

29-A
20je.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**ESTUDIO DEL EFECTO DE INMUNIZACION INTRAGASTRICA CON
MICOBACTERIAS ATIPICAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE
HACIA Mycobacterium tuberculosis EN RATONES NIH Y BALB/c**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

PATRICIA SONIA LOPEZ MURGUIA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. IRIS CITLALI ESTRADA GARCIA

COASESOR

M.C. VICTOR M. ZENDEJAS BUITRON

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio del efecto de inmunización intragástrica con
micobacterias atípicas sobre la respuesta inmune hacia
Mycobacterium tuberculosis en ratones NIH y BALB/c.
que presenta la pasante: Patricia Sonia López Murgula
con número de cuenta: 7913116-4 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Junio de 1994

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Corderjas Ramírez</u>
VOCAL	<u>Dr. Marco A. Vega López</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Víctor M. Zendejas Buitrón</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. M^{te}. Esther Revuelta Miranda</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Antonio Sánchez Ortega</u>

[Firmas manuscritas]

Doy Gracias a Dios por haber iluminado mi vida;
renovaste mi espíritu, perdona mis faltas y me
alienta cada instante con tu amor, gracias por
estar siempre conmigo y dame la oportunidad de
ser una profesionista. Bendito Seas Siempre.

El presente trabajo lo dedico a:

A ti Mamá que te debo tanto y que no sabría
como recompensar todo el apoyo que hasta
este momento me has brindado. Gracias por
crear de nuevo en mí. Que Dios te bendiga
por toda la eternidad. Gracias Mil.

A ti pequeña Ameyalli: sin ti creó que nunca
hubiera logrado esta meta, Gracias por existir
hija, por dame una nueva ilusión cada que veo
tus ojos, que escucho tu voz. Gracias por tu
presencia. Te Amo.

A mis hermanos por su ayuda : Adolfo,
Susana, Juan Carlos, Alberto ,Cecilia

Y en especial a : Pancho, Pepe y Cuauhtanoc
por querer tanto a mi hija. Gracias por su
Amor y ayuda.

A la Dra. Iris Estrada García . Gracias por
dame la oportunidad de realizar este trabajo,
por su apoyo y confianza.

A todos mis tíos y primos que de
alguna forma u otra siempre me han
brindado su cariño y apoyo.
En especial a mi tía Virginia M.

A todos mis " Amigos " y en especial a :

Dr. Alejandro Monge y Guadalupe Cú por su
ayuda incondicional y cariño.

A Rebeca y Miguel porque siempre
están cerca de mí.

Ana Carbajal y Azucena Diaz por todas esas
palabras y actos de aliento para conmigo.

A Raquel Silveira por su amistad.

A la Maestra Paty Zuñiga por creer en mí
y alentarme día a día.

A Victor M. Zendejas gracias por
brindarme tú amistad y ayuda.

INDICE GENERAL

CONTENIDO

INDICE DE DIAGRAMAS Y FIGURAS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	iii
1.- INTRODUCCION	1
Respuesta Inmune	1
Características de la Mucosa Intestinal y Presentación de Antígenos	5
Características de la IgA	9
Antígenos e inmunogenicidad	12
Codiciones que Favorecen la Inducción de Tolerancia	14
Mecanismos Responsables de la Tolerancia Inmunológica	18
Tolerancia Oral	20
Planteamiento del Problema	23
Hipótesis de Trabajo	24
2.- OBJETIVOS	24
3.- MATERIAL Y METODOS	25
4.- RESULTADOS	44
5.- DISCUSION	54
6.- CONCLUSIONES	57
APENDICE I	58
APENDICE II	59
APENDICE III	60
APENDICE IV	61
APENDICE V	62
APENDICE VI	63
APENDICE VII	64
APENDICE VIII	65
7.- BIBLIOGRAFIA	66

INDICE DE DIAGRAMAS Y FIGURAS

Figura 1, Cooperación Celular

Figura 2, Presentación de antígenos en mucosa intestinal

Figura 3, Estructura de IgA monomérica

Figura 4, Modelo de la IgA presente en secreciones

Figura 5, Haptenos y proteína acarreadora

Figura 6, Molécula de antígenos con diferentes epitopos

Figura 7, Zona-Alta y Zona-Baja de Tolerancia

Diagrama 1, Diagrama de flujo 1

Diagrama 2, Diagrama de flujo 2

Diagrama 3, Protocolo de inmunización 1

Diagrama 4, Protocolo de inmunización 2

Diagrama 5, Protocolo de inmunización 3

Diagrama 6, Protocolo de inmunización 4

Diagrama 7, Protocolo de inmunización 5

Diagrama 8, Protocolo de inmunización 6

Diagrama 9, Protocolo de inmunización 7

Figura 8, Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Figura 9, Inmunoelctrotransferencia, sistema semi-seco

Figura 10, I.E.T. de *M.tbc* dilución óptima

Figura 11, I.E.T. de *M.tbc* Cinética de respuesta

Figura 12 I.E.T. de *M.tbc* preinmunizados con *M.phlei*, respuesta 14d con *M.tbc*

Figura 13 I.E.T. de *M.tbc* preinmunizados con *M.phlei* respuesta 21d con *M.tbc*

Figura 14 I.E.T. de *M.tbc* preinmunizados con *M.phlei* respuesta 28d con *M.tbc*

Figura 15 I.E.T. de *M.tbc* preinmunizados con *M.vaccae* 1500 μ g cinética de respuesta 7d, 14, 21d, 28d, con *M.tbc*

Figura 16 I.E.T. de *M.tbc* preinmunizado con *M.vaccae* 2500 μ g cinética de respuesta 7d, 14d, 21d, 28d, con *M.tbc*.

ABREVIATURAS

Anticuerpo.....	Ac
Antígeno.....	Ag
Albumina Sérica Bovina.....	BSA
Dinitroclorobenceno.....	DNB
Solución de Ditiotreitól.....	DTT
Inmunoeléctrotransferencia.....	I.E.T
Adyuvante incompleto de Freund.....	IFA
Intragástrica.....	i.g.
Intraperitoneal.....	i.p.
<i>Mycobacterium</i>	M
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>M.phlei</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M.tbc</i>
<i>Mycobacterium vaccae</i>	<i>M.vaccae</i>
Extracto Soluble de <i>M.phlei</i>	MPSE
Extracto Soluble de <i>M.tbc</i>	MTSE
Extracto soluble de <i>M.vaccae</i>	MVSE
SDS-Poliacrilamida.....	PAGE
Electroforesis de Proteínas.....	PAGE-SDS
Medio de Youmans modificado por Proskaver y Beck.....	PBY
Regulador para el gel de resolución.....	RB
Regulador para el gel concentrador.....	SB
Dodecil sulfato de sodio.....	SDS
Solución Salina Estéril.....	S.S
Regulador de fosfatos y salina.....	TBS
Regulador de fosfatos y salina con Tween.....	TTBS

RESUMEN

Debido a la existencia de una gran variedad de micobacterias atípicas en el medio ambiente, es de esperarse que el contacto con éstas tenga algún efecto sobre la respuesta inmune hacia las micobacterias patógenas. La importancia del contacto inmunológico con las micobacterias del medio ambiente, es la inducción de tolerancia. Algunos autores han discutido acerca del posible efecto tolerogénico que pueda tener éste contacto.

Es de todos conocido que la vía ideal para inducir tolerancia es la oral. Entonces no es difícil suponer que el sistema inmune de individuos que se alimentan de material contaminado con micobacterias atípicas, pueda generar tolerancia hacia algunos antígenos micobacterianos de reacción cruzada.

En el presente trabajo, se utilizó como modelo experimental al ratón porque se ha observado que da respuesta de anticuerpos semejantes a las del ser humano y la obtención del reconocimiento del patrón de respuesta inmune humoral, en los sueros de ratones previamente inmunizados con micobacterias, se realizó mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (I.E.T).

Los diferentes grupos de ratones fueron inmunizados 1) i.p con *M.tbc*; 2) i.g con 500 μ g de *M.phlei* y posteriormente i.p con *M.tbc*, 3) i.g con 1 500 μ g y 2 500 μ g de *M.vaccae* y posteriormente con *M.tbc*, con el fin de evaluar si las micobacterias atípicas inducían un efecto tolerogénico y si el efecto producido también era dosis-dependiente.

En los resultados obtenidos se observó que los ratones respondieron adecuadamente al desafío con *M.tbc*, y se evaluó si la inmunización i.g con micobacterias atípicas modificaba ésta respuesta. Concluyendo que las micobacterias atípicas modifican el reconocimiento de anticuerpos hacia *M.tbc*, induciendo una tolerancia transitoria para el caso de *M.phlei* y una tolerancia total de zona-alta para *M.vaccae* estando en función de la dosis del antígeno administrado.

INTRODUCCION

RESPUESTA INMUNE

El término inmunidad engloba al conjunto de reacciones, y de factores humorales y celulares producidos por el organismo, dirigido a la eliminación de sustancias inmunogénicas, sea en forma específica o no, quedando de esta forma protegido contra las agresiones infecciosas, parasitarias y contra las proliferaciones malignas. El común denominador de las principales reacciones inmunológicas es la especificidad que poseen para las sustancias extrañas que las han inducido, los antígenos.⁽⁴⁾

En la actualidad se sabe que en el organismos se pueden presentar una gran diversidad de reacciones inmunológicas, a los cuales se atribuyen los múltiples tipos de células capaces de responder al desafío antigénico, con intervención de anticuerpos, mediadores de diversas funciones y de varias categorías de células dotadas de propiedades citotóxicas.^(4,5,10)

Los mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria se han dividido en dos grandes grupos: El primero comprende la síntesis de anticuerpos o inmunoglobulinas y se le conoce como respuesta humoral. El segundo incluye la producción de citotoxinas así como células efectoras y se le conoce como respuesta celular.⁽¹⁾

El sistema inmune es activado basalmente por todas las estructuras moleculares tanto internas como externas, produciendo una respuesta humoral y/o celular de afinidades muy variadas que son la base del equilibrio dinámico del sistema, y que en un momento dado le permite hacer frente a las agresiones por parte de ellas.⁽¹⁷⁾

A estas estructuras moleculares se le conoce genéricamente antígenos y a los productos de la respuesta inmune humoral anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con los antígenos que los indujeron, para que éstos sean eliminados. La característica principal de los anticuerpos es su selectividad es decir, la capacidad de combinarse con mayor fuerza a ciertas estructuras, con menor a estructuras relacionadas y pobremente a estructuras

diferentes. Los anticuerpos distinguen, entonces estructuras antigénicas diferentes, los que se denomina especificidad.⁽¹⁷⁾

Los anticuerpos son secretados bajo un estímulo específico y sólo se unen al antígeno que indujo su producción. Otras de las características de las inmunoglobulinas es que se producen en grandes cantidades, se distribuyen a todo el organismo a través de la sangre y por lo general son fácilmente detectables. Las funciones biológicas de éstas moléculas son la neutralización de virus y toxinas; la opsonización para facilitar la fagocitosis y, la activación del sistema completo entre las más importantes.^(1,17)

Las inmunoglobulinas están compuestas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas; las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos (κ o λ), las pesadas pueden representar (γ , α , ϵ , δ , μ). Los isotipos más abundantes son las inmunoglobulinas A (IgA), la inmonoglobulina G (IgG) y la inmonoglobulina M (IgM). Con respecto a la IgA, se encuentra como el isotipo predominante en secreciones externas.

Los anticuerpos son sintetizados por células plasmáticas, los cuales constituyen la etapa final de diferenciación de los linfocitos B, estos últimos son los responsables de la respuesta inmunitaria humoral y se caracteriza por presentar inmonoglobulina de superficie (sIg). El receptor específico de linfocito B es la sIg que se sintetiza intrínsecamente, la cual al perder una porción transmembranal puede ser excretada al medio.^(1,17)

La inmunología celular se ha concretado en el estudio de los componentes celulares del sistema inmunocompetente y las complejas interacciones celulares que, además de ser muy diversas, juegan un papel esencial en la regulación de la respuesta inmune. Los componentes celulares principales del aparato inmunológico son los macrófagos, linfocitos, mastocitos, eosinófilos, etc.⁽¹⁰⁾

Los macrófagos, aunque son considerados células no específicas con respecto al reconocimiento del antígeno, llevan a cabo un gran número de funciones dentro de las

cuales estacan las siguientes: 1) La concentración, procesamiento y presentación de los antígenos a los linfocitos; 2) La producción y secreción de mediadores biológicamente activos que regulan la actividad de los linfocitos, ya sea induciendo o bien suprimiendo la división celular y la diferenciación de éstas células; 3) la fagocitosis, que es la capacidad de ingesta de agregados moleculares (complejo antígeno-anticuerpo) la cual generalmente procede al procesamiento de los antígenos; 4) los macrófagos que han sido activados o estimulados, poseen la capacidad de destruir células tumorales ⁽¹⁰⁾; utilizando mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (oxidativos y no oxidativos).

