

300627

16
2EJ



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA U. N. A.

**"INDUCCION DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA
(DTH) CON FRACCIONES DE Mycobacterium
habana EN COBAYOS SENSIBILIZADOS CON
ANTIGENOS MICOBACTERIANOS"**

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA ELENA GOMEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS:
Q. F. B. MA. LETICIA LINARES ESTUDILLO

MEXICO, D. F.

1996

FALLA DE ORIGEN 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOLOGIA MOLECULAR II DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA DE
LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS.**

DIRECTOR:

Q.F.B. MA. LETICIA LINARES ESTUDILLO.

ASESORES:

DRA. IRIS ESTRADA GRACIA.

Q.B.P. MA. MAGDALENA VILCHIS LANDEROS.

DR. SERGIO ESTRADA PARRA.

A DIOS.

Por haberme dado una vida llena de oportunidades, una hermosa familia, y por permitirme lograr esta meta.

A mis padres Gabriel y Adriana.

Con todo mi amor, agradecimiento y respeto. Por su cariño y comprensión, por el apoyo y estímulo que siempre me han brindado y a quienes debo todo lo que soy.

A mis hermanos Gabriel y Adrián.

Con mucho cariño, por todo lo que me han ayudado y por lo mucho que representan para mí, deseándoles que siempre sigan adelante.

A la Universidad La Salle.

Por sus enseñanzas y formación tanto personal como profesional.

Al Instituto Politécnico Nacional.

Por haberme abierto las puertas.

A Iris.

Por el cariño e invaluable ayuda que siempre me brindó.

A Male.

Por su gran ayuda y amistad.

Al Dr. Estrada.

Con sincero agradecimiento.

A Arturo.

Con mucho cariño.

**A todas las personas que de alguna manera han contribuido en mi
formación profesional.**

INDICE

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
JUSTIFICACION	14
OBJETIVO	15
MATERIAL Y METODOS	16
RESULTADOS	24
DISCUSION	35
CONCLUSIONES	40
APENDICE	42
BIBLIOGRAFIA	50

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de Amonio
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin (<i>Mycobaterium bovis</i> BCG)
DTH	Hipersensibilidad Tardía
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
G3PDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
I.d.	Intradérmicamente
kDa	Kilodaltones
mcg	Microgramos
mcl	Microlitros
MH	<i>Mycobacterium habana</i>
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MHSE	Extracto soluble de <i>Mycobacterium habana</i>
MLSE	Extracto soluble de <i>Mycobacterium leprae</i>
PBS	Regulador de fosfatos y salina
PBST	Regulador de fosfatos y salina con Tween
PBY	Medio de Youmans modificado por Proskauer y Beck
R	Gel de resolución
RB	Regulador para gel de resolución
S	Gel concentrador
SB	Regulador para gel concentrador
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes
TB	Regulador de transferencia
TEMED	N,N,N',N' tetrametilendiamina

RESUMEN.

En este trabajo se analizó la capacidad de cinco fracciones obtenidas a partir de MHSE por electroelución a partir de geles desnaturalizantes de poliacrilamida para inducir respuestas de hipersensibilidad tardía (DTH) en cobayos sensibilizados con *M.leprae* o *M.habana*. Las fracciones obtenidas comprenden pesos moleculares de >60 kDa, 60-30 kDa, 30 kDa, <30 kDa y >30 kDa. La inducción de DTH se realizó en grupos de cobayos inmunizados con 5×10^9 bacilos de *M.leprae* o de *M.habana* muertos por calor en la base del cuello, así como en cobayos no sensibilizados. Después de 4 semanas cada grupo se retó en forma intradérmica con 0.1, 1.0 y 10 mcg de las fracciones proteicas de *M.habana*, 10 mcg de la fracción proteica de < 30 kDa s/c (sin colorante azul de bromofenol), 5 mcg de MHSE, 5 mcg de MLSE. Los resultados obtenidos demuestran la inducción de DTH en cobayos sensibilizados con *M.habana* o *M.leprae* a una concentración de 10 mcg/0.1 ml, con el antígeno homólogo y con el heterólogo, demostrando reactividad cruzada entre ambas micobacterias. La respuesta de DTH fue mayor en los animales inmunizados con *M.habana*. También se encontró que ninguna fracción fue capaz de inducir respuesta de DTH en los cobayos de 300-350 g no sensibilizados a ninguna concentración, lo que confirma la especificidad de las DTH anteriores. Ninguna fracción fue capaz de inducir respuestas de DTH a concentraciones de 0.1 y 1 mcg/0.1 ml. La fracción <30 kDa fue capaz de inducir la mayor respuesta de DTH tanto en los cobayos sensibilizados con *M.habana* como en los sensibilizados con *M.leprae* con y sin colorante azul de bromofenol.

Introducción

La lepra es una enfermedad que se reconoció desde la más remota antigüedad debido a sus obvias manifestaciones en la piel. Hasta hace poco más de un siglo la humanidad atribuía la lepra a una terrible herencia o a un mandato divino, por lo que, el descubrimiento por Gerhard Armauer Hansen, en 1873, de que la enfermedad era causada por un microorganismo, vino a cambiar radicalmente la situación en favor de los enfermos. Después de muchas observaciones y trabajos en la lepra, Hansen encontró en biopsias de piel que el bacilo estaba presente siempre donde estaba la enfermedad, por lo que dedujo que la lepra era causada por un microorganismo (3,24).

Existen registrados en el mundo alrededor de 5.5 millones de enfermos de lepra, sin embargo, debido a defectos de registro y notificación se estima que el número total de casos asciende a 11.5 millones (1).

La lepra es una enfermedad cosmopolita, actualmente predomina en regiones tropicales y subtropicales, pero anteriormente existió en zonas de clima frío siendo endémica en algunos países europeos. El problema es más frecuente en África Central y en el Sudeste Asiático (1).

La forma de transmisión no ha sido esclarecida por completo, la diseminación por gotas de aerosol de saliva que proviene de pacientes lepromatosos no tratados o tratados inadecuadamente, parece ser la forma de transmisión más importante, aunque también ha sido propuesta la diseminación por artrópodos, fomites y la existencia de reservorios (1).

Se sabe que de todas las personas expuestas al agente causal solamente una pequeña parte desarrolla la enfermedad clínica y que, a pesar de que no se han demostrado distintas cepas de *M.leprae*, la enfermedad puede presentar manifestaciones clínicas muy variadas, que son el resultado de la interacción de la bacteria con el hospedero, atribuyéndose fundamentalmente a las diferencias de la respuesta inmunológica y a la constitución genética del hospedero (1).

El comienzo de la lepra es insidioso. Las lesiones afectan a los tejidos más fríos del cuerpo: piel, nervios superficiales, nariz, faringe, laringe, ojos y testículos. Las lesiones cutáneas pueden ocurrir como lesiones pálidas, maculares anestésicas de 1 a 10 cm de diámetro; como nódulos difusos o discretos, eritematosos e infiltrados de 1 a 5 cm de diámetro o como una infiltración cutánea difusa. Los trastornos neurológicos se manifiestan por infiltración nerviosa y engrosamiento con anestesia concomitante, neuritis, parestesia, úlceras tróficas, reabsorción ósea y acortamiento de los dedos. La desfiguración debida a la infiltración cutánea y a la complicación de los troncos nerviosos puede ser extrema en casos no tratados (16).

La enfermedad es polar y con un amplio espectro y se divide en dos tipos principales muy diferentes: lepromatoso y tuberculoide, así como en varias etapas intermedias. Se incluye además la lepra indeterminada considerada como la forma inicial más común y punto de partida hacia las demás (27).

La lepra lepromatosa constituye el tipo progresivo, sistémico, relativamente transmisible y espontáneamente incurable de la enfermedad. Invade extensamente la piel y las mucosas en forma de nódulos y/o infiltración difusa, lesiona los nervios periféricos y todos los órganos y sistemas excepto el nervioso central, se caracteriza por la presencia de numerosos bacilos de Hansen, tanto en el raspado de la mucosa nasal como en el de las lesiones cutáneas, la inmunidad mediada por células es notablemente deficiente para el germen y la piel está infiltrada por linfocitos T citotóxicos, presenta formas clínicas de importancia variable: lepromatosis nodular y lepromatosis difusa (27).

La lepra lepromatosa nodular comprende no solo a la lesión característica (el nódulo), sino a otras lesiones circunscritas tales como manchas hipopigmentadas, placas eritematohipocrómicas o francamente eritematosas e infiltradas, nódulos foliculares de estructura leprosa que preceden, acompañan o se presentan en lugar del nódulo típico. Todo lo anterior se haya asentado sobre la infiltración difusa más o menos acentuada.

