

## ANTECEDENTES

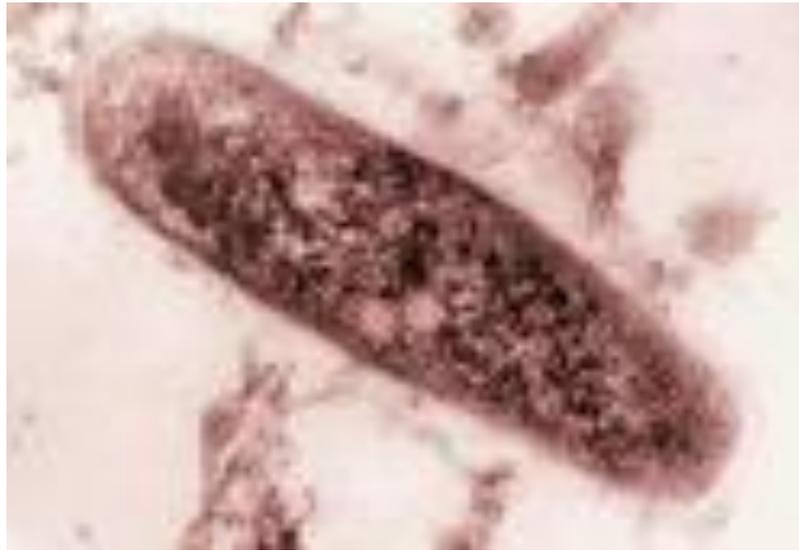
### *Mycobacterium tuberculosis*

#### **Características Generales**

*Mycobacterium tuberculosis*, es una especie bacteriana que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*; es un bacilo ligeramente curvo o recto (Prescott y col., 1999), intracelular obligado, aerobio, inmóvil (Ramírez Rivera y col., 2002) con dimensiones de 1-4 x 0.3 x 0.6  $\mu\text{m}$  (Fig. 1) (Brennan-Nikaido, 1995). Con carencia de actividad catalasa, capacidad de acumular niacina y reducir los nitratos a nitritos (Koneman y col., 1997).

Su pared celular es muy rica en lípidos (Prescott y col., 1999) lo cual determina sus características propias como: hidrofobia, que es la tendencia que muestran las células a adherirse unas con otras durante su crecimiento en medios acuosos, y por ello a flotar en la superficie; resistencia a la acción de ácidos y álcalis; tiempo de generación, y resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos fijadores de complemento (Lugo de la Fuente, 1996).

*Mycobacterium tuberculosis* obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa y glicerol). El aumento de la presión de  $\text{CO}_2$  estimula su crecimiento, y crece en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio (Lugo de la Fuente, 1996). Forma colonias no pigmentadas, rugosas de color gamuza, después de 14 a 28 días de incubación en medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook. Su crecimiento se propicia en una atmósfera de 5 a 10% de dióxido de carbono, pero sigue siendo lento, con un tiempo medio de generación de 12 a 24 horas (Champoux y col, 1990). También es resistente a la desecación, insensible a los detergentes cationicos, pero no resiste el calor ni la radiación ultravioleta (Lugo de la Fuente, 1996).