Los linfocitos, según su función, sitio de diferenciación y moléculas que expresan en su superficie, han sido clasificados en linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos B son los precursores de las células plasmáticas, encargadas de la producción de anticuerpos, y al parecer se diferencian de los órganos linfáticos asociados al tubo gastrointestinal ⁽³⁵⁾ o en la médula ósea ⁽⁴⁾. Los linfocitos T pasan parte de su proceso de diferenciación en el timo. De aquí se derivan dos poblaciones de timocitos: una compuesta por células pequeñas, inmaduras y que constituyen del 85-90% de la totalidad de las células linfoides del timo; la segunda población constituye un 10% de la población total, está compuesta por células un poco más grandes, situadas en la médula del timo. Estas células ya han terminado su proceso de maduración, y son las que constantemente salen del timo para ir a poblar los órganos linfoides periféricos.^(4,5,10,11)

Existen varias clases de linfocitos T, cada una de las cuales realiza una función determinada, ya sea reguladora o efectora. Dentro de los linfocitos T reguladores se encuentran los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) de los cuales hay dos tipos los TH1 y los TH2, y entre los efectores los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$). Los linfocitos T efectores son los responsables de la inmunidad mediada por células, la destrucción e células tumorales, rechazo a los injertos y la eliminación de algunas células infectadas por virus.^(4,5,10,11)

La respuesta inmune se inicia con la captación del antígeno por una célula accesoria y su presentación al linfocito $CD4^+$ en unión de un antígeno de histocompatibilidad de clase

II. La célula presentadora del antígeno al entrar en contacto con el linfocito CD4⁺ en el momento de realizar esta función libera un factor llamado interleucina (IL-1) necesario también para la activación del linfocito. En la figura 1 se describe brevemente lo que se conoce como cooperación celular.^(4,5,10,11)

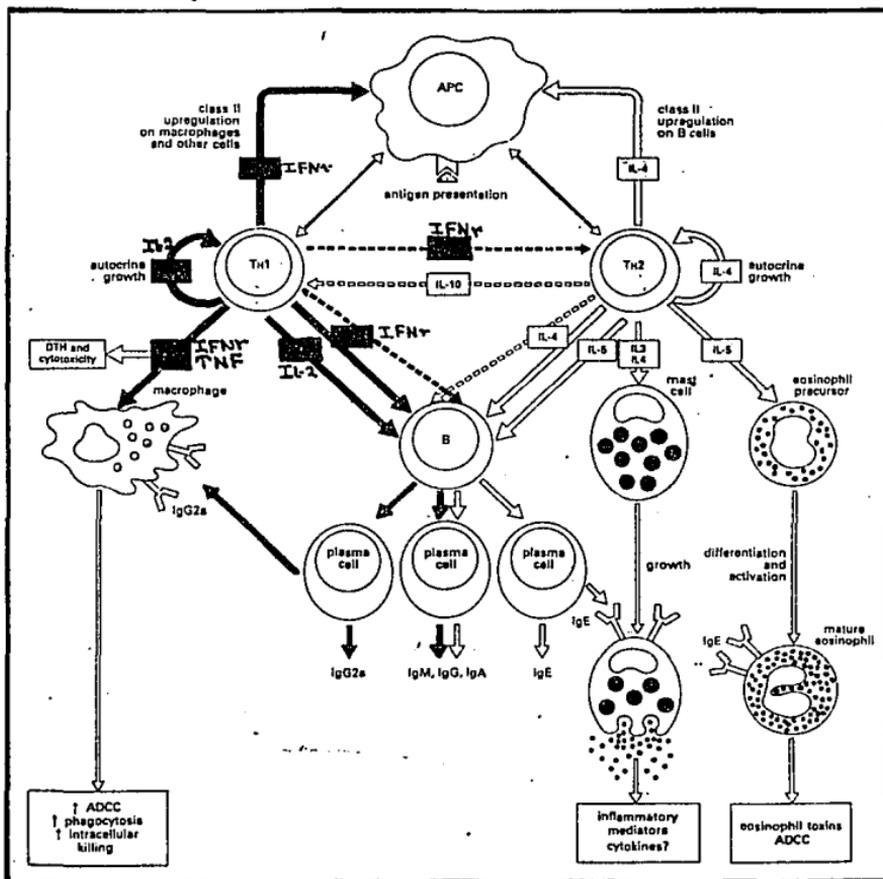


FIGURA 1. Cooperación Celular.

CARACTERÍSTICAS DE LA MUCOSA INTESTINAL Y PRESENTACIÓN DE ANTIGENOS

Las mucosas están en contacto constante con un gran número de posibles antígenos. En estas superficies se asienta la flora normal y en ocasiones son las vías de ingreso para los agentes patógenos. Cuando ingerimos alimentos o respiramos, exponemos a las mucosas a un continuo contacto con una gran variedad de antígenos, que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria si se administra en otra forma. El sistema inmunitario asociado a mucosas tiene la capacidad de discernir el tipo de respuesta inmune más adecuado para la sobrevivencia del organismo; las cuales pueden ser respuestas locales o generales contra los agentes patógenos y la tolerancia para los antígenos de la dieta.^(6,7,8,9,16)

En 1829, Dakin describe la costumbre de los indios norteamericanos de comer hojas de hiedra venenosa para prevenir la dermatitis al entrar en contacto con esta planta, induce una tolerancia general por medio de la administración del antígeno por vía oral. Chase en 1946 indujo tolerancia mediante la administración de un agente sensibilizante por vía oral; al suministrar cloruro de picilo en la dieta de cobayos, y estos no eran capaces de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad retardada cuando eran expuestos a este reactivo en piel.^(13,37)

La mayoría de los estudios del sistema digestivo, especulan que todas las moléculas que se ingieren son degradadas hasta formas no inmunogénicas. Pero pequeñas porciones del total de los antígenos administrados por vía oral penetran a la circulación general. La absorción de pequeñas cantidades de antígeno permite que se alcancen concentraciones séricas que inducen una tolerancia general en animales maduros. En cambio, la gran cantidad de antígenos en animales inmaduros puede ser suficiente para inducir respuestas inmunitarias generales.^(1,37)

Por otro lado, las proteínas solubles inducen tolerancia general al administrarse por vía oral. En algunos casos si se dan dosis masivas o formas agregadas es posible lograr

respuestas locales aunque no sistémicas.^(1,37)

Entre las células presentadoras de antígeno encontramos a los macrófagos, células dendríticas, células veladas, células del epitelio asociado al folículo, y probablemente a las células B y las células epiteliales de todas las mucosas.

En el ratón se identifica a los macrófagos en la región apical de las vellosidades intestinales y en las zonas cercanas a los vasos de la lámina propia, mientras que en la rata se localizan en la lámina propia y en la zona interfolicular de las placas de Peyer. En los dos casos estas células son susceptibles a las tinciones características de los macrófagos, presentan los marcadores de las células fagocíticas y los antígenos Ia (antígenos de histocompatibilidad de clase II).

Las células veladas, llamadas así por sus proyecciones citoplasmáticas en forma de velo, se encuentran en las placas de Peyer de rata, cobayo y cerdo. estas células expresan el antígeno Ia y tienen actividad ATPasa y estearasa no específica de este tipo celular.⁽¹⁾

En las regiones interfoliculares y foliculares del tejido linfoide asociado a mucosa es posible identificar células dendríticas interdigitales similares a las encontradas en ganglios periféricos y bazo. Una de las particularidades del tejido linfoide asociado al folículo es el epitelio; a diferencia del resto de la superficie de la mucosa en esta región no se produce moco (no hay células calciformes), ni IgA (tampoco existen células plasmáticas), ni componente secretor. El tipo celular distintivo de este epitelio es la célula M. Las células M poseen un sistema túbulo vesicular que permite el transporte de los antígenos presentes en la luz, hacia las zonas infrayacentes.⁽¹⁾

Las células B expresan antígenos Ia en su superficie y tienen una capacidad de procesamiento limitada. Pruebas *in vitro* han demostrado que las células B son capaces de presentar antígenos a clones de linfocitos T, aunque en estos experimentos no se han usado células B provenientes del sistema inmunitario asociado a mucosa.⁽¹⁾

Las células epiteliales de la mucosa intestinal de rata son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T periféricos *in vitro*. El sistema emplea la incubación de las células epiteliales con los linfocitos T en presencia del antígeno y posteriormente la separación de las células epiteliales de los linfocitos T, al realizar esto, los linfocitos T no proliferan. Esta presentación de antígenos se impide si se añade al sistema anticuerpos contra antígenos Ia (evita la presentación del antígeno), cloroquina o cloruro de amonio (inhibidores del procesamiento de antígenos). Los linfocitos que proliferan en este sistema funcionan como células supresoras para la proliferación de cultivos de linfocitos periféricos para un antígeno homólogo. Estas células con actividad supresora presentan el marcador CD8. ^(1,4,7,8,9,10)

Los mecanismos de paso y presentación de antígenos en las mucosas, Figura 2, son los siguientes:

a) Paso directo de una pequeña parte de los antígenos ingeridos sin que sean degradados, alcanzan niveles tolerogénicos que permiten la inducción a las células con capacidad supresora.

b) Los antígenos o sus fragmentos son capturados por las células epiteliales de las mucosas, procesados y presentados en forma tal que inducen a las células con actividad supresora.

c) Los antígenos con propiedades de lectina-adhesina se unen a los carbohidratos de las células blanco específicas, que los presentan o transportan hacia las células transportadoras, lo que da como resultado la inducción de respuestas humorales locales y generales.

d) Los macrófagos en las superficies mucosas captan a los antígenos particulares y los transportan hacia el interior, para luego presentarlos.

e) El epitelio, asociado a la estructura de captación de antígenos en la mucosa, toma los antígenos presentes en las superficies mucosas para transportarlo al interior, donde son presentados por células accesorias a los linfocitos locales. ⁽¹⁾

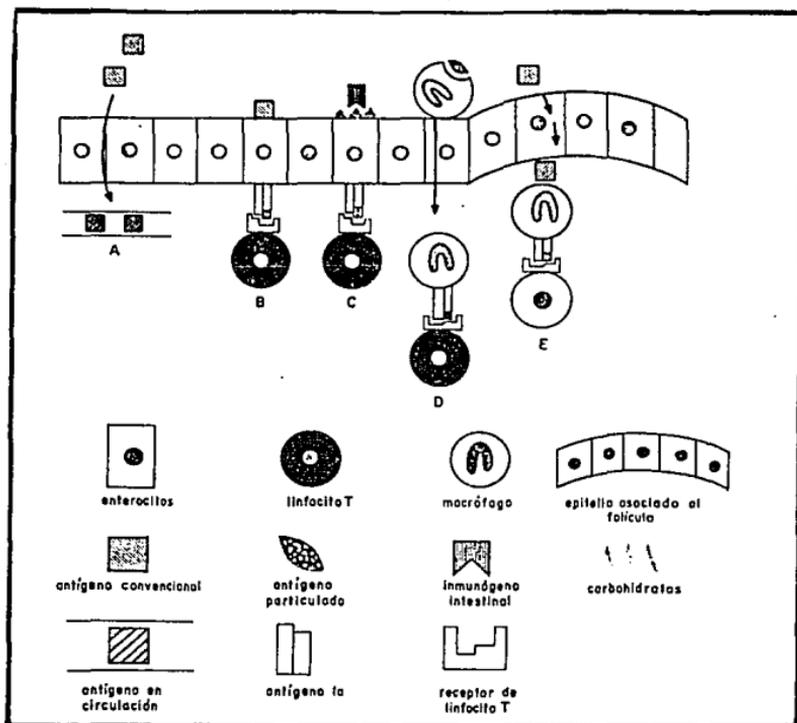


FIGURA 2. Presentación de antígenos en mucosa intestinal.

CARACTERÍSTICAS DE LA "IgA"

Las células plasmáticas que secretan IgA sérica, la producen en forma monomérica; en cambio las células del tejido linfoide asociado a mucosa, generan principalmente IgA dimerica. El ensamble de dos monómeros de IgA ocurre dentro de una célula plasmática, por interacción de grupos sulfhidrilo de las regiones Fc con los correspondientes de la cadena J. La unión es catalizada por la enzima de intercambio de enlaces disulfuro.^(1,2,7,8,35)

La IgA, está constituida por dos subclases que son IgA₁ y IgA₂. En las moléculas IgA₂ se han hallado dos marcadores genéticos denominados alotipos Am 2 (+) y Am 2 (-). Además, se ha detectado un tercer marcador que recibe el nombre de isoalotipo nA 2m que se encuentra en todas las IgA₁ y en las IgA₂ subtipo Am 2 (+).⁽¹⁾

IgA 1.- De las subclases IgA, la IgA₁ es la molécula predominante en suero y mucosas, ya que en el suero un 80% de IgA tiene cadenas $\alpha 1$ y en secreciones constituye el 60%. La principal diferencia de IgA₁ comparada con la IgA₂ es a nivel de bisagra; en la IgA₁ hay una duplicación de 8 residuos de aminoácidos con una secuencia en prolina, serina y treonina. Las proteínas IgA₁, generalmente son resistentes a la acción de enzima como papaína y quimi tripsina. Cuando forman dímeros y se unen al componente secretor SC (siglas en inglés) son aún más resistentes a las proteasas. Sin embargo, algunas cepas bacterianas que provocan la meningitis (*H. influenzae* tipo B), neumonía (*S. pneumoniae*), infecciones venéreas (*N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis*) y algunas bacterias que intervienen en la formación inicial de la placa dental, producen proteasas extracelulares que fraccionan a las moléculas IgA₁ en su región de bisagra. Lo anterior se traduce en una mayor facilidad de éstas bacterias para colonizar las mucosas.^(2,7,8)

IgA2.- A diferencia de la IgA₁, la IgA₂ carece de 12-13 residuos de aminoácidos en la región de bisagra, al parecer esto le confiere resistencia a las enzimas bacterianas que degradan a la IgA₁. Sin embargo, existen bacterias que excretan proteasas para la IgA₂ como las que producen periodontitis (*B. gingivalls*) y colitis ulcerosa (*Clostridium spp*) a

excepción de ésta última bacteria que no digiere el alotipo Am 2 (-),^(1,2) Figura 3.