La lepra lepromatosa difusa se caracteriza por un tipo especial de reacción leprosa: eritema necrosante o fenómeno de Lucio.

La lepra tuberculoide constituye el tipo regresivo, no sistémico, no tan transmisible y espontáneamente curable del padecimiento. Este tipo de lepra se caracteriza porque sus manifestaciones tienden a localizarse exclusivamente en la piel y en los nervios periféricos, por la ausencia o escasez de bacilos de Hansen, por su estructura tuberculoide típica con células gigantes multinucleadas tipo Langerhans, células epiteloideas, linfocitos e histiocitos y porque se presenta en individuos cuya inmunidad tanto celular como humoral son normales (16,27).

Los casos indeterminados son aquellos en donde no es posible evidenciar clínicamente, por lo menos durante algún tiempo, características francas de uno de los dos tipos polares. Estos casos se caracterizan por su situación indefinida: Inmunidad celular normal o aumentada si el paciente se ha orientado hacia el polo tuberculoide, o bien, deprimida, si lo está haciendo hacia el polo lepromatoso. Sus manifestaciones se localizan en la piel y en los nervios periféricos; hay ausencia o escasez de bacilos, esto último sólo si el caso no es ya lepromatoso, y se presentan infiltrados inespecíficos.

Los casos dimorfos, borderline, fronterizos intermediarios o interpolares se designan a un grupo de casos, que como los indeterminados son inestables y suelen posteriormente pertenecer en general, al tipo lepromatoso. Estos casos se caracterizan porque sus manifestaciones se localizan aparentemente solo en la piel y en nervios periféricos, por la presencia de bacilos de Hansen, por presentar infiltrados que recuerdan a los de la lepra tuberculoide, sólo que no se pegan como ésta a la epidermis y muestran además algunos histiocitos vacuolados, con bacilos escasos aislados o formando globias. Son casos indefinidos, inestables y cambiantes, que a veces se muestran como lepromatosos y otras como tuberculoideas.

Debido a la gran variedad de manifestaciones en la lepra, ésta ofrece grandes posibilidades para el entendimiento de los mecanismos inmunorreguladores en el hombre, ya que la respuesta inmunológica a *M.leprae* correlaciona directamente con las manifestaciones clínicas, bacteriológicas e histopatológicas de la enfermedad (11).

La multiplicación de *M.leprae* en medios de cultivo no ha sido posible (26), sin embargo, la búsqueda de modelos animales ha permitido la obtención de pequeñas cantidades para su estudio.

La primera transmisión experimental del bacilo de Hansen a un animal se logró en 1960, cuando Shepard obtuvo una multiplicación limitada del microorganismo en el ratón, aunque la infección solo se limita al cojinete plantar es posible la vacunación del animal quedando este 100% protegido contra la enfermedad (33.13). El problema del desarrollo del bacilo de Hansen en el cojinete plantar del ratón es que es moderado y solo llega a un cierto límite.

En 1971, por primera vez, Kirchheimer y Storrs lograron una infección experimental diseminada con *M.leprae* al inocular armadillos de nueve bandas. A partir de entonces este animal se ha convertido en el mejor modelo experimental que existe hasta la fecha para la multiplicación de este microorganismo, pero es muy difícil conservar a los animales, y para tener bacilos abundantes pueden necesitarse hasta dos años de cautiverio (1).

Debido a que el uso del bacilo de Hansen como vacuna tiene la desventaja de que no se pueden obtener abastos importantes del mismo, se ha puesto mucho énfasis en encontrar alguna otra micobacteria que proteja en forma semejante a *M.leprae*, pero que sea cultivable *in vitro*. Dentro de las micobacterias cultivables *in vitro* que han sido estudiadas para el desarrollo de una vacuna contra la lepra, se encuentran: *M.bovis* BGC, *M.vaccae* y *M.habana* (11).

La vacunación del ratón con bacilos de *M.vaccae* muertos por irradiación con ^{60}Co no confirió protección a la infección en el cojinete plantar con *M.leprae* vivo, el *M.bovis* BCG solo confirió protección parcial del 60%, mientras que *M.habana* confirió protección en un 100% (15,32,33).

En el caso de *M.habana*, por existir un alto grado de reactividad antigénica cruzada con *M.leprae*, no se conoce que característica de esta micobacteria le de la capacidad de protección en el modelo murino contra la infección con *M.leprae* (32).

M.habana fue aislada por primera vez en esputos de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Los bacilos son ácido alcohol resistentes, no esporulados y carecen de movilidad, se observan algunos elementos cocobacilares y otros con granulaciones mono y bipolares (38).

Cuando *M.habana* se siembra en medio Lowenstein Jensen, entre los 10 y los 14 días de cultivo se observan colonias de aproximadamente 0.5 mm, que a las 3 o 4 semanas aparecen como colonias de 1 a 3 mm, redondas, convexas, de bordes regulares y de superficie lisa, de consistencia cremosa y fácilmente dispersables en agua. El color de las colonias jóvenes (2 a 3 semanas), corresponden al No. 1 de la escala de Juhlin (YRS-0-4-Hesselgren), o sea un color amarillo ligero. A 37°C y a temperatura ambiente, puede observarse crecimiento a los 14 días; pero en general el crecimiento es más destacado a 37°C, no habiendo crecimiento a 45°C (39).

M.habana no desarrolla pigmento en la obscuridad ni inducido por la luz. Presenta una potente actividad de catalasa y es incapaz de reducir el nitrato a nitrito, no provoca hidrólisis del Tween 80, en el medio de Lowenstein-Jensen, cuando se dispersa el crecimiento en solución salina no se observa formación de cordón, sin embargo, en microcolonias en medio de Price se observa una tendencia a la formación de éste, pero no se define organización acordonada como en el caso de *M.tuberculosis* (39).

En general los cobayos cuando son inoculados con *M.habana* muestran a las 8 semanas un aumento de peso promedio de 100 g. El punto de inoculación en todos los animales no presenta una huella lesional, y tanto los ganglios regionales como los distales se encuentran sin alteraciones. Los órganos como bazo, hígado y pulmones aparecen sin ningún tipo de alteración patomórfica (39).

La característica más importante de esta micobacteria es la fuerte positividad que presenta a la niacina en una micobacteria de crecimiento lento y no cromógena. Estas características se habían considerado hasta 1971 exclusivas de *M.tuberculosis*. Las características bioquímicas más importantes que la diferencian del bacilo de la tuberculosis son la prueba de la niacina, que es fuertemente positiva, y la de la catalasa, que aún a 68°C se conserva. A diferencia de *M.tuberculosis* las colonias de esta micobacteria son lisas, de fácil dispersión en agua, la actividad de catalasa es muy fuerte, es nítrasa negativa, crece a temperatura ambiente, no es virulenta en cobayos y es resistente a las principales drogas antifímicas y a las de segunda generación investigadas (39).

En estudios recientes se ha encontrado que esta cepa de *Mycobacterium habana* TMC 5135 confiere protección contra la infección con *Mycobacterium ulcerans* en ratones (30).

Se cree que esta micobacteria es un serotipo de *M.simiae*, pero el hecho de que *M.simiae* no confiera ninguna protección a ratones contra el reto con *M.tuberculosis* H37Rv vivo y *M.habana* si, hace pensar que posiblemente estas micobacterias no se encuentren relacionadas serológicamente en su capacidad de conferir protección inmunológica (13,14,23).

Las bacterias son organismos sumamente complejos con una vasta serie de antígenos (6), cuyo número obstaculiza la identificación de los epítomos más importantes.

La inmunidad celular que muy frecuentemente se correlaciona con la hipersensibilidad tardía interviene de manera crucial en la defensa del huésped contra micobacterias, incluyendo *M.leprae* y otros microorganismos que se replican dentro de la célula (5,25).

La hipersensibilidad tardía o DTH es una reacción inmunitaria mediada por células que puede ser provocada por la inyección subcutánea de antígeno, con un infiltrado celular subsiguiente y edema que son máximos 24-48 horas después de la provocación con el antígeno. El infiltrado inflamatorio que ocurre 24-48 horas después de la inyección intradérmica de un antígeno consta primordialmente de células mononucleares. El infiltrado celular, la producción de fibrina y el edema acompañante dan por resultado la induración de la piel y el diámetro de esta reacción es un índice de la hipersensibilidad cutánea. La induración de 5 mm o más de diámetro es el criterio generalmente aceptado de una prueba cutánea positiva de hipersensibilidad tardía (37).

