39
VII.10. Determinación de la reactividad de sueros humanos	

con un péptido biotinilado	40
VIII. RESULTADOS	41
VIII.1. Montaje de condiciones para evaluar la reactividad de sueros con péptidos mimótopos expresados en fago filamentoso	41
VIII.2. Análisis de la reactividad de sueros humanos con el antígeno nativo	43
VIII.3. Identificación de las clonas con mayor potencial para serodiagnóstico	44
VIII.4. Péptido sintético como reactivo de diagnóstico	47
VIII.5. Montaje de condiciones para evaluar la antigenicidad del péptido 1 sintético como antígeno para diagnóstico serológico	47
VIII.6. Evaluación de un mimótopo peptídico (libre de fago) como antígeno para diagnóstico serológico de TB pulmonar activa	48
VIII.7. Biotinilación del péptido mimótopo con posible utilidad para inmunodiagnóstico de TB	49
VIII.8. Evaluación del péptido biotinilado como reactivo Para serodiagnóstico de TB pulmonar activa	51
VIII.9. Influencia de las muestras biológicas sobre los resultados obtenidos	52
IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	55
X. APÉNDICE	58
XI. BIBLIOGRAFÍA	60

RESUMEN

La tuberculosis (TB), también conocida como enfermedad de Pott, peste blanca, escrofulosis, consunción o tisis, ha sido reconocida como una de las enfermedades más importantes que han atacado a la humanidad desde los primeros registros históricos. La implementación de métodos de diagnóstico novedosos que puedan reemplazar las técnicas de uso común es urgente para poder detectar nuevos casos con mayor rapidez y eficacia, para el control de la enfermedad. El inmunodiagnóstico es un método que puede ser empleado en el diagnóstico de la TB activa, debido a que es una metodología fácil de realizar, aplicable a amplias poblaciones y de bajo costo sin embargo una de las limitantes que puede presentar es la difícil disponibilidad de antígenos específicos y sensibles. Uno de los antígenos más prometedores en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis es el lipoarabinomanano (LAM), lipoglicano altamente antigénico.

En este estudio se evaluaron 12 dodecapéptidos expresados en el fago filamentoso M13 así como un péptido (libre de fago) es decir mimótopos de LAM como posibles reactivos en el diagnóstico serológico de la TB, todos ellos identificados mediante la tecnología de despliegue en fagos. Hemos encontrado que en un estudio preliminar los doce mimótopos logran discriminar entre sueros de individuos sanos y de pacientes con TB pulmonar activa; sin embargo en estos análisis también se puso en evidencia que el fago M13 como tal, es decir el sistema utilizado para despliegue de los mimótopos, da origen a reacciones no específicas con los sueros humanos. Ante este problema, nuevas soluciones deben ser propuestas. En el marco de este trabajo se exploró el uso de mimótopos libres de fago (sintéticos) como reactivos de inmunodiagnóstico. El péptido por sí solo al ser utilizado como antígeno demostró una sensibilidad del 40% y una especificidad del 93% en individuos con TB pulmonar activa y controles sanos. Los péptidos libres de fagos (sintéticos) pueden resultar una alternativa en el diagnóstico de la TB.

II. Antecedentes

II.1. Mimótopos de carbohidratos

Es posible sustituir Ag sacarídicos por péptidos que los mimetizan, es decir por mimótopos de carbohidratos. Un mimótopo es un péptido que imita o mimetiza estructural y/o funcionalmente un sitio biológicamente activo. Se ha demostrado que mimótopos péptidicos de azúcares son capaces de sustituir a la molécula nativa en un sin fin de actividades como antigenicidad, unión a receptores, etc. Algunos usos que se han propuesto con estos mimótopos incluyen terapias anticancerosas, vacunas, inmunodiagnóstico, etc. (Karbassi, 2002). Algunos ejemplos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.- Ejemplos de mimótopos peptídicos.

CARBOHIDRATOS	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS
Polisacárido Meningococcal grupo A	Antigénico/Inmunogénico	Grotaus <i>et al</i> 2000
Lipóligosacárido de <i>N. meningitidis</i>	Inmunogénico	Charalambous <i>et al</i> 2000
Polisacárido capsular Glucoronoxilomanano <i>Cryptococcus neoformans</i>	Inmunogénico	Fleuridor <i>et al</i> 2001
Polisacárido <i>S. pneumoniae</i>	Antigénico/Inmunogénico	Lesinski <i>et al</i> 2001
Péptidos mimótopos <i>N. meningitidis</i> grupo B	Antigénico	Shin <i>et al</i> 2001
Manósido <i>C. albicans</i>	Antigénico	Jouault <i>et al</i> 2001
L2/HNK-1 carbohidrato	Antigénico	Simon-Haldi <i>et al</i> , 2002
Lipoligosacárido de <i>N. meningitidis</i>	Antigénico/Inmunogénico	Brett <i>et al</i> 2002 Charalambous & Feavers
Lipoligosacárido de <i>H. influenzae</i>	Antigénico/Inmunogénico	Hou & Gu 2003
Polisacárido de <i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo C	Inmunogénico	Prinz <i>et al</i> 2004
Polisacárido de <i>Neisseria meningitidis</i> grupo B	Inmunogénico	Park <i>et al</i> 2004
Polisacárido de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Antigénico/Inmunogénico	Gevorkian <i>et al</i> 2005
Polisacárido de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Inmunogénico	Buchwald <i>et al</i> 2005

II.1.2. Despliegue de péptidos en fagos

A partir de 1992, el uso de bibliotecas de péptidos expresado en fagos (comúnmente conocida como despliegue en fagos) ha facilitado la identificación de péptidos que mimetizan antígenos no proteicos (Karbassi *et al.*, 2002). La tecnología de despliegue en fagos se ha convertido en una alternativa para el hallazgo y producción de agentes preventivos terapéuticos, así como para el desarrollo de métodos de diagnóstico de múltiples enfermedades.

La idea de usar sustitutos de antígenos nativos mediante la técnica de despliegue en fagos permitiría un sinnúmero de ventajas como reproducibilidad, producción de partículas de bajo riesgo biológico, bajo costo y capacidad de producción para el diagnóstico de amplias poblaciones (Luo *et al.*, 1998).

Es una técnica de bioselección *in vitro* en la cual un péptido o proteína es fusionada genéticamente a una de las proteínas de superficie de un bacteriófago o fago filamentoso. Esta fusión resulta en el despliegue del péptido o proteína en el exterior del fago mientras que el DNA que codifica para la fusión reside dentro del mismo fago. En la Figura 10 se esquematiza la estructura de un fago filamentoso.

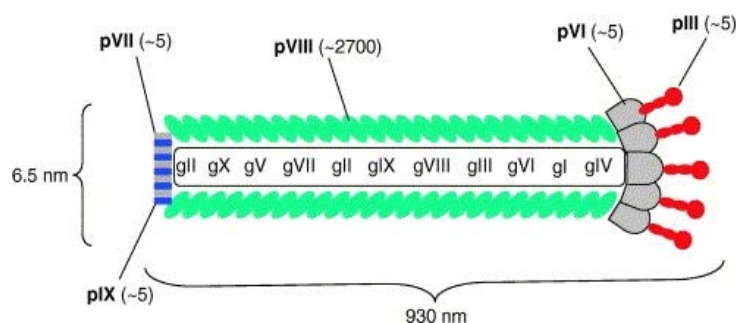


Figura 10.- Representación esquemática del fago filamentoso.

La relativa sencillez de la manipulación in vitro de los fagos, permite una rápida generación de moléculas ligando (desplegadas en los fagos) con altas afinidades de unión, a muy bajo costo y en poco tiempo. Los fagos filamentosos necesitan algún tipo de bacterias que expresan pili para realizar el proceso de infección. Utilizan el pili de la bacteria como un receptor; durante el proceso de infección productiva, estos fagos, a diferencia de los fagos líticos, no matan ni lisan a sus hospederos. Lo anterior es una gran ventaja para el sistema, ya que facilita enormemente los procesos de obtención y purificación de las partículas virales (Figura 11) (Santamaría 2003).

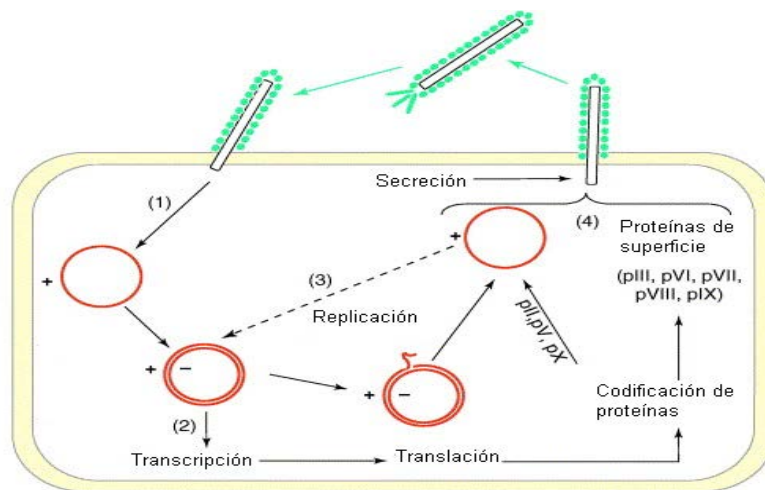


Figura 11.- Ciclo de vida del fago filamentoso en *Escherichia coli*. (1) El fago se enlaza a *E. coli* por la proteína pIII, donde el genoma viral se inyecta a la célula y un filamento complementario es sintetizado en forma de doble trenza. (2) subsecuentemente las proteínas son codificadas mediante una síntesis (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX), las proteínas para la replicación son (pII, pV, pX) y las proteínas que envuelven, ensamblan y exportan son (pI y pIV). (3) el genoma del fago es replicado (4) los viriones son ensamblados y exportados en la membrana de las bacterias (Mullen *et al.*, 2006).