IgA polimérica. La IgA polimérica es el anticuerpo más predominante en secreciones externas, Figura 4; aproximadamente constituye el 90% de las inmunoglobulinas de superficie de mucosa. Principalmente se generan dímeros con un coeficiente de sedimentación 11s, pero también se han detectado pequeñas cantidades de trímeros, tetrámeros y pentámeros. Una de las propiedades de la IgA polimérica es la de poder asociarse con la cadena o proteína J (unida por enlace covalente); ésta asociación es esencial para llevarse a cabo la unión con el SC. Otra característica es la actividad de precipitación y aglutinación aumentada con respecto al monómero.^(1,2)

La cadena J es sintetizada por las mismas células plasmáticas que producen la IgA e IgM poliméricas. También se ha detectado en células productoras de IgD e IgG, pero como propuso Mestecky y colaboradores ⁽²⁵⁾, que quizá la síntesis temprana provoca una retroalimentación negativa, que reprime la síntesis posterior. Normalmente, la cadena J se ha encontrado sólo en la IgA e IgM en su forma polimérica en relación de una molécula J por polímero.^(1,25)

El componente secreto es sintetizado por las células epiteliales y se localiza en la membrana de la cara interna, posteriormente es endocitado y viaja a través de la célula dentro de vesículas para ser secretado hacia la cara externa. El transporte se SC no requiere de la unión con la IgA dimérica, mientras que ésta última depende del enlace para ser endocitada, transportada y liberada en la superficie mucosa.^(1,25)

Jackson y colaboradores ⁽¹⁾, han sugerido el acceso de otras inmunoglobulinas hacia la luz del intestino, algunas de las cuales no dependen del sistema SC. Los autores hallaron que ratas inoculadas con un antígeno en placas de Peyer, excretan en bilis IgM e IgG. En el caso de la IgG se desconoce la vía de acceso. Es posible que la IgA de éstas células plasmáticas, que han sido estimuladas inicialmente en respuesta a antígenos presentes en intestino, llegue al duodeno por vía biliar para reforzar la inmunidad intestinal.^(1,25)

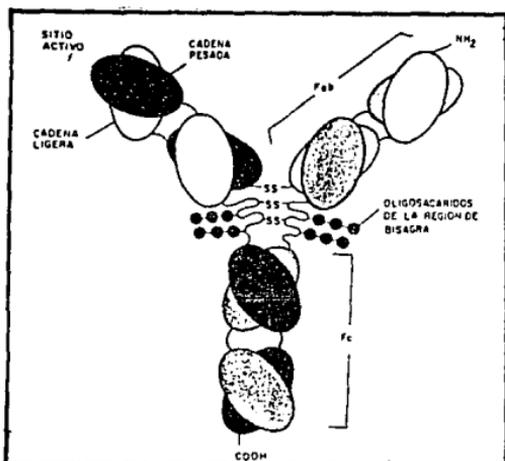


FIGURA 3. Estructura de la IgA monomérica y su región de bisagra. La molécula que se representa es la A₂m (1) la cual característicamente presenta un enlace disulfuro intercadenas ligeras.

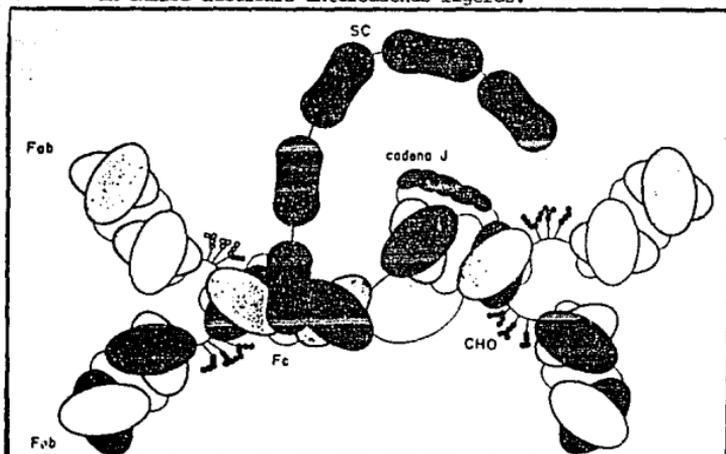


FIGURA 4. Modelo de la IgA presente en secreciones. Se presentan dos monómeros de IgA 1 unidos entre sí, por enlaces intercatenarios constituidos por puentes de disulfuro. Asimismo, la cadena J y el SC se muestran unidos individualmente a dos cadenas de un mismo monómero.

ANTIGENOS E IMUNOGENICIDAD

Se denomina antígeno (Ag) a toda sustancia capaz de inducir una respuesta inmune específica e interactuar específicamente con los productores de ésta respuesta, anticuerpos (Ac) o linfocitos sensibilizados. Fisicoquímicamente pueden ser particulados (estar formando parte de una partícula mayor como células, bacterias, virus, etc; bien estructuralmente o adsorbidos a ellas) ó solubles.⁽¹⁷⁾

Los antígenos se clasifican como xenoantígenos (pertenecientes a antígenos diferentes), a lo antígenos (a individuos de la misma especie) y autoantígenos (sustancias del propio individuo que en ciertas condiciones son capaces de inducir una respuesta inmune autoreactiva). De acuerdo a su estructura bioquímica la mayoría son proteínas de peso molecular elevado; las variaciones en el grado de antigenicidad de unas proteínas a otras, depende en gran manera de su composición de aminoácidos. Las proteínas con una mayor proporción de residuos aromáticos (Ej. tirosina) son mejores antígenos que aquellos compuestos fundamentalmente por aminoácidos no aromáticos. Comparado con las proteínas, cualquier otra sustancia es menos antigénica; ya que sólo ellas son capaces de iniciar una respuesta celular T de forma significativa.^(17,29,36)

Se denominan haptenos o antígenos incompletos a sustancias químicas de bajo peso molecular (PM 4 000 daltons) que por sí solas no son capaces de inducir una respuesta inmune, pero sí e interactuar con los anticuerpos específicos. Estos haptenos inducen una respuesta inmune cuando están unidos a una proteína a la que se le denomina acarreadora que convierte el hapteno en un antígeno completo, Figura 5. A la capacidad de inducir una respuesta inmune se denomina inmunogenicidad. El hapteno no es inmunógeno, sólo lo será unido al acarreador. Cada antígeno posee diferentes zonas de unión a los anticuerpos, también son llamados determinantes antigénicos o epitopos, Figura 6.^(17,29,36)

El tamaño de un determinante antigénico se corresponde estrechamente con el sitio de unión en el anticuerpo. En una proteína comprende entre seis a siete aminoácidos; en los

polisacáridos seis azúcares y en los ácidos nucleicos de cuatro a seis nucleótidos, aunque todos los residuos participan en definir la especificidad de una determinante antigénico, existen algunos que desempeñan un papel primordial en el establecimiento de ella. A esta pequeña porción se denomina inmunodominante. El número de epitopos de una molécula varía con el tamaño y complejidad bioquímica de la misma. En general, cuanto más compleja es una molécula mejor funciona como antígeno. La superficie de una proteína es una sucesión continua de determinantes antigénicos potenciales y la selección de uno u otro depende del hospedero. También depende de una serie de factores del hospedero, tales como la propiedad de tolerancia a lo propio, los genes de la respuesta inmune y la red idiotype-antiidiotipo.^(17,29)

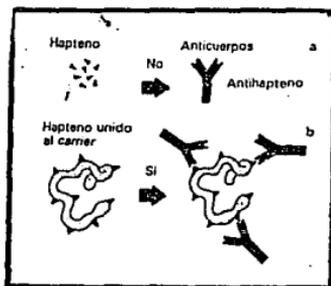


FIGURA 5. Haptenos y proteína acarreadora.

a) El hapteno no es capaz de inducir una respuesta de Ac frente a él. b) El hapteno unido al acarreador provoca la aparición de anticuerpos específicos.

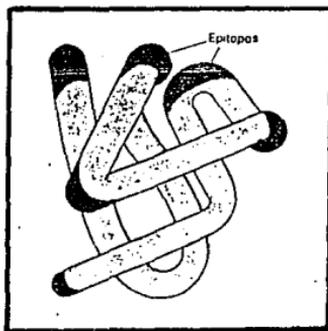


FIGURA 6. Molécula de antígeno con diferentes epitopos.

CONDICIONES QUE FAVORECEN LA INDUCCIÓN DE LA TOLERANCIA

a) Propiedades fisicoquímicas del antígeno.

Una característica importante de un antígeno para que pueda inducir una respuesta o no, es el tamaño de la molécula. El efecto del tamaño es particularmente notable con antígenos que se encuentran en formas poliméricas, monoméricas y con antígenos en forma de agregados. Como ejemplo tenemos a la flagelina, una proteína proveniente de *Salmonella adelaide*. La flagelina en su forma polimérica (POL), con un peso molecular de 10^7 daltons, es un potente inmunógeno, induce una respuesta T independiente exclusivamente, el monómero de la flagelina MON, con un peso molecular de 40 000, induce una respuesta cuando es administrada a bajas dosis y una no respuesta cuando se administra a altas dosis. El fragmento A del MON obtenido por la acción del bromuro de cianógeno, tiene un peso molecular de 18 000 daltons y se comporta a altas dosis como un tolerógeno. La diferencia de respuesta contra estos tres tipos de antígenos, no es como se presenta al hospedero, radica en el tamaño de la molécula exclusivamente.^(20,21)

Diversas proteínas que se encuentran en el suero (Ej. albúmina) forman agregados espontáneamente cuando se encuentran en solución acuosa, ésta agregación se puede aumentar mediante calentamiento. Los agregados proteínicos pueden separarse por ultracentrifugación, obteniéndose dos formas de proteínas: agregadas y no agregadas. Estas dos formas tienen diferente efecto en el sistema inmune; los agregados proteínicos son altamente inmunogénicos, mientras que los no agregados promueven la inducción a la tolerancia. La diferencia en la respuesta de estas dos formas de proteínas está dada por el sistema reticuloendotelial del hospedero: Los agregados proteínicos son llevados a circulación rápidamente, son captados, procesados por los macrófagos y posteriormente presentados a los linfocitos en una forma inmunogénica. Las proteínas no agregadas permanecen más tiempo en circulación y solamente son procesadas por los macrófagos.^(20,21)

b) Naturaleza química del antígeno.

Ciertos compuestos son fuertes tolerógenos por naturaleza, como ejemplo tenemos a la D-amino polimerasa ácida; la cual induce tolerancia en una amplio rango de dosis, en contraste con la L-amino polimerasa ácida que se comporta como inmunógeno a las mismas dosis. En ratones inmunizados con DNP conjugado a un polímero ácido D-glutámico y D-lisina (DNP-D-GL) no produce anticuerpos contra el DNP, posterior a la inmunización con el conjugado DNP. A menudo una pequeña modificación en la molécula puede convertir un inmunógeno en un tolerógeno. Por ejemplo la acetil colina de MON puede convertirlo en tolerogénico, aún en dosis que normalmente inducen inmunidad.^(20,21,24)

c) Densidad del Epitopo

La variación en el número de determinantes antigénicos en una molécula es regulada por los linfocitos. Por ejemplo, cuando el DNP-POL es adicionado a un cultivo de células de bazo normales, la respuesta de los linfocitos depende del número de grupos presentes de DNP por molécula de flagelina. Con una densidad 0.7 grupos de DNP por molécula de flagelina, se observó una respuesta anti-DNP excelente a esta concentración de antígeno; a una densidad de 2.7 grupos de DNP por molécula de flagelina, se observó por una parte una buena respuesta de anticuerpos con concentraciones intermedias y una no respuesta a concentraciones altas; y finalmente, a una densidad de 3.8 grupos de DNP por molécula de flagelina, todas las concentraciones del antígeno inducen tolerancia.^(20,21,29)

d) Dosis del antígeno

Cuando se prueban diferentes rangos de concentraciones del antígeno, se observó que a bajas dosis a menudo se induce tolerancia, a dosis intermedias se induce inmunidad, y a altas dosis se induce tolerancia, Figura 7. Por consiguiente existen para este caso dos formas de inducir tolerancia, en bajas-dosis y en altas-dosis.^(20,21,29)

Felton en 1949 ⁽¹³⁾, observó que a dosis altas de antígeno un animal no responde al posterior desafío con el mismo antígeno. Inoculó un grupo de animales con 100 μ g y otro

grupo con 10 μg con un polisacárido de un neumococo tipo III (SIII), desafiando ambos grupos con una bacteria virulenta de neumococos. El segundo grupo fue protegido contra la enfermedad, Felton especula que en el primer grupo, la dosis alta del antígeno de alguna manera paraliza al sistema inmune. Desde entonces a éste fenómeno se le conoce como parálisis inmunológica. Para una precisa interpretación de éste fenómeno, realizó experimentos complementarios, en que los animales eran tratados con altas dosis de SIII y que en realidad únicamente producen una no respuesta superficial; ya que estos producen anticuerpos que se combinan inmediatamente con un polisacárido no degradable que persiste en el medio y son neutralizados los anticuerpos; como el grupo de animales que se inocularon con bajas dosis del antígeno (SIII). La parálisis inmunológica usualmente no es considerada como una genuina tolerancia, pero sí una pseudotolerancia. Sin embargo, Felton incrementa la dosis a 250 μg y descubre que realmente existe una tolerancia a altas dosis del antígeno.^(20,21)

Mitchison descubre en 1964 ^(26,27) que la tolerancia puede ser inducida por dosis subinmunológicas del antígeno, Mitchison inoculó un grupo de ratones con albúmina sérica bovina (BSA) soluble, tres veces por semana durante un período de 16 semanas. Posteriormente desafió a los animales con dosis inmunogénicas de BSA y descubre que los animales tienen una menor cantidad de inmunoglobulinas anti-BSA que los animales controles. Repite el tratamiento con dosis bajas del antígeno durante un período prolongado, permaneciendo el estado de tolerancia a bajas dosis. En animales recién nacidos, la tolerancia a bajas dosis puede ser inducida por un sinnúmero de antígenos, mientras que en los animales adultos, solamente se conocen pocos antígenos. Sin embargo, la tolerancia a bajas dosis de varios antígenos puede ser inducida en animales adultos que han sido irradiados, timoctizados para eliminar sus células inmunocompetentes. En otras palabras un daño en el sistema linfóide facilita la inducción de tolerancia a dosis bajas; la tolerancia a bajas dosis se debe probablemente a las células T, aunque aparentemente las células T son más susceptibles a la tolerización a bajas dosis del antígeno, que las células B.^(20,21)

La inducción de tolerancia no siempre se encuentra, después de la inducción

gradualmente descende y si los animales viven mucho tiempo, ésta tolerancia se pierde con el tiempo. La duración de la tolerancia depende de varios factores, entre los más importantes se encuentra la presencia continua del tolerógeno. Aunque una sola dosis de proteínas de sueros en animales recién nacidos, puede hacerlos tolerantes por varios meses, y en el estado de tolerancia eventualmente termina espontáneamente. Para prolongar la duración de un estado tolerante, se debe desafiar continuamente al animal con la forma tolerogénica del antígeno. Sin embargo, la replicación de los antígenos, puede inducir tolerancia de por vida.^(20,21)

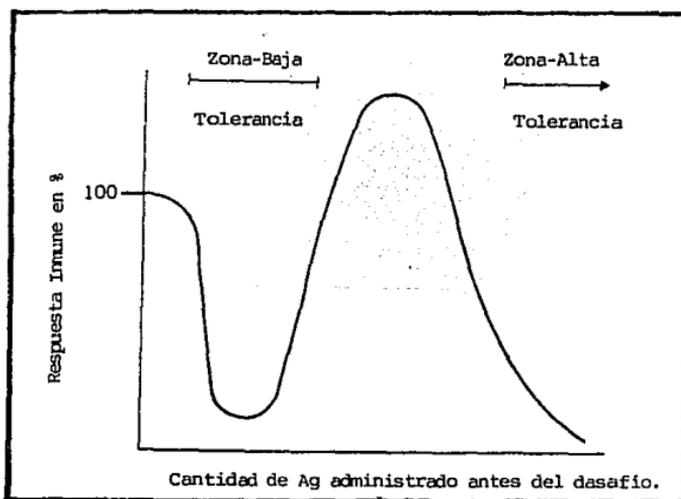


FIGURA 7. Zona Alta y Zona Baja de Tolerancia.