Estudios recientes han demostrado que *M.leprae* es capaz de inducir respuesta de hipersensibilidad tardía en individuos sanos después de haber sido inmunizados con una suspensión de 2×10^8 bacilos muertos de *M.leprae* obtenidos de tejidos infectados de armadillo. En contraste, también se ha demostrado que individuos con lepra lepromatosa fueron incapaces de inducir reacción de hipersensibilidad tardía en presencia de *M.leprae* después de haber sido inmunizados con bacilos muertos del mismo, lo que demuestra la falta de reactividad de las células T hacia *M.leprae*, es posible que en la lepra lepromatosa no existan células reactivas a *M.leprae*, o quizá haya células T potencialmente reactivas, con reactividad suprimida (35,36).

Por otra parte, cobayos sensibilizados con bacilos muertos de *M.habana* y *M.leprae* retados con habanina y lepromina, presentan respuesta de hipersensibilidad tardía tanto al antígeno homólogo como al heterólogo (31).

M.habana es capaz de inducir positividad a la lepromina en el 50% de los monos Rhesus y Langures indios inmunizados con una sola dosis, ésta sensibilización persiste por más de 1 año (34).

La reactividad cruzada entre *M.habana* y *M.leprae* podría deberse a la presencia de determinantes antigénicos comunes entre ambas micobacterias, ya que en estudios posteriores se ha comprobado que *M.habana* presenta epitopos comunes a *M.leprae*, entre los que se encuentra el epitopo de la proteína de 18 kDa (4,18).

Las características antes mencionadas de *M.habana* la convierte en un candidato para el desarrollo de una vacuna contra la lepra, o un reactivo para la prueba cutánea de hipersensibilidad tardía basado en determinantes antigénicos específicos de *M.leprae* y *M.habana* como instrumento de diagnóstico (29).

JUSTIFICACION.

Las micobacterias son organismos complejos con una gran cantidad de antígenos, cuya complejidad obstaculiza la identificación de epítomos relevantes para inmunoprofilaxis. El desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico y la prevención de la lepra se basa en el aislamiento de componentes inmunogénicos del bacilo de Hansen. Debido a que el *M.leprae* no se ha podido cultivar *in vitro*, se ha puesto mucho énfasis en encontrar otra micobacteria que proteja en forma semejante. En estudios recientes se ha encontrado que *M.habana* confiere 100% de protección al reto de bacilos vivos de lepra en el ratón, por lo que consideramos de gran importancia identificar antígenos de *M.habana* que puedan inducir respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH) en animales sensibilizados con *M.leprae* y *M.habana*, ya que la respuesta inmune de tipo celular es la responsable de la protección en contra de la lepra.

OBJETIVO.

Identificar antígenos de *M.habana* capaces de inducir reacciones de hipersensibilidad tardía (DTH) en cobayos sensibilizados con *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium habana*.

MATERIAL Y METODOS.

Micobacterias.

La cepa de *Mycobacterium habana* TCM 5135 fue cultivada en medio de Youmans, modificado por Proskauer y Beck (PBY) en condiciones estacionarias durante 5 semanas a 37°C. Esta cepa fue donada por el Dr. M. J. Colston del National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres, Gran Bretaña.

Los bacilos de *Mycobacterium leprae* se obtuvieron a partir de tejidos infectados de armadillo, proporcionados por el Dr. Fausto Quesada Pascual Del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Los extractos solubles de estos bacilos fueron obtenidos por sonicación (100 W/15 minutos) seguida de centrifugación a 12,500 g en una centrífuga Beckman J2-MC durante 15 minutos a 4°C. Al sobrante se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry⁽¹⁹⁾ y se conservó a -70°C hasta su uso.

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

Se realizó la electroforesis de proteínas de acuerdo al método descrito por Laemmli (17) de un sistema discontinuo de reguladores.

Los geles se prepararon mezclando las soluciones indicadas en el apéndice, dependiendo de la concentración deseada del gel concentrador y del gel de resolución. Para preparar los geles primero se vació en la cámara la mezcla para formar el gel de resolución, inmediatamente después de haber vaciado en la cámara el gel y antes de que polimerizara, se colocó sobre la mezcla una capa de butanol saturado con agua con el propósito de que la superficie del gel quedara plana. Se dejó polimerizar por lo menos una hora, transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de butanol con agua corriente y se secó la superficie del gel con papel para posteriormente colocar el gel concentrador. Para la preparación del gel concentrador se mezclaron perfectamente los reactivos en las proporciones indicadas en el apéndice y se vació en la cámara, en donde ya se encontraba formado el gel de resolución, inmediatamente se colocó el peine antes de que polimerizara. Una vez preparado el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se llenó ésta con el regulador de corrimiento (ver apéndice).

Se corrieron geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) de 3 mm de espesor y 12 cm de longitud, a una concentración de 5%/13.5% (gel concentrador y de resolución, respectivamente) y 5%/17.5% con extracto soluble de *M.habana* y marcadores de peso molecular conocido. Se utilizó un peine ciego con 2 carriles, uno de 0.8 cm de longitud en donde se colocaron los marcadores, y el otro de 12 cm de longitud, en donde se colocó el MHSE, colocándose una cantidad de 600 mcg de antígeno, las muestras fueron tratadas con regulador de la muestra (ver apéndice) (v/v) previamente al corrimiento electroforético, el cual se realizó con una corriente constante de 30 mA por placa .

Para realizar el corte del gel y separar las fracciones proteicas, se cortó el carril con los marcadores, se enjuagó con agua bidestilada y posteriormente se sumergió en una solución de CuCl_2 al 4%, apareciendo los marcadores en 5 minutos, ésta es una tinción negativa, ya que el gel se tiñe de azul, no así las proteínas. Posteriormente, la parte con los marcadores fue acoplada al resto del gel y con referencia a ésta fue cortado el gel en las siguientes fracciones proteicas: >60 kDa, 60-30 kDa, 30 kDa y < 30 kDa.

Electroelución.

Con el fin de purificar las proteínas se utilizó la técnica de electroelución, la cual consiste en una electroforesis que tiene como propósito aislar la proteína del resto del gel.

Cada una de las fracciones proteicas se trató en forma independiente; el gel se cortó en pedazos pequeños los cuales se introdujeron en los tubos de una cámara de electroelución modelo BIORAD 422, los cuales constaban de un contenedor con una membrana que era removida de acuerdo a la fracción tratada; una vez montada la cámara, ésta se llenó con el regulador de corrimiento.

El corrimiento electroforético se realizó con una corriente constante de 40 mA durante 4 horas por fracción proteica y las proteínas se colectaron en volúmenes de 0.6 ml de regulador de corrimiento.

Para eliminar las sales del regulador de corrimiento (ver apéndice), cada una de las fracciones proteicas se dializó contra un volumen de 2 litros de agua bidestilada en refrigeración, haciendo 2 cambios y con agitación continua.

Para eliminar el agua, las fracciones fueron sometidas a liofilización, para posteriormente ser resuspendidas en 1 ml de solución salina al 0.85% y congeladas a -70°C .

Se determinó la concentración de proteínas de cada fracción por el método de Lowry (19), posteriormente se corrieron geles al 3%/10% para comprobar que las fracciones correspondían a su peso molecular, y se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 durante una hora, quitando el exceso de colorante con solución desteñidora.

Inmunolectrotransferencia (Western Blot) (12,38).

Cada una de las fracciones proteicas de *M.habana* obtenidas fueron sometidas a electroforesis y transferidas a papel de nitrocelulosa.

La electrotransferencia se llevó a cabo colocando sobre la rejilla del equipo de electrotransferencia tres papeles filtro previamente empapados en regulador de transferencia, inmediatamente se colocó el gel y sobre éste el papel de nitrocelulosa cortada al tamaño del gel evitando la formación de burbujas entre ellos; sobre el papel de nitrocelulosa se colocaron otros tres papeles filtro y una esponja empapados también con regulador, se cerró la rejilla y se colocó en la cámara de electrotransferencia sumergido en regulador, verificando que el gel quedara orientado hacia el polo negativo y la membrana de nitrocelulosa hacia el polo positivo. La transferencia se realizó a 300 mA durante 2 horas.

La nitrocelulosa fue teñida con una solución de amido negro en alcohol isopropílico al 0.1% y el exceso de colorante fue eliminado con solución desteñidora, para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente.

Posteriormente otra membrana de nitrocelulosa que contenía también las fracciones proteicas de *M.habana* se cortó en pequeñas tiras para analizar las fracciones por separado.

Las tiras de nitrocelulosa que contenían a los marcadores de peso molecular fueron teñidas con una solución de amido negro al 0.1% y el exceso de colorante fue eliminado con una solución deteñidora.