Los péptidos expresados en fagos podrían ser una alternativa en el ensayo de inmunodiagnóstico, aunque aún se encuentra en desarrollo su evaluación como potenciales reactivos de diagnóstico. En diversos trabajos se han identificado y evaluado el uso potencial de los mimótopos péptidicos, con fines terapéuticos y en el diagnóstico de diferentes tipos de enfermedades, por ejemplo, la identificación

de péptidos de *T. crassiceps* en el diagnóstico de la neurocisticercosis (Robles *et al*, 2005), la evaluación de mimótopos en el diagnóstico e inmunoterapia de la TB (Sharma *et al*, 2006), la identificación de mimótopos inmunogénicos del antígeno MG7 asociado al cáncer gástrico (Xu *et al*, 2005), la identificación y evaluación de péptidos del receptor de estrógeno 1D5 como posible blanco terapéutico contra el cáncer (Sompuram *et al*, 2002), la utilidad de los péptidos en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme (Kouzmitcheva *et al*, 2001) y la identificación de péptidos mimótopos de fomopsinas como candidatos en el diagnóstico de enfermedades causadas por toxinas en plantas (Yu *et al*, 2005).

Además de su capacidad de mimetismo antigénico los péptidos expresados en fagos son capaces de ser adsorbidos en soportes de uso común para métodos de diagnóstico, como la nitrocelulosa (Fournel *et al*, 2003). La tecnología más empleada para la identificación de péptidos mimótopos es el despliegue en fagos. En la Figura 12 se esquematiza la identificación de mimótopos de azúcares.

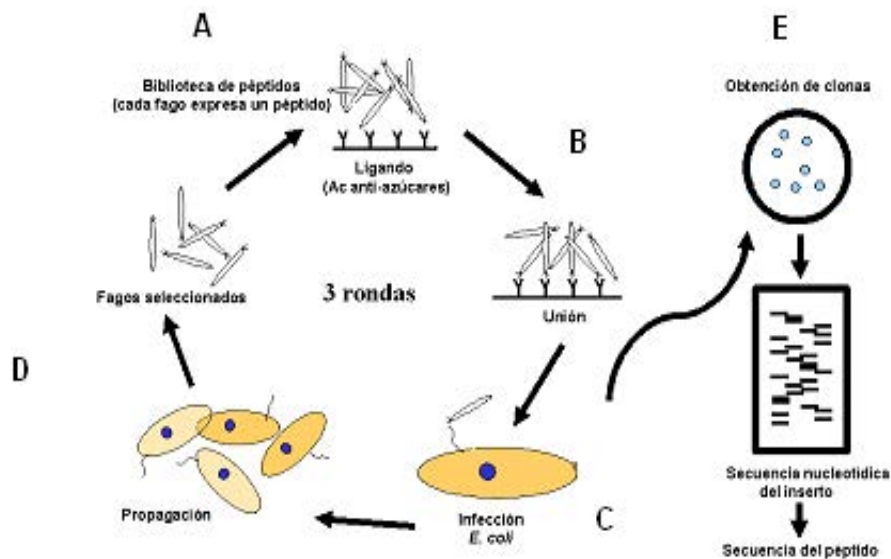


Figura 12.- Selección de péptidos expresados en fagos que mimetizan azúcares. (A) Bibliotecas de péptidos de una cierta talla, expresados en fagos filamentosos, son puestas en contacto con ligandos de azúcares, como anticuerpos anti-azúcares. (B) Los fagos que expresan péptidos que mimetizan azúcares serán seleccionados por afinidad a los anticuerpos. (C) Después de eliminar los fagos no afines, mediante lavados, los fagos

seleccionados pueden ser eluido y propagados por infección de *E. coli*, ya que se trata de fagos no líticos. El proceso se repite varias veces a fin de enriquecer los eluidos con los fagos de mayor afinidad. (D) Se seleccionan clonas de fagos (cada una expresa un solo péptido) y (E) la secuencia peptídico del inserto es determinada por secuenciación del ADN del fago.

III. JUSTIFICACIÓN

La TB, es una enfermedad que se ha extendido con gran facilidad debido a la transmisión por vía aérea, por lo tanto, la identificación temprana y un tratamiento adecuado de individuos con una tuberculosis activa sería de gran impacto en Salud Pública. Actualmente, con las herramientas disponibles, el control de la TB se basa en el tratamiento oportuno de los casos contagiosos. Pero dicho tratamiento depende totalmente del diagnóstico temprano (se estima que cada individuo enfermo, sin tratamiento, es capaz de infectar de 10 a 15 personas cada año). Los métodos de diagnóstico bacteriológicos carecen de eficiencia pues son muy poco sensibles o demasiado lentos. Es necesario el desarrollo de un método para un diagnóstico rápido con sensibilidad y especificidad altas. Siendo la TB una enfermedad ligada a la pobreza, se requiere de un método de diagnóstico que no solo brinde rapidez, sino que sea accesible y fácil en cuanto a su implementación, especialmente en poblaciones amplias. Un método que puede cumplir con estas características es el inmunodiagnóstico. Este método tiene, además, la capacidad potencial para detectar formas extrapulmonares de la enfermedad. Sin embargo la difícil disponibilidad de antígenos nativos y la imposibilidad de producción recombinante de productos genéticos secundarios, como el LAM, hacen necesaria la búsqueda de reactivos alternos para el diagnóstico oportuno de la TB. Previamente se han identificado péptidos que son capaces de mimetizar la reactividad antigénica del LAM, uno de los antígenos más prometedores para inmunodiagnóstico de la TB, por lo que explorar su potencial como nuevo reactivo de diagnóstico para TB resulta de especial interés.

IV. Hipótesis

Los péptidos que mimetizan antigénicamente al lipoarabinomanano de *Mycobacterium tuberculosis* pueden ser utilizados como reactivos para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de mimótopos peptídicos del lipoglicano de *Mycobacterium tuberculosis*, el lipoarabinomanano (LAM), como antígenos para serodiagnóstico de tuberculosis pulmonar.

VI. OBJETIVO PARTICULARES

Amplificar, titular y ajustar la concentración de partículas de fago filamentosos M13 que expresan en su proteína PIII insertos péptidicos con afinidad a anticuerpos anti-LAM.

Purificar el péptido sintético QEPLMGTVPIRAGGGS, mimótopo de LAM, suministrado comercialmente en forma semipura.

Evaluar la utilidad de los mimótopos péptidicos del LAM expresados en fagos como reactivos para inmunodiagnóstico de tuberculosis pulmonar activa.

Evaluar la utilidad del péptido QEPLMGTVPIRAGGGS como reactivo para inmunodiagnóstico de TB pulmonar activa.

VII. MATERIAL Y METODOLOGÍA

VII.1. Muestras biológicas

Los sueros de individuos con tuberculosis pulmonar fueron obtenidos del Hospital de Infectología Manuel Méndez, Centro Médico “La Raza” del IMSS en la Ciudad de México y del Hospital General de México. Todos fueron diagnosticados por baciloscopía o por cultivo. Los sueros de individuos sanos fueron obtenidos del banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI en la Ciudad de México, del Hospital Infantil Federico Gómez y de donadores del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

VII.2. Propagación de fagos

La propagación de fagos que expresan mimótopos de LAM se realizó en 50 ml de medio 2xYT (ver apéndice). A 50 ml de medio, se agregaron 200µl de bacterias *Escherichia coli* cepa TG1 crecidas en 10 ml de 2xYT durante 4 horas en agitación a 37°C, se infectaron con 15 µl de la muestra con el fago de interés. Después del crecimiento, el medio se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado, que contiene las bacterias, fue descartado y el sobrenadante recuperado. Enseguida se le agregó 1/6 de volumen de polietilenglicol PEG/NaCl (ver apéndice) para precipitar los fagos, dejándose actuar toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió y se precipitó nuevamente con 1/6 de volumen de PEG/NaCl, como se menciona arriba. Después de centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, el precipitado se resuspendió en 200µl de TBS. Se realizó una centrifugación de 10 min a 10000 rpm con el fin de formar un precipitado de las bacterias contaminantes. Finalmente el sobrenadante se recuperó.

VII.3. Titulación de las clonas

Se procedió a determinar el número de fagos propagados; para esto se realizaron 3 diluciones sucesivas de los fagos de 1:1000 en medio de cultivo 2xYT (ver apéndice). Después de realizar la tercera dilución se tomaron alícuotas de 5 y 50 µl, que fueron depositadas en 200 ml de un cultivo de bacterias *E. coli* cepa TG-1.

Se dejó incubando por 30 minutos a 37°C y se agregaron 14 µl de Xgal/IPTG (ver apéndice). Esta mezcla se depositó en un tubo con 4ml de medio Top agar (fundido ver apéndice), se mezcló y se vació en una caja petri preparada con agar LB (ver apéndice) que se dejó incubar a 37°C toda la noche; al día siguiente se obtuvo el título contando las ufp.

