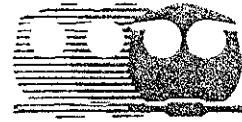


116



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

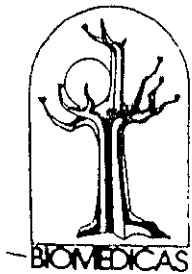
“RESPUESTA INMUNE CELULAR A LA PROTEÍNA DE 50KDA
DE *Mycobacterium vaccae*.”

295805

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
REYES MARIANO



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2001



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN

- I-1. - Aspectos generales de la tuberculosis y su agente causal el *Mycobacterium tuberculosis*.
- I-2. - Patogenia de la tuberculosis.
- I-3. - Inmunología de la tuberculosis.
 - I-3-1. - El papel de los anticuerpos en respuesta a la tuberculosis.
 - I-3-2. - Linfocitos T CD4 y CD8 en respuesta a la tuberculosis.
 - I-3-3. - El sistema fagocítico mononuclear.
- I-4. - Antígenos proteicos del *M. tuberculosis* involucrados en la respuesta inmune.
- I-5. - Importancia de la fibronectina en la respuesta inmune a las micobacterias.
- I-6. - Importancia de los carbohidratos en la respuesta inmune hacia las micobacterias.
- I-7. - *Mycobacterium vaccae*.
 - I-7-1. - Aspectos generales del *M. vaccae*.
 - I-7-2. - *M. vaccae* como agente inmunoprolifactorio.
 - I-7-3. - Respuesta inmune inducida por *M. vaccae*.
 - I-7-4. - Glicoproteína de 50kDa del *M. vaccae*.

II.- HIPOTESIS.

III.- OBJETIVOS.

IV.- METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

- IV-1. - Cepas bacterianas.
- IV-2. - Cultivo bacteriano y obtención de extracto proteico del filtrado de cultivo del *Mycobacterium vaccae*.
 - IV-2-1. - Precipitación proteica del filtrado de cultivo del *M. vaccae*.
- IV-3. - Cultivo bacteriano y obtención del extracto proteico del filtrado de cultivo del *M. tuberculosis*.
- IV-4. - Cultivo bacteriano y obtención del extracto proteico del filtrado de cultivo de *Streptomyces lividans*.
- IV-5. - Análisis proteico en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) e inmunoblot.
- IV-6. - Purificación de la glicoproteína de 50kDa del *M. vaccae*.

I.- Introducción.

I-1.- Aspectos generales de la tuberculosis y su agente causal el *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha afectado al hombre desde tiempos inmemoriales. Se describe como un padecimiento prevalente entre los egipcios en los años 3700 a 1000 AC. En el año 460 AC, Hipócrates describe ya la sintomatología de la enfermedad (17). En 1882 el médico alemán Robert Koch, identificó al bacilo de la tuberculosis como el agente causal de la enfermedad. Actualmente, la amplificación del DNA micobacteriano de restos humanos por PCR, ha permitido establecer la presencia de la enfermedad en momias egipcias de 5400 años de edad (14), así como en las culturas prehispánicas (16). No obstante que se considera a la tuberculosis como una de las enfermedades más antiguas de la humanidad, desde el punto de vista evolutivo *M. tuberculosis* es relativamente joven, pues se calcula que apareció aproximadamente hace 20.000 años (34).

A pesar de los esfuerzos por controlar su incidencia, la TB continúa siendo una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo. Se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada y que si no hay cambios en su incidencia cerca de 30 millones de personas morirán en los próximos años (58).

En México, la TB es la 17ª causa de muerte en la población general, la 8ª en menores de edad y 3ª en la población inmunodeficiente, sin embargo es la primera causa de mortalidad causada por un sólo agente infeccioso (68).

El resurgimiento de la tuberculosis se atribuye a diferentes causas como son. 1. - La asociación de esta enfermedad con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). 2. - El surgimiento de cepas multi-resistentes al tratamiento. 3. - El fracaso de la vacunación con la cepa atenuada del *Mycobacterium bovis* BCG (bacilo de Calmette Guérin), usada desde 1927 en diferentes partes del mundo.

Debido a la variable eficacia de esta vacuna que oscila desde cero hasta un 80%, su efecto protector es motivo de controversia. Actualmente la vacuna BCG se aplica sólo a los infantes durante el primer año de vida en los países en vías de desarrollo y en los países desarrollados su uso se limita a los casos detectados negativos a la prueba cutánea de PPD. Las causas de la variabilidad de la BCG se han atribuido a factores tales como; cambios que ha sufrido la bacteria desde su atenuación en 1921 y su primera aplicación en humanos. A partir de entonces se han generado diversas subcepas que difieren en características bioquímicas y contenido genético (9). Aunado a esto, otros factores que podrían estar influyendo son: las condiciones de vida de la población, y el constante contacto de los individuos con micobacterias saprofitas del medio ambiente.