MECANISMOS RESPONSABLES DE LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Se ha establecido claramente que la interacción de antígenos con un sistema inmaduro facilita enormemente la inducción de la tolerancia. El sistema no tiene forma de diferenciar antígenos propios o extraños que por el momento de su entrada en contacto con ellos: Se hará tolerante para todo antígeno con el que interacciones en estadios muy tempranos, cuando todavía es muy inmaduro y con el que permanezca regularmente en contacto (los reconoce como propios), mientras que para el resto, con los que no entra en contacto o lo hará cuando ya esté más desarrollado y de forma intermitente no se hará tolerante (los reconoce como extraños).^(17,18,36)

La tolerancia inmunológica estaría mantenida por varios mecanismos, estando implicados unos u otros dependiendo del autoantígeno de que se trate, pero actuando en muchos casos varios superpuestos para ofrecer mayores garantías. En síntesis habría que hablar de:

a) **Anergía clonal.**- Este término en la actualidad tiende a sustituir a los más antiguos de **delección clonal** o **aborto clonal**. En efecto, se ha visto experimentalmente que esa desaparición de los clones autoinmunes (que es fácil de conseguir fundamentalmente en los linfocitos B inmaduros que solo tienen IgM en su superficie, cuando interaccionan con el antígeno) no supone la destrucción total y definitiva del clon. El clon persistiría, pero en un estado de tolerancia del que sería muy difícil su salida, y sin células que expresen receptores para el antígeno en su superficie.^(17,18)

b) **Tolerancia de linfocitos B y Linfocitos T.**- Jacques M. Chiller, y colaboradores ⁽¹⁴⁾, determinaron las propiedades tolerantes de las células B y T, inocularon ratones recién nacidos con un no agregado de HGG, haciéndolos tolerantes a este antígeno; transfirieron células de médula ósea (fuente de células B) y células del timo (fuente de células T) en recipientes irradiados letalmente, determinan cuales células son necesarias para la transferencia de tolerancia a los hospederos irradiados; al mismo tiempo evalúan el tiempo

de inducción de la tolerancia y la duración de ésta. Más tarde Weigle y colaboradores ⁽²⁶⁾ realizaron el mismo experimento para la inducción de tolerancia en células T y B maduras; pero utilizando linfocitos de bazo separando las células T y las células B. Concluyen que 1) las células del timo y las células del bazo se hacen tolerantes rápidamente (a las 24 H de inocular el antígeno) y el estado de tolerancia se mantiene por un período aproximado de cuatro meses; 2) Las células B del bazo adquieren un estado de tolerancia (a los 2-4 días de inoculados) pero la tolerancia es tres veces más corta que la de las células T; 3) Las células B obtenidas de médula ósea, adquieren un estado de tolerancia lento (a la semana de la inoculación); 4) y en las células B maduras, esta es de corta duración. Estos experimentos demuestran, que las células T y B son tolerantes independientemente una de otra.^(15,17,18)

Se ha podido comprobar que en la tolerancia de zona baja se hacen tolerantes tanto los linfocitos B como los T, mientras que en la tolerancia de zona alta es únicamente de los linfocitos T. En éste último caso persisten los linfocitos B capaces de interactuar y responder frente al antígeno, pero la respuesta no tiene lugar al faltar la cooperación de los linfocitos T. Esta situación se da con frecuencia en la tolerancia natural de humanos, pues son numerosos los ejemplos de auto-antígenos circulantes a bajas concentraciones para los que se encuentran los linfocitos B pero no los T capaces de interactuar con ellos y para los que se mantiene la tolerancia (Ej. tiroglobulina).^(20,21)

TOLERANCIA ORAL

La vía de administración de un antígeno probablemente desempeña el papel más importante en el tipo de respuesta que se presente, cuando se tratan animales recién nacidos y adultos. La vía de administración determina la accesibilidad del antígeno a los macrófagos; la cual como se mencionó anteriormente es uno de los factores más importantes entre la inducción de inmunidad o la tolerancia.^(20,21)

Un cambio en la vía de administración puede convertir un inmunógeno en tolerógeno. Por ejemplo, cuando los agregados proteicos del suero, que normalmente se comportan como inmunogénicos, se inoculan en la vena hepática, los agregados rápidamente entran al hígado, y estos son removidos por las células Kupffer y el resto del antígeno pasa en forma libre de agregados dentro de la circulación donde estos inducen tolerancia.^(20,21)

La entrada de microorganismos por la vía oral puede inducir supresión de la respuesta inmune sistémica, y algunos investigadores han demostrado que ésta puede ser inducida por antígenos micobacterianos como por otros microorganismos^(33,34). Es interesante en este contexto, que en el caso de los pacientes con lepra, estos "guarda" grandes cantidades de bacilos en el epitelio de la mucosa nasofaríngea, mismos que son tragados constantemente, y que podrían generar supresión en el paciente.^(33,34)

La literatura clínica de principios de siglo, contiene varios reportes acerca de los efectos benéficos de la ingestión de antígenos como una forma de terapia para las enfermedades que se presentaban como fenómenos de hipersensibilidad tipo IV o tardía. En 1829, Dakin reportó que la ingestión de hojas de Rhus, una práctica común entre los indios americanos, reducía la incidencia y severidad de las lesiones cutáneas subsecuentes al contacto con la ortiga⁽³⁷⁾. En los 50's parecía ser que el que la desensibilización oral era efectiva en un bajo porcentaje de individuos, en los que la desensibilización sistémica era ineficiente o se acompañaba de severas reacciones. El fenómeno de anergia o falta de respuesta que sigue a la alimentación de un antígeno definido, fue estudiado en primera instancia por Wells⁽³⁹⁾,

quien demostró que cobayos alimentados con ovoalbúmina, perdían la capacidad para desarrollar anafilaxia sistémica.

Estos experimentos fueron ampliados por Chase en 1946 ⁽¹¹⁾, demostrando inhibición del fenómeno de hipersensibilidad a dinitroclorobenceno (DNCB), en animales a los que previamente se les había administrado el DNCB por vía oral. La disminución de la respuesta inmune sistémica, subsecuente a la ingestión de antígeno ha sido reportada en varios modelos de animales. Más recientemente, Challacambe y Tomasi ⁽¹²⁾, demostraron que la administración intragástrica de antígenos solubles o particulados en ratones puede llevar a la inducción de anticuerpos en saliva de la clase IgA, pero también a una importante supresión sistémica.

Existen resultados experimentales que apoyan que el reconocimiento inmunológico con micobacteria saprofitas, ya sea que el reconocimiento resulte o no en infección, determina la respuesta del hospedero hacia retos posteriores con micobacterias. Inclusive, algunas relaciones simbióticas hospedero-bacteria, tienen la capacidad de modificar la exposición subsecuente a organismos patogénicos. Más recientemente, se ha hecho evidente que la infección sin enfermedad, debe de ser considerada importante. Esto parece aplicarse particularmente bien, a las micobacterias saprofitas, cuyo principal papel, al infectar a un animal, sería el de modificar la respuesta inmune, mas que el de inducir la enfermedad.⁽¹³⁾

El humano entra en contacto con estas especies saprofitas a través de diferentes fuentes, y diversas rutas: siendo el agua y los alimentos contaminados, la principal fuente ⁽¹⁴⁾. Hasta el momento existe poca evidencia del efecto que puede tener el contacto con estas micobacterias, sobre la respuesta inmune contra micobacterias patogénicas, y que será muy difícil, casi imposible, analizar el tipo y cantidad de exposición que un humano puede tener antes de la exposición a bacterias patogénicas.

Considerando lo interesante del tema y la importancia que este pueda tener, en el desarrollo de inmunoprolácticas, se realizó una serie de experimentos, para probar la

hipótesis de que el contacto con micobacterias saprofiticas modifica el reconocimiento de antígenos de micobacterias patógenas, utilizando para esto un modelo animal.

La ruta de infección en la tuberculosis queda clara: la vía respiratoria; sin embargo, para otras micobacterias, éste no es el caso, como en la lepra. Una ruta que muchos investigadores aceptan, es la respiratoria, pero es muy lógico que también pueda ser la gástrica.⁽³²⁾

Posiblemente la presencia de micobacterias saprofiticas en alto número en reservorios de agua potable, puede inducir éstos mecanismos supresores. En ciudades como Bombay, el agua potable puede contener hasta 10^5 micobacterias/ml, ya que las micobacterias son muy numerosas en el musgo *Sphagnum* (16), grandes cantidades de éstos pudieron haber sido consumidos por los habitantes del área de Bergen en Noruega, cuando el agua era extraída de éstas fuentes, explicando porqué la lepra fue común en Bergen hasta el final del siglo XIX.⁽³⁰⁾

En esta tesis se emplearon ratones para estudiar el efecto de la inoculación intragástrica (i.g.) con micobacterias saprofiticas sobre la respuesta inmune contra una micobacteria patógena: *Mycobacterium tuberculosis*. El ratón es un modelo adecuado para estos ensayos, ya que puede infectarse e inmunizarse con el bacilo dando respuestas de anticuerpos semejantes a las del humano.⁽²⁸⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe un aumento en el número de casos de infecciones por micobacterias en todo el mundo, lo anterior se ha asociado con un estado nutricional deficiente originado por males condiciones socioeconómicas, aunque también se ha postulado un mecanismo de tolerancia inducida por micobacterias atípicas. Sabiendo que la ruta de infección en la tuberculosis es la vía respiratoria, ruta que muchos investigadores aceptan por la transmisión que es a través de aerosoles (nariz-boca) y por su cercanía puede ser también la gástrica.

Es posible inducir el fenómeno de tolerancia Oral sistémica con micobacterias atípicas hacia la respuesta de *M. tuberculosis*. Debido al continuo contacto con micobacterias atípicas a través de diferentes fuentes, como el agua y alimentos contaminados, utilizando como modelo experimental al ratón porque se ha observado que da respuestas de anticuerpos semejantes a las del humano.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La inoculación por vía oral con micobacterias atípicas inducirá una tolerancia en el reconocimiento de anticuerpos hacia *M. tuberculosis*.

OBJETIVOS

1) Evaluar la respuesta inmune humoral, analizando el patrón de reconocimiento de sueros de ratones NIH y BALB/c inmunizados intraperitonealmente con extracto soluble de *Mycobacterium tuberculosis* (MTSE).

2) Analizar el patrón de reconocimiento de anticuerpos en sueros de ratones NIH y BALB/c inmunizados primero intragástricamente con micobacterias atípicas *M. phlei* y *M. vaccae*, y posteriormente intraperitonealmente con *M. tuberculosis*.

3) Comparar los patrones de reconocimiento de anticuerpos obtenidos en los puntos 1 y 2, para identificar si con la inmunización intragástrica se induce tolerancia en el reconocimiento de antígenos de *M. tuberculosis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL

A) De vidrio e instrumental

El empleado fue de uso común en el laboratorio de inmunología.

B) Aparatos

Microscopio

Estufa de CO₂

Autoclave

Balanza analítica (Sartorius)

Balanza electrónica (Sartorius LC 1200)

Balanza electrónica (Sartorius R 300 SRS)

Potenciómetro (Beckman)

Micropipetas (Gilson)

Centrífuga (Beckman)

Sonicador

Incubadora

Cámara de electroforesis (Hoefer SE 250)

Aparato de transferencia (Sartorius, Sartoblot II ES 17556)

Fuente de poder (Hoefer PS 500 XT)

C) Medios de Cultivo

Caldo nutritivo-tween 80 (0.5%). Ver apéndice I

Medio de Youmans modificado por Proskaver y Beck. Ver apéndice I

D) Cepas de Referencia

Mycobacterium tuberculosis H37Rv cepa 7416, donada por el Dr. M.J. Colston, Londres, Gran Bretaña.