El resto de las tiras de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada durante 30 minutos a temperatura ambiente y el exceso de bloqueador se eliminó con tres lavados utilizando PBST. Las tiras que contenían fracciones >30, <30, y 30 fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón contra el doblete de la proteína de 28/30kDa, y las tiras con las fracciones 60-30 y >60 fueron incubados con suero de ratón contra la proteína de choque térmico de 60 kDa, durante toda la noche a temperatura ambiente. En todos los casos los anticuerpos se utilizaron diluidos 1:100 en regulador del anticuerpo. Una vez transcurrido este tiempo se eliminó el primer anticuerpo 3 lavados con PBST y se procedió a incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con conjugado de cabra anti-Ig de ratón unido a peroxidasa, diluido 1:3000 en regulador del anticuerpo. Posteriormente se lavaron las membranas dos veces con PBST y una vez con PBS.

Por último, se procedió al revelado de las transferencias con 3-amino-9-etil-carbazolona como cromógeno y peróxido de hidrógeno como sustrato.

Inmunización.

Se formaron tres grupos de 5 cobayos hembra de la cepa abierta Hartley de 300-350 g cada uno, el primer grupo fue inmunizado intradérmicamente en 5 sitios diferentes de la base del cuello, con una suspensión que contenía 5×10^9 bacilos muertos por calor de *M.leprae*, el segundo grupo fue inmunizado de la misma forma con una suspensión que contenía 5×10^9 bacilos de *M.habana* muertos por calor y el tercer grupo no fue inmunizado

Después de 4 semanas, los tres grupos de cobayos fueron inoculados intradérmicamente con cada fracción proteica de *M.habana* a concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mcg/0.1 ml (8) y con extractos solubles de *M.leprae* y *M.habana* a una concentración de 5 mcg, así como un testigo de solución salina al 0.85% y un testigo de gel que se obtuvo del corrimiento de un gel al 10% con solución salina en lugar de extracto micobacteriano (MHSE) para verificar que el gel por sí solo no inducía DTH.

La induración se midió a las 24 y 48 horas, considerándose positiva si el diámetro de la misma era igual o mayor a 5 mm.

ESQUEMA DE INMUNIZACION

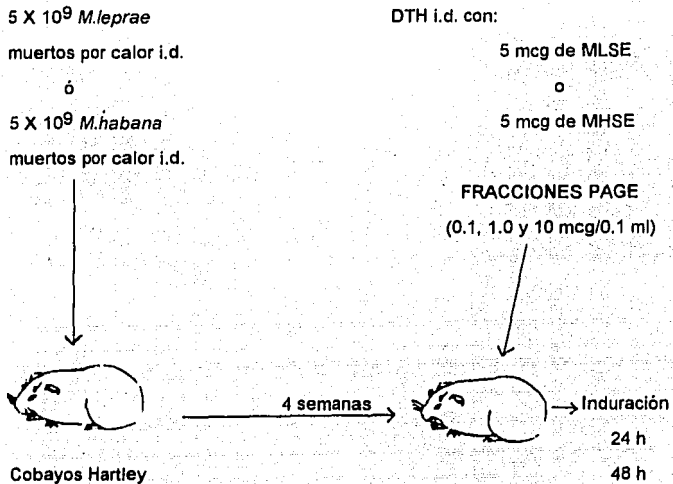


Fig.1. Esquema de inmunización. Protocolo utilizado para sensibilizar a los cobayos con *M.habana* ó *M.leprae* y posteriormente retarlos con las fracciones proteicas de *M.habana*. (Merha et. al., Infect. Immun. 1979, 23: 787).

Resultados.

Se obtuvieron los siguientes grupos de fracciones proteicas a partir de MHSE: >60 kDa, 60-30 kDa, 30 kDa, <30 kDa y >30 kDa.

Para verificar los pesos moleculares de las fracciones proteicas de *M. habana* obtenidas se corrieron las fracciones en geles de poliacrilamida a una concentración de 3%/10%, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, una de las cuales fue teñida con amido negro (Fig.2), en donde se observa que las fracciones corresponden a los pesos moleculares esperados.

La otra membrana fue revelada con diferentes anticuerpos (Fig.3), encontrándose que las fracciones >60 kDa y 60-30 kDa contenian la proteína de 60 kDa, y las fracciones >30 kDa y 30 kDa contenian la proteína de 30 kDa, no así la fracción < 30 kDa.

Para probar la capacidad de dichas fracciones para inducir DTH se inmunizaron grupos de 5 animales de 1 año de edad y de 450-500 g de peso con bacilos de *M.leprae* o *M.habana*, respectivamente, muertos por calor. Después de 4 semanas todas las fracciones fueron probadas Inyectándose en forma i.d. a tres diferentes concentraciones: 10 mcg/0.1 ml, 1 mcg/0.1 ml y 0.1 mcg/0.1 ml (8).

Como controles de este experimento se utilizaron MHSE, MLSE, solución salina (0.1 ml i.d.), así como un testigo obtenido del corrimiento de un gel al 10% con solución salina como muestra.

Como grupo control se utilizó un grupo de 5 animales no inmunizados, todas las fracciones, así como el MHSE y el MLSE se utilizaron a las mismas concentraciones que en los experimentos anteriores para inducir DTH.

Ninguna fracción fue capaz de inducir respuesta de DTH a concentraciones de 0.1 mcg/0.1 ml y 1 mcg/0.1 ml (Tabla 1).

Todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml fueron capaces de inducir DTH tanto en cobayos sensibilizados con *M.habana* como con *M.leprae*, siendo mayor en los animales inmunizados con *M.habana* (Tabla 1).

Ni la solución salina ni el testigo de gel fueron capaces de inducir respuesta de DTH en ninguno de los cobayos (Tabla 1).

La fracción <30 kDa fue capaz de inducir la mayor respuesta de DTH en ambos grupos de cobayos, causando necrosis (Tabla 1, Fig.4).

Todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml indujeron DTH en los cobayos no inmunizados, por lo que se repitió todo el experimento con los mismos controles, utilizándose cobayos de menor edad y menor peso, ya que los anteriores excedían la edad y el peso establecidos (Tabla 2).

Se volvieron a inmunizar 2 grupos de 5 animales de 1 mes de edad y de 300 a 350 g de peso con bacilos de *M.leprae* o *M.habana*, respectivamente, muertos por calor. Después de 4 semanas todas las fracciones fueron probadas inyectándose en forma i.d. a tres diferentes concentraciones: 10 mcg/0.1 ml, 1 mcg/0.1 ml y 0.1 mcg/0.1 ml.

En este experimento, ninguna fracción fue capaz de inducir respuesta de DTH a concentraciones de 0.1 mcg/0.1 ml y 1 mcg/0.1 ml.

Todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml fueron capaces de inducir DTH tanto en cobayos sensibilizados con *M.habana* como con *M.leprae*, siendo mayor en los animales inmunizados con *M.habana* (Tabla 3).

Ninguna fracción fue capaz de inducir respuesta de DTH en cobayos no inmunizados a ninguna concentración (Tabla 3).

Ni la solución salina ni el testigo fueron capaces de inducir respuesta de DTH en ninguno de los cobayos (Tabla 3).

La fracción <30 kDa fue capaz de inducir la mayor respuesta de DTH en ambos grupos de cobayos causando necrosis (Tabla 3, Fig. 4).

Debido a que dicha fracción <30 kDa tenía residuos del colorante (Azul de bromofenol 0.03%) presente en el regulador de la muestra se procedió a analizar si la inducción de DTH fue provocada por la fracción proteica o por el colorante, para ello, se corrió un gel más concentrado (5%/17.5%) para obtener la misma fracción sin residuos de colorante (<30 s/c) la cual fue capaz de inducir respuesta de DTH casi de la misma magnitud que la que contenía colorante (Tabla 4).

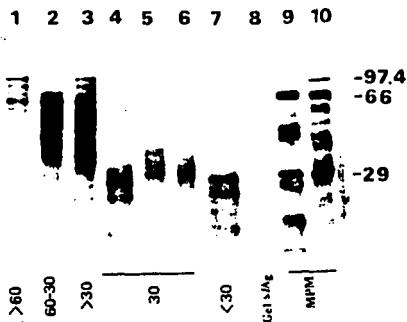


Fig. 2. Inmunoelctrotransferencia de las fracciones proteicas de *M.habana*, teñidas con amido negro al 0.1%. Carril 1 fracción >60 kDa, carril 2 fracción de 60-30 kDa, carril 3 fracción >30 kDa, carriles 4, 5 y 6 fracción de 30 kDa, carril 7 fracción <30 kDa, carril 8 gel sin antígeno, carriles 9 y 10 marcadores de peso molecular: Miosina (205 kDa), B-galactosidasa (116 kDa), fosforilasa (97.4 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), G3PDH (36 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsinógeno (20 kDa), lactalbúmina (14 kDa).