En vista del gran problema de salud pública que constituye la tuberculosis, se requiere urgentemente de la identificación y producción de nuevos medicamentos y vacunas.

El agente causal de la tuberculosis pertenece al género *Mycobacterium*, que se encuentra ubicado dentro de la familia de las *Mycobacteriaceae*, formando parte del orden de los *Actinomycetales* y la clase *Sachizomicetos*.

presentadoras de antígeno para activar células T vírgenes. El segundo tipo de células dendríticas se llaman células dendríticas foliculares, porque están presentes en los centros germinales de los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas.

I-4.- Antígenos proteicos del *M. tuberculosis* involucrados en la respuesta inmune a la micobacteria.

Uno de los temas más estudiados en el área de la tuberculosis es el relacionado al estudio de la respuesta inmune protectora y los antígenos bacterianos que participan en ella. Recientemente se ha establecido que las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* juegan un papel muy importante en la inducción de la inmunidad protectora. Se ha sugerido que éstas pueden ser las responsables de un rápido reconocimiento del bacilo por los linfocitos del huésped. Esta teoría es apoyada por la existencia de una fuerte correlación entre la multiplicación bacteriana en el huésped y la reacción de las células T contra las proteínas de secreción. La caracterización de las proteínas secretadas activamente por la bacteria se ha llevado a cabo en extractos proteicos obtenidos del filtrado de cultivo de la bacteria a tiempos cortos. El análisis de las proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio (PAGE-SDS) mostró que durante los primeros tres días predominan las proteínas de peso molecular de 22 a 24kDa y de 45 a 50kDa. El día 5 aparece una pronunciada banda de 11kDa y varias bandas en la región de 30 a 35kDa. Durante el último periodo de cultivo, el número de proteínas presentes en el filtrado se incrementa substancialmente, produciendo un muy variado y complejo patrón de bandas (24,4).

La identificación de estas proteínas ha sido revelada por secuenciación de las regiones aminoterminales de las proteínas separadas en geles de doble dimensión, lo que ha permitido compararlas con las secuencias reportadas en la base de datos del genoma de *M. tuberculosis* concluida recientemente (12). Así mismo el uso de sueros de conejo y anticuerpos monoclonales de ratón originado en contra de las proteínas micobacterianas han permitido detectar su presencia en otras especies de micobacterias, siendo raras las proteínas individuales que son específicas de la especie (41).

Entre las proteínas de secreción específicas del complejo *M. tuberculosis* más ampliamente estudiadas por su participación en la respuesta inmune están;

- La glicoproteína de 38 kDa, o PstS-1 que tiene una función importante en el sistema de transporte de fosfato del *M. tuberculosis* (22). Esta proteína inmunodominante ha sido considerada como un marcador de la enfermedad, al ser reconocida por un alto porcentaje de sueros de enfermos con TB (21). Los estudios de caracterización de la proteína de 38 kDa realizados por Vordermeier et. al., condujeron a la identificación de un epítipo localizado en los residuos de amino ácidos entre 350-369 (péptido G) responsable de la respuesta proliferativa y de la hipersensibilidad tardía en modelos murinos (62).
- La lipoproteína de 19 kDa, que fue expresada en *M. vaccae*. En los ratones inmunizados con *M. vaccae* recombinante se obtuvo una fuerte respuesta de tipo 1 caracterizada por la producción de anticuerpos IgG2a e INF- γ . Sin embargo, a diferencia de la proteína de 38 kDa cuando los animales fueron retados con *M. tuberculosis*, no hubo evidencias de protección (60).

antígenos compartidos entre *M. vaccae* y *M. tuberculosis*. Entre los antígenos que cruzan inmunológicamente entre estas dos bacterias son la proteína de 50kDa, la proteína de choque térmico de 65 kDa y del complejo 85 A B y C que fueron reconocidas por sueros policlonales originado contra los respectivos antígenos del *M. tuberculosis*, la GP45/47kDa y la HSP65 kDa del *M. bovis* y *M. tuberculosis* respectivamente (24).

Por la secuencia amino terminal se identificó a la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3) en los filtrados de cultivo del *M. vaccae*, la cual mostró un 90% de homología con la enzima del *M. tuberculosis*. La enzima fue detectada por inmunoblot usando sueros hiperinmunes dirigidos contra la E3 de bovino y de cerdo, tanto en el extracto celular como en el filtrado de cultivo del *M. tuberculosis* y *M. vaccae* (2).