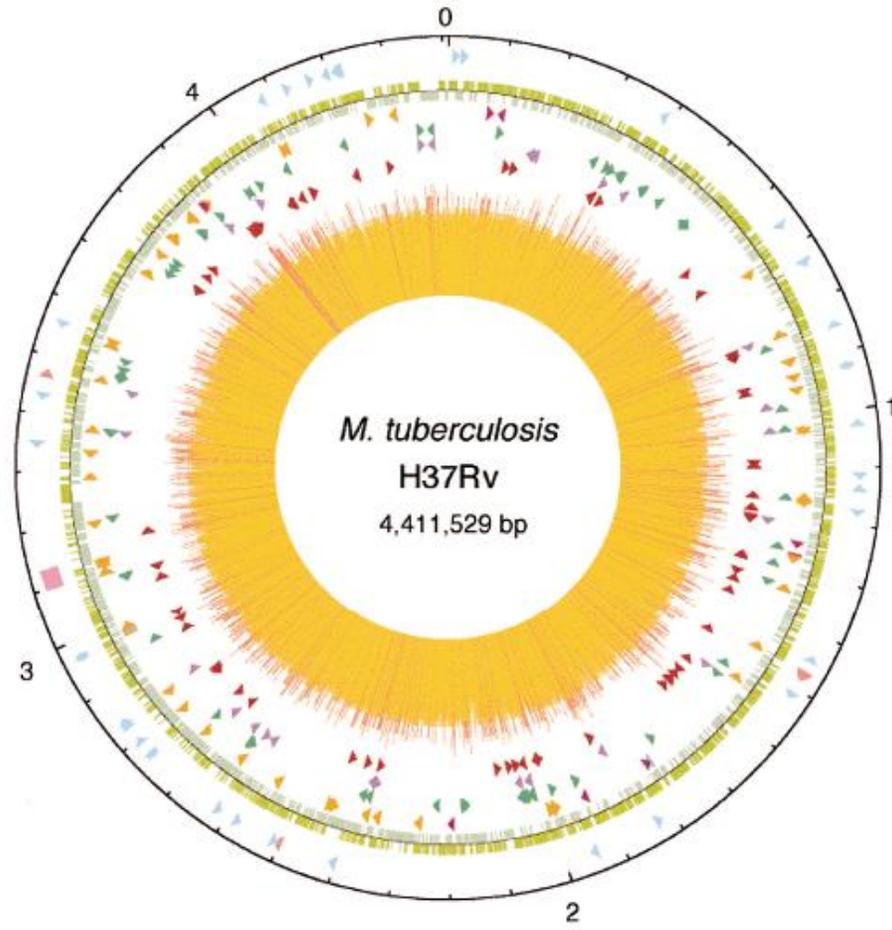
**Fig. 1.** Bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. Fuente:  
<http://www.iqb.es/dermatologia/atlas/tuberculosis/tuberculosis01.htm>

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv consiste en  $4.4 \times 10^6$  pares de bases, conteniendo aproximadamente 4,000 genes (Fig. 2). Alrededor de 200 de estos genes están involucrados en la codificación de enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos. Así mismo, otra característica del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* es la presencia de genes codificadores de proteínas ricas en glicina y de las familias de proteínas PE y PPE, los nombres derivan de las secuencias de aminoácidos Pro-Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE) encontradas en las regiones N-terminal de cada una de estas proteínas, que tienen aproximadamente de 110 y 180 aminoácidos (Smith, 2003).

### **Características Estructurales**

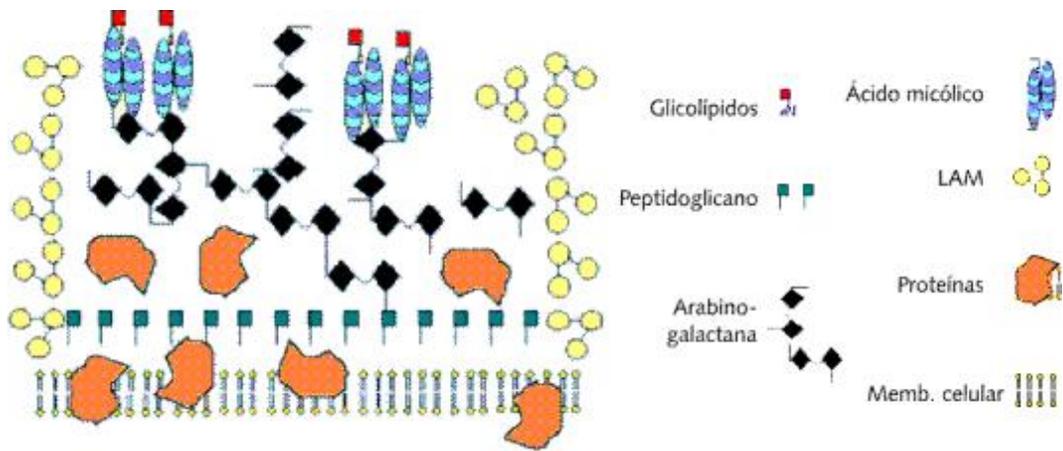
La envoltura de *M. tuberculosis* es compleja (Brennan-Nikaido, 1995) (Fig. 3). Su pared celular contiene lípidos, que constituyen el 20 % del peso seco de la bacteria, y está compuesta de cuatro capas, la más interna de mureína o peptidoglicano; que como en otros géneros da a la bacteria forma y rigidez. Por encima de esta capa están tres diferentes, compuestas de complejos péptidos, polisacáridos y lípidos que semejan filamentos arreglados en una matriz homogénea. La pared bacteriana rígida está constituida por una estructura covalente de dos polímeros unidos entre sí: peptidoglicano y arabinogalactano, contenidos aproximadamente en igual proporción. El 50 % de los lípidos son ésteres de ácidos micólicos (ácidos grasos ramificados de 50-90 átomos de carbono) y un 25 %, son ácidos grasos de cadena corta o media (Lugo de la Fuente, 1996).