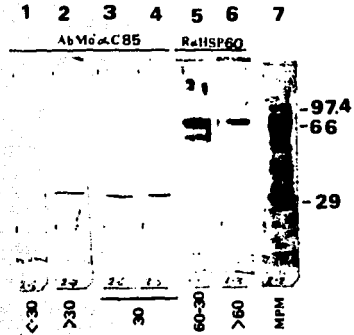


Fig. 3. Inmunoelectrotransferencia de fracciones protéicas de *M.habana* reveladas con diferentes sueros. Carriles 1, 2 y 3 revelados con suero de ratón contra la proteína de choque térmico de 60 kDa, carriles 4, 5 y 6 revelados con anticuerpo monoclonal de ratón contra el doblete 28/30 kDa de BCG (Complejo 85).

Fracción	DTH + / Total de cobayos inmunizados 24 hrs.		Promedio de induración en mm ± desv. estd. 24 hrs.		DTH + / Total de cobayos inmunizados 48 hrs.		Promedio de induración en mm ± desv. estd. 48 hrs.	
	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana
>60 kDa								
0.1 µg	0/4	0/4	0.0	0.0	0/4	0/4	0.0	0.0
1.0 µg	2/4	4/4	3.0±1.0	8.2±1.1	0/4	4/4	1.0±1.7	6.7±0.8
10.0 µg	4/4	4/4	9.8±3.3	15.5±1.6	4/4	4/4	8.2±1.8	14.7±0.8
60-30 kDa								
0.1 µg	0/4	0/4	0.0	0.0	0/4	0/4	0.0	0.0
1.0 µg	0/4	3/4	0.0	7.0±0.8	0/4	3/4	0.0	8.7±0.9
10.0 µg	4/4	4/4	9.0±1.2	11.8±0.4	4/4	4/4	7.5±1.6	13.0±0.7
30 kDa								
0.1 µg	0/4	0/4	0.0	0.0	0/4	0/4	0.0	0.0
1.0 µg	1/4	3/4	6.0	6.6±1.7	1/4	3/4	5.0	4.7±0.0
10.0 µg	4/4	4/4	8.5±2.3	12.8±1.5	4/4	4/4	8.2±2.4	13.7±1.3
> 30 kDa								
0.1 µg	0/4	0/4	0.0	0.0	0/4	0/4	0.0	0.0
1.0 µg	3/4	4/4	7.7±1.7	9.8±1.9	1/4	3/4	6.0	7.0±1.6
10.0 µg	4/4	4/4	12.6±2.7	13.5±1.1	4/4	4/4	12.0±2.0	13.2±3.5
<30 kDa								
0.1 µg	0/3	4/4	0.0	9.2±1.9	0/3	4/4	0.0	7.5±1.1
1.0 µg	3/3	4/4	9.6±2.4	14.3±1.3	3/3	4/4	10.7±2.5	12.8±0.4
10.0 µg	3/3	4/4	15.6±1.2	21.3±1.9	3/3	4/4	13.7±1.2	18.0±1.2
MH 5µg	3/4	4/4	9.3±1.9	12.0±1.9	3/4	4/4	9.3±2.4	13.2±1.8
ML 5µg	4/4	2/4	7.8±0.4	7.0±1.0	4/4	2/4	6.3±1.3	5.0±0.0

Tabla 1. Reacciones de hipersensibilidad tardía en cobayos de 500 g de peso inmunizados con M. habana o M. leprae y retados con las fracciones proteicas de M. habana. Grupos de 4 cobayos de 500 g de peso fueron inmunizados con 5X10⁸ bacilos de M. habana o M. leprae (muertos por calor), distribuidos en cinco sitios en la base del cuello. Despues de 4 semanas cada grupo se retó en forma i.d. con 0.1, 1 y 10 µg de las fracciones proteicas de M. habana, 5 µg de extracto soluble de M. habana (MH) y 5 µg de extracto soluble de M. leprae (ML). Los diámetros de induración fueron medidos a las 24 y 48 h.

Fracción	DTM * / Total de cobayos no inmunizados: 24 hrs.	Promedio de induración en mm ± desv. estd. 74 hrs.	DTM * / Total de cobayos no inmunizados 48 hrs.	Promedio de induración en mm ± desv. estd. 48 hrs.
60 kDa				
0.1 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
1.0 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
10.0 µg	5/5	9.0±1.8	5/5	6.0±0.6
60-30 kDa				
0.1 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
1.0 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
10.0 µg	1/5	6.0	0/5	0.0
30 kDa				
0.1 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
1.0 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
10.0 µg	5/5	7.8±0.4	2/5	6.0±1
>30 kDa				
0.1 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
1.0 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
10.0 µg	5/5	7.6±1.9	5/5	4.6±2.3
<30 kDa				
0.1 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
1.0 µg	0/5	0.0	0/5	0.0
10.0 µg	5/5	11.0±2.3	5/5	5.8±0.8
MH 5µg	1/5	6.0	0/5	0.0
ML 5µg	0/5	0.0	0/5	0.0

Tabla 2. Reacciones de hipersensibilidad tardía en cobayos de 500 g de peso no inmunizados y retados con las fracciones protéicas de *M. habana*. Grupos de 4 cobayos de 500 g de peso fueron retados en forma i.d. con 0.1, 1 y 10 µg de las fracciones protéicas de *M. habana*, 5 µg de extracto soluble de *M. habana* (MH) y 5 µg de extracto soluble de *M. leprae* (ML). Los diámetros de induración fueron medidos a las 24 y 48 h.

Fracción	DTR + / Total de cobayos inmunizados 24 hrs.		Promedio de induración en mm ± desv. estd. 24 hrs.		DTR + / Total de cobayos inmunizados 48 hrs.		Promedio de induración en mm ± desv. est. 48 hrs.	
	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana
>60 kDa								
0.1 µg	-	0/4	-	0.0	-	0/4	-	0.0
1.0 µg	-	1/4	-	5.0	-	0/4	-	0.5±0.9
10.0 µg	4/4	4/4	7.5±1.7	10.0±2.5	4/4	3/4	6.3±1.6	6.5±0.9
60-30 kDa								
0.1 µg	-	0/4	-	0.0	-	0/4	-	0.0
1.0 µg	-	1/4	-	5.0	-	0/4	-	0.0
10.0 µg	4/4	4/4	10.0±1.6	10.0±1.6	4/4	4/4	8.5±0.7	6.5±1.2
30 kDa								
0.1 µg	-	0/4	-	0.0	-	0/4	-	0.0
1.0 µg	-	1/4	-	6.0	-	1/4	-	6.0
10.0 µg	4/4	4/4	9.0±0.0	9.3±1.1	4/4	4/4	8.5±0.5	7.0±1.6
> 30 kDa								
0.1 µg	-	0/4	-	0.0	-	0/4	-	0.0
1.0 µg	-	2/4	-	5.5±0.5	-	0/4	-	0.0
10.0 µg	4/4	4/4	8.3±0.4	9.0±0.7	4/4	1/4	7.3±0.5	6.0
<30 kDa								
0.1 µg	-	0/4	-	0.0	-	0/4	-	0.0
1.0 µg	-	4/4	-	11.3±1.8	-	4/4	-	8.5±0.5
10.0 µg	4/4	4/4	13.5±1.1	15.5±1.8	4/4	4/4	11.8±1.1	12.0±0.7
MH 5µg	4/4	4/4	9.3±1.5	14.7±1.8	4/4	4/4	8.3±0.8	8.75±0.8
ML 5µg	4/4	4/4	7.0±0.7	6.7±1.3	4/4	4/4	5.5±0.5	5.5±1.5

Tabla 3. Reacciones de hipersensibilidad tardía en cobayos de 300 g de peso inmunizados con M. habana o M. leprae y retados con las fracciones proteicas de M. habana. Grupos de 4 cobayos de 300 g de peso fueron inmunizados con 5x10⁷ bacilos de M. habana o M. leprae (muertos por calor), distribuidos en cinco sitios en la base del cuello. Después de 4 semanas cada grupo se retó en forma i. d. con 0.1, 1 y 10 µg de las fracciones proteicas de M. habana, 5 µg de extracto soluble de M. habana (MH) y 5 µg de extracto soluble de M. leprae (ML). Los diámetros de induración fueron medidos a las 24 y 48 h. Los animales inmunizados con M. leprae únicamente fueron retados con las fracciones a una concentración de 10 µg.