I-7-4.- Glicoproteína de 50kDa del *M. vaccae*.

En la literatura se ha descrito a una proteína de 55kDa (GP55kDa) del *M. vaccae* con capacidad de unión a FN y que presenta homología en su secuencia carboxi-terminal con la GP45/47kDa del *M. tuberculosis*. Igualmente, en nuestro laboratorio hemos identificado una proteína de 50kDa de *M. vaccae* que cruza inmunológicamente con la glicoproteína de 45/47kDa del *M. tuberculosis* (2). Estos datos sugieren que la proteína de 55 kDa es una proteína altamente conservada y es miembro de una familia de proteínas que funcionan como receptores de la FN de las micobacterias (56). La importancia de las proteínas que unen FN en micobacterias ha sido enfatizada por el hecho de que en la respuesta antitumoral inducida por *M. bovis* BCG en el tratamiento del cáncer vesical es necesaria la unión de BCG a FN dentro de la vejiga (64).

II. Hipótesis.

Se ha encontrado una proteína de 50kDa en los filtrados de cultivo del *M. vaccae* que presenta una reacción cruzada con la proteína de 45/47kDa del *M. tuberculosis* identificada con un suero de conejo inmunizado con esta proteína. Por sus características bioquímicas e inmunológicas, la proteína de 50kDa del *M. vaccae* podría jugar un papel importante en la inducción de la respuesta inmune celular, en animales previamente sensibilizados con *M. tuberculosis*.

III. Objetivos.

- ◆ Obtener y purificar la glicoproteína de 50kDa (GP50kDa) del *M. vaccae* a partir de los sobrenadantes de los filtrados del medio de cultivo del *M. vaccae*.
- ◆ Caracterizar bioquímica e inmunológicamente a la proteína de 50kDa del *M. vaccae* homóloga a las proteínas del complejo 45/47kDa de *M. tuberculosis*.
- ◆ Comparar la GP45/47kDa del *M. tuberculosis* con la GP50kDa del *M. vaccae* haciendo uso de los métodos de análisis como la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), doble dimensión y por inmunoblot.
- ◆ Estudiar la respuesta inmune linfoproliferativa a la GP50kDa del *M. vaccae* en ratones previamente sensibilizados con *M. tuberculosis* H37Rv inactivada por irradiación y compararla con su homóloga del *M. tuberculosis*.

IV. Metodología y Diseño experimental.

IV-1.- Cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron: *Mycobacterium vaccae* (NCTC 11659) donada por la Unidad de Tuberculosis del Hospital Hammersmith de Londres Inglaterra, *M. tuberculosis* cepa H37Rv y *Streptomyces lividans* TK-24 transformada con el gen que codifica para la GP45/47kDa del *M. tuberculosis*.

IV-2.- Cultivo bacteriano y obtención del extracto proteico del filtrado de cultivo (FC) del *Mycobacterium vaccae*.

El *M. vaccae* del stock a -70°C fue inoculado en medio Middlebrook 7H11 agar enriquecido con OADC (Lab. Difco) e incubada por 72 h, a 37°C . De las colonias aisladas se tomaron un par de asadas y se inocularon en 50 ml de medio Middlebrook 7H9 (Difco), suplementado con glucosa al 20% y Tween-80 al 0.05%; el cultivo se incubó con agitación (230 rpm) por 72 h a 37°C (precultivo). Posteriormente, 2 ml del precultivo se inocularon en 200 ml de medio fresco de igual manera suplementado con glucosa y Tween-80. Los matraces fueron incubados bajo las mismas condiciones de crecimiento bacteriano.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8000 rpm a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se separó del paquete celular y se filtró sucesivamente a través de membranas de 0.8, 0.44 y $0.22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro. El paquete celular se almacenó en un tubo estéril tipo FALCON sellado con parafilm, etiquetado y guardado a -70°C .

IV-2-1.- Precipitación de las proteínas del sobrenadante de cultivo del *M. vaccae*.

El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (25g/50 mL de cultivo) en frío y con agitación constante. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C . El sedimento se resuspendió en agua bidestilada y para eliminar el exceso de sales, se dializó por 72 h contra agua. La proteína se liofilizó y el sedimento se resuspendió en agua MQ para su posterior análisis y purificación.

IV-3.- Cultivo bacteriano y obtención del extracto proteico del filtrado de cultivo del *M. tuberculosis*.

El filtrado de cultivo del *M. tuberculosis* (FC-TB) se obtuvo de la cepa H37Rv incubada a 37°C en estado de reposo bajo estrictas condiciones de seguridad como se ha descrito anteriormente (23,33). Para este ensayo se usó un extracto previamente almacenado que fue obtenido en nuestro laboratorio y proporcionado por la QBP Amador J. A.