Mycobacterium phlei 8151 (Danada por el laboratorio de microbiología de la ENCB-IPN)
Mycobacterium vaccae 1526 (Donada por el laboratorio de Microbiología de la ENCB-IPN)

E) Reactivos

Solución salina estéril S.S

Tween 80

Reactivos de Lowry (Ver apéndice III)

Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8% (Ver apéndice III)

Regulador para gel de resolución (RB) pH 8.8 (Ver apéndice IV)

Regulador para el gel concentrador (SB) pH 6.8 (Ver apéndice IV)

Solución dodecil sulfato de sodio 10%. SDS 10% (Ver apéndice IV)

Acido clorhídrico concentrado

Solución de Hidróxido de sodio al 40%

Temed

Persulfato de amonio 10%, APS 10% (Ver apéndice VI)

Regulador de muestra RM (Ver apéndice V)

Regulador de corrimiento (Ver apéndice V)

Solución de tinción para geles (Ver apéndice VI)

Regulador Alterno pH 9.2 (Ver apéndice VII)

Regulador de fosfatos y salina TBS (Ver apéndice VII)

Regulador de fosfatos y salina con tween TTBS (Ver apéndice VII)

Solución de bloqueo (Ver apéndice VIII)

Regulador de anticuerpo (Ver apéndice VIII)

Solución de revelado para conjugado con peroxidasa (Ver apéndice VIII)

Solución de tinción para transferencia (Ver apéndice VIII)

Nota: Todos los reactivos utilizados son de sigma ch.Co.,St.LoMiss

Marcadores de Peso Molecular preteñidos (RAINBOW™ code RPN.756)

F) Colorantes

Equipo de tinción para Ziehl-Neelsen (Ver apéndice II)

Azul de Coomasie RG-250 (Sigma ch.Co.,St.Lo.Miss)

Amido negro (Sigma ch.Co.,St.Lo.Miss)

G) Biológicos

Suero de ratones NIH

Suero de ratones BALB/c

Conjugado de ratón anti-Ig GMA (Sigma ch.Co.,St.Lo.Miss)

MÉTODOS

El trabajo experimental fue dividido en cuatro parte:

A) Cultivo y cosecha de micobacterias

Mycobacterium tuberculosis H37Rv cepa 7416 (*M.tbc* H37Rv 7416)

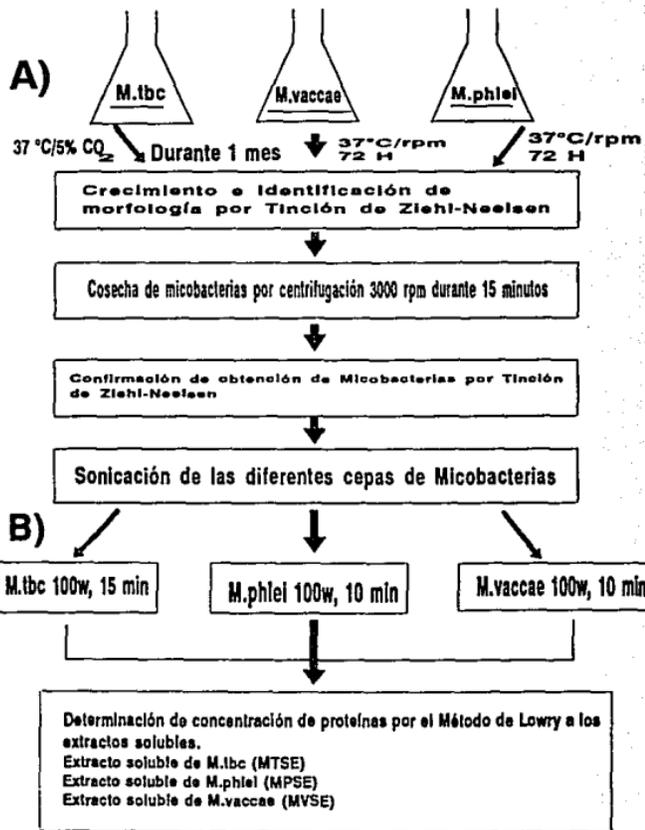
Mycobacterium phlei cepa 8151 (*M.phlei* 8151)

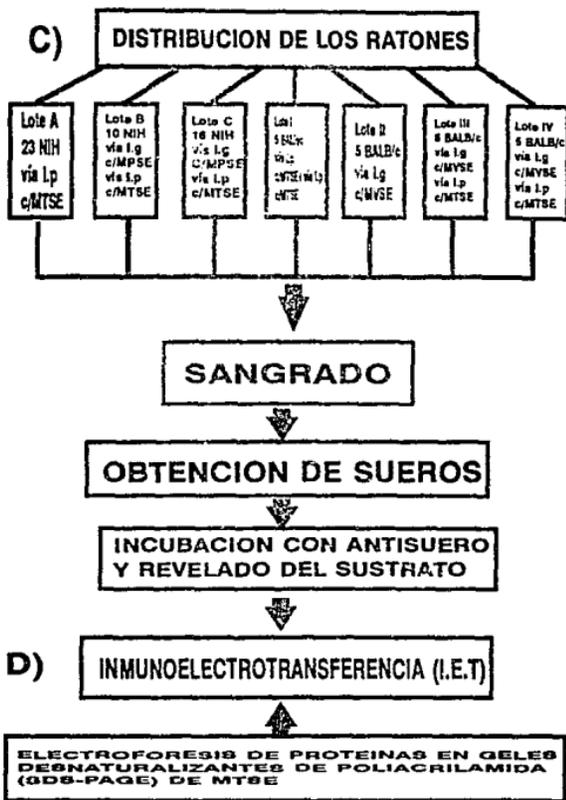
Mycobacterium vaccae cepa 1526 (*M.vaccae* 1526)

B) Preparación de antígenos

C) Inmunización de ratones NIH y BALB/c con extractos solubles de micobacterias.

D) Reconocimiento del patrón de respuesta Inmune Humoral, en los sueros de ratones previamente inmunizados con micobacterias mediante la técnica de Inmunoelctrotransferencia (I.E.T).





A) Cultivo, cosecha y preparación de los extractos solubles de los diferentes cepas de micobacterias.

1) El *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cepa 7116, fue cultivado en el medio de Youmas modificado por Proskaver y Beck PBY ⁽³⁾ en condiciones estacionarias a 37°C durante seis semanas. Esta cepa fue donada por el Dr. M.J.Colston de National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres, Gran Bretaña.

2) El *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium vaccae*, fueron cultivados en caldo nutritivo-Tween 80, bajo las siguientes condiciones; a 37 ° C con agitación durante 72 h. Estas cepas fueron donadas por el departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.

B) Preparación de antígenos.

1) Una vez obtenida la masa celular para las especies anteriormente mencionadas; se procedió a su cosecha por centrifugación a 300 rpm durante 15 minutos. Obtenido el paquete celular (bacilos) se sometieron a tres lavados exhaustivos con solución salina estéril (S.S). Del paquete bacilar se tomó una pequeña alícuota para confirmar su pureza mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Una vez confirmada la pureza de la cepa, el paquete celular se resuspendió en un volumen conocido de S.S., para someterlo posteriormente a sonicación durante 15 min.

2) Los extractos solubles de *M.tbc*, *M.phlei*, *M.vaccae* fueron obtenidos por sonicación, para *M.tbc* las condiciones fueron 100w durante 15 min, y para *M.phlei* y *M.vaccae* de 100w durante 10 min; todo el proceso se llevó a cabo en un baño de hielo-agua. El sonicado en todos los casos se centrifugó a 10 200 G durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se le determinó la concentración de proteínas usando el método Lowry ⁽²⁴⁾. Estos sobrenadantes se conservaron a 20 C hasta su uso. Los extractos solubles se designaron como MTSE (Extracto soluble de *M.tbc*), MPSE (extracto soluble de *M.phlei*), y MVSE (extracto soluble de *M.vaccae*).

C) Inmunización de ratones NIH y BALB/c con extractos solubles de micobacterias.

1) Distribución de ratones por lotes:

Lote A.- 23 ratones inmunizados i.p con *M.tbc*.

Lote B.- 10 ratones NIH inmunizados i.g con dos dosis de *M.phlei* y posteriormente inmunizados i.p con *M.tbc*.

Lote C.- 16 ratones NIH inmunizados i.g con una dosis de *M.phlei* y posteriormente inmunizados i.p con *M.tbc*.

Lote I.- 5 ratones BALB/c inmunizados i.p con *M.tbc*.

Lote II.- 5 ratones BALB/c inmunizados i.g con 500 μ g de *M.vaccae* y posteriormente inmunizados i.p con *M.tbc*.

Lote III.- 5 ratones BALB/c inmunizados i.g con 1500 μ g de *M.vaccae* y posteriormente inmunizados i.p con *M.tbc*.

Lote IV.- 5 ratones BALB/c inmunizados i.g con 2500 μ g de *M.vaccae* y posteriormente inmunizados i.p con *M.tbc*.

2) Para MTSE se inmunizan los diferentes lotes de ratones NIH y BALB/c con 50 μ g de MTSE, 0.25 ml por ratón. El antígeno (Ag) se preparó con adyuvante incompleto de Freund (IFA); en una relación de una parte de Ag más tres partes de IFA.

3) Para MPSE se inmunizan los lotes B y C intragástricamente (i.g) son 500 μ g de MPSE, o.15 ml por ratón.

En los diagramas siguientes se describen los diferentes protocolos de inmunización de los lotes de ratones.

LOTE A 23 RATONES NIH

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA.
3 RATONES SUERO NO INMUNE

SUERO 1A

SE INMUNIZA i.p CON 50 µg DE MTSE + IFA.
0.25 ml POR RATON (20 RATONES)

7

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA A LOS 7 DIAS DE
INMUNIZADOS
CON M. tbc (5 RATONES)

SUERO 2A

7D

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA.
A LOS 14 DIAS DE INMUNIZADOS CON
M. tbc (5 RATONES)

SUERO 3A

7

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA.
A LOS 21 DIAS DE INMUNIZADOS CON
M. tbc (5 RATONES)

SUERO 4A

7

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA A LOS 28 DIAS DE
INMUNIZADOS
CON M. tbc (5 RATONES)

SUERO 5A

32

LOTE B 10 RATONES NIH

SE INMUNIZA i.g CON 500 µg DE MPSE
0.5 ml POR RATON (10 RATONES)

↓ 7D

SEGUNDA INMUNIZACION i.g CON MPSE
MISMA DOSIS

↓ 7D

A) SANGRIA INDIVIDUAL POR FUNCION CARDIACA A LOS 14 DIAS DE
INMUNIZADOS
CON M phii (5 RATONES)

SUERO 1B

B) SE INMUNIZA i.p CON 50 µg DE MTSE + IFA. 0.25 ml POR RATON (5
RATONES)

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL POR FUNCION CARDIACA A LOS 7 DIAS DE
INMUNIZADOS
CON M.tbci (5 RATONES)

SUERO 2B

DIAGRAMA 4. Protocolo de inmunización 2.

LOTE C 16 RATONES NIH

SE INMUNIZA i.g CON 500 μ g DE MPSE
0.5 ml POR RATON (16 RATONES)

14 D

SE INMUNIZA i.p CON 50 μ g DE MTSE + IFA
0.25 ml POR RATON (16 RATONES)

14 D

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA
A LOS 21 DIAS DE INMUNIZADOS CON
M.tbc (5 RATONES)

SUERO 1C

7 D

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA
A LOS 21 DE INMUNIZADOS CON
M.tbc (5 RATONES)

SUERO 2C

7 D

SANGRIA INDIVIDUAL POR PUNCIÓN CARDIACA
A LOS 28 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc (5 RATONES)

SUERO 3C

LOTE I 5 RATONES BALB/c

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
SUERO NO INMUNE

SUERO I₀



SE INMUNIZA i.p CON 50 µg DE MTSE + IFA
0.25 ml POR RATON

7 D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS CON
M.tbc

SUERO I₁

7 D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 14 DIAS DE INMUNIZADOS CON
M.tbc

SUERO I₂

7 D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 21 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO I₃

7 D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 28 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO I₄

DIAGRAMA 6. Protocolo de inmunización 4.

LOTE II 5 RATONES BALB/c

SE INMUNIZAN i.g 500 μ g DE MVSE
0.5 ml POR RATON

↓ 7D

A) SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M. vaccae

SUERO II₀

B) SE INMUNIZA i.p CON 50 μ g DE MTSE +IFA
0.25ml POR RATON

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO II₁

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 14 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO II₂

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 21 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO II₃

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 28 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO II₄

DIAGRAMA 7. Protocolo de inmunización 5.

LOTE III 5 RATONES BALB/C

SE INMUNIZA i.g 1 500 µg DE MVSE
0.5 ml POR RATON

7D

A) SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.vaccas

SUERO III₀

B) SE INMUNIZA i.p CON 50 µg DE MTSE +IFA
0.25 ML POR RATON

7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO III₁

7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 14 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO III₂

7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 21 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO III₃

7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 28 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tbc

SUERO III₄

DIAGRAMA 8. Protocolo de inmunización 6.

LOTE IV 5 RATONES BALB/c

SE INMUNIZA i.g 2500 µg DE MVSE
0.5 ml POR RATON

↓ 7D

A) SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.vaccine

SUERO IV₀

B) SE INMUNIZA i.p CON 50 µg DE MTSE + IFA
0.25 ml POR RATON

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 7 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tb_c

SUERO IV₁

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 14 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tb_c

SUERO IV₂

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 21 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tb_c

SUERO IV₃

↓ 7D

SANGRIA INDIVIDUAL RETROORBITAL
A LOS 28 DIAS DE INMUNIZADOS
CON M.tb_c

SUERO IV₄

4) Para MVSE se inmuniza i.g los lotes I, II, III, IV con 500 μ g, 1500 μ g 2500 μ g, respectivamente con MVSE, 0.5 ml por ratón. El lote II con 500 μ g de una sola dosis; el lote III con 500 μ g cada tercer día y el lote IV con 500 μ g diariamente durante 5 días.

D) Reconocimiento del patrón de respuesta inmune humoral, en los sueros de ratones inmunizados con micobacterias mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (I.E.T).

1) Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizados de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se realizó la electroforesis de proteínas de acuerdo al método descrito por Laemmli⁽²³⁾ de un sistema discontinuo de reguladores con modificaciones. Los geles se prepararon mezclando las soluciones indicadas en el apéndice VI, dependiendo de la concentración deseada del gel concentrador (SB) y del gel de resolución (RB).

Se prepararon los geles vaciando primero en la cámara de mezcla para formar el gel de resolución inmediatamente después de haber vertido en la cámara del gel la mezcla de reactivos y antes de que gelifique, se colocó sobre la mezcla una capa de butanol al 80% (V/V) con el propósito de que la superficie del gel quedase plana. Se dejó gelificar por lo menos una hora, transcurrido el tiempo se eliminó el exceso de butanol con agua corriente y se secó la superficie del gel con papel para posteriormente colocar la mezcla del gel concentrador. Para la preparación del gel concentrador se mezclaron perfectamente los reactivos en las proporciones indicadas en el apéndice VI y se vertió en la cámara donde ya se encontraba formado el gel de resolución, posteriormente se colocó el peine antes de que ocurriera la gelificación. Una vez preparado el gel se colocó en la cámara de electroforesis y ésta se llenó con el regulador de corrimiento.