La capa externa de la envoltura de las micobacterias sirve de protección contra múltiples factores externos, entre sus principales componentes se encuentran el ácido micólico y los glicolípidos que junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria, por lo general estas moléculas son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa (Gorocica y col., 2005).



**Fig.2.** Genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (Smith, 2003).

Mapa Circular del cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. El círculo externo muestra la escala en megabases, donde el 0 representa el origen de la replicación.



**Fig. 3.** Representación esquemática de la pared celular micobacteriana (Gorocica y col., 2005).

Su membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (Gorocica y col., 2005).

## **Tuberculosis**

### **Epidemiología**

La tuberculosis es una de las enfermedades de mayor impacto de salud pública en el mundo (Zenteno Cuevas, 2003); la tuberculosis pulmonar es la forma más común de tuberculosis. Se trata de una enfermedad infectocontagiosa de naturaleza crónica, que afecta a seres humanos de todas las edades (Palma-Nicolás y col., 2007), causada por el complejo *M. tuberculosis* pero principalmente por la especie *Mycobacterium tuberculosis* (Zenteno Cuevas, 2003).

La reemergencia de la tuberculosis, observada en los últimos 30 años (Rosas y col., 2007) está asociada con su coexistencia con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y con la aparición de cepas multifarmacorresistentes (Pereira Arias-Bouda y col., 2000), así como con el deterioro de la calidad de vida de las poblaciones emergentes; los factores socioeconómicos son tan importantes como la predisposición genética del hospedero y determinan la susceptibilidad a esta enfermedad en las diferentes poblaciones humanas (Herrera Barrios y col., 2005).

Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (Daginawala y col., 2007), y según el 12° informe anual de la Organización Mundial de la Salud, en el 2006 hubo 9.2 millones de casos nuevos de tuberculosis en el mundo, de los cuales 500,000 fueron multirresistentes y 700,000 se presentaron en países con alta prevalencia del VIH. Se calcula que en ese mismo año murieron de tuberculosis 1.5 millones de personas (OMS, 2008).

De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en el año 2002, en México se contabilizaron 14,064 casos de tuberculosis (Zenteno Cuevas, 2003). Sin embargo, el número de casos nuevos crece cada día más, pues hasta la semana 28 del año 2006 se notificaron 7,257 casos nuevos de tuberculosis pulmonar en México (Palma-Nicolás y col., 2007).

### **Patogenia**

La tuberculosis es un ejemplo de infección producida por una bacteria intracelular en la que coexisten inmunidad protectora e hipersensibilidad patológica, en la que las lesiones se deben fundamentalmente a la respuesta del huésped. El contagio suele ocurrir por vía respiratoria y es transmitida de persona a persona (Abbas, 2003). Una vez en los pulmones, los bacilos son fagocitados por los macrófagos (Koneman y col., 1997), éstos juegan un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis, debido a que son sus principales células huésped, pero también uno de los posibles mecanismos de control (Gorocica y col., 2005), produciéndose una respuesta de hipersensibilidad donde se forman pequeños nódulos duros, llamados tubérculos, que son característicos de la tuberculosis y que dan el nombre a la enfermedad (Prescott y col., 1999).