VII.4. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos expresados en fagos

Se evaluó la reactividad de los anticuerpos humanos con los péptidos que mimetizan LAM utilizando dos diferentes técnicas: En la primera, se depositaron 200ng por pozo de anticuerpo monoclonal anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited), diluido en 100µl de buffer de carbonatos con un pH 9.6 (ver apéndice) sobre placas Maxisorp (Nunc), se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregaron en cada pozo 200µl de PBS-BSA 2% y se incubaron por una hora a 37° C. Las partículas de fagos (10^{10} ufp/ml) fueron suspendidas en PBS/BSA 0.1% y se añadió 100 µl de esta suspensión a cada pozo, se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS/BSA 1% y se incubó por una hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se añadió un anticuerpo de ratón anti-IgG humano conjugado a fosfatasa (100µl de una dilución de 1:10000) en PBS-BSA 1% Tween 20 al 0.1%, se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregaron 100µl de 4-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina (ver apéndice). Se incubó a 37°C durante 15 min o el tiempo necesario hasta obtener densidades ópticas de 0.3-1.0 leyendo a 405 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

Para la segunda técnica utilizada, se depositaron 0.5µg por pozo de anti-IgG humano (Goat, Anti-Human IgG, H+L; Zymed), diluido en 100µl de buffer de carbonatos con un pH 9.6 (ver apéndice) sobre placas Maxisorp (Nunc), y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se

agregaron en cada pozo 200µl de PBS-BSA 2% y se incubaron por una hora a 37° C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS/BSA 1% y se incubó por una hora a 37°C. Las partículas de fagos (10^{10} pfu/ml) fueron suspendidas en PBS/BSA 0.1% y se añadió 100 µl de esta suspensión a cada pozo. Después se agregó el anti-M13 acoplado a peroxidasa (100µl de una dilución 1:50000) en PBS-BSA 1% Tween 20 al 0.1%, se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregaron 100µl de 4-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina. Se incubó a 37°C durante 15 min o el tiempo necesario hasta obtener densidades ópticas de 0.3-1.0 leyendo a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas.

VII.5. Análisis de la reactividad de sueros humanos con el antígeno nativo

Se realizó este ensayo de ELISA para evaluar la reactividad de los sueros humanos (tanto de individuos sanos como de pacientes con TB pulmonar) con el arabinomanano. Se depositaron 1µg de arabinomanano por pozo diluido en 100µl de buffer de carbonatos sobre placas Maxisorp (Nunc), y se incubó toda la noche a 4°C. Después de cuatro lavados con PBS/Tween 20 al 0.2% se agregaron en cada pozo 200µl de PBS-BSA 2% y se incubó durante dos horas a 37°C o cuatro horas a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados con, PBS/Tween 20 al 0.2% se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS/BSA 1%, Tween 20 al 0.1% y se incubó durante la noche a 4°C. Se lavó cuatro veces con PBS/Tween 20 al 0.2% y se agregó un anticuerpo de ratón anti-IgG humano conjugado a fosfatasa (100µl/pozo de una dilución de 1:10 000) en PBS-BSA 1% Tween 20 al 0.1%. Se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente se realizaron cuatro lavados. Se agregaron 100µl de 4-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina en cada pozo para revelar. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y se tomó lectura a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas.

VII.6. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos sintéticos

Se depositaron 1 μ g del péptido sintético (QEPLMGTVPIRAGGGS) por pozo diluido en 100 μ l de buffer de carbonatos con un pH de 9.6 (ver apéndice) sobre placas Maxisorp (Nunc), y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1% se agregaron en cada pozo 200 μ l de PBS-BSA 2% y se incubó por una hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS/BSA 1% y se incubó por una hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregó un anticuerpo de ratón anti-IgG humano conjugado a fosfatasa (100 μ l de una dilución de 1:10000) en PBS-BSA al 1% y Tween 20 al 0.1%, se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregaron 100 μ l de *p*-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina. Se incubó a 37°C durante 15 min o el tiempo necesario hasta obtener densidades ópticas de 0.3-1.0 leyendo a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas.

VII.7. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos sintéticos c/ transiluminador de U.V. (luz ultravioleta)

Se expuso una placa Maxisorp (Nunc) durante 20 min bajo luz ultravioleta, (según Boudet *et al.*, 1991) se cubrió con egapack, posteriormente se depositaron 1 μ g del péptido sintético (QEPLMGTVPIRAGGGS) por pozo diluido en 100 μ l de buffer de boratos pH 8.2 (ver apéndice) y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregaron en cada pozo 200 μ l de PBS-Tween 20 al 0.1% /BSA 1% y se incubaron por una hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se añadió suero humano diluido 1:100 en PBS/BSA al 1%/Tween 20 al 0.1% y se incubó por 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1% se agregó un anticuerpo de ratón anti-IgG humano conjugado a fosfatasa (100 μ l de una dilución de 1:10000) en PBS- BSA 1% /Tween 20 al 0.1%, se incubó durante 2 horas a 37°C.

Se agregaron 100µl de *p*-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina. Se incubó a 37°C durante 10 min o el tiempo necesario hasta obtener densidades ópticas de 0.3-1.0 leyendo a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas.

VII.8. Péptido sintético

El péptido sintético P1 (QEPLMGTVPIRAGGGS), fue adquirido libre de sales de Invitrogen (CA, USA), y purificado por cromatografía de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) según protocolos del fabricante.

VII.9. Biotinilación de un péptido mimótopo

Para la biotinilación del péptido (QEPLMGTVPIRAGGGS) se depositaron 1mg de péptido diluido en 1ml de PBS y se agregaron 6.7µl de una solución de biotina, la cual reaccionó con el grupo amino terminal del péptido formando un enlace amida estable (Biotin Labeling Kit (Roche) Indianápolis, IN, USA). Se dejó incubando por 2 horas de 15 a 25°C en agitación suave. Una vez terminada la incubación, la mezcla se transfirió a una columna (Sephadex G-25), se eluyó la solución de empaque y posteriormente se tomó lectura mediante un fotómetro a 230 nm. Las muestras con péptido se reunieron en un solo tubo, se dializaron toda la noche a 4°C en agua milliQ, y se cubrió herméticamente, se recuperó la muestra en un tubo eppendorf y se liofilizó.

VII.10. Determinación de la reactividad de sueros humanos con péptidos sintéticos biotinilados

Se depositaron 0.25µl del péptido sintético biotinilado (QEPLMGTVPIRAGGGS-Biot) por pozo diluido en 100µl de buffer de carbonatos sobre placas Streptawell, y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.2% se agregaron en cada pozo 200µl de PBS-BSA 2% y se dejó incubar por una hora a 37° C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.2%, se agregó suero humano 1:100 en PBS/BSA 1% Tween 20 al 0.1%, y se incubó por dos horas a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.2%, se agregó un anticuerpo de ratón anti-IgG humano conjugado a fosfatasa (100µl de una dilución de 1:10000) en PBS-BSA 1% Tween 20 al 0.1%, y se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 al 0.1%, se agregaron 100µl de *p*-nitrofenilfosfato (1mg/ml) en solución amortiguadora de dietanolamina. Se incubó a 37°C durante 15 min o el tiempo necesario hasta obtener densidades ópticas de 0.3-1.0 leyendo a 405nm en un espectrofotómetro de microplacas.

Datos de los ensayos serológicos

Para cada inmunoensayo se consideraron los siguientes parámetros: la media entre cada uno de los grupos de individuos, simbolizada con una línea, el valor de corte, que fue determinado con el promedio más dos desviaciones estándar (Thomas y Debanne, 1987).

La sensibilidad: número de enfermos que dan resultado positivo al método/ total de enfermos a quienes se les aplicó el método por 100.

La especificidad: número de individuos sanos que dan un resultado negativo al método/ número total de sanos por 100.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Montaje de condiciones para evaluar la reactividad de sueros con péptidos mimótopos expresados en fago filamentoso

Se evaluaron 2 métodos distintos para medir la reactividad de los sueros humanos con los péptidos expresados en fagos. El primero de ellos consistió en dejar sensibilizando la placa con Ac anti-M13¹, después se depositó el fago M13² y posteriormente los sueros humanos³. Enseguida Ac anti-IgG acoplado a fosfatasa⁴ y *p*-nitrofenilfosfato⁵ en dietanolamina como sustrato revelador (Figura 15).

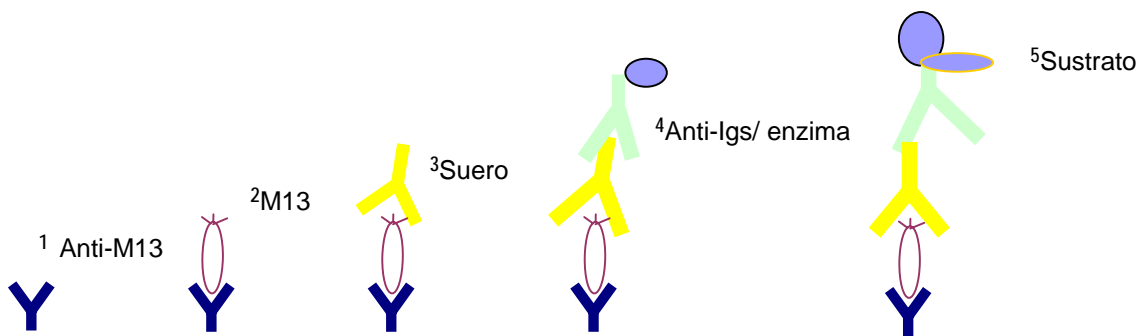


Figura 15. Ensayo de ELISA indirecto inmovilizando el Ac anti-fago M13 sobre el soporte.