Se prepararon geles dodecil sulfato de sodio-Poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1.5 mm de espesor, a una concentración de 3% SB/10% RB y se agrega el extracto soluble de *M.tbc*; la cantidad utilizada de antígeno por peine fue de 170 μ l o 850 μ g de MTSE.

Las muestras se tratan con regulador de muestra 1:1 (V/V) previo al corrimiento. El regulador de mezcla se preparó con 400 μ l de regulador de muestra, 90 μ l de SDS al 10% y 10 μ l de ditioneitol (DTT) 1 M. se adicionaron 170 μ l de regulador de muestra a los 170 μ l de antígeno; la muestra se coloca en un baño a 100 C durante tres minutos, depositandola con una micropipeta en el espacio donde se colocó el peine.

El corrimiento electroforético se realizó a corriente constante de 30 mA por placa. Para comprobar el adecuado corrimiento electroforético se tiñeron geles de azul de Coomasi R-250 durante una hora y posteriormente se elimina el exceso de colorante con una solución desteñidora (ver apéndice VI), figura 8.

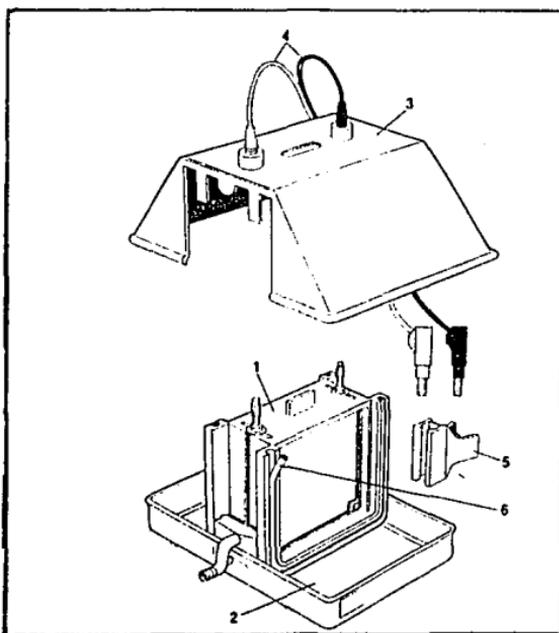


FIGURA 8. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizados de poliacrilamida. (SDS-PAGE).

2) Inmunoelctrotransferencia (I.E.T)

Una vez estandarizada la técnica de electroforesis se procede a la electrotransferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin ⁽³⁸⁾.

La electrotransferencia se llevó a cabo colocando sobre la plancha del equipo de electrotransferencia (Sistema semi-seco), seis papeles filtro previamente empapados con regulador alterno (ver apéndice VII), inmediatamente después se colocó el gel y sobre éste la membrana de nitrocelulosa cortada al tamaño adecuado evitando la formación de burbujas entre ellos; sobre la membrana de nitrocelulosa se colocan otros seis papeles filtros empapados también con regulador alterno; se cierra el sistema con la tapa del equipo de electrotransferencia, verificando de que el gel quede orientado hacia el polo negativo y la membrana de nitrocelulosa hacia el polo positivo. La transferencia se realizó a corriente constante de 100 mA durante una hora y media, figura 9.

La membrana de nitrocelulosa que contiene los marcadores de peso molecular preteñidos, se guardan para su comparación con los resultados de los sueros.

Las tiras de nitrocelulosa se lavan con TBS durante 10 minutos, después se bloquean con la solución de bloqueo BSA al 1% (ver apéndice VIII) durante 30 minutos a temperatura ambiente y el exceso de la solución de bloqueo se elimina con tres lavados utilizando TTBS. Posteriormente las tiras se incuban con los sueros de ratones a probar durante toda la noche a temperatura ambiente. Los sueros se utilizaron diluidos 1:40 con regulador de anticuerpo BSA al 1% en TTBS (ver apéndice VIII). Una vez transcurrido éste tiempo se elimina el primer anticuerpo con tres lavados de TTBS y se procede a incubar a temperatura ambiente una hora con el segundo anticuerpo conjugado de ratón anti-Ig GMA unido a peroxidasa, diluido 1:2000 en regulador de anticuerpo, transcurrido el tiempo de incubación las tiras de lavan tres veces en TTBS durante 5 minutos en cada lavado y después se lavan tres veces durante 5 minutos en TBS.

Por último, se procede al revelado en las transferencias con 3-amino-9-etil-carbazolona como cromógeno y peróxido de hidrógeno como sustrato (ver apéndice VIII), la reacción se lleva a cabo en oscuridad deteniéndola con agua corriente cuando son visibles las bandas de proteínas en las tiras de nitrocelulosa.

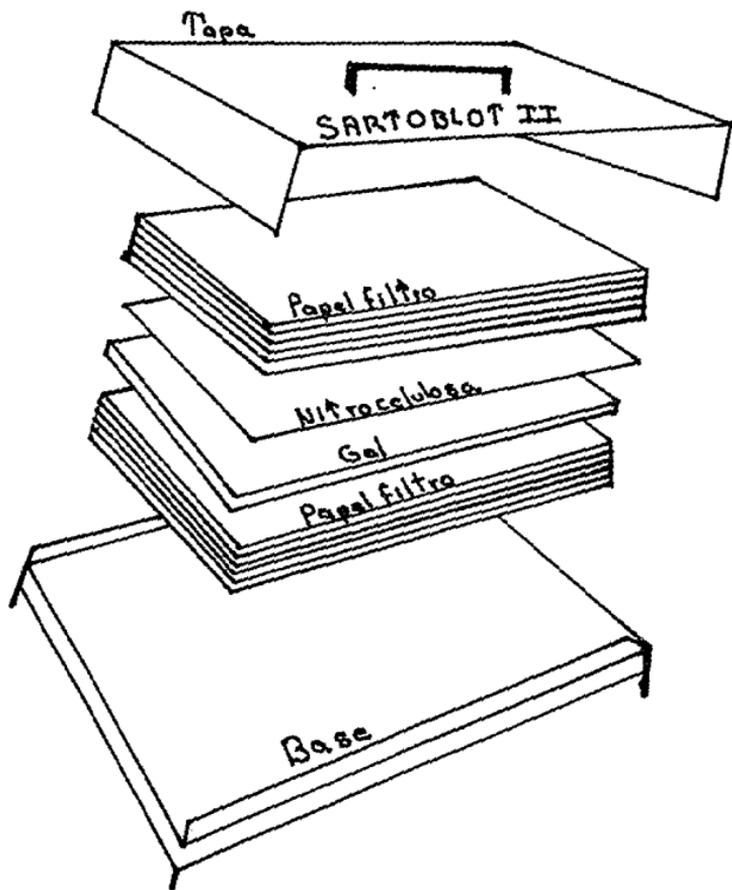


FIGURA 9. Immunoelectrotransferencia I.E.T. Sistema semi-seco

RESULTADOS

Las concentraciones obtenidas para los extractos solubles de las diferentes cepas de micobacterias fueron las siguientes:

MTSE 5.0 mg/ml

MPSE 1.0 mg/ml

MVSE 5.6 mg/ml

Determinación de la dilución óptima de suero.

Para determinar la solución óptima de suero a emplear en la técnica de I.E.T. se utilizó una mezcla de cinco sueros de ratones NIH, inmunizados i.p con 50 μ g de MTSE como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo un conjugado de ratón anti-Ig GMA (comercial) diluido 1:2000, revelados con 3-amino-etil-carbazolona como cromógeno y H₂O₂ al 30% como sustrato. Las diferentes diluciones del suero empleadas fueron 1:20, carril 1; 1:40, carril 2; 1:80, carril 3; 1:160, carril 4. Se determinó que la mejor dilución de suero fue la de 1:40. ver Figura 10, carril 2.

Se realizó una cinética de respuesta inmune humoral hacia *M.tbc*, utilizando una mezcla de sueros de ratones NIH inmunizados i.p con 50 μ g de MTSE. Suero no inmune, carril 1; 7, carril 2; 14, carril 3; 21, carril 4; 28 días, carril 5; marcadores de peso molecular, carril 6, ver figura 11. El mejor y más completo patrón de reconocimiento de anticuerpos hacia *M.tbc* se dió a los 28 días de inmunizados con *M.tbc*, ver figura 11, carril 5. Se encontró proteínas de peso moleculares aproximados de 14.3, 2 proteínas de 21.5, 2 proteínas entre 21.5-30, 3 proteínas de 30, 2 proteínas entre 46-69 y 4 proteínas menos visibles que las anteriores entre 92.5-200 KDa.

La respuesta de anticuerpos a *M.tbc* en sueros de ratones NIH a los 14 días de inmunizados con 50 μ g de MTSE (ver figura 12, carril 1), comparada con la respuesta de

anticuerpos a *M.tbc* a los 14 días en sueros de ratones NIH preinmunizados con 500 µg de MPSE (ver figura 14 carril 2). se observa que la respuesta de anticuerpos a los 14 días de inmunizados con *M.tbc* únicamente reconoce proteínas de pesos moleculares de 14.3, 21.5, 30, 69-200 KDa. Esta respuesta de anticuerpos se modificó con el reto previo de *M.phlei* por vía oral, debido a que se observó que éstos sueros no reconocen ninguna proteína de *M.tbc* a diferencia de la respuesta dada únicamente por *M.tbc*.

La respuesta a anticuerpos a *M.tbc* de suero de ratones NIH a los 21 días de inmunizados con 50 µg de MTSE (figura 13, carril 1), comparada con la respuesta de anticuerpos a *M.tbc* a los 21 días en sueros de ratones NIH preinmunizados con 500 µg de MPSE por vía oral (figura 13, carril 2). se observa que la respuesta de anticuerpos a los 21 de inmunizados con *M.tbc* reconoce proteínas de peso molecular de 14.3, 21.5, 3 proteínas entre 21.5-30, 2 proteínas entre 46-69 y 4 proteínas entre 92.5-200 KDa. esta respuesta de anticuerpos se modificó con el reto previo de *M.phlei* por vía oral, pero se va recuperando hacia *M.tbc* pero no totalmente, ya que se detectó el reconocimiento de proteínas de 21.5, 21.5-30, una proteína de 69 y una proteínas entre los 92.5 KDa.

La respuesta de anticuerpos a *M.tbc* en sueros de ratones NIH a los 28 días de inmunizados i.p con 50 µg de MTSE (figura 14, carril 1), comparada con la respuesta de anticuerpos a *M.tbc* a los 28 días en sueros de ratones NIH preinmunizados con 500 µg de MPSE (figura 14, carril 2). se observa que la respuesta de anticuerpos a los 28 días de inmunizados con *M.tbc* reconocieron proteínas aproximadamente de 14.3, 21.5, proteínas de un rango de 21.5-30, 2 proteínas de 69, 5 proteínas entre 92.5-200 KDa. La respuesta de anticuerpos con una sola administración por vía oral de *M.phlei* evaluada posteriormente a los 28 días de inmunizados con *M.tbc* se recuperó la respuesta a *M.tbc*, faltando únicamente la proteína de 14.3 KDa.

La respuesta de anticuerpos a *M.tbc* en sueros de ratones BALB/c a los 7 días de inmunizados con 1 500 µg de MVSE por vía oral, (figura 15, carril 1), comparada con la

respuesta de anticuerpos a *M.tbc* a los 7 días, (carril 2; 14; carril 3; 21, carril 4; 28), posterior al reto i.p con 50 μg de MTSE, (figura 15) en sueros de ratones BALB/c preinmunizados con 1 500 μg de MVSE por vía oral. Se observó que a los 7 días de inmunizados con *M.vaccae* reconocieron una proteína de 21.5 KDa y al ser inmunizados posteriormente con *M.tbc* se reconoce ésta proteína en toda la cinética de respuesta evaluada; pero a los 7 días reconocieron levemente una proteína entre 21.5-30 KDa, a los 14 días reconocen tres proteínas entre 2.5-30 Kda, a los 21 y 28 días la respuesta fue más evidente a éstas proteínas, a diferencia de lo observado en la respuesta a ratones inmunizados previamente con *M.phlei* y posteriormente con *M.tbc*, ésta disminuye, pero al final de la cinética de recuperó el patrón de reconocimiento a *M.tbc*. Cuando se aumentó la dosis de micobacterias atípicas 1 500 μg de MVSE, se observó una marcada disminución en toda la cinética de respuesta evaluada; que a dosis menores.

La respuesta de anticuerpos a *M.tbc* en sueros de ratones BALB/c a los 7 días de inmunizados con 2 500 μg de MVSE por vía oral (figura 16, carril 1), comparada con la respuesta de anticuerpos a *M.tbc* a los días 7, carril 2; 14, carril 3; 21, carril 4; 28, carril 5, posterior al reto i.p con 50 μg de MTSE, (figura 16), en sueros de ratones BALB/c preinmunizados con 2 500 μg de MVSE por vía oral. Se observó que a los 7 días de inmunizados con *M. vaccae* reconocieron una proteína de 21.5 KDa y ésta proteína se reconoció también a los 7 días posteriores al reto i.p con *M.tbc*, pero no fue reconocida a los 14, 21 y 28 días de inmunizados con *M.tbc*. A los 7 días de inmunizados con *M.tbc* y preinmunizados con *M.vaccae* reconocieron proteínas levemente entre 21.5-30, una proteína de 46, y 3 proteínas entre 92.5-200 KDa, pero a los días 14, 21 y 28 no reconocieron ninguna de éstas proteínas. Comparando las figuras 15 y 16 se observó que la dosis del antígeno administrado por vía oral al incremento de 1 500 μg a 2 500 μg influyó en gran manera en el reconocimiento a *M.tbc*, a dosis menores se dió una respuesta baja, pero al aumentar la dosis se inhibió completamente la respuesta.



FIGURA 10. Inmunolectrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de M.tbc, enfrentados con sueros de ratones NIH inmunizados i.p. con 50ug de MTSE. Evaluando la dilución de suero más apropiada, 1:20 carril 1; 1:40 carril 2; 1:80 carril 3; 1:160 carril 4. Encontrándose como la óptima la dilución 1:40.