Fracción	DTR + / Total de cobayos inmunizados 24 hrs.		Promedio de induración en mm ± desv. estd. 24 hrs.		DTH + / Total de cobayos inmunizados 48 hrs.		Promedio de induración en mm ± desv. est. 48 hrs.	
	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana	M. leprae	M. habana
<30 kDa S/C	4/4	3/3	10.8±0.8	13.3±0.5	4/4	3/3	10.2±0.4	10.3±0.5
	4/4	3/3	9.3±1.5	11.6±0.4	4/4	3/3	8.3±0.8	10.3±1.6
	4/4	3/3	7.0±0.7	6.6±0.4	4/4	3/3	5.5±0.5	6.7±0.5

Tabla 4. Reacciones de hipersensibilidad tardía en cobayos de 300 g de peso inmunizados con *M. habana* o *M. leprae* y retados con la fracción protéica de *M. habana* <30 kDa sin azul de bromofenol. Grupos de 4 cobayos de 300 g de peso fueron inmunizados con 5X10⁷ bacilos de *M. habana* o *M. leprae* (muertos por calor), distribuidos en cinco sitios en la base del cuello. Después de 4 semanas cada grupo se retó en forma i.d. con 10 µg de la fracción protéica de *M. habana* <30 kDa sin azul de bromofenol, 5 µg de extracto soluble de *M. habana* (MH) y 5 µg de extracto soluble de *M. leprae* (ML). Los diámetros de induración fueron medidos a las 24 y 48 h.

DTH EN COBAYOS INMUNIZADOS CON MICOBACTERIAS (24 H)

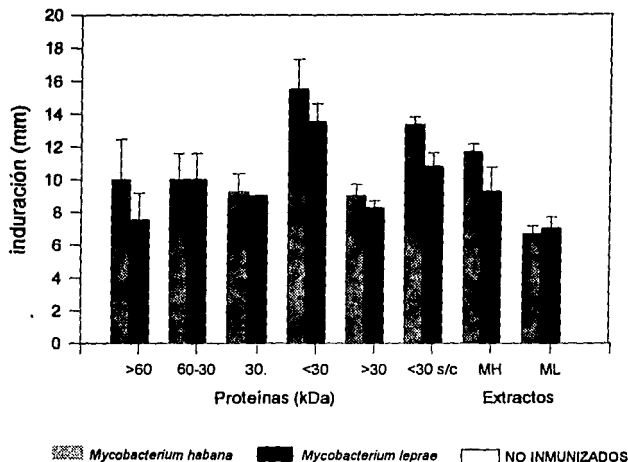


Fig. 4. DTH en cobayos inmunizados con *M.habana* o *M.leprae* y retados con fracciones proteicas de *M.habana*. Grupos de 4 animales de 300-350 g de peso fueron inmunizados con 5×10^8 bacilos de *M.habana* o *M.leprae* muertos por calor en la base del cuello. Después de 4 semanas cada grupo se retó en forma intradérmica con 0.1, 1 y 10 mcg de las fracciones proteicas de *M.habana*, 10 mcg de la fracción proteica de < 30 kDa s/c (sin colorante azul de Bromofenol), 5 mcg de extracto soluble de *M.habana* (MHSE), 5 mcg de extracto soluble de *M.leprae* (MLSE). Cada barra es el promedio de induración de los 4 animales a las 24 h. **NOTA:** Los cobayos no inmunizados no aparecen en la gráfica porque no hubo respuesta de DTH.

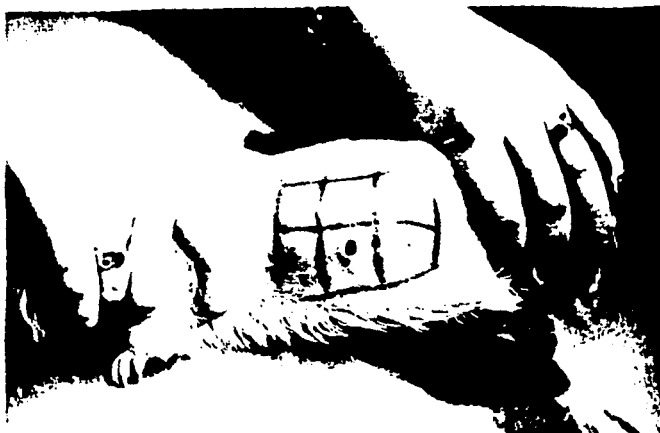


Fig. 5. Inducción de DTH (48 H) con fracciones proteicas de *M.habana* en un cobayo sensibilizado con *M.leprae*. Las fracciones proteicas se encuentran a una concentración de 10 mcg/0.1 ml en el siguiente orden:

> 60 kDa	60 - 30 kDa	> 30 kDa
30 kDa	< 30 kDa	< 30 kDa s/c

DISCUSION.

Puesto que se desconoce la existencia de un reservorio para el *M.leprae* excepto el hombre, puede sugerirse que los individuos infectados sin diagnóstico, son la fuente principal de la propagación de la enfermedad, por lo que la clave del control y erradicación de la lepra es la identificación y tratamiento de los enfermos.

A pesar del desenvolvimiento de una multitud de procedimientos complejos para la evaluación de la respuesta inmune celular, la prueba cutánea de hipersensibilidad tardía se considera como un útil instrumento de diagnóstico (37).

En la infección leprosa, las micobacterias persisten como parásitos intracelulares, por lo que la inmunidad celular que casi siempre se correlaciona con la hipersensibilidad tardía interviene de manera crucial en la defensa del hospedero (10,21,25).

En estudios recientes se ha encontrado que *M.habana* protege en un 100% a ratones contra la infección con *M.leprae*, además de ser cultivable *in vitro*. Con la intención de identificar antígenos de *M.habana* que puedan inducir respuestas de hipersensibilidad tardía (DTH) en animales sensibilizados con *M.leprae* o *M.habana*, se obtuvieron fracciones proteicas de MHSE. Las fracciones obtenidas fueron las siguientes: >60kDa, 60-30 kDa, 30 kDa, <30 kDa y >30 kDa.

Todas las fracciones fueron probadas a concentraciones de 0.1, 1 y 10 mcg/0.1 ml, tanto en los cobayos sensibilizados con *M.habana* o *M.leprae* como en los cobayos no inmunizados.

Debido a que en el experimento las fracciones indujeron respuesta de DTH en los cobayos no inmunizados en una concentración de 10 mcg/0.1 ml, se repitió el experimento con cobayos de menor edad y peso.

Ninguna de las fracciones indujo respuesta de DTH a concentraciones de 0.1 y 1 mcg/0.1 ml, en ninguno de los dos experimentos, lo que demuestra que esas dosis no son capaces de inducir respuesta de hipersensibilidad tardía bajo nuestras condiciones de trabajo.

Todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml indujeron respuesta de DTH tanto en cobayos sensibilizados con *M.habana* como con *M.leprae* en los dos experimentos, lo que demuestra reactividad cruzada entre ambas micobacterias.

En el primer experimento, como ya se ha mencionado, todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml indujeron respuesta de DTH en los cobayos no inmunizados, lo cual pudo haber sido porque se utilizaron cobayos de mayor edad, que al estar en contacto con micobacterias del medio ambiente durante tanto tiempo, pudieron haber generado respuesta inmune contra ellas, con epitopos de reacción cruzada con *M.habana* y *M.leprae*.

Se repitió el experimento con cobayos más jóvenes y ninguna de las fracciones indujo respuesta de DTH en cobayos no inmunizados a ninguna concentración, confirmando la especificidad de las DTH.

Ni la solución salina ni el testigo de gel indujeron respuesta de DTH en ninguno de los cobayos, en ningún experimento, lo cual confirma que las respuestas de DTH efectivamente fueron causadas por las fracciones proteicas y no por la solución salina o algún componente del gel.

La fracción que indujo la mayor respuesta de DTH en ambos grupos de cobayos y en ambos experimentos fue la fracción <30 kDa.

En el grupo de proteínas <30 kDa existen epítomos comunes entre *M.habana* y *M.leprae* como el epítomo de la proteína de 18 kDa (18), el cual podría ser un antígeno de reacción cruzada entre ambas micobacterias, ya que es una proteína de choque térmico. También se sabe de la existencia de otra proteína de choque térmico de 10 kDa que presenta *M.leprae*, la cual también podría estar presente en *M.habana* y presentar epítomos de reacción cruzada (20).

Estrada García y colaboradores analizaron la capacidad de 10 péptidos para inducir respuestas de hipersensibilidad tardía en cobayos sensibilizados con *M.leprae* o con BCG. Los péptidos corresponden a la secuencia de aminoácidos de las proteínas de *M.leprae* de 65 kDa, 28 kDa, 18 kDa, el péptido de la proteína de 18 kDa fue capaz de inducir reacciones positivas de DTH en más del 40% de los animales inmunizados con *M.leprae*, lo cual confirma la capacidad de la proteína de 18kDa de inducir DTH (8).