Para los ensayos de linfoproliferación se utilizaron las siguientes concentraciones tanto para las proteínas purificadas como para el FC-TB: 10, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1, 0.03 y 0.01 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Finalmente los ensayos de linfoproliferación se llevaron a cabo con ratones C57BL/6J, con una carga de 10^7 bacterias en IFA dado que presentaron una mejor respuesta y como control negativo PBS más IFA. Se ha descrito que el IFA, no tiene efecto alguno sobre el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad retardada, ni en forma más general, sobre la inmunidad celular. El IFA retarda la destrucción del antígeno e incrementa su dispersión (7).

V-11. – Protocolo para la sensibilización de ratones.

Los ratones fueron sensibilizados a la semana cero con la carga bacteriana anteriormente descrita, ocho días después les fue dado un refuerzo igual al anterior y a la tercera semana fueron sacrificados. La obtención y la cuenta de los linfocitos T se realizó siguiendo la metodología anteriormente descrita.

V. Resultados.

V-1.- Identificación y caracterización de la Glicoproteína de 50kDa del *M. vaccae*.

Los FC del *M. tuberculosis* y del *M. vaccae*, fueron analizados por PAGE-SDS e identificadas las bandas de interés que migran dentro del rango de 42 a 55 kDa, teñidos con azul de Coomassie, como se demuestra en la figura 1 panel A.

En el filtrado de cultivo del *M. vaccae* se identificó una proteína de 50kDa que reaccionó con el suero contra el antígeno proteico de 45/47kDa del *M. tuberculosis*. (Fig 1B). De manera similar, la proteína del *M. vaccae* reaccionó positivamente con Con A, una indicación de que al igual que la GP45/47kDa del *M. tuberculosis*, el antígeno del *M. vaccae* está glicosilada. (Fig 1C carril 5 y 6 respectivamente). Algunos extractos presentaron una banda de aproximadamente 40 kDa, que reaccionó con el suero de conejo (Fig. 2 A, carril 3), y a con Con A (Fig. 1C carril 7).

Puesto que esta banda aparecía principalmente en los filtrados de cultivos previamente almacenados, consideramos que puede tratarse de otras proteínas glicosiladas o de un probable producto de degradación.

Wester blot de los filtrados de cultivo de las proteínas de *M. tuberculosis* y de *M. vaccae*.

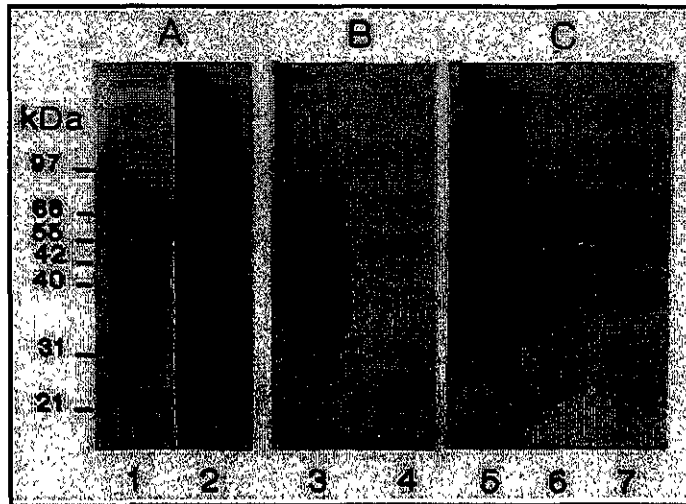


Fig. 1. PAGE-SDS del FC-TB del *M. tuberculosis* y de los FC del *M. vaccae*. Panel A, Tinción con Azul de Coomassie de los FC del *M. tuberculosis* y *M. vaccae* (carril 1 y 2 respectivamente). Panel B. Inmunoblot de los FC del *M. tuberculosis* y *M. vaccae*, revelados con el suero de conejo anti-45/47 kDa (carril 3 y 4 respectivamente). Panel C. Inmunoblot del FC del *M. tuberculosis* (carril 5) y los FC del *M. vaccae*, fresco y almacenados (carril 6 y 7 respectivamente) revelados con Concanavalina A peroxidasa.

isoelectrico ligeramente más básico en el extracto almacenado (Fig. 3 Panel A1 y B2) el cual no se presentó en el extracto fresco (Fig.3, panel B4). La tinción con azul de Coomassie del FC reveló que están presentes en éste diversas proteínas. Al separar las proteínas de los FC por doble dimensión se observó que no existen proteínas que precipitan a lo largo de un amplio espectro del punto isoelectrico (pI) en el área de migración de 50kDa según el marcador de peso molecular, lo cual sugiere que no existen isoformas de esta proteína ni de ninguna otra en el rango de peso molecular de 50kDa. En contraste con el producto de degradación de 40kDa por ejemplo, en donde migran otros tipos de proteínas. (Fig 3, panel A1 flechas).