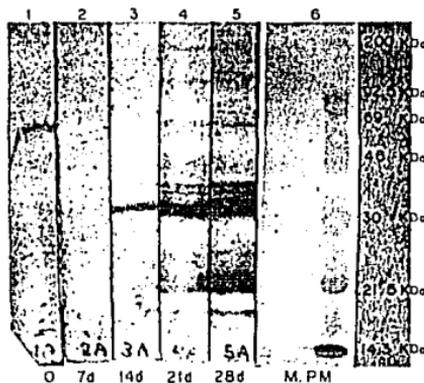
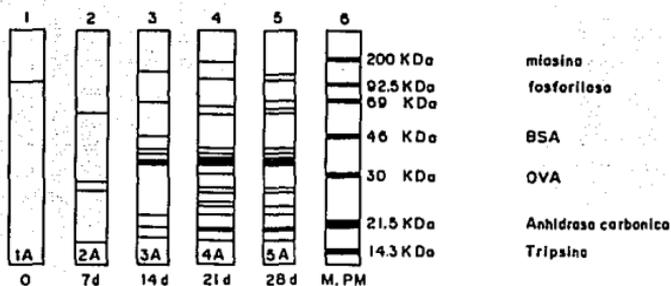


FIGURA 11. Inmunoelctrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de M.tbc, enfrentados con sueros de ratones NIH inmunizados i.p. con 50 ug de MTSE. Se muestra la cinética de respuesta inmune humoral a los días 0, carril 1; 7, carril 2; 14, carril 3; 21, carril 4; 28, carril 5; Marcadores de peso molecular (M.PM), carril 6.

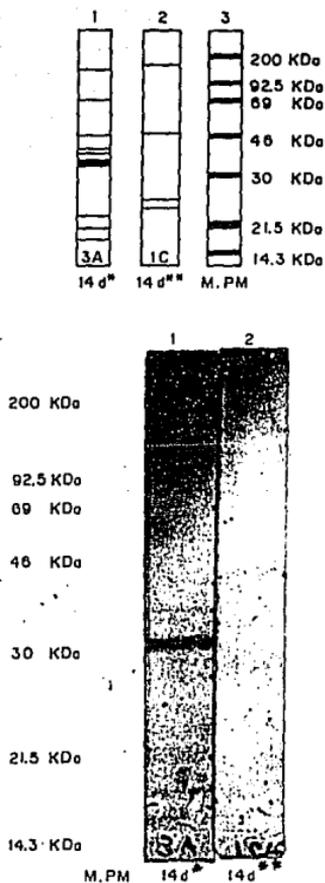


FIGURA 12. Inmunoelctrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de M.tbc, enfrentados con sueros de ratones NIH inmunizados i.p. con 50ug de MTSE. 14 días*, carril 1; comparada con la respuesta de sueros de ratones NIH preinmunizados con 500ug de M.phlei por vía oral 14 días previos al reto i.p. con M.tbc y 14 días** posterior al reto con M.tbc, carril 2.

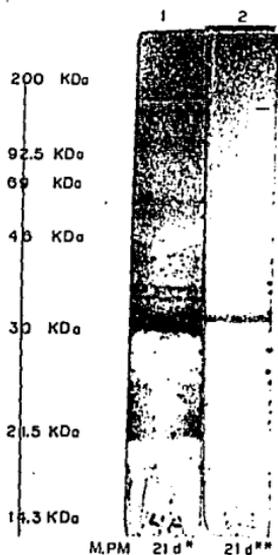
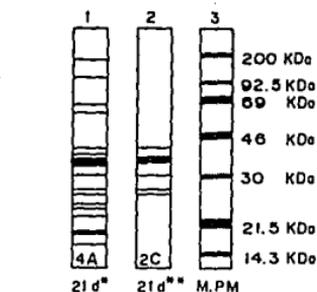


FIGURA 13. Immunoelectrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de M.tbc, enfrentados con sueros de ratones NIH inmunizados i.p. con 50ug de MTSE a los 21 días*, carril 1; comparada con la respuesta de sueros de ratones NIH preinmunizados con 500ug de M.phlei por vía oral 14 días previos al reto i.p. con M.tbc y 21 días** posterior al reto con M.tbc carril 2.

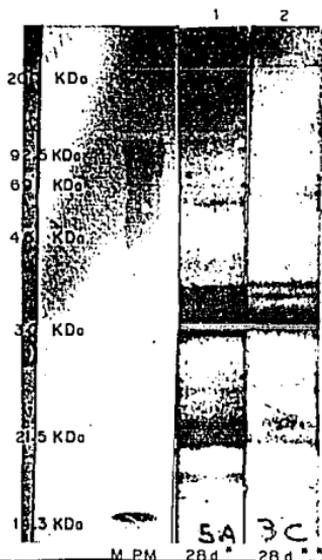
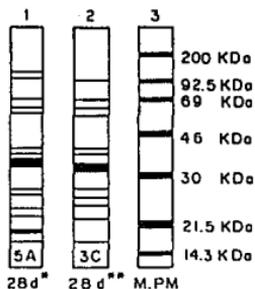


FIGURA 14. Immunoelectrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de M.tbc, enfrentados con sueros de ratones NIH inmunizados i.p. con 50ug de MTSE a los 28 días*, carril 1; comparada con la respuesta de sueros de ratones NIH preinmunizados con 500ug de M.phlei por vía oral 14 días previos al reto i.p. con M.tbc y 28 días ** posterior al reto con M.tbc, carril 2.

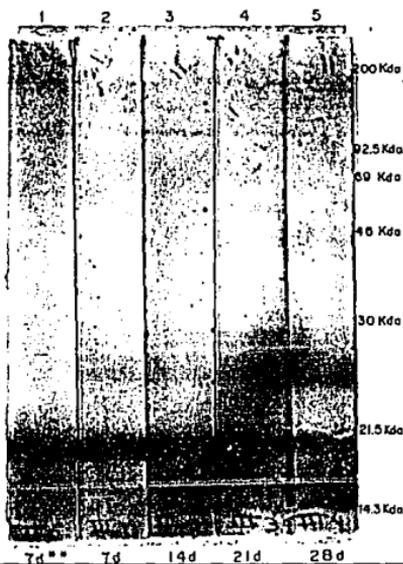
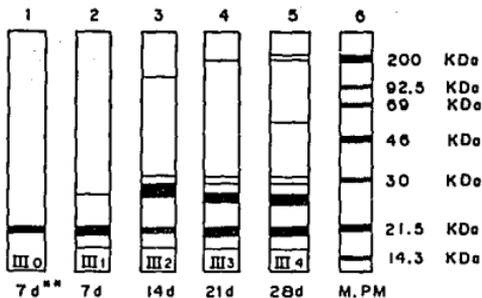


FIGURA 15. Inmunoelctrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de M.tbc, enfrentados con sueros de ratones BALB/c preinmunizados por vía oral con 1500ug de MVSE, respuesta a los 7 días** de inmunizados con M.vaccae, carril 1; y posteriormente inmunizados i.p. con M.tbc. Los sueros se obtuvieron a los días 7, carril 2; 14, carril 3; 21, carril 4; 28, carril 5; posterior al reto i.p. con M.tbc.

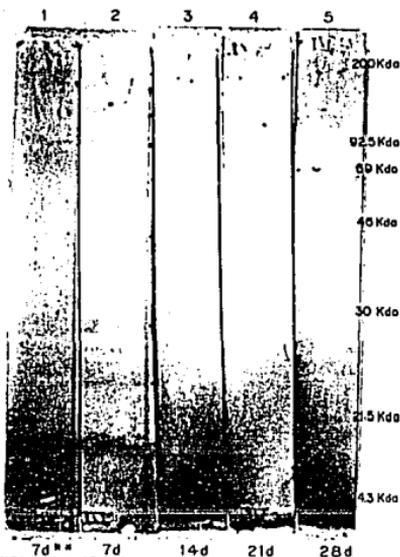
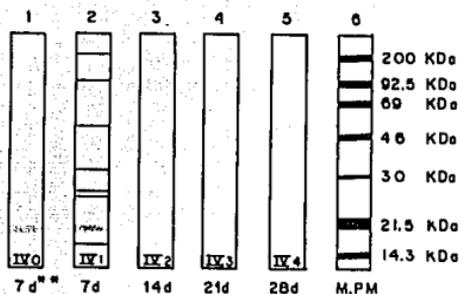


FIGURA 16. Inmuno-electrotransferencia de corrimiento electroforético en condiciones no reductoras de *M.tbc.*, enfrentados con sueros de ratones BALB/c preinmunizados por vía oral con 2500ug de MVSE, respuesta a los 7 días** de inmunizados con *M.vaccae*, carril 1; y posteriormente inmunizados i.p. con *M.tbc.* Los sueros se obtuvieron a los días 7, carril 2; 14, carril 3; 21, carril 4; 28, carril 5; posterior al reto i.p. con *M.tbc.*

DISCUSION

Por medio del presente trabajo, ha sido posible obtener una respuesta de anticuerpos contra *M.tbc* adecuada a la dilución 1:40, dando el mejor patrón de reconocimiento de anticuerpos a ésta dilución. asimismo, se realizó una cinética de respuesta contra *M.tbc* a los 7, 14, 21, 28; se evaluó la respuesta Inmune Humoral en base al tiempo, observando que el mejor y más completo patrón de reconocimiento contra *M.tbc* se dió a los 28 días de inmunizados con *M.tbc*, ver figura 11 (5A).

Posteriormente se realizaron cinéticas de respuesta de anticuerpos contra *M.tbc* posterior a la inoculación con micobacterias atípicas por vía i.g; para evaluar d que manera se modificaba la respuesta de anticuerpos contra *M.tbc*, es decir, si la vía de administración del antígeno juega un papel importante en el tipo de respuesta que se presenta ^(12, 29 21); debido a que *M.tbc* y las micobacterias atípicas a través de diferentes fuentes como el agua y los alimentos contaminados ⁽³⁰⁾, tienen la capacidad de modificar la respuesta del hospedero hacia los retos posteriores con micobacterias patógenas como *M.tbc* para ésta experimento.

Para el caso en el que se utilizó sueros de ratones que recibieron una inmunización oral con *M.phlei* y posteriormente se inoculan i.p con *M.tbc*, evaluando la respuesta de anticuerpos a los 14 días de inmunizados con *M.tbc* ver figura 12 (1C), comparándola con la respuesta de anticuerpos contra *M.tbc* a los 14 días de inmunizados ver figura 12(3A) sin previo reto con micobacterias atípicas, se observó que los animales que reciben una sola dosis de *M.phlei* su respuesta de anticuerpos se modificó completamente, debido a que éste grupo de ratones no tuvo anticuerpos contra ninguna banda de proteínas contra *M.tbc*, como en el caso de los animales que se inmunizaron únicamente con *M.tbc*. Concluyendo que las micobacterias atípicas inducen tolerancia con una sola dosis de ésta micobacteria ⁽³⁰⁾.

Al principio de la inmunización por vía oral ⁽¹²⁾ con *M.phlei* a éstas dosis se indujo tolerancia contra ésta antígeno, como lo describe Felton en sus experimentos ⁽¹³⁾; debido a

que no existe respuesta de anticuerpos, pero la respuesta se va recuperando conforme transcurre el tiempo de inmunización con *M.tbc* ⁽¹³⁾, lo cual indica que la tolerancia es transitoria ^(20, 21).

En la figura 13 (2C), a los 28 días de inmunizados con *M.phlei* y 21 días de inmunizados con *M.tbc* se observó que va apareciendo la respuesta de proteínas, y el patrón de reconocimiento se recuperó a los 28 días de inmunizados con *M.tbc*, faltando únicamente el reconocimiento a una proteína de bajo peso molecular. debido a que se perdió reactividad hacia esta proteína de bajo peso molecular, aproximadamente de 20 KDa. Se observó que ésta proteína desaparece el patrón de reconocimiento de anticuerpos a los 14 y 21 días ver figuras 12 y 13 respectivamente, incluso después de los 28 días ver figura 14 (3C). De acuerdo a esta pérdida de proteína de bajo peso molecular podemos concluir que existe una tolerancia marcada a ésta proteína, durante toda la cinética de respuesta contra *M.tbc*.

Cuando se incrementa la dosis de micobacterias de 1 500 μg a 2 500 μg para el caso de *M.vaccae*, ver figura 15 y 16 respectivamente, se observó una marcada desaparición de la respuesta de anticuerpos contra *M.tbc*, el aumento de dosis del antígeno, aumento también mencionado por Felton en sus trabajos ⁽¹⁵⁾; los animales inmunizados con una dosis total de 1500 μg reconocen sólo algunas proteínas de *M.tbc* y al aumentar la dosis de *M.vaccae* a 2 500 μg se observó que no reconocen ninguna proteína de *M.tbc*.

El fenómeno observado depende en gran manera de la dosis empleada ^(15, 26, 27), debido al incremento de la dosis de micobacterias atípicas de 1 500 μg a 2 500 μg por animal se observó una marcada disminución en la respuesta humoral a todas las proteínas contra el patrón de reconocimiento de *M.tbc* ver figura 16. A diferencia de *M.phlei* en donde se observó que a una dosis de 500 μg la respuesta se inhibe al principio y se recuperó al final de la cinética de respuesta de anticuerpos contra *M.tbc* a los 28 días, ver figura 14, faltando el reconocimiento hacia una proteína de bajo peso molecular. En estos casos donde la dosis es tres veces y cinco veces mayor se observó un efecto de tolerancia ^(15, 20, 21, 26, 27),

De acuerdo a los resultados obtenidos, el efecto se incrementa al aumentar la dosis del antígeno, administrado por vía oral. Se indujo probablemente un fenómeno de Tolerancia de zona-alta ^(15, 26), inducido específicamente por los antígenos de micobacterias atípicas *M.phlei* y *M.vaccae* ⁽¹⁷⁾ para la inmunización por vía oral de los diferentes grupos de ratones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que las micobacterias atípicas administradas por vía oral si tienen un efecto tolerogénico sobre la respuesta de anticuerpos de *M.tbc*, que es específico para *M.phlei* y *M.vaccae*, lo cual está de acuerdo con los trabajos realizados por Kubin ⁽²²⁾, Stanford y colaboradores ⁽³⁴⁾, donde demostraron que la exposición continua de una antígeno a través del Medio ambiente y la administración del antígeno por vía oral inducen un fenómeno de Tolerancia.