Andersen y Heron estudiaron la respuesta inmune celular de memoria contra diferentes fracciones de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales fueron purificadas de acuerdo al método descrito por Sadamu Nagai y colaboradores (23) y encontraron que las fracciones < 20 kDa fueron las que mostraron una mayor respuesta celular, en especial la fracción de 14.4 kDa (2), lo cual coincide con nuestros resultados de la fracción < 30 kDa.

También es importante considerar la fracción de 30 kDa, ya que aunque la respuesta de DTH fue menor que con la fracción <30 kDa, la respuesta de DTH es aceptable, y esta fracción es importante ya que en trabajos anteriores, estudiando la respuesta inmune humoral de pacientes con lepra hacia antígenos de *M.habana*, se encontraron anticuerpos de la clase IgG contra una proteína de aproximadamente 28/30 kDa, los cuales no fueron encontrados en pacientes con tuberculosis pulmonar activa ni en individuos sanos. En el caso de *M.tuberculosis*, se ha observado un alto título de IgG contra el doblete 28/30 kDa en pacientes con lepra lepromatosa, no así en pacientes con lepra tuberculoide (6,8,26).

Como pudimos observar, la fracción > 30 kDa, a pesar de tener mayor cantidad de proteínas no fue capaz de inducir una respuesta tan alta como la fracción < 30 kDa, lo mismo podemos observar con el extracto completo MHSE, la cual induce una respuesta parecida a la fracción > 30 kDa, por lo que suponemos que algunas fracciones > o = 30 kDa pueden estar suprimiendo el efecto protector.

Desde el descubrimiento de la tuberculina por Koch, el cobayo ha sido reconocido como el mejor animal de experimentación para el estudio inmunológico de micobacteriosis. Las bases de este hecho, son su elevada susceptibilidad a la infección con tuberculosis y el alto grado de hipersensibilidad tardía que desarrolla después de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* o inmunización con antígenos de micobacterias. Este hecho coloca al cobayo como el modelo experimental ideal para ensayar posibles reactivos para pruebas cutáneas de hipersensibilidad tardía.

La capacidad de montar respuestas inmunológicas de tipo celular contra antígenos de micobacterias puede encontrarse bajo control genético, y por lo tanto es importante considerar este hecho junto con la futura caracterización y desarrollo de antígenos definidos para uso diagnóstico. Con base en lo anterior, es fácil suponer que la variabilidad en nuestros resultados y las respuestas de DTH positivas en los cobayos no inmunizados en el primer experimento pueden deberse a la edad (a mayor edad, mayor exposición a las micobacterias, en general) y al uso de una cepa abierta de cobayos Hartley.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las fracciones de MHSE pueden ser utilizadas para el estudio de reacciones inmunológicas a antígenos de *M.leprae*. Existen otras preparaciones como la lepromina y la leprosin A (mezclas complejas obtenidas a partir de bacilos de *M.leprae* muertos por calor o radiación) ampliamente utilizadas para este fin, aunque dichas preparaciones son útiles bajo muchas condiciones, carecen de especificidad para la detección de DTH hacia *M.leprae*.

CONCLUSIONES.

1.- Todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml fueron capaces de inducir respuestas de DTH, tanto en cobayos sensibilizados con *M.habana* como con *M.leprae*, lo que demuestra reactividad cruzada entre ambas micobacterias

2.- La inducción de DTH fue mayor en los animales inmunizados con *M.habana*.

3.- La fracción <30 kDa fue capaz de inducir la mayor respuesta de DTH en ambos grupos de cobayos.

4.- Ninguna de las fracciones fue capaz de inducir respuesta de DTH a concentraciones de 0.1 mcg/0.1 ml y 1 mcg/0.1 ml.

5.- Todas las fracciones a una concentración de 10 mcg/0.1 ml indujeron respuesta de DTH en cobayos no inmunizados de 400-500 g de peso de un año de edad.

6.- Ninguna de las fracciones fue capaz de inducir respuestas de DTH en cobayos de 300-350 g no inmunizados a ninguna concentración, confirmando la especificidad de las respuestas de DTH.

7.- Ni la solución salina ni el testigo de gel fueron capaces de inducir respuestas de DTH en ningún grupo de cobayos, lo cual confirma que las respuestas de DTH fueron causadas por las fracciones proteicas y no por la solución salina ni por algún componente del gel.

8.- Nuestros resultados sugieren que todas las fracciones obtenidas fueron buenos reactivos para la inducción de DTH en cobayos sensibilizados con *M.leprae* o *M.habana*. Aunque la fracción <30 kDa es la que indujo mejores respuestas de DTH.

APENDICE.

1.- MEDIO DE CULTIVO.

- Medio de Youmans modificado por Proskauer y Beck (PBY).

Asparagina	0.5 g
$K_2H_2PO_4$	0.5 g
K_2SO_4	0.05 g
Glicerol	2 ml
H ₂ O destilada c.b.p.	100 ml

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

2. - DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY.

Reactivo A.

Tartrato de sodio y potasio al 4%	2 ml
Carbonato de sodio al 3% en NaOH al 0.1%	94 ml
Sulfato de cobre al 1%	4 ml

Adicionar 3 ml del reactivo A a la muestra y mezclar. Después de 10 minutos adicionar 0.5 ml del reactivo de Folin diluido 1:2 con agua destilada y mezclar. Preparar una curva de calibración con una solución de albúmina con un límite de concentración de 20 a 200 mcg de proteína. Incubar por 30 minutos y leer la densidad óptica a 650 nm.

3.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS (SDS-PAGE).

- Acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%.

Acrilamida 150 g

Bisacrilamida 4 g

Disolver la acrilamida en 200 ml de agua destilada y desionizada. Disolver la bisacrilamida en 100 ml de agua bidestilada previo calentamiento. Mezclar las soluciones y ajustar el volumen a 500 ml. Filtrar a través de papel Whatman No. 1. Conservar a 4°C en frasco ámbar.

- SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 g

Agua bidestilada c.b.p. 100 ml

- Solución de Ditiotretolol 1M (DTT).

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 1 M (PM=154.24). En otro tubo Eppendorf medir el volumen anterior y hacer una marca que servirá como guía para el aforo del tubo con el DTT. Afórar, disolver y conservar a -20°C.

- 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 121.1 g 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 2M pH 8.8. Pesar 121.1 g de Tris-base, disolver en 120 ml y ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 200 ml con agua bidestilada.

- Regulador de corrimiento 10X.

Tris-base	15 g
Glicina	72 g
Agua bidestilada c.b.p.	500 ml

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

- Regulador para la muestra 2X.

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

Para utilizarse con la muestra en el gel:

Regulador de la muestra	400 mcl
SDS al 10%	90 mcl
DTT 1 M	10 mcl

- Butanol saturado con agua.

Mezclar 80 ml de n-butanol con 100 ml de agua. Mezclar enérgicamente y dejar que se separen las dos capas. Colocar la capa superior (butanol) en una botella con 15 ml de agua.

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

	para 10 ml de R	para 5 ml de S
Agua	4.5 ml	3.178 ml
RB	2.0 ml	-
SB	-	1.25 ml
Acril/bis	3.335 ml	0.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	50.0 mcl
TEMED	5.0 mcl	2.5 mcl
APS 10%	50.0 mcl	20.0 mcl

- Geles al 5%/17.5% (gel concentrador (S)/gel de resolución (R)).

	para 10 ml de R	para 5 ml de S
Agua	2.01 ml	2.84 ml
RB	2 ml	-
SB	-	1.25 ml
Acril/bis	5.8 ml	835 mcl
SDS 10%	100 mcl	50 mcl
TEMED	5 mcl	2.5 mcl
APS 10%	50 mcl	25 mcl

- Solución de tinción para geles.

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

- Solución fijadora y desteñidora para geles.

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

4.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WB).

- Regulador de transferencia 5X (5XTB)

Tris-base 125 mM	15.15 g
Glicina 960 mM	72.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Para usar preparar regulador 1X TB:

5X TB	200 ml
Metanol 20%	200 ml
Agua destilada	600 ml

- Regulador de fosfatos y salina (PBS) 10X

NaCl	80.0 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	8.64 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Para usar diluir 1:10 con agua bidestilada.

- Regulador de fosfatos y salina con Tween (PBST 1X).

5X PBS	200 ml
Agua destilada	800 ml
Tween 20	0.5 ml

- Solución de bloqueo.

Leche descremada al 5% en PBS 1X.

- Regulador del anticuerpo.

Leche descremada al 1% en PBST 1X.

- Solución de revelado para conjugado con peroxidasa.

1) 3 amino, 9 etil-carbazolona.