En otro tipo de ensayos se dejó sensibilizando la placa con Ac anti-IgG de humano¹, enseguida se depositaron los sueros de individuos sanos ó enfermos², seguidos por el fago M13³. La reacción fue revelada agregando Ac anti-M13 acoplado a peroxidasa⁴ y como sustrato enzimático ABTS⁵ (Figura 16).

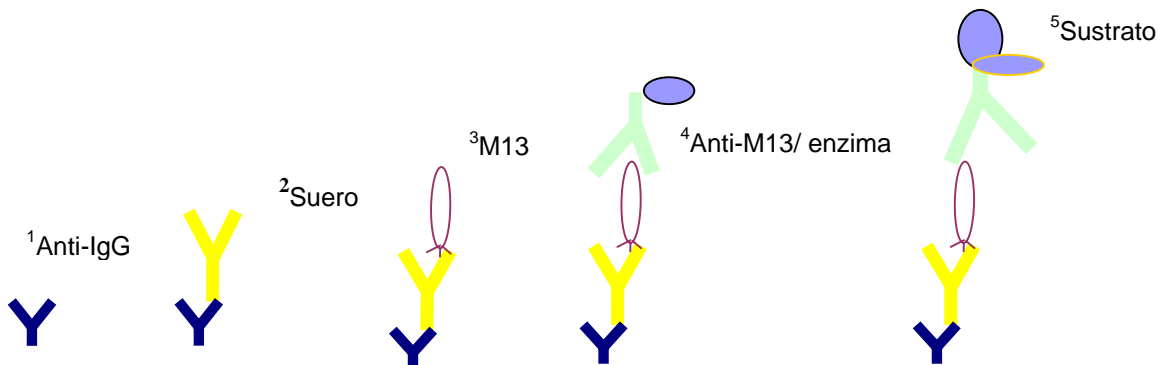


Figura 16. Ensayo de ELISA indirecto inmovilizando los Ac humanos sobre el soporte.

A fin de comparar estos dos protocolos, se realizó un ensayo con 5 sueros de individuos sanos y 5 de individuos con tuberculosis pulmonar activa, utilizando como Ag uno de los mimótopos expresados en fago M13. En particular, se utilizó la clona 4 del fago M13 la cual tiene insertado el péptido mimótopo GKVGLHEPIRTR. En la Figura 17 se puede observar que al utilizar el protocolo 2, en donde los Ac humanos son inmovilizados sobre el soporte, no se puede evaluar la reactividad ante el mimótopo debido a que los sueros de los dos grupos no reaccionan de manera diferencial. Por el contrario, al emplear el protocolo 1, en el cual se inmoviliza sobre el soporte el fago M13, sí pudo observarse una reactividad diferencial entre los dos grupos de sueros.

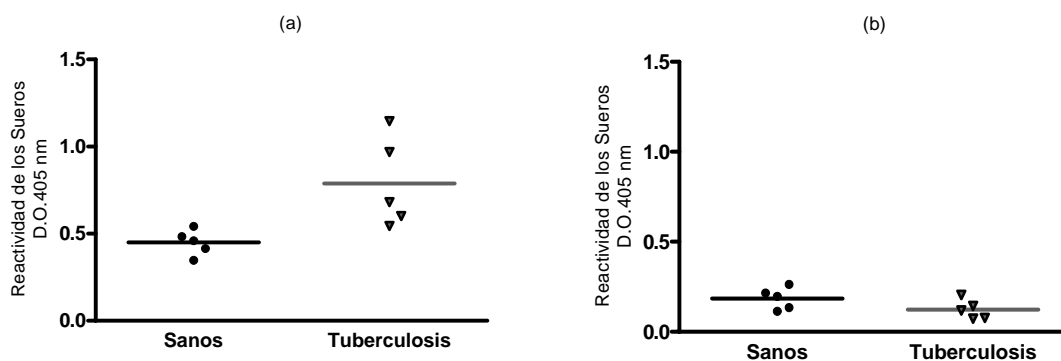


Figura 17.- ELISA de sueros de individuos con TB y controles sanos, empleando los protocolos 1 (a), 2 (b) y la clona 4 como antígeno.

A partir de estos resultados se decidió evaluar la reactividad de los mimótopos expresados en fagos sensibilizando la placa con anti-M13, es decir con el protocolo 1.

VIII.2. Análisis de la reactividad de sueros humanos con el antígeno nativo

A fin de poder evaluar la capacidad de los péptidos (expresados en fago o sintéticos) para mimetizar la antigenicidad del producto nativo, procedimos a caracterizar una colección de sueros con TB pulmonar activa, en cuanto a su reactividad con el AM (arabinomanano), el antígeno mimetizado en su forma nativa. Se utilizaron 115 sueros de individuos sanos y 103 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. En la Figura 18 se muestra que con el AM nativo se obtuvo una sensibilidad del 55.45% y una especificidad del 94.78%.

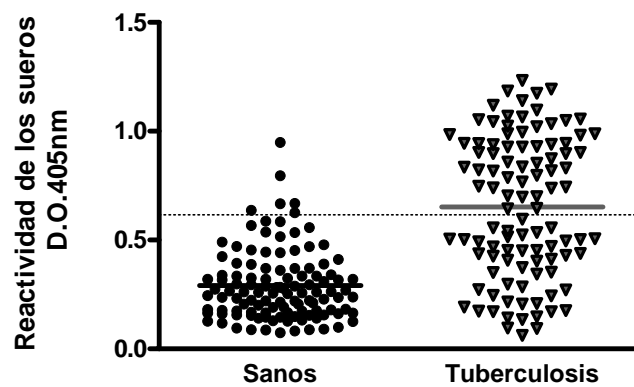


Figura 18.- Reactividad de los sueros utilizando como antígeno Arabinomanano.

Este análisis nos permitió seleccionar (para una primera evaluación) una serie de sueros con reactividad positiva o negativa al Ag nativo, evitando así que los resultados obtenidos con péptidos mimótopos estén sesgados por la presencia de individuos cuya reactividad serológica al Ag nativo no corresponda a su estatuto de infección.

VIII.3. Identificación de las clonas con mayor potencial para serodiagnóstico

Para evaluar las clonas como antígenos de diagnóstico se llevaron a cabo inmunoensayos enzimáticos utilizando 10 sueros de individuos sanos vacunados con BCG y positivos a la prueba del PPD, así como 10 individuos enfermos con tuberculosis pulmonar activa, se emplearon como controles negativos el fago silvestre M13 (que no expresa inserto alguno en sus proteínas pIII) así como un fago que expresa el péptido AWTQVPFASQPR sin ninguna relación con *M. tuberculosis*. Como se puede observar en las Figura 19 y 20, los sueros de individuos con TB presentan en general una mayor reactividad con todas las clonas, que los sueros de individuos sanos.

Sin embargo la capacidad para discriminar entre ambos grupos de sueros es claramente pronunciada con algunas clonas, como la 8, la 17 y la 21. Por otro lado, algunas de las clonas presentaron poca reactividad con los sueros de individuos sanos, mientras que otras de ellas mostraron reacción con una dispersión considerable. Este último comportamiento también fue observado al utilizar las clonas (M13 nativo y APP-12.3.1) que no contienen insertos mimótopos. Todos estos resultados mostraron que:

El sistema de expresión del mimótopo, es decir el fago M13, da origen a reacciones inespecíficas que no se relacionan con la presencia de Ac en contra del antígeno mimetizado y un 50% de los sueros de individuos con TB parecen reaccionar más que los sueros control ante antígenos exógenos en general (presentan mayor reactividad con los fagos control), fenómeno que podría ser originado por una mayor exposición a patógenos en algunos de los individuos. En consecuencia, para determinar la utilidad de los mimótopos como reactivos de diagnóstico, era necesario eliminar la reactividad de fondo debido al fago M13 en sí.