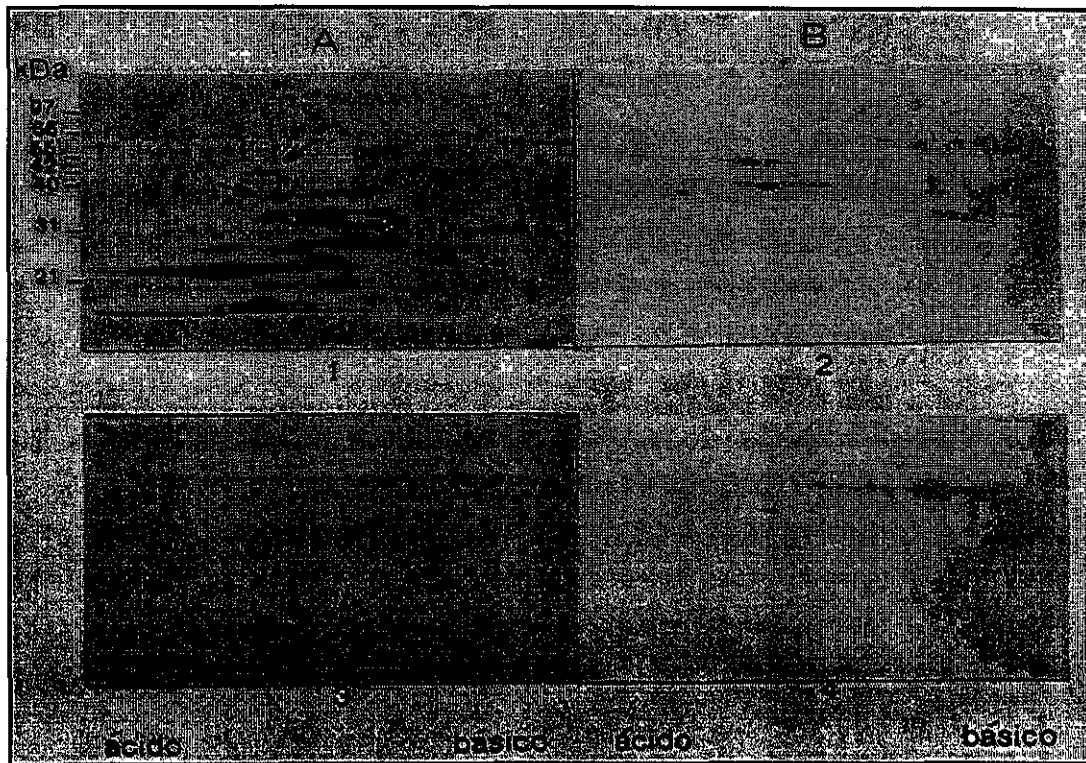
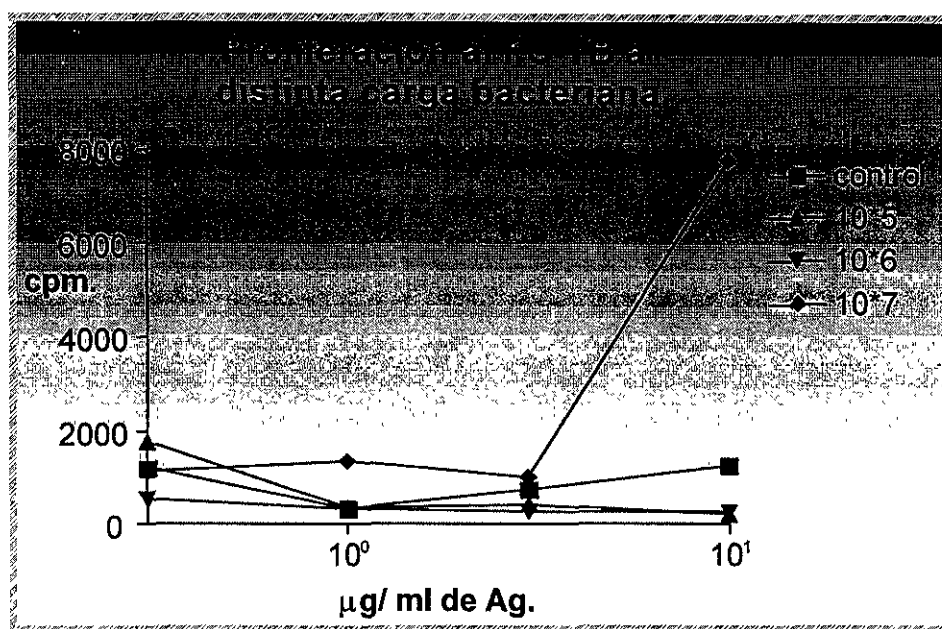