- Disolver 6 mg de 3 amino, 9 etil-carbazolona en 1.25 ml de N,N' dimetilformamida.

- Mezclar 25 ml de regulador de acetatos 0.05 M pH 5.0 con 25 mcl de H₂O₂ al 30%.

- Mezclar las soluciones preparadas.

- Parar la reacción con agua.

2) Regulador de acetatos.

Solución A: Acido acético 0.2 M

Solución B: Acetato de sodio 0.2M

Mezclar volumen a volumen para obtener pH 5.

- Solución de tinción para transferencias (amido negro al 0.1%).

Amido negro 10 B 30 mg

Acido acético glacial 3 ml

Alcohol isopropílico 13.5 ml

Agua destilada 13.5 ml

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Solución desteñidora.

Metanol	45 ml
Acido acético glacial	10 ml
Agua destilada	5 ml

BIBLIOGRAFIA.

1.- Amezcua Ch.M.E., Castellanos G.G., Castro B.E., Escobar G.A., Estrada G.I., Estrada P.S., Flores A.O., Quezada P.F., Rodríguez R.O., Santamaría G.V. Lepra: Pasado, presente y perspectivas para el futuro. Publicación técnica del INDRE # 15, México, 1992. pp. 3-6, 15-18, 27, 33, 80-81, 91.

2.- Andersen Peter & Heron Iver. Specificity of a Protective Memory Immune Resaponse against *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity. 61 (1993): 844-851.

3.- Bellanti J.A. Inmunología. Editorial Interamericana. México, 1991. pp. 242-251.

4.- Britton W.J., Hellquist L., García R.J., Basten A. Antigens of *Mycobacterium leprae* Identified by immunoprecipitation with sera from leprosy and tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 71 (1988): 394-398.

5.- Collins F.M., Morrison N.E., Watson S.R., Fernandez and Mitsuda Reactivity in Guinea Pigs Sensitized with Heat-killed *Mycobacterium leprae*: Persistence and specificity of skin Reactivity to soluble and Particulate Antigens. Int. J. Lepr. 51 (1983): 481-489.

6.- Daniel, T.M. & Janicki, B.W. Mycobacterial Antigens: A review of their isolation, chemistry and immunological properties. Microb. Rev. 42(1978): 84-113.

7.- Das P.K., Rambukkana., Bass J.G., Grootuis D.G., Halperin M. Enzyme-linked immunosorbent assay for distinguishing serological responses of lepromatous and tuberculoid leproses to the 29/33 kilodalton doublet and 64 kilodalton antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Microbiol. 28 (1990): 379-382.

8.- Estrada G.I., Gutierrez M.C., Esparza J., Quezada P.F., Estrada P.S., Possani L.B. Use of Synthetic peptides corresponding to sequences of *Mycobacterium leprae* proteins to study Delayed-type Hypersensitivity Response in sensitized guinea pigs. Int. J. lepr. 60 (1992):18-27.

9.- Espitia C., Scuito E., Botasso O., González amaro R., Hernandez Pando R., Mancilla R. High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa in tuberculosis and lepromatous leprosy. Clin. Exp. Immunol. 87(1992): 362-367.

10.- Fine P.E.M., Ponnighaus J.M., Maine N.P. The relationship between delayed type hypersensitivity and protective immunity induced by mycobacterial vaccines in man. Lepr. Rev. 57(1986):275-283.

11.- Gaylord H & Brennan P.J. Leprosy and the leprosy bacillus: Recent developments in characterization of antigens and immunology of disease. Ann. Rev. Microbiol. 41 (1987): 645-675.

12.- Gershoni J.M., Palade G.E. Protein Blotting: Principles and Applications. Analy. Bioch. 131 (1983): 1-15.

13.- Gupta H.P., Mathur I.S., Singh N.B. Protective effect of *Mycobacterium habana* in mice against infection with indigenous strains of *M.tuberculosis*. *Curr. Sci.* 53(1984): 695-697.

14.- Gupta H.P., Mathur I.S., Singh N.B., Gupta S.I. *Mycobacterium habana*, a new immunogenic strain in experimental tuberculosis of mice. *Indian J. Exp. Biol.* 17(1979) : 1190-1193.

15.- Gupta H.P., Singh N.B., Kumar A. Containment of *Mycobacterium leprae* multiplication in foot-pads of *Mycobacterium habana* vaccinated animals. *Biol. Mem.* 13 (1987) : 174-178.

16.- Jawetz E., Melnick J.L. *Microbiología Médica*. Editorial El manual moderno. México 1990. pp. 264-265.

17.- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970): 680-685.

18.- Lamb F.I., Singh N.B., Colston M.J. The specific 18-kilodalton antigen of *Mycobacterium leprae* is present in *Mycobacterium habana* and functions as a heat-shock protein. *J. Immuno.* 144(1990): 1922-1925.

19.- Lowry H.O., Rosebrouh N.I., Far A.L. & Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951):265-275.

20.- Mehra V. & Bloom R.A. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10 kDa Heat-shock cognate protein. *J. Exp. Med.* 175 (1992):275-284.

21.- Mehra V. & Bloom B.R. Induction of Cell-mediated immunity to *Mycobacterium leprae* in guinea pigs. Infection and Immunity, 23 (1979):787-794.

22.- Meissner G. & Schroder K.H. Relationship between *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium habana*. Am. Rev. Respir. Dis. 111 (1975):196-200.

23.- Nagai S., Gotten W.H., Harboe M., Kinomoto M. Isolation and Partial Characterization of Major Protein Antigens in the Culture Fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity 59 (1991): 372-382.

24.- Ortiz O.L., Inmunología. Editorial Interamericana. México, 1990. pp. 221, 226-227.

25.- Patel P.J., Lefford M.J., Induction of cell-Mediated immunity to *Mycobacterium leprae* in mice. Infection and immunity 19(1978) pp.87-93.

26.- Rees R.J.W., Waters M.F.R., Palmer E. Experimental lepromatous leprosy. Nature 215 (1966) 599-602.

27.- Ridley D.S. & Jopling W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. Leprosy. 34 (1966):255-273.

28.- Rumschlag H.S., Sninnick T.M., Cohen M.L. Serogical responses of Patients with Lepromatous and Tuberculoid Leprosy to 30-, 31-, and 32 kilodalton antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microb. 26 (1988): 2200-2202.

29.- Shinnick T.M. Peptides as potential immunodiagnostic reagents to detect mycobacterial infections. *Lepr. Rev.* 57 (Suppl. 2) (1986):149-155.

30.- Singh N.B., Gupta H.P., Mathur I.S., Srivastava A. A novel immunogenic strain: *Mycobacterium habana* against *Mycobacterium ulcerans* (Buruli ulcer) infection in mice. *Curr. Sci.* 50 (1981):994-996.

31.- Singh N.B., Gupta H.P., Srivastava A., Kaul S.M., Chautoraol V.K. A prospective broad spectrum antimycobacterial candidate vaccine: *M.habana*. *Indian J. Lep.* 60 (1988): 407-412.

32.- Singh M.B., Gupta H.P., Srivastava A., Kaul S.M., Shukla O.P. Antigen cross reactivity between *Mycobacterium habana* and *Mycobacterium leprae* monitored through foot pad enlargement (FPE) in mice. *Biol. Mem.* 14:2 (1988): 199-204.

33.- Singh N.B., Lowe A.C.R.E., Rees R.J., Colston M.J. Vaccination of mice against *Mycobacterium leprae* infection. *Infec. Immun.* 57 (1989):653-655.

34.- Singh N.B., Srivastava A., Gupta H.P. Induction of lepromin positivity in monkeys by a candidate antileprosy vaccine: *Mycobacterium habana*. *Int. J. Lepr.* 56(1991):317-320.

35.- Smelt A.H.M., Rees R.J.W., Llew F.Y. Induction of delayed type hypersensitivity to *Mycobacterium leprae* in healthy individuals. *Immunol. Clin. Exp.* 44(1981):501-506.

36.- Smelt A.H.M., Rees R.J.W., Llew F.Y. Failure to induce delayed type hypersensitivity to *Mycobacterium leprae* in long-term treated lepromatous leprosy patients. Clin. Exp. Immunol. (1981) 44, 507-511

37.- Stites D.P., Fudenberg H.H., Stobo J.D., Wells J.V. Inmunología básica y clínica. El manual moderno S.A. de C.V. México pp. 281-283, 326, 564-568, 698.

38.- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979):4350-4354.

39.- Valdivia Alvarez J., Suárez Méndez R., Echemendia Font M. *Mycobacterium habana*: posible nueva especie dentro de las micobacterias no clasificadas. Bol. Hig. Epid. 9 (1971):65-73.