

Mycobacterium tuberculosis: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa.

Ramírez Rivera Nilda Alejandra, Cocotle Ronzón Bertha Elvia, Méndez Pérez Armando, Arenas Benhumea José.
Departamento de Patología experimental
Facultad de Medicina. Xalapa.

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas en la historia de la humanidad. Se calcula que habrá cerca de 80 millones de casos de tuberculosis en la primera década del siglo XXI, una proporción de los cuales es muy probable que sea resistente a medicamentos. Aproximadamente un tercio de la población mundial es portadora de *M. tuberculosis*, y la OMS predice que, en el año 2005, en los países en desarrollo, causará 8 millones de nuevos casos y de 3 a 4 millones de muertes por año, más que cualquier otro agente infeccioso único. Esto está atribuido primariamente a una respuesta inmune inadecuada del huésped, lo cual sugiere que se produce una inhibición del crecimiento de la micobacteria más que su destrucción, con la ulterior multiplicación catastrófica^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}.

El agente causal de la tuberculosis fue descubierto en 1882 por Roberto Koch, es de aspecto bacilar recto y alargado, mide 0.4 x 3 micras, pertenece al orden *Actinomycetae*, a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*^{9, 10, 11}.

El género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies que pueden clasificarse en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico; con fines didácticos se dividen en tres apartados¹³.

Complejo tuberculosis: Incluye las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (incluida la cepa BCG) y *Mycobacterium africanum*, productoras todas ellas de tuberculosis, siendo el primero el que se aísla con mayor frecuencia. Se incluye también *Mycobacterium microti*, productor de tuberculosis en rata.

Complejo lepra: En el que se incluyen las especies *M. leprae*, productor de la lepra humana.

Otras Micobacterias: Algunas llegan a ser patógenas, otras pueden ser patógenas oportunistas y finalmente otras suelen ser saprofitas. Producen las denominadas micobacteriosis.

Se caracteriza por ser un microorganismo intracelular obligado, aerobio, inmóvil, que se replica dentro de los fagosomas de los macrófagos^{6, 13, 14}. Su tiempo de duplicación es de 12 horas o más por lo que su crecimiento en medios de cultivo es muy lento.¹⁵ Es sensible al calor, rayos ultravioleta y al sol directo, presenta resistencia a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación; además es naturalmente resistente a muchos antibióticos debido principalmente a la envoltura celular altamente hidrofóbica que actúa como una barrera permeable lo que hace difícil su tratamiento.^{13, 16}

Su pared celular es compleja, posee un alto contenido de lípidos (40%), proteínas y polisacáridos; es rica en ácido micólico, el cual se encuentra unido covalentemente con glicolípidos tales como α, α' - tetrahalosa dimicolato (TDM, cord factor) y α, α' -trihalosa monomycolato (TMM). Ésta barrera permeable protege al organismo del medio ambiente, contribuye a la persistencia de la enfermedad y a la resistencia a muchos antibióticos a la vez que contribuye a la longevidad de la micobacteria. Inicia las reacciones inflamatorias del huésped y actúa en la patogénesis de la enfermedad^{15, 17, 18}.

Estructura celular de *M. tuberculosis*¹²

Consta de un gruesa pared, separada de la membrana celular por el espacio periplásmico, con cuatro capas. La mas interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico, con cortas cadenas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente, hay otras 3 capas compuestas: una por polímeros de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son ácidos grasos derivados y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el *cord factor*, llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada

con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos.

Los principales antígenos de las micobacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: los solubles o citoplasmáticos y los insolubles ligados a la pared celular

En relación a la naturaleza de los antígenos solubles, se sabe que hay:

a) De naturaleza polisacárida: comunes a todas las micobacterias y constituidos por arabinomananos, arabinogalactanos, glucanos.

b) Proteínas: algunas están bastante estudiadas. Entre ellas la denominada tuberculina vieja (OT) o el Derivado Proteíco Purificado (PPD). También el antígeno 5 o el de 65 Kda.

c) Lipídica: los monósidos de fosfatidil inositol (PIM) constituyen una familia de lípidos polares que se encuentran presentes en la membrana plasmática de las micobacterias. Entre ellos podemos citar los glicolípidos fenólicos, específicos para *M. tuberculosis* (PGL-Tbl).

d) El denominado antígeno 60 (Ag 60): es un complejo proteíco-lipopolisacárido procedente del citoplasma y de la membrana celular de *M. bovis* BCG y es común a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras micobacterias.