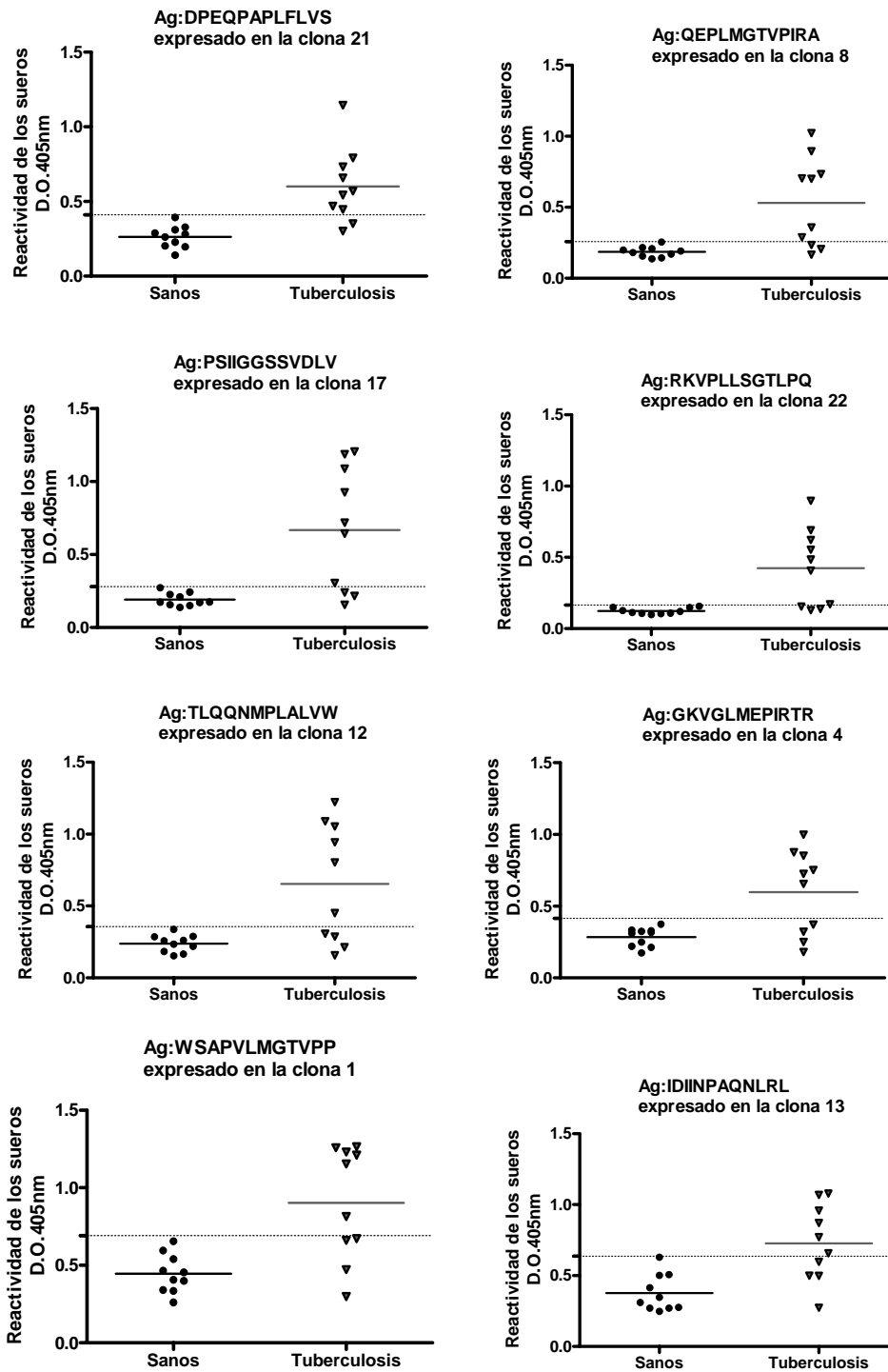


Figura 19.- Reactividad de los sueros con las clonas 21, 8, 17, 22, 12, 4, 1 y 13.

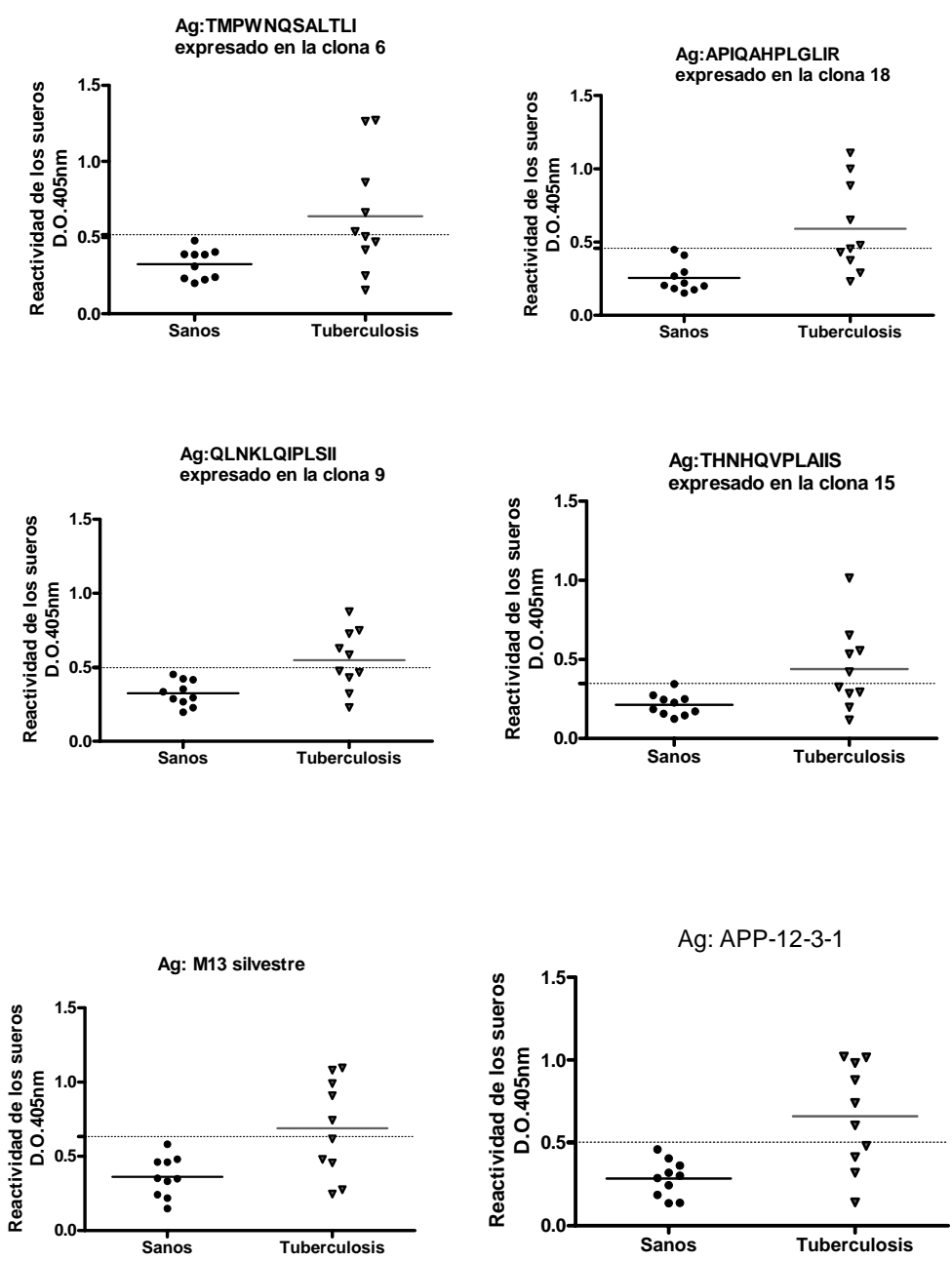


Figura 20.- Reactividad de los sueros con las clonas 6, 18, 9,16 y los fagos control (M13 y APP12-3-1).

concluyentes se decidió explorar el uso de ambos protocolos con un mayor número de sueros.

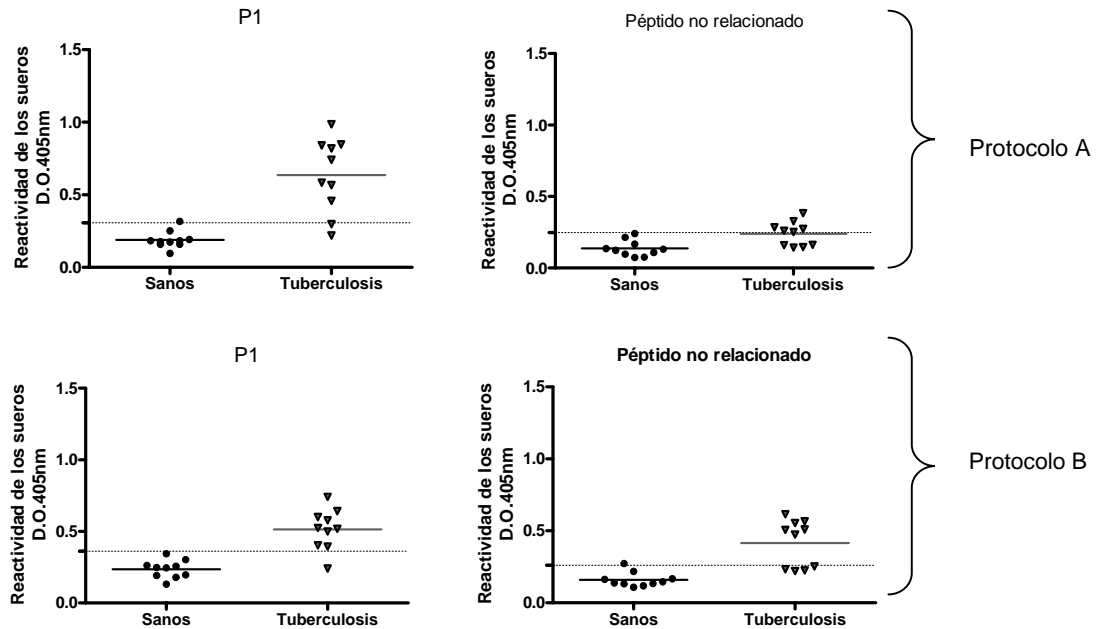


Figura 22.- Reactividad de los sueros con el péptido mimótopo 1, y con un péptido no relacionado (T1C) empleando dos protocolos de análisis (ver texto).

VIII.6. Evaluación de 1 mimótopo peptídico (libre de fago) como antígeno para diagnóstico serológico de TB pulmonar activa

A fin de evaluar el péptido 1(QEPLMGTVPIRAGGS) como posible reactivo para el diagnóstico serológico se realizó un ensayo, utilizando 115 sueros de individuos sanos y 100 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. En la Figura 23 se muestra que el análisis proporcionó una especificidad del 93.91%, pero solamente un 10% de los enfermos mostraron una reactividad al péptido con el protocolo A. En contraste, al evaluar el péptido utilizando el protocolo B (antígeno depositado en una placa irradiada con luz UV), se encontró una especificidad del 93.04% con una sensibilidad del 40%.