Fig.-3 Inmunoblot de filtrados de cultivo del *M. vaccae*. Panel A1; Filtrado de Cultivo (almacenado) revelado con azul de Coomassie, las flechas indican las dos bandas del antígeno de 50kDa. Panel B2 el filtrado revelados con el suero de conejo anti-45/47kDa. Panel A3. FC fresco revelado con azul de Coomassie. Panel B4 el FC revelado con el suero de conejo anti-45/47kDa.

V-5.- Respuesta proliferativa a diferentes concentraciones del FC-TB en ratones C57BL/6j sensibilizados con diferente carga bacteriana.

Los ratones fueron inmunizados con *M. tuberculosis* inactivada por irradiación a tres distintas dosis 10^5 , 10^6 y 10^7 bacterias en IFA con un refuerzo a los 8 días y posteriormente fueron extirpados los ganglios poplíteos a los siguientes 8 días.

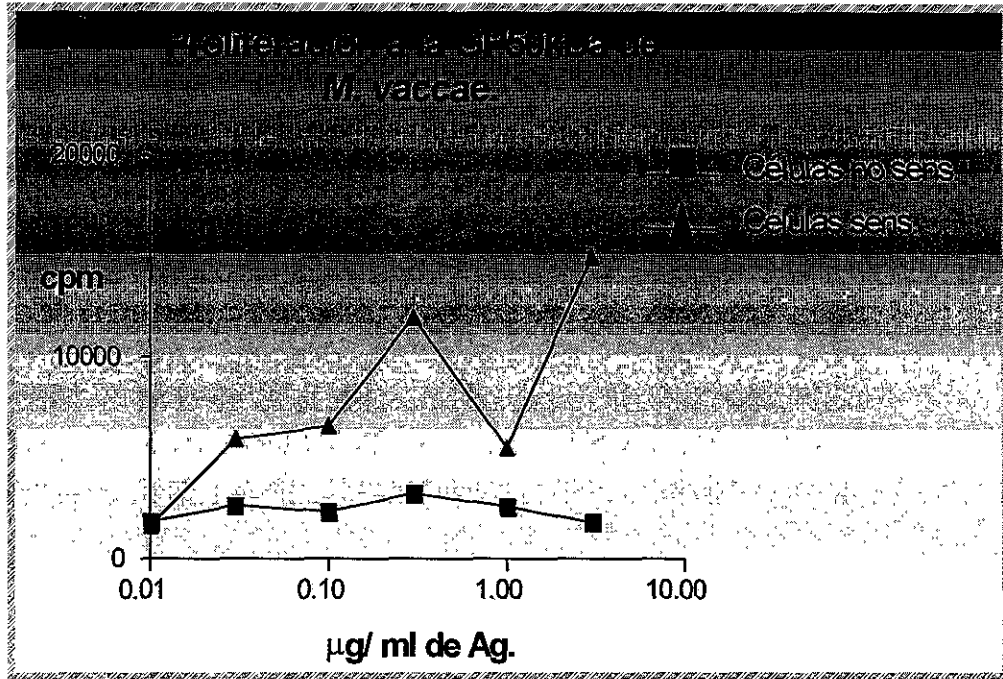
Inicialmente, la respuesta proliferativa al FC-TB se estudió en los ratones de las cepas BALB/c, BALB/k y C57BL/6j. La mejor respuesta de linfoproliferación se obtuvo en ratones de la cepa C57BL/6j, por lo cual estos ratones fueron utilizados para los subsecuentes ensayos. Por otra parte se ha observado que esta cepa de ratón es resistente a la tuberculosis. Las concentraciones de proteínas del FC-TB utilizadas fueron de 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$, y la mejor respuesta linfoproliferativa se obtuvo cuando una suspensión de 20 μl de 10^7 bacterias más IFA son utilizadas para sensibilizar a los ratones, dándoles un refuerzo a los 8 días.



Graf. 2. En esta grafica se presenta el grado de linfoproliferación en cpm, al filtrado de cultivo del *M. tuberculosis*, de linfocitos provenientes de ratones sensibilizados con tres distintas cargas bacterianas más IFA. Como control negativo se utilizó PBS más IFA.

Proliferación de linfocitos T a la GP50kDa del *M. vaccae*.