Las proteínas del *Mycobacterium* son las que le confieren la propiedad antigénica; ciento cincuenta de sus 1000 proteínas han sido caracterizadas¹⁵. Las más predominantes han sido aisladas, caracterizadas y copiadas por síntesis química o sus genes han sido insertados en huéspedes como *Escherichia coli*, para la reproducción en gran escala de proteínas recombinantes¹⁹. Para su estudio se han agrupado en cuatro grupos de acuerdo a su función, secuencia y características físico químicas:

El primer grupo formado por proteínas de stress térmico (hsp, del inglés heat shock protein), son un grupo de polipéptidos esencialmente citoplasmáticos, que incrementan su síntesis frente a estímulos estresantes como los cambios en la temperatura, el incremento de daño oxidativo y la disminución de nutrientes; esta respuesta probablemente proteja a la micobacteria durante situaciones adversas, manteniendo la conformación funcional de

proteínas esenciales y asistiendo en la reducción de proteínas desnaturizadas. Se agrupan en familias dependiendo del peso molecular: hsp65 kDa o GroEL, hsp 10 kDa o GroES, hsp 70 kDa o DnaK, hsp 90 kDa, hsp 16 kDa entre otras. Estas proteínas están presentes tanto en células procarióticas como eucarióticas; se conoce que están altamente conservadas dentro y a través de las especies, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de que la respuesta de las células T a determinantes compartidos de las hsp propias y las del *Mycobacterium tuberculosis* tienen un papel importante en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes^{4, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27}.

El segundo grupo son las lipoproteínas, incluye a las de 19 kDa, 26 kDa, 27 kDa y 38 kDa, fundamentalmente constitutivas de la pared celular pero pueden ser encontradas en el citoplasma, las de 19 y 38 kDa son las más importantes. Se considera que estas lipoproteínas están involucradas en la inducción de respuestas humorales y celulares, en especial de la respuesta de las células T de memoria *invitro*, y tienen un papel funcional en el transporte de nutrientes a través de la pared celular^{28,29}. Un tercer grupo son las proteínas secretoras, están constituidas principalmente por proteínas de 15, 18, 23, 26, 27, 30, 31, 31.5 y 41 kDa, algunas de éstas forman el complejo 85 que es el mayor constituyente del sobrenadante de los cultivos del *Mycobacterium tuberculosis*^{30, 31, 32}.

El último grupo está constituido por las enzimas, la L-alanina deshidrogenasa de 40 kDa y la superóxidodismutasa de 23 kDa, que están involucradas en los mecanismos de defensa del bacilo dentro de los macrófagos.

Se está tratando de definir que antígeno o epítopo estimula las diferentes respuestas de las células T; la gran mayoría de los antígenos micobacterianos son llamados timodependientes, ya que necesitan de la participación de los linfocitos T cooperadores para generar suficientes respuestas humorales³³.

El *Mycobacterium* presenta 30 diferentes sustancias antigénicas que son capaces de despertar reacciones de hipersensibilidad con destrucción celular³⁴.

El antígeno 38 kDa antes conocido como antígeno 78, antígeno 5 o antígeno proteico "b" (pab), es una proteína de 38,000 daltones, que se ha identificado como una de las de más alta especificidad para la detección de la enfermedad. Es el mayor constituyente de líquido de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*. De las especies de Micobacterias se encuentra sólo presente en *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*, su concentración en este último es 10 veces superior. La secuencia de aminoácidos de la proteína 38 kDa posee un 30% de homología con una proteína (PhoS) relacionada con la fijación y el transporte de fósforo en *Escherichia coli*, la cual se incrementa durante la disminución de fosfato en el citoplasma.

El antígeno 38 kDa de la micobacteria posee diferentes epítopes localizados en la porción central de la molécula y en el carboxilo terminal, los cuales son capaces de inducir la proliferación de clones de células T específicos para *M. tuberculosis*, aunque algunos pueden tener reactividad cruzada. Una respuesta humoral excesiva al 38 kDa parece tener significado patogénico^{11, 33, 35}. La glicoproteína 38 kDa es una molécula blanco para los CD8. La inmunodominancia del 38 kDa en las reacciones mediadas por anticuerpos y células T se basa en su localización extracelular.