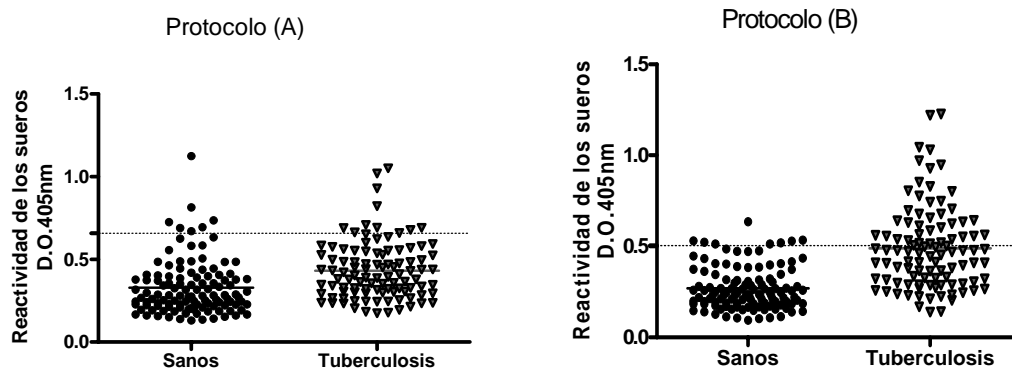


Figura 23. Reactividad del péptido libre de fago (P1), utilizando dos protocolos de análisis (ver texto). El valor de corte considerado fue el promedio de los controles negativos +2DS.

Si bien los resultados obtenidos con este último protocolo son alentadores, considerando que se trata del mimótopo de un solo epítopo, se decidió explorar si la modificación química del péptido podría brindar ventajas en cuanto a la eficacia del método, por lo que se procedió a obtenerlo en forma biotinilada.

VIII.7. Biotinilación del péptido mimótopo con posible utilidad para inmunodiagnóstico de TB

En un intento por mejorar el reconocimiento de péptidos mimótopos por anticuerpos humanos en el ensayo inmunoenzimático, se decidió modificar el péptido 1 ligándolo a una molécula de biotina. Con la biotinilación del péptido se pretende mejorar la exposición del epítopo en solución, como se muestra en la Figura 24.

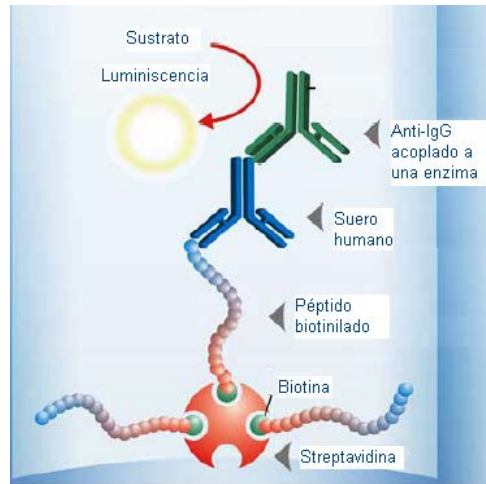


Figura 24.- ELISA usando péptido biotinilado

El péptido fue biotinilado y purificado por cromatografía de exclusión molecular. En la Figura 25 se muestra el perfil cromatográfico, obtenido por absorción de luz UV a 230 nm, en las fracciones eluidas.

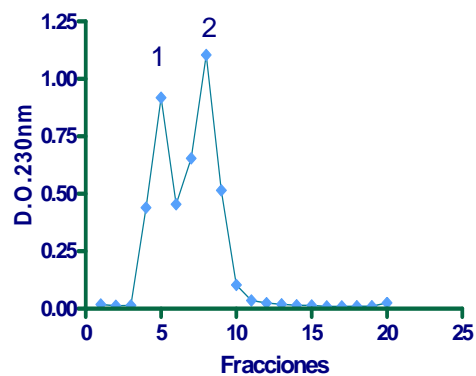


Figura 25.- Purificación del péptido biotinilado mediante una columna de exclusión molecular (1): péptido biotinilado, (2): biotina en exceso.

VIII.8. Evaluación del péptido biotinilado como reactivo para serodiagnóstico de TB pulmonar activa

El péptido biotinilado se evaluó como antígeno en ELISA utilizando 87 sueros de individuos sanos y 92 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar. Como se muestra en la Figura 26, el análisis brindó una sensibilidad de 37.6% y una especificidad del 95.4%, no mejorándose la eficacia encontrada con el péptido solo.

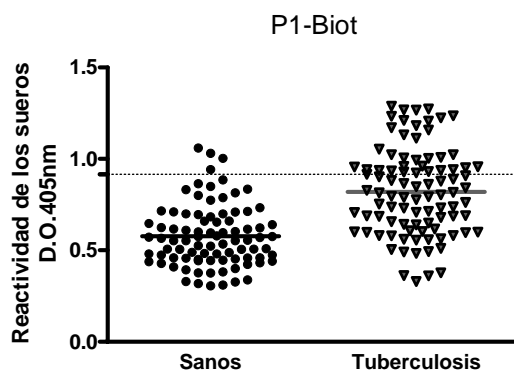


Figura 26.- Reactividad del péptido 1 biotinilado en sueros de individuos sanos y sueros de individuos enfermos con tuberculosis pulmonar activa. El valor de corte considerado fue el promedio de los controles negativos +2DS.

En la tabla 3 se muestran los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos con los diferentes protocolos establecidos para la evaluación del P1 como posible reactivo en el diagnóstico serológico de la tuberculosis.

Tabla 3.- Eficacia de diagnóstico de tuberculosis activa, utilizando un mimótopo peptídico con tres diferentes protocolos de ensayo.

Protocolos	Sensibilidad %	Especificidad %
Protocolo A (ELISA estándar, utilizando tampón de carbonatos)	10%	93.91%
Protocolo B (ELISA estándar, utilizando tampón de boratos y microplacas expuestas a luz UV).	40%	93.04%
Péptido Biotinilado (Antígeno depositado a través de una molécula de biotina en placas con estreptavidina)	37.6%	95.4%

VIII.9. Influencia de las muestras biológicas sobre los resultados obtenidos

Importantemente, todos los análisis mostrados en este trabajo incluyeron 2 grupos de sueros de pacientes enfermos con tuberculosis pulmonar activa, los cuales provenían de dos centros hospitalarios. Un tercer grupo de muestras estaba conformada por sueros de individuos sanos obtenidos de un tercer centro hospitalario. Finalmente, sueros de donadores sanos fueron obtenidos a partir de individuos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Como se mostró en el capítulo VIII 3, los sueros humanos utilizados en el presente trabajo mostraban una respuesta humoral heterogénea en general. Al analizar de

manera detallada los resultados de reactividad serológica, resultó evidente que el mimótopo peptídico sintético brindaba una eficacia de diagnóstico distinto dependiendo del grupo de sueros utilizado. Por ejemplo, al utilizar el mimótopo en forma biotinilada, con el cual las sensibilidades encontradas con muestras de distintos centros hospitalarios fueron de 55% y de 15% (Figura 27).

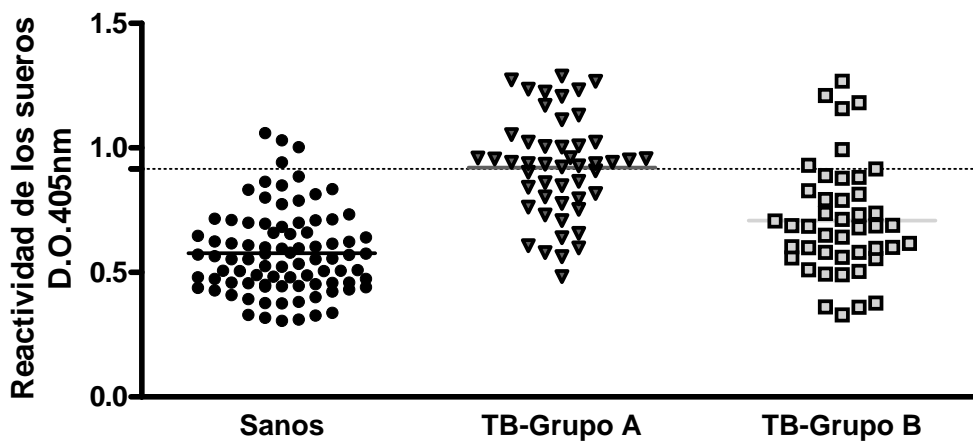


Figura 27.- Evaluación del péptido QEPLMGTVPIRAGGGS-Biotinilado como antígeno para diagnóstico de TB pulmonar, utilizando dos grupos de sueros y el grupo control.

Estos resultados indicaban que la reactividad de los sueros era marcadamente diferente dependiendo de la fuente hospitalaria de la que provenían. Utilizando las mismas muestras, realizamos un ensayo serológico utilizando un antígeno nativo no relacionado, el cual ha mostrado ser uno de los reactivos de mayor eficacia de diagnóstico para tuberculosis activa, el glicolípido di-O-acil-trealosa (DAT). Como se muestra en la Figura 28, la misma discrepancia en cuanto a sensibilidad de diagnóstico fue encontrada para el diagnóstico de individuos provenientes de distinta fuente hospitalaria (sensibilidades de 79% y de 31%). Los datos

encontrados nos muestran, por consiguiente, que para reportar datos confiables en la evaluación de un nuevo reactivo de diagnóstico será necesario contar con los datos clínicos de las muestras realizadas, a fin de saber en qué etapa de la enfermedad y en qué tipo de individuo el método pudiera ser aplicado.