La tuberculosis en la mayoría de los casos sigue un patrón general (Smith, 2003). El primer estadio inicia con la inhalación del bacilo tuberculoso (Van Crevel y col., 2002) y su implantación en los alvéolos; después, la bacteria se disemina por circulación linfática hacia los nódulos linfáticos del pulmón (Smith, 2003), los macrófagos alveolares fagocitan al bacilo (Van Crevel y col., 2002) formando el denominado Complejo Primario o de Ghon (Smith, 2003). En este estadio, la destrucción de la micobacteria depende de que la capacidad microbicida intrínseca de los fagocitos del huésped supere a los factores de virulencia de la micobacteria (Van Crevel y col., 2002). El segundo estadio, dura cerca de tres meses (Smith, 2003), a veces las lesiones tuberculosas se licuan y forman cavernas tuberculosas llenas de aire. A partir de estas cavidades la bacteria se puede diseminar (Prescott y col., 1999) por la circulación

hematógena hacia diversos órganos, incluyendo otras partes del pulmón; para este tiempo, en muchos individuos la enfermedad aguda y fatal puede presentarse en forma de tuberculosis meníngea o miliar (tuberculosis diseminada) (Smith, 2003).

### **Proteínas de Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis***

Las proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* son aquellas que la bacteria libera al medio de cultivo en el que crece. En la mayoría de los casos, se desconoce el mecanismo de secreción y la función de las proteínas de filtrado (Smith, 2003), sin embargo, se sabe que de las más de 257 proteínas, 159 contienen una señal peptídica N-terminal, 25 poseen un dominio transmembranal y 36 son lipoproteínas (Målen y col., 2007). Un número significativo de estas proteínas son blanco de inmunorespuestas en el huésped infectado (Ramírez y col., 2002), de tal manera que el filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* constituye una fuente importante de antígenos con enorme potencial en términos de su valor diagnóstico (Gennaro y col., 2001) y con capacidad de inducir inmunidad protectora (Gomez y col., 2000).

La mayoría de los estudios con estas proteínas están encaminados a la identificación de blancos moleculares con utilidad potencial para el desarrollo de una prueba diagnóstica (Samanich y col., 2001) y el desarrollo de nuevas vacunas; se cree que una de las posibles estrategias para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la tuberculosis involucra el uso de proteínas secretadas por *Mycobacterium tuberculosis* durante su crecimiento *in vitro* (Attanasio y col., 2000).

### **Proteínas de Potencial Valor Serodiagnóstico**

Un antígeno que se destaca por el gran número de investigaciones llevadas a cabo con él, es el antígeno inmunodominante de 38 kDa (Ramírez y col., 2002) que es uno de los mayores constituyentes en los cultivos líquidos de *Mycobacterium tuberculosis* (Wiker y Harboe, 1992). Este antígeno es una lipoproteína que presenta homología con la proteína PhoS de *Escherichia coli*, y es conocida como un potente

inmunógeno (Chang y col., 1994) ya que posee diferentes epítopes capaces de inducir la proliferación de anticuerpos específicos contra *Mycobacterium tuberculosis* (Ramírez y col., 2002). Diversos estudios han demostrado que los anticuerpos anti-38-kDa están presentes en pacientes con enfermedad avanzada, recurrente y crónica (Samanich y col, 2000) y por esta razón la proteínas de 38 kDa ha sido empleada para el desarrollo de ensayos comerciales para la detección de tuberculosis (Houghthon, 2002); sin embargo, este antígeno tiene una sensibilidad entre el 45 a 80% en diferentes cohortes de pacientes (Samanich y col, 2000), por lo que no es posible sugerir su uso masivo (Dillon y col., 2000).