Los anticuerpos dirigidos contra la proteína 38 kDa se presentan en un alto porcentaje de pacientes con Tuberculosis y tiene una alta especificidad para la enfermedad activa^{35, 36}. La mayoría de pacientes produce anticuerpos contra la proteína 38 kDa, mientras que en los controles sanos no se encuentra.

Recientemente se demostró que la vacuna DNA de 38kDa está induciendo una inmunidad protectora en ratones vacunados que se exponen a bacilos tuberculosos virulentos, lo que resulta en una disminución de la carga bacteriana. Este anticuerpo se une sólo al antígeno hallado en *M. tuberculosis* y en BCG de *M. bovis*, no produce una reacción visible con otros sueros, por lo que el antígeno de 38 kDa parece ser serológicamente específico. Debido a su alta especificidad, se considera que la proteína 38

kDa puede llegar a sustituir al derivado proteico purificado (PPD) en el diagnóstico de la Tuberculosis^{4, 11, 33, 38, 39, 40, 41}.

El antígeno 16 kDa es una proteína de superficie, el más potente inmunógeno, una herramienta de gran valor en el estudio del *Mycobacterium*, puesto que es altamente específico. La localización celular es desconocida, aunque se considera que está en la parte externa de la pared celular; en otras palabras, esta proteína es probablemente periférica asociada con la membrana^{4, 42}. Forma un complejo de 9 subunidades específicas con una masa total calculada de 144.9 kDa, pudiendo funcionar como chaperón molecular *in vitro* en una forma independiente del ATP.

Cuando hay infección por *M. tuberculosis*, la respuesta al óxido nitroso (NO) produce el incremento en la síntesis del homólogo alfa cristalino sHsp 16, que es una proteína mayor de *M. tuberculosis* producida por la exposición a intermediarios de nitrógeno reactivos^{37, 43, 44}. El antígeno de 16 kDa es un antígeno inmunodominante con valor serodiagnóstico, lleva los epítopes restringidos al bacilo tuberculoso. La presencia de la proteína 16 kDa se eleva en casos de enfermedad activa o cuando se ha desarrollado una recaída o el bacilo se ha vuelto resistente a los fármacos, disminuye en caso de que exista una respuesta adecuada al tratamiento. Los anticuerpos contra 16 kDa podrían elevarse en respuesta a la infección aún sin que la tuberculosis sea clínicamente aparente, por lo que se considera como un marcador temprano de enfermedad, además de que puede utilizarse también en el diagnóstico de la enfermedad en los niños.

Bibliografía

1. Stewart S. Granulomatous reactions. En: Stewart S. et al. Immunology, immunopathology and immunity. 1996. 5^a edición. Appleton and Lange USA. 467 – 471.
2. Tuberculosis. Sociedad Iberoamericana de Información científica (SIIC). Consejo de Dirección. relacion@siicsalud.com. 1998.
3. Behr MA, Wilson MA, Salamon H, Gill WP, Schoolnik GK, Rane S, Small PM Science 1999; 284: 1520–1523.