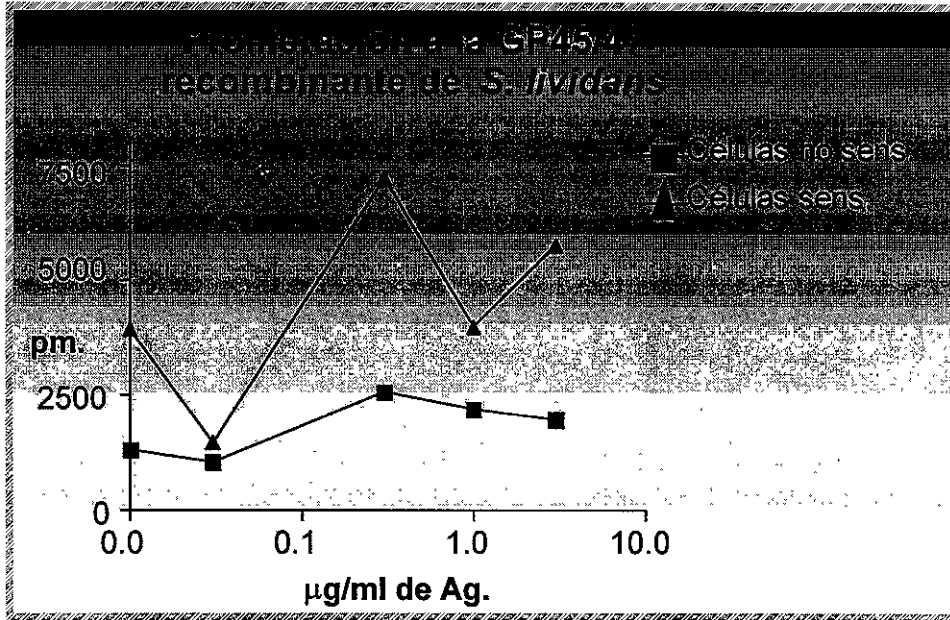
La respuesta de linfocitos T de ratones sensibilizados con una dosis de 10^7 bacterias inactivadas del *M. tuberculosis*, reacciono muy bien a las distintas concentraciones de la GP50kDa del *M. vaccae*. La mejor respuesta se observó cuando la dosis fue de 3.0 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno seguida de 0.3 $\mu\text{g/ml}$. Como se muestra en la grafica 4.



Graf. 4. Respuesta linfoproliferativa a la proteína purificada GP50kDa del *M. vaccae*. (Los resultados son representativos de 3 ensayos realizados).

Proliferación de linfocitos T a la GP45/47 recombinante expresada en *Streptomyces lividans*.

Por otra parte también los linfocitos T obtenidos de ratones sensibilizados con la misma carga bacteriana respondieron bien a diferentes concentraciones de la proteína recombinante del *M. tuberculosis* expresada en *S. Lividans*. La mejor respuesta proliferativa se observó cuando se utilizó una dosis de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína, como se observa en la grafica 6.



Graf. 6. Respuesta de linfoproliferación a la proteína recombinante de *S. lividans*. (Los resultados son representativos de 3 ensayos realizados)

VI. Discusión

La protección obtenida contra *M. tuberculosis*, por la vacunación con *M. bovis* BCG, ocurre únicamente con la bacteria viva. Sin embargo, a consecuencia de los controvertidos resultados obtenidos con la vacuna de BCG, se piensa que la baja protección podría ser debida a que los antígenos protectores liberados por el bacilo vivo, no están suficientemente representados en esta bacteria y por lo tanto no son apropiadamente presentados a los linfocitos T, entre otros factores ya mencionados. Por esta razón entre las alternativas para la inmunoprofilaxis y prevención de la tuberculosis, está el de utilizar a las proteínas secretadas por la bacteria como candidatos potenciales a ser usados como vacunas. La búsqueda de componentes bacterianos inmunoprotectores se ha extendido a otras micobacterias, como *M. vaccae*. Esta bacteria ha sido estudiada ampliamente por varios grupos de investigación y se ha probado no solamente como vacuna sino como agente inmunoprolifático en casos de tuberculosis severa (40, 31). Más aún, ha sido también utilizada en el tratamiento de otras enfermedades no tuberculosas con resultados prometedores (67, 3, 11, 32). A pesar de la gran cantidad de trabajo que se ha llevado a cabo en este aspecto, a la fecha no se conoce el o los componentes micobacterianos responsables de la inmunomodulación inducida por *M. vaccae* en individuos afectados por la tuberculosis.