La identificación y caracterización de dos antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6 y CFP-10 ha dado lugar al desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico específicas para la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, ya que estas dos proteínas están contenidas dentro de la región RD1 del genoma micobacteriano, región que se encuentra ausente en las cepas de *Mycobacterium bovis* BCG y micobacterias no tuberculosas (Ravn y col., 2005). El antígeno de secreción temprana denominado ESAT-6 (Rosenkrands y col. 1998), ha demostrado tener el mayor potencial como herramienta de diagnóstico para diferenciar entre una infección por tuberculosis y la inmunidad producida por la vacuna BCG (Brandt y col., 2000), siendo un blanco dominante para la inmunidad mediada por células tanto en modelos animales como en pacientes con tuberculosis (Vicenti y col., 2003); contiene numerosos epítopes reconocidos por un alto porcentaje de individuos (arriba del 90%, dependiendo de la sensibilidad del ensayo utilizado) (Brandt y col., 2000).

Así mismo, se ha demostrado que el antígeno CFP-10 o también denominado MTSA-10 (Antígeno 10 *Mycobacterium tuberculosis* Específico) es reconocido por un subconjunto de sueros de pacientes con tuberculosis y por un subconjunto de individuos saludables con la prueba de la tuberculina positiva (PPD +). El antígeno CFP-10, al ser reconocido por el sistema inmune por un porcentaje significativo de individuos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, tanto con enfermedad activa como los que

han desarrollado respuestas protectoras, tiene una utilidad potencial como componente de una prueba serológica para la tuberculosis activa y como un componente de una prueba antigénica dérmica mejorada para detectar la exposición con *Mycobacterium tuberculosis* (Dillon y col., 2000).

### **Proteínas con Potencial Valor Preventivo**

El complejo 85, que es el mayor constituyente del sobrenadante de los cultivos del *Mycobacterium tuberculosis* (Ramírez y col., 2002) (aunque también se le ha encontrado en asociación con la superficie bacteriana), es el mayor producto cuantitativamente secretado en el medio de Sauton (Wiker y Harboe, 1992) y comprende tres proteínas estrechamente relacionadas, Ag85A (31kDa), Ag85B (30kDa) y Ag85C (31.5kDa) (Daginawala y col., 2007). Se ha visto que este complejo es capaz de inducir una inmunidad protectora contra la tuberculosis en cerdos de guinea, así como una fuerte proliferación de células T y la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en células mononucleares de sangre periférica de los individuos saludables con reacción positiva a la tuberculina (Kim y col., 1999).

Las regiones de 6 a 10 kDa y de 24 a 36 kDa de los filtrados de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* de corto plazo, son preferentemente reconocidas por las células Th1 en distintos modelos animales, así como por pacientes con la enfermedad. La región de masa molecular de 24 a 36 kDa comprende varias proteínas bien caracterizadas de los filtrados de cultivo, entre las que se identificó y purificó la nueva proteína CFP29 (de 29 kDa) que se caracterizó por desencadenar la liberación de altos niveles de IFN- $\gamma$  en células de memoria efectoras de ratón, provocando inmunidad protectora contra la tuberculosis, pero estudios posteriores indicaron que la CFP29 está ampliamente distribuida en diferentes especies micobacterianas y su expresión ha sido demostrada tanto en especies patógenas como en especies no patógenas de origen ambiental (Rosenkrands y col., 1998).

La lipoproteína de 19 kDa ha demostrado ser un blanco prominente para las respuestas inmunes celulares y humorales tanto en ratones como humanos (Herrmann y col., 1996). También las proteínas de choque térmico (HSPs) como la HSP 90, HSP 70, HSP 65 y HSP 10 han demostrado desencadenar una fuerte respuesta inmune en el hospedero durante la infección tuberculosa. Pero entre éstas, la HSP 65 de 65 kDa está presente en una amplia variedad de especies de *Mycobacterium tuberculosis*, y es inmunodominante por desencadenar las respuestas inmunes celulares y humorales (Mudaliar y col., 2006).