CONCLUSIONES

- 1) Se determinó el número y el peso molecular de las proteínas que son reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones NIH y BALB/c inmunizados i.p. con una dosis de 50 μ g de MTSE. El mejor grado de reconocimiento se encontró a los 28 días, con un total de 15 proteínas con un peso molecular entre 20-200 KDa.
- 2) Cuando se inmuniza i.g ratones con micobacterias atípicas *M.phlei* y *M.vaccae*, y se retaron i.p con 50 μ g de MTSE, se observó una ausencia de la respuesta de anticuerpos contra *M.tbc* a los 14, 21, 28 días para el caso de *M.phlei*. Esta ausencia fue máxima a los 14 y 21 días, recuperándose casi totalmente a los 28 días; siendo muy clara la falta de anticuerpos contra una proteína de aproximadamente 20 KDa. Para el caso de *M.vaccae* a dosis mayores de antígeno 1 500 μ g y 2 500 μ g por vía intragástrica, los sueros de los ratones mostraron una transitoria y una total ausencia de anticuerpos respectivamente.
- 3) Al comparar los resultados obtenidos en los puntos 1 y 2, se puede concluir que las micobacterias administradas por vía intragástrica modifican el reconocimiento de anticuerpos contra *M.tbc*, induciendo una Tolerancia Transitoria para el caso de *M. phlei* y una Tolerancia Total de zona-alta para *M.vaccae*.

APÉNDICE I

MEDIO DE CULTIVO

Caldo Nutritivo-Tween 80 (0.5%)

Caldo nutritivo	25 g
Tween 80	1.5 ml
H ₂ O destilada	1 000 ml

Disolver los ingredientes en el agua en el orden descrito, asegurándose que cada uno se disuelva completamente antes de añadir el siguiente. Esterilizar a 121 °C durante 20 min.

Medio de Youmans modificado por Proskaver y Beck (PBY)

Aspargina	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ SO ₄	0.05 g
Glicerol	2 ml
H ₂ O destilada	100 ml

Disolver los ingredientes en agua en el orden descrito, asegurándose de que cada uno se disuelva completamente antes de añadir el siguiente. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH al 40% y añadir 0.15 g de citrato de magnesio. Esterilizar a 121 °C durante 20 min.

APÉNDICE II

Tinción de Ziehl-Neelsen

- Solución Fucsina Félica

Fucsina básica	1 g
Alcohol absoluto	10 ml
fenol al 5% en H ₂ O destilada	100 ml

Disolver la fucsina básica en alcohol y posteriormente se mezcla con la solución de fenol.

- Alcohol ácido

Acido clorhídrico (1.19)	3 ml
Alcohol absoluto al 95%	97 ml
(Alcohol industrial metilado)	

- Azul de metileno

Azul de metileno	0.5 g
H ₂ O destilada	100 ml

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE III

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

- Reactivo A

Tartrato de sodio y potasio 4%	2 ml
Carbonato de sodio al 3% en NaOH al 1%	94 ml
Sulfato de cobre al 1%	4 ml

- Reactivo B

Reactivo de Folin modificado

Adicionar 3 ml del reactivo A a la muestra y mezcla. Después de 10 min adicionar 0.5 ml del reactivo de Folin diluido 1:2 con agua destilada y mezclar. Incubar por 30 minutos y leer la densidad óptica a una longitud de onda de 650 nm. Preparar una curva de calibración con una solución de albúmina con un límite de concentración de 200 μg de proteína.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS (PAGE-SDS)

Soluciones concentradas

- Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%

Acrilamida	150 g
Bisacrilamida	4 g

APÉNDICE IV

Disolver la acrilamida en 200 ml de agua destilada y desionizada. Disolver la bisacrilamida en 100 ml de agua bidestilada en baño de 37 C. Mezclar las soluciones y ajustar el volumen a 500 ml. Filtrar a través de papel Watman No 1, conservar a 4 C en frasco ambar.

- SDS AL 10%

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10 g
H2O bidestilada	100 ml

Reguladores para geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS y DTT (PAGE).

a) RB 5X (Regulador para el gel de resolución)

Tris-HCl 2M pH 8.8. Pesar 121.1g de Tris-base, disolver en un volumen menor a los 500 ml y ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 500 ml con agua bidestilada.

b) SB 5X (Regulador para el gel concentrador)

Tris-HCl 0.5M pH 6.8. Pesar 121.1 g de Tris-base, disolver a 120 ml y ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 200 ml con agua bidestilada.

APÉNDICE V

- Regulador de corrimiento 10X

Tris-base	15 g
Glicina	72 g
H ₂ O bidestilada	500 ml

Para usarse diluir 1:10 con agua bidestilada, agregar 100 ml del regulador de corrimiento 10X, 890 ml de agua y 10 ml de SDS al 10%. Mezclar los reactivos en orden.

- Solución de Ditiotreitól 1M (DIT)

En un tubo Eppendorf pesar entre 0.1542 y 0.2313 g de DTT. Calcular por regla de tres el volumen requerido para tener una solución 1M (PM 154.24 g). En otro tubo Eppendorf medir el volumen anterior y hacer una marca que servirá como guía para el aforo del tubo con el DTT. Aforar, disolver y conservar a -20 C.

- Regulador para la muestra 2X (geles de poliacrilamida desnaturalizantes)

	solución conc.	para 100 ml
Tris-HCl 200 mM pH 8.4	1M	20 ml
Sacarosa	0.5M	17.115 g
EDTA 5 mM pH 8	0.5M	1 ml
Azul de bromofenol 0.03%	1%	3 ml

APÉNDICE VI

- Geles al 3%/10% (gel concentrador (S)/gel de resolución (R))

	para 5 ml de S	para 10 ml de R
Agua	3.2 ml	5.5 ml
RB	-	2.0 ml
SB	1.25 ml	-
Acril/bis	0.5 ml	2.34 ml
SDS 10%	50.0 μ l	0.1 ml
TEMED	2.5 μ l	5.0 μ l
*APS 10%	20.0 μ l	50 μ l

*Persulfato de amonio recién preparado

- Solución de tinción para geles

Azul de Coomassie RG-250 0.2%	0.2 g
Acido acético glacial al 10%	10.0 ml
Metanol al 20%	20.0 ml
Aforar con agua destilada	100.0 ml

- Solución fijadora y desteñidora para geles

Metanol al 30%	30.0 ml
Acido acético glacial al 10%	7.0 ml
Aforar con agua destilada	100.0 ml

APÉNDICE VII

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (I.E.T)

- Regulador alterno

Tris 48 mM	2.9064 g
Glicina 39 mM	1.500 ml
SDS 1.3 mM	0.1874 g
Metanol al 20%	100 ml
Aforar con agua bidestilada	500 ml

La solución ya preparada tiene un Ph de 9.2

- Regulador de fosfatos y salina TBS 5X

Tris-base 100 mM	12.2 g
NaCl	146.2 g
Aforar con agua bidestilada	1 000 ml
Ajustar a pH 7.5 con HCl.	

- Regulador de fosfatos y salina tween (TTBS 1X)

5X TBS	200 ml
H ₂ O bidestilada	800 ml
Tween 20	0.5 ml

APÉNDICE VIII

- Solución de bloqueo

BSA 1%	1 g
TBS 1X	100 ml

- Regulador anticuerpo

BSA 1%	1 g
TTBS 1X	100 ml

- Solución de revelado para conjugado con peroxidasa

Disolver 6 mg de 3-amino-9-etil carbazolona en 25 ml de regulador de acetatos de 0.05 M pH 5. Adicionar a los reactivos 1.25 ml de dimetil formamida, mezclar y adicionar 25 μ l de H₂O₂ al 3% y usar inmediatamente.

- Solución de tinción para transferencia (amida negro al 0.1%)

Amida negro 10 B	30 mg
Acido acético glacial	3 ml
Alcohol isopropílico	13.5 ml
H ₂ O destilada	13.5 ml

- Solución desteñidora

Metanol	45 ml
Acido acético glacial	10.0 ml
H ₂ O destilada	5.0 ml

Bibliografía

- 1.- Acosta Altamirano, G. 1992. Inmunología de las Mucosas. Distribuidora y Editorial Mexicana, México. 1: 7-17; 2: 21-28; 7: 101-106.
- 2.- Acosta AG., Barranco C., y Roost EV. 1980 Isolation and characterization of secretory IgA and free secretory component from rat bile. *Mol Immunol.* 17:1525-1537.
- 3.- Allen B.P. Beck FJ. P. 1968. Mycobacteria and isolation, identification and sensitivity pesting. Ed. Butterworthy Laboratory Ards, Londo. pág-51.
- 4.- Bach, J.F. y Lesavre. 1983. Inmunología. Editorial Masson, 1a ed. España. pag: 251-271.
- 5.- Barret, J.T. 1981. Inmunología. Editorial Interamericana. 1a ed. México. pág:49-63; 200-203.
- 6.- Bienestock, J. y Befus, A.D. 1980. Mucosal Immunology. *Immunology.* 41: 249-269.
- 7.- Blan, P.W. y Warren, L.G. 1986. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine I. *Immunology.* 58: 1-7.
- 8.- Blan, P.W. y Warren, L.G. 1986. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine II. *Immunology.* 58: 9-14.
- 9.- Brandtzaeg, P. 1985. The human secretory immune system: General review. *Mucosal Immunity. International Symposium Series, Revillard J.P. Editor.* 11: 11-13.
- 10.- Celis, F.E. 1983. Inmunología en Biología Contemporánea. Las Ciencias en el Siglo XX; Universidad Nacional Autónoma de México. pág. 159-183.
- 11.- Dulbecco, R. y Ginsberg, H.S. 1979. Togavirus y otros virus transmitidos por artrópodos. Salvat Editores, S.A; 2a ed. España. pág: 1401-1420.
- 12.- Challacombe, S.J. y Tomasi, T.B. 1980. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J. Exp. Med.* 152: 1459-1472.
- 13.- Chase, N.W. 1946. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agent. *Proc. Soc. exp. Biol.* 61: 257.
- 14.- Chiller JM, Habicht GS and Weigle WO. 1971. Kinetic differences in unresponsiveness of thymus and bone marrow cells. *Science* 171: 813-814.

- 15.- Felton, L.D. 1949. The significance of the antigen in animal tissues. *J. Immunol.* 61: 107-117.
- 16.- Ferguson, A. 1990. Mucosal Immunity. *Immunol Today.* 11: 1-3.
- 17.- Figueredo, M.A., Alvarez, R. y Puchc, C. 1988. Antígenos, Anticuerpos y sus interacciones. *Medicine.* 2a ed. 47:2999-3010.
- 18.- Gómez de la Concha, E. 1988. Tolerancia y Autoinmunidad. *Medicine.* 2a ed. 47: 3021-3023.
- 19.- Kazda, J., Lorentz, M.T. y Muller, K. 1980. Insolation of non-cultivable acid fast bacilli in Sphagnum and moss vegetation by fast pad technique in mice *Int.J.Lepr.* 48: 1.
- 20.- Klein, J. 1985. *Immunology. The Science of non self discrimination.* Nueva York A Wiley interscience publication. Pág: 348-407.
- 21.- Klein, J. 1985. *Immunological Unresponsiveness.* Nueva York, A Wiley Interscience Publication. pág: 565-574.
- 22.- Kubin, M. Svandová, Medek B, Chobot S and Olsovsky Z. 1980. Mycobacterium *Kansasii* infection in a endemic area of Czechoslovakia. *Tubercle* 61; 207-212.
- 23.- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- 24.- Lowry, H.O. Resembrough, N.I. Farr, A.L. & Randal, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 25.- Mesteky, Winchester RJ. 1977. Parallel synthesis of immunoglobulins and J chain in poke weed mitogen stimulated normal cells and in lymphoblastoid cell line. *J. Exp. Med.* 145: 760-765.
- 26.- Mitchison, N.A. 1964. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol).* 161: 275-292.
- 27.- Mitchison, N.A. 1969. *Immunological Tolerance.* Academic, New York. pág: 149-151.
- 28.- Ribí, E. Granger, D.L. Milner, K.C. et al. 1982. Induction of resistance to tuberculosis in mice with defined components of mycobacteria and some unrelated materials. *Immunol,* 46: 297-305.

- 29.- Roitt, I. Brotoff, J., Male, D. 1985. *Inmunology*. Londres, Gower Medical Pub. Pág: 6-25.
- 30.- Rook, G.A.W. 1983. *The immunology of Leprosy*. tubercle. 64: 297-305.
- 31.- Shield, M.J. 1983. Importance of Immunologically effective contact with environmental mycobacteria. *biol. of Mycobacteria*. Ed. Ac. Press. London. 2: 348-412.
- 32.- Stanford, J.L. 1981. A Mycobacteriologist's view of the Immunology of Leprosy *Bull. Inst. Pasteur*. 79: 262-273.
- 33.- Stanford, J.L., Shield, M.J. y Took, G.A.W. 1981. How environmental mycobacteria may predetermine the protective efficacy of BCG. *Tubercle*. 62: 55-62.
- 34.- Stanford, J.L., Paul, R.C., Penketh, A., Thurlow, S. et al. 1976. A preliminary study of the effect of contact with environmental mycobacteria on the pattern of sensitivity to a range of new tuberculin among Uganda adults. *J. Hygiene*. 76: 205-214.
- 35.- Stifles, Daniel P.H. Fundenberg. 199 . *Inmunología Básica y Clínica. Inmunosupresión Immunopotenciación y Medicamentos Antiinflamatorios*. Ed. El Manual Moderno. México. Cap. 17: 274-290; 297-298.
- 36.- Stoks, C.R. Newby, T.J. Bourne, F.J. 1983. The influence of oral immunization on local and systemic immune responses to heterologous antigen. *Clin. Exp. Immunol*, 52: 399-406.
- 37.- Tomasi, T.B. 1980. Oral Tolerance overview. *Transplantation*. 29: 353-356.
- 38.- Towbin, H. Stachelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. academic. Sci*. 76: 4350-4354.
- 39.- Wells, H.G. 1911. Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with insolated proteins, especially those of the hens egg. *J. Infect. Dis*. 9: 147.