4. Chang Z, Primm TP, Jakan J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, Gilbert HF, Quiocco FA. *Journal of biological chemistry*. 271; 12:
5. Chang z, Choudary A, Lathigra R, Quiocco FA. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269; 21: 1956-58.
6. Perskvist N, Zheng L, Stendahl O. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 959 – 965.
7. Raman S, Song T, Puyang X, Bardarov S, Jacobs WR, Husson RN. *Journal of Bacteriology*. 2001; 183 (20): 6119 – 6125.
8. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Coston JM, Hewinson RG. *Nature*. 1999; 400; 99: 269 – 271
9. Cherrys JC. *An introduction to infectious diseases*. Elsevier. 1984: 698 – 701.
10. Pitchenik AE, Fertel D. *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterium diseases*. *Med Clin North Am*. 1992; 76: 121 – 171.
11. Murray P. "Mycobacterium". En: Murray P, et al. *Manual of clinical microbiology*. 1999. 17^a edición. 370 – 421.
12. Antonio GM, Martín N, Moreno S, Nogales MC. "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias". En: *Recomendaciones de la sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Procedimientos en microbiología clínica*. 1999.
13. Arredondo G, Calderón J. *Conceptos clínicos de infectología*. 1995, 10^a edición. Méndez Editores. México D.F. 225 – 233.
14. Microbiología médica.
15. Koneman W. "Mycobacterias". En Koneman. *Diagnóstico microbiológico*. 1992. 3^a edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 62.
16. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV. *Nature*. 1998. 93: 538 – 544.
17. Bradley J, Mckluskey J. "Tuberculosis". En: Bradley J, Mckluskey J. *Clinical immunology*. 1997. Oxford. Hong Kong. 189.
18. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. *Science* 276:1420-1422
19. Rose N. "Citokines and immune cells products". Rose N, et al. *Manual of clinical laboratory in immunology*. 1997. 5a ed. USA. 536.
20. Pospolevo LE. *Tuberculosis impaction in various HLA phenotypes*. *Tubercle*. 1990; 71: 187 – 192.
21. Young RA. *Stress proteins and immunology*. *Annu Rev Immunol*. 1990; 8: 401 – 420.
22. Young DD, Kauffman SH. *Mycobacterial protein antigen*. *Mol Microbiol*. 1992; 6: 133 – 145.
23. Young D, Galve TR. *Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis**. *Infect Immun*. 1991; 59: 3086 – 3093.
24. Yang X, Gasser DJ, Feige U. *Prevention of adjuvant arthritis in rats by a nonapeptid from 65 kDa Mycobacterial heat shock protein*. *Clin Exp Immunol*. 1990; 81: 189 – 194.
25. Lamb J, Bal P. *Stress Protein may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity*. *Int Immun*. 1991; 121: 191 – 196.
26. Peetermans WE, Raats IJ, van Furth R, Langermans AM. *Infection and immunity*, 1995,. 63; 9: 3454-3458.
27. Jaatela M, Wissing D. *J Exp Med*. 177, 1993: 231 – 36.
28. Young DB, Garbe TR. *Res Microbiol*. 91, 142; 1: 55- 65.
29. Post FA, Manca C, Neyrolles O, Ryffel B, Young DB, Kaplan G. *Infection and immunity*. 2001, 69; 3: 1433-1439.
30. Rees AD, Roman E, Moreno C. *The effect of lipoylation on human epitope specific CD4 T-cell recognition of the 19 kDa mycobacterial antigen*. *Immunology*. 1993; 80: 407-414.
31. Content J, De Wit L. *The genes coding for the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning , sequence, determination, and genomic organization of the gene coding for the antigen 85-C of *Mycobacterium tuberculosis**. *Infect Immun*. 1991; 59: 3205-3212.
32. Wiker HG, Harboe M. *The antigen 85 complex: a majors secretion product of *Mycobacterium tuberculosis**. *Microbiol Res*. 1992;56:648-661.
33. Rojas EO. "Desarrollo de inmunógenos y vacunas contra Lepra y Tuberculosis". En: Cabrera CR. *Vacunas*. 2000. 249 – 260.
34. Pérez TR. "Patología de las enfermedades infecciosas". En Pérez TR. *Principios de Patología*. 1991. 3^a ed. México D.F. 325 – 329.
35. Vordermeier HM, Harris DP, Roman E, Lathigra R, Moreno C, Ivany J. *The Journal of Immunology*, 1991; 147: 1023 – 1029
36. Kadiva GB, Charapas SV, Hussong D. *Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of the 38 kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis**. *J Immunol*. 1987; 139: 2447 – 2451.
37. Daniel TM, Anderson PA. *The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and Physico chemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5*. *Am Res Respir Dis*. 1978; 117: 533 – 539.

38. Xiaojiu Z, Stauss HJ, Ivanyi J, Vordermeier HM. International Immunology, 1997. 9; 11: 1669-1676.
39. Gururaj VK, Sotiros DCh, Hussong D. Journal of immunology. 1987. 139; 7: 2447-2451.
40. Harboe M, Wiker HG. The Journal of Infectious Diseases. 1992; 166: 874 – 884.
41. Kadival GJ, Chaparas SD, Hussong D. The Journal of Immunology, 1987, 139: 2447 – 2451.
42. Imaz MS, Bonifasich E, Diaz N, Claus JD, Singh M. Int J Tuberc Lung Dis. 2001, 5; 11: 1036-43.
43. Quiocho F, Chag Z, Choudhary A. Cloning, overexpression and purification of 38 kDa y 16 kDa protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis* (DCM20).
44. Garbe TR; Hibler NS; Deretic V. Infect Imun. 1999; 67; 1: 460-5.