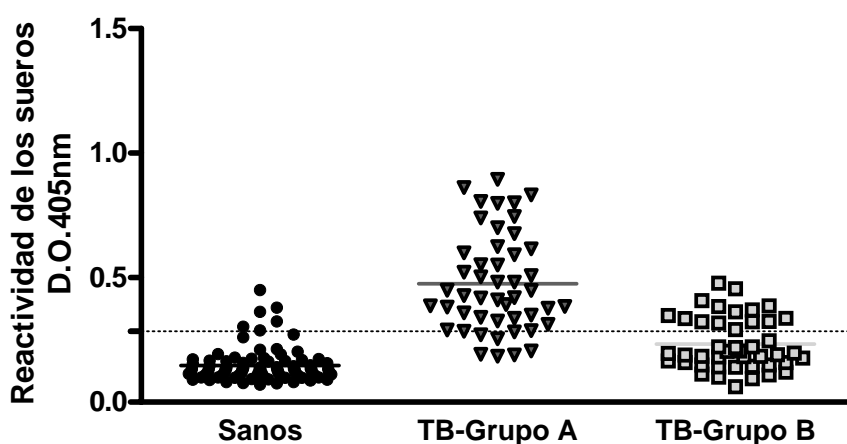


Figura 28.- Evaluación del DAT (Diacil-trehalosa) como antígeno para diagnóstico de TB pulmonar, utilizando el grupo control y dos grupos de sueros.

IX. Discusión y Conclusión

Actualmente los métodos convencionales que existen en el diagnóstico de la TB son poco eficaces debido al bajo índice de detección y los riesgos que representan para el personal que los maneja. En la actualidad es una necesidad contar con metodologías más eficaces en el diagnóstico oportuno, que sean accesibles, de bajo costo y aplicable a amplias poblaciones.

Un método que puede cumplir con estas características es el inmunodiagnóstico; sin embargo, una de las limitantes es la difícil disponibilidad de antígenos con sensibilidad y especificidad altas. Uno de los antígenos más prometedores para el diagnóstico de la TB es el LAM, lipoglicano altamente antigénico. Sin embargo la obtención de antígenos no proteicos, como éste, requiere el uso de infraestructura altamente costosa (laboratorios de bioseguridad nivel 3), largos tiempos de cultivo y procedimientos complicados que permitan purificar los productos a partir de extractos lipídicos del bacilo, caracterizados por una alta complejidad. Dado lo anterior, el uso de moléculas alternativas que pudieran sustituir al LAM, permitiría la aplicación de un diagnóstico basado en este antígeno sin los inconvenientes ligados a su obtención.

En este estudio se evaluaron mimótopos péptidicos de LAM, identificados mediante la técnica de despliegue en fagos, expresados en el fago M13 y libres de fago (péptido sintético) como posibles reactivos en el diagnóstico serológico de la tuberculosis.

Al evaluar la utilidad de los mimótopos de LAM expresados en el fago M13, se observó que estos reactivos sí son capaces de discriminar entre sueros de individuos sanos y sueros de individuos con TB activa (Figura 19 y 20), encontrándose que algunos mimótopos (expresados en clonas aisladas) pueden hacerlo con mayor eficacia que otros. Estos resultados también mostraron, sin embargo, que fagos no relacionados o el fago silvestre (sin inserto), producen reacciones inespecíficas en sueros humanos. Es posible que estas reacciones

sean debidas a la presencia de anticuerpos dirigidos en contra de colifagos en cada individuo, por lo que será interesante el evaluar si una pre-adsorción de dichos anticuerpos con sonicados de fagos podría evitar la aparición de resultados inespecíficos.

En el marco de este trabajo se exploró, como otra posible solución, el uso de mimótopos libres de fago (sintéticos) como reactivos de inmunodiagnóstico. Como era de esperarse, el uso de péptidos sintéticos como antígenos es dependiente en gran medida de encontrar condiciones de análisis óptimas. En este trabajo, encontramos dos protocolos que brindaron una alta especificidad y sensibilidades de 36.7 y 40.0% para el diagnóstico de TB. Es posible que estos resultados pudieran ser mejorados, por ejemplo con el uso de complejos multi-peptídicos o con el acoplamiento a una proteína acarreadora. Sin embargo, es importante mencionar que la sensibilidad y especificidad encontradas aquí resultan alentadoras, si se compara la eficacia de un péptido mimótopo con antígenos proteicos recombinantes. Por ejemplo, Lyaschenko y colaboradores (1998) encontraron sensibilidades de 25-27% para una proteína recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* de 38 kDa, del 12-20% para los antígenos recombinantes MPT63, MPT64, KatG, Ag85B y ESAT 6, y 39-44% de sensibilidad con el uso de las proteínas recombinante de 14 y de 19 kDa y el Ag 85 recombinante se ha reportado un 10% de sensibilidad (Valencia, 2004).

La obtención de una sensibilidad de hasta un 40% de reactividad resulta un valor considerablemente alto si se compara con los métodos convencionales. Por ejemplo la baciloscopía brinda una sensibilidad del 50% para TB pulmonar y solo de un 20-58% para TB meníngea, mientras que el cultivo muestra sensibilidades del 10% para TB peritoneal, 35% TB pleural y de un 50-70% en TB meníngea. En las pruebas serológicas, incluyendo radioinmunoensayo, hemaglutinacion y ELISA se han reportado sensibilidades de 16-57% y especificidades de 62-100% dependiendo del antígeno (Dinnes *et al*, 2007). Por su parte, la técnica de PCR ha mostrado una sensibilidad del 40-42%.

De acuerdo con Mark Goldberger los criterios que un método debe cumplir para sustituir a la baciloscopía es que presente una sensibilidad de al menos un 70%, y una especificidad del 98%, que logre discernir entre individuos con baciloscopía positiva y negativa, simplicidad, que no requiera de equipo sofisticado, que proporcione estabilidad, que no requiera el uso de refrigeración y que sea de bajo costo (WHO, 1997).

Es importante considerar que las muestras de sueros de pacientes con TB pulmonar utilizadas en este estudio están clasificados como individuos con infección activa por baciloscopía positiva. Sin embargo se desconoce la fase de la enfermedad así como otros padecimientos como el VIH que pudieran influir en la reactividad. Considerando lo anterior, el uso de mimótopos de antígenos micobacterianos para el diagnóstico serológico de la TB aportaría numerosas ventajas, destacando la facilidad y bajo costo de producción y la estabilidad para su transporte, por lo que la identificación de nuevos mimótopos peptídicos, que pudieran ser parte de un cóctel de antígenos para diagnóstico, resulta de sumo interés.

Finalmente, cabe resaltar la necesidad de establecer una vinculación más estrecha entre los laboratorios dedicados a la búsqueda de nuevos reactivos de diagnóstico con el sector salud, sin lo cual resultaría impensable la propuesta de nuevas metodologías en poblaciones específicas.

X. APÉNDICE

REACTIVOS UTILIZADOS

Medio LB (Luria Bertani) 1L

Bacto Tryptone 10g

Extracto de levadura 5g

NaCl 5g

Esterilizar por 25 minutos, en autoclave a 121°C
almacenar a temperatura ambiente.

Top Agar 1L

Bacto Tryptone 10g

Extracto de levadura 5g

NaCl 5g

MgCl².6H²O 1g

Agarosa 7g

Esterilizar por 25 minutos, en autoclave a 121°C
almacenar a temperatura ambiente.

Medio 2xYT 1L

Bacto Tryptone 16g

Extracto de levadura 10g

NaCl 5g

Esterilizar por 25 minutos, en autoclave a 121°C
almacenar a temperatura ambiente.

Buffer salino de fosfatos PBS 10X

NaCl 80g 1.37M

KCl 2g 0.027M

Na²HPO⁴ 14.4g 1M

KH²PO⁴ 2.4g 0.01M

Ajustar pH a 7.4 con HCl y aforar a un 1 litro.

PBS 0.01M

KH_2PO_4	0.01M
Na_2HPO_4	0.1M
NaCl	1.37M
KCl	0.027M

**Solución amortiguadora de Dietanolamina
(Dietanolamina 10%(v/v), pH 9.8).**

Dietanolamina	100ml
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	102mg
NaN^3	0.40g

Ajustar pH a 9.8 con HCl.

Aforar a 1 litro (conservar al abrigo de la luz)

PEG/NACI (8000)

NaCl	2.5M
Polietilenglicol (PEG 8000)	20% (p/v)

Esterilizar por 30 minutos, en autoclave a 120°C
almacenar a temperatura ambiente.