El complejo antigénico de 45/47 kDa es una glicoproteína codificada en el gen *apa*. Este complejo está presente en los filtrados de *Mycobacterium tuberculosis* y ha sido identificada y aislada por su habilidad de interactuar principalmente con linfocitos T y/o anticuerpos inducidos por inmunización con la bacteria viva en cerdos de guinea (Romain y col., 1999).

### **Métodos para la Identificación de Antígenos Inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

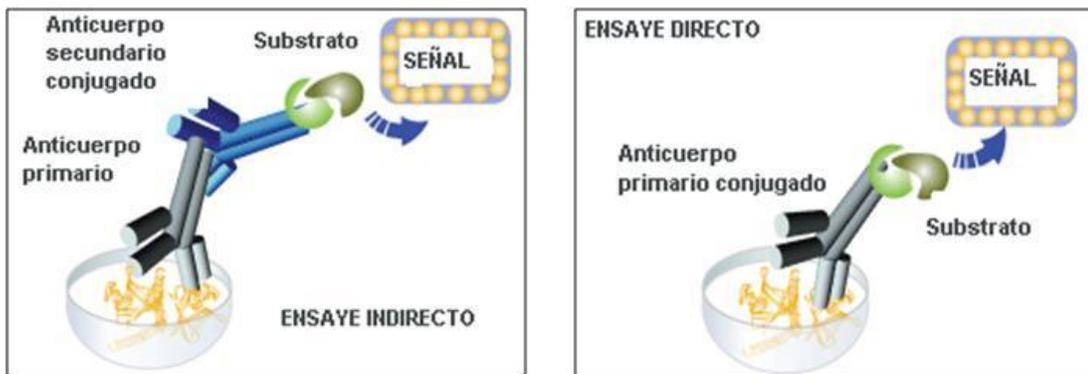
Los análisis basados en la detección de anticuerpos contra *Mycobacterium tuberculosis*, detectan la respuesta inmunológica que se presenta en sujetos infectados (Palma Nicolás y col., 2007). Entre estos métodos se encuentra el ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA), la electrotransferencia e inmunodetección (Western blot) y el ensayo de manchas (Dot blot). La estandarización de estos métodos permite determinar las condiciones de temperatura, pH, agitación y otros requisitos prácticos que influyen en el resultado final del ensayo. Este conjunto de estudios constituye la antesala de la validación que como proceso más complejo, establece que las características determinadas previamente, reúnen los requisitos para la aplicación de la técnica analítica (Martínez y col., 2003).

### **Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas**

Es un método de detección basado en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo([http://www.aesan.mspsi.es/AESAN/docs/docs/publicaciones\\_estudios/seguridad/SEGURIDAD\\_ALIMENTARIA.pdf](http://www.aesan.mspsi.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/seguridad/SEGURIDAD_ALIMENTARIA.pdf)), este ensayo utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de dicho complejos (Guzmán-Vázquez, 2004). Permite la detección de distintas sustancias antigénicas mediante la unión de anticuerpos específicos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuyo producto es visible y puede ser medido. Esta reacción se detecta gracias a que el anticuerpo lleva unida (conjugada) una enzima, que suele ser peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina, que en presencia del sustrato adecuado genera un producto coloreado ([http://www.aesan.mspsi.es/AESAN/docs/docs/publicaciones\\_estudios/seguridad/SEGURIDAD\\_ALIMENTARIA.pdf](http://www.aesan.mspsi.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/seguridad/SEGURIDAD_ALIMENTARIA.pdf)).

Todos los tipos de ELISA pueden ser resumidos en dos grandes grupos: ELISA directo para la detección de antígenos y ELISA indirecto para la detección de anticuerpos (Fig. 4). Ambas técnicas se basan en el mismo principio, ya que en primer lugar, se fija una cantidad de anticuerpo o antígeno en un soporte sólido (microplacas para titulación). Después, los sitios en los que no hayan quedado adsorbidas las moléculas de interés son bloqueadas para evitar uniones inespecíficas, mediante la adición de una proteína o molécula que ocupe los sitios vacíos; esta biomolécula debe de tener la particularidad de ser inerte en el sistema. Posteriormente, se añade la solución problema (con el antígeno o el anticuerpo), según el tipo de ELISA. El segundo anticuerpo, que está fijado a una enzima, se adiciona después de lavar los pozos para eliminar el excedente de antisuero primario. Éste sirve de puente y así, mientras mayor sea la cantidad de antígeno o anticuerpo en la solución problema, mayor será la cantidad del segundo anticuerpo marcado con la enzima que se requiere. Con este método, es posible estudiar en las muestras de un paciente la presencia de anticuerpos específicos para antígenos microbianos como indicadores de infección (Abbas y Lichtman, 2003).

La prueba de ELISA se basa en varias teorías: 1) el antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2) las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar (Guzmán-Vázquez, 2004).



**Fig. 4.** Esquematización de los diferentes ensayos de ELISA. Fuente: [http://www.genwaybio.com/gw\\_file.php?fid=6056](http://www.genwaybio.com/gw_file.php?fid=6056).

El método de ELISA directo utiliza un anticuerpo marcado contra el antígeno y ELISA indirecto es un método de dos pasos que utiliza un segundo anticuerpo marcado para la detección.

## **Electrotransferencia e Inmunodetección (Western blot)**

Este método se refiere a la transferencia biológica de muestras de un gel a una membrana y su subsecuente detección sobre la superficie de la membrana, también es llamado immunoblotting debido a que un anticuerpo es utilizado específicamente para detectar su antígeno. Fue introducido por por Towbin, y col., en 1979 y ahora es una técnica de rutina para el análisis de proteínas, comúnmente empleada para identificar una proteína específica dentro de una mezcla compleja y obtener datos cualitativos y semicuantitativos acerca de la proteína (Thermo Fisher Scientific Inc., 2008).

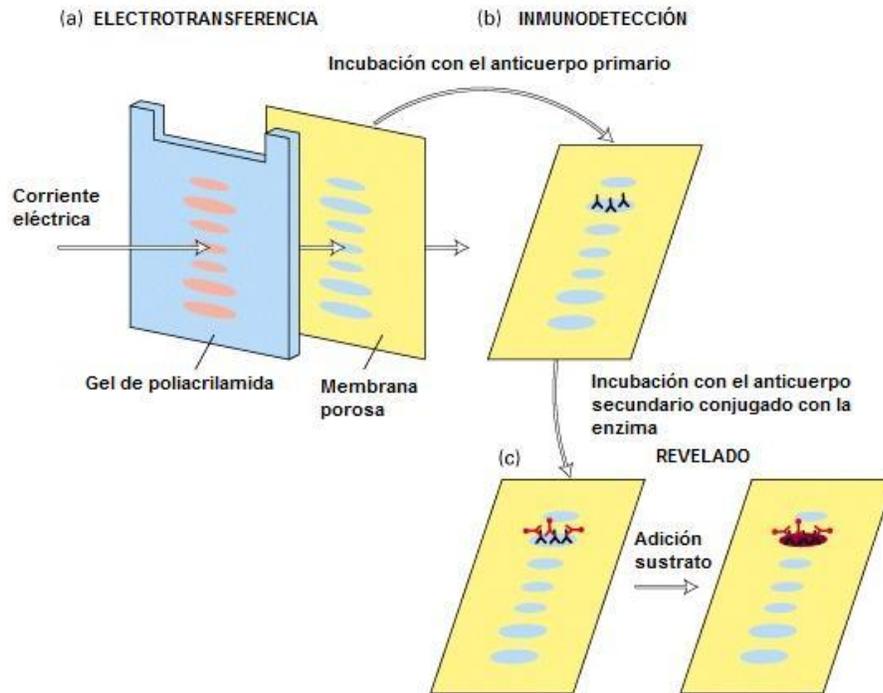
La mezcla es sometida primero a una separación analítica, para lo que suele utilizarse electroforesis en condiciones desnaturalizantes, de forma que las posiciones finales de las distintas proteínas en el gel dependen del tamaño de sus moléculas. A continuación, se transfiere el conjunto de proteínas separadas desde el gel de poliacrilamida de separación a una membrana de soporte, lo que hace que la membrana adquiera una réplica del conjunto de macromoléculas separadas en el gel. Durante el proceso de transferencia, el dodecil sulfato de sodio se separa de la proteína y a menudo se recuperan los determinantes antigénicos originales cuando la proteína vuelve a plegarse. La posición del antígeno proteico en la membrana puede detectarse gracias a su unión con el anticuerpo marcado específico hacia esa proteína, lo que proporciona información sobre el tamaño y la cantidad de antígeno (Abbas y Lichtman, 2004).