**Solución amortiguadora de
Carbonatos 0.05M, pH 9.6**

Solución Na^2CO^3 0.05M	31.8mg
Solución NaHCO^3 0.05M	21mg

Aforar a 500ml

Mezclar ambas soluciones hasta obtener un pH de 9.6

Solución amortiguadora de Boratos pH 8.2

Solución NaCl	0.075M
Solución $\text{Na}^2\text{B}_4\text{O}_7$	0.025M
Solución H^3BO^3	0.01M

X-Gal/IPTG

X-Gal	1g
IPTG	1.25g
Dimetil formamida	25ml

Mantener a -20°C

XI. Bibliografía

- Altamirano L.M. Desde las fuerzas Mágicas hasta Roberto Koch: Un enfoque epidemiológico de la tuberculosis. *Re. Ins. Nal. Enf. Res. Mex.* 2004; **2**:117-125.
- American Thoracic Society Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2000; **161**:1376-1395.
- Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends. Immunol.* 2001; **22**:160-168.
- Baez-Saldaña A.R, Pérez P.J. y Salazar L. M. Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaría de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud pública de México.* 2003; **2**:78-83.
- Boudet F, Théze J y Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol. Methods.* 1991 ; **142** :73-82.
- Buchwald U.K, Less A, Steinitz M y Pirofski L.A. A peptide mimotope of type 8 pneumococcal capsular polysaccharide induces a protective immune response in mice. *Infect. Immunol.* 2005; **73(1)**: 325-33.
- Brett P.J, Tiwana H, Feavers I.M y Charalambous B.M. Characterization of oligopéptidos that cross react with carbohydrate specific antibodies by real time kinetics, in solution competition enzyme linked immunosorbent assay and immunological analyses. *Biol. Chem.* 2002; **277(23)**: 20468-76.
- Carrada B. T. Perspectivas en tuberculosis: Sugerencias para su eliminación en la República Mexicana. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2002; **15(2)**: 102-125.
- Collins M. F. Mycobacterial Pathogenesis: a historical perspective. *Front. Biosci.* 1998; **3**:123-32.

- Crubézy E, Ludes B, Poveda DJ, Clayton J, Roy-Crouau B y Montagnon D. Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5 400 years old. *C.R. Acad. Sci. III.* 1998; **321(11)**: 941-951.
- Chan ED, Heifets L, Iseman DM. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber. Lung. Dis.* 2000; **80 (3)**: 131-140.
- Chan ED, Reves R, Belisle TJ, Brennan LP y Hahn EW. Diagnosis of Tuberculosis by a Visually Detectable Immunoassay for Lipoarabinomannan. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2000; **161**:1713-1719.
- Charalambous MB y Feavers MI. Peptide mimics elicit antibody responses against the outer membrane lipooligosaccharide of group B *Neisseria meningitidis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 2000.**191**:45-50.
- Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997.**1**:579-588.
- Donoghue H, Spigelman ML, Greenblatt CH, Lev-Maor G, Bar-Gal KG Matheson, C Vernon, KG Nerlich y Zink A. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet. Infect Dis.* 2004; **4**:584-92.
- Daniel MT, Bates HJ y Downes AK. History of Tuberculosis. In Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Ed. B. R. Bloom. ASM Press, Washington, D. C: 1994; 13-24.
- Dayal R, Sirohi G, Singh MK, Mathur PP, Agarwal BM, Katoch VM, Joshi B Singh, y Singh HB. Diagnostic value of ELISA serological tests in childhood tuberculosis. *J Trop Pediatr.* 2006; **(6)**:433-7.
- Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F y Lalvani A. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess.* 2007; **(3)**: 1-196.
- Fournel S y Muller S. Synthetic peptides in the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 2003; **4**:261-276.
- Fleuridor R, Less A y Pirofski LA. A cryptococcal capsular polysaccharide mimotope prolongs the survival of mice with *Cryptococcus neoformans* infections. *J. Immunol.* 2001; **166 (2)**: 1087-96.

- Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma J, Espitia C, Manoutcharian K y López ML. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem. J.* 2005; **387**:411-417.
- Gorocica P, Jimenez M, Garfias J, Sada I y Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev. Ins. Nat. Enf. Res. Mex.* 2005; **18(2)**: 142-153.
- Goyal M, Shaw R, Barnerjee D, Coker R, Robertson D y Young D. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 1997; **10**:1120-1124.
- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. World Health Organization.
- Grotaus MC, Srivastava N, Smithson SL, Kieber-Emmons T, Williams DB, Carlone GM y Westerink MA. Selection of an immunogenic peptide of *Neisseria meningitidis* serogroup A using a peptide display library. *Vaccine.* 2000; **18**:1253-1263.
- Harper C. Tuberculosis, a neglected opportunity. *Nat Med.* 2007; **13(3)**:309-12.
- Hou Y y Gu X. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. *J. Immunol.* 2003; **170(8)**: 4373-9.
- Jouault T, Fradin C, Dzierszinskin F, Borg-Von-Zepellin M, Tomavo S, Corman R, Trinel PA, Kerckaert JP y Puolain D. Peptide that mimic *Candida albicans* derived beta-1, 2-linked mannosides. *Glycobiology.* 2001; **11 (8)**: 693-701.
- Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* 2001; **1(1)**:20-30.
- Kaufmann SH y McMichael JA. Annulling a dangerous liaison: Vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* 2005; **11**:33-44.

- Kouzmitcheva AG, Petrenko AV y Smith PG. Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; **8**:150-160.
- Lesinski GB, Smithson SL, Srivastava N, Chen D, Widera G y Westerink MA. DNA vaccines encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine.* 2001; **19(13-14)**: 1717-26.
- Luo P, Agadjanyan M, Qiu J, Julie WM, Steplewski Z y Kieber- Emmons T. Antigenic and immunological mimicry of peptide mimotopes of Lewis carbohydrate antigens. *Mol. Immunol.* 1998; **35**: 865-879.
- Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D y Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infection. Immun.* 1998; 3936-3940.
- Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, Sanchez E, Pinedo Y, Saravia JC, Salazar C, Oberhelman R, Hollm-Delgado MG, LaChira D, Escombe AR y Friedland JS. Microscopic-observation drug susceptibility assay for the diagnosis of tb. *N. Engl. J.Med.* 2006; **355(15)**:1539-50.
- Monzavi-Karbassi B, Cunto-Amesty G, Luo P y Kieber-Emmons T. Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. *Trends. Biotechnol.* 2002; **20(5)**: 207-214.
- Migliori GB, Loddenkemper R, Blasi F y Raviglione MC. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic. *Eur. Respir. J.* 2007; **29**: 423-427.
- Mullen ML, Nair PS, Ward MJ, Rycroft NA y Henderson B. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends. Microbiol.* 2006;**3**: 141-147.
- Nakamura LY. Producción de anticuerpos monoclonales en contra de glicolipidos de *Mycobacterium*. 2005; Tesis de Licenciatura de la facultad de ciencias.
- Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie.* 2003 ; **85**:153-166.

- Pai M, Kalantri S y Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II active tuberculosis and drug resistance. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2006; **6(3)**: 423-432.
- Park SA, Choi IH, Kim SJ y Shin JS. Peptide mimotopes of *Neisseria meningitidis* group B capsular polysaccharide. *Yonsei. Med. J.* 2004; **45(4)**: 755-8.
- Patil Gourie-Devi, Chaudhuri JR y Chandramuki A. Identification of antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the csf of tuberculous meningitis patients by western blotting. *Clin. Immunol and Immunopathol.* 1996 ; **81(1)**:35-40.
- Prinz DM, Smithson SL y Westerink MA. Two different methods result in the selection of peptides that induces a protective antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J. Immunol. Methods.* 2004; **285(1)**: 1-14.
- Restrepo IB. Nuevas herramientas para la detección de la tuberculosis latente. *Biomédica.* 2004; **24**: 202-11.
- Riley W, Lee. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2006; **116 (6)**: 1475–1478.
- Rook GA y BR Bloom. Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Ed. B. R. Bloom. ASM Press, Washington, D. C. 1994; 485-501.
- Robles Y, González E, Govezensky T, Mungia ME, Acero G, Bobes JR, Gevorkian y G Manoutcharian K. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. *Clin. Immunol.* 2005; **116**: 265-270.
- Sada E, Brennan JP, Herrera T y Torres M. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 2587-2590.
- Sada DE. La respuesta inmune en la tuberculosis. *Gac Méd Méx.* 2003; **139(5)**: 481-486.

- Simons-Haldi M, Mantei N, Franke J, Volshol H y Schachner M. Identification of a peptide mimic of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope. *Neurochem.* 2002; **83(6)**:1380-8.
- Shin JS, Lin JS, Anderson PW, Insel RA y Nahm MH. Monoclonal antibodies specific for *Neisseria meningitidis* group B polysaccharide and their peptide mimotopes. *Infect. Immun.* 2001; **69(5)**: 3335-42.
- Santamaría H. Phage display y su aplicación en el diagnóstico clínico. *Revista de investigación clínica.* 2003; 55(6):711-718.
- Sharma A, Saha A, Bhattacharjee S, Majundar S y Das Gupta SK. Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2006; 1143-1154.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis*. Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 463-496.
- Sompuram RS, Models V, Ramanathan H, Wescott C, Radcliffe G y Bogen AS. Synthetic peptides identified from phage displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. *Clin. Chem.* 2002; 48(3):410-420.
- Valencia Delgado J.M. Identificación de mimótopos del Ag 85 de *Mycobacterium tuberculosis*. 2004; Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias.
- WHO, Tuberculosis Diagnostics Workshop Report. 1997.
- Xu L, Jin B y Fan D. Selection and identification of mimic epitopes for gastric cancer-associated antigen MG7. *Ag. Mol. Cancer. Ther.* 2003; **2**: 301-306.
- Young BD y Robertson BD. Approaches to combat tuberculosis. *Curr. Opinion y Biotechnol.* 1998; **9**:650-652.
- Yu M, Than K, Colegate S, Shiell B, Michalski PW, Prowse S y Wang L. Peptide mimotopes of phomopsins: Identification, characterization and application in an immunoassay. *Mol. Divers.* 2005; **9**: 233-240.
- Zenteno CR. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Res. Mex.* 2004; **16**: 181-186.