Las moléculas separadas y transferidas a una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o PVDF, es bloqueada para prevenir la unión inespecífica de anticuerpos en la superficie de la membrana. Las proteínas transferidas se unen al anticuerpo marcado con una enzima, formando un complejo. El sustrato apropiado es adicionado y junto con la enzima produce un producto detectable como un precipitado cromogénico o fluorogénico sobre la membrana para la detección colorimétrica o fluorimétrica respectivamente. El método de detección más sensible usa un sustrato quimioluminiscente, que combinado con la enzima, produce luz como subproducto. La

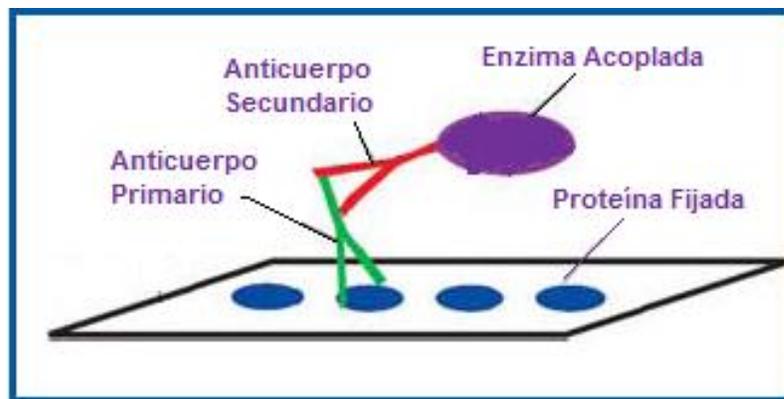
luz puede ser capturada utilizando una película o una cámara diseñada para la detección quimioluminiscente. Cualquiera que sea el sustrato usado, la intensidad de la señal esta correlacionada con la abundancia de antígeno sobre la membrana (Fig. 5) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2008).

### **Ensayo de Manchas**

Es una técnica ampliamente utilizada para la detección e identificación de proteínas. Es similar a la técnica de Western blot pero difiere en que las muestras proteicas no son separadas electroforéticamente (Abcam, 2008), sino aplicadas directamente en forma de pequeñas gotas de una solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha (<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm>), el proceso de inmunodetección es idéntico al del Western blot. La concentración de proteínas específicas en preparaciones crudas (como los filtrados de cultivo micobacterianos) puede ser estimada semicuantitativamente por este método si se tienen los anticuerpo específicos (Abcam, 2008; Fig. 6).



**Fig. 5.** Esquematización del Método de Electrotransferencia e Inmunodetección.  
 Fuente: <http://www.life.umd.edu/.../bsci423/song/Lab12.html>



**Fig. 6.** Esquema de un Ensayo de Manchas.

Fuente: [http://www.kpl.com/catalog/categories.cfm?Catalog\\_ID](http://www.kpl.com/catalog/categories.cfm?Catalog_ID)

Está compuesto de los siguientes pasos: (1) se agregan gotas del antígeno sobre el soporte, (2) después se lleva a cabo un bloqueo con una proteína inerte, (3) se agrega el primer anticuerpo o suero problema, (4) seguido de un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, (5) por último, se revela la reacción con la adición del sustrato específico para la enzima. Una reacción antígeno-anticuerpo es evidenciada por la presencia de un punto negro.