En el presente trabajo nos propusimos analizar la participación de un antígeno inmunodominante producido por *M. vaccae* que tiene un homólogo en *M. tuberculosis*. Se trata de una proteína de 50kDa (GP50kDa) que se libera al medio de cultivo y que cruza inmunológicamente con el suero de conejo anti-45/47kDa del *M. tuberculosis*. Esta proteína al igual que la de *M. tuberculosis* esta glicosilada (2) y tiene la capacidad de unirse a fibronectina (56). La adherencia de las micobacterias a fibronectina (FN) es considerada biológicamente importante especialmente en *M. bovis* BCG en donde al parecer esta capacidad esta directamente relacionada con el éxito de la bacteria en el tratamiento del cáncer de la vejiga (64). La presencia de azúcares en la GP50kDa del *M. vaccae* por su unión a Con A, como se observó en el presente trabajo y que tiene implicaciones inmunológicas importantes, estudios previos han revelado que únicamente la proteína glicosilada de 45/47kDa del *M. tuberculosis* induce la proliferación de linfocitos T y que cambios en el patrón de glicosilación como ocurre con la proteína recombinante expresada en *M. smegmatis* pueden disminuir en 10 veces la capacidad proliferativa o desaparecer totalmente cuando la proteína se encuentra totalmente deglicosilada, como ocurre también de la proteína recombinante obtenida en *Escherichia. Coli* (47).

La caracterización de la proteína de 50kDa del *M. vaccae* muestra que ésta es muy semejante en varios aspectos a la del *M. tuberculosis*, ambas proteínas son secretadas al medio de cultivo, unen FN, se encuentran glicosiladas y como se demostró en el presente trabajo, la glicoproteína de 50kDa de *M. vaccae* tiene la capacidad de inducir una respuesta proliferativa de linfocitos T.

A diferencia de la proteína del *M. tuberculosis* que presenta varias isoformas en geles de doble dimensión, la proteína del *M. vaccae* presenta únicamente 1 isoforma ácida. Un aspecto muy importante a considerar es la participación de esta proteína en la respuesta inmune. Por esta razón en el presente trabajo la glicoproteína aislada del medio de cultivo fue utilizada para estudiar su capacidad de inducir proliferación de células linfoides. Los estudios se llevaron a cabo con linfocitos obtenidos de los ganglios poplíteos de ratones

VII. Conclusiones

1. - *M. vaccae* posee una proteína de 50kDa que cruza inmunológicamente con el antígeno de 45/47kDa del *M. tuberculosis*. Esta proteína al igual que la del *M. tuberculosis* es capaz de unir a la lectina Con A, sugiriendo esta observación que la proteína de 50kDa del *M. vaccae* al igual que la de 45/47kDa del *M. tuberculosis* esta glicosilada.

2.- El punto isoeléctrico de la proteína de 50kDa del *M. vaccae* es ácido al igual que la del *M. tuberculosis*, pero a diferencia de esta no presenta isoformas.

3. - La GP50kDa de *M. vaccae* es capaz de inducir una respuesta linfoproliferativa a partir de células obtenidas de ratones previamente sensibilizados con *M. tuberculosis* inactivada.

4.- Estos resultados, demuestran dos aspectos importantes: que la GP50kDa del *M. vaccae* puede ser de gran utilidad en; 1) como parte de una unidad de vacunación para hacer frente a la tuberculosis y 2) Como agente inmunoprolifático, donde la GP50kDa del *M. vaccae* pueda ser utilizada también para otros tipos de enfermedades distintas a la tuberculosis.

5.- Es muy probable que los linfocitos T de humanos enfermos con tuberculosis, reflejan el mismo comportamiento observado con las células murinas a la GP50kDa de *M. vaccae*.

6.-Puesto que la GP50kDa del *M. vaccae*, tiene la capacidad de inducir una respuesta proliferativa, es importante evaluar el perfil de citocinas producidas por los linfocitos T inducidas por esta glicoproteína, y como ya se menciono anteriormente es de gran importancia que ésta respuesta esté dirigida hacia un perfil de citocinas Th1 y no a Th2.

7. – Se sugiere que en futuros estudios se realice este mismo ensayo, pero ahora haciendo uso del *M. tuberculosis* vivo.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas K Abul, Lichtman H. Andrew and Pober S. Jordan. 1995. Inmunidad Frente a los microorganismos. **Inmunología Celular y Molecular**.
2. Amador A y Espitia C. (observaciones no publicadas).
3. Amir Lehrer, Amalia Bressanelli, Viviana Wachsmann, Oscar Bottasso, Maria-Luisa Bay, Mahavir Singh, Cynthi Stanford and Jonh Stanford.1988. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of Psoriasis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 21: 71-77.
4. Andersen Peter, Dorthe Askgaard, Line Ljungqvist, Jorgen Bennedsen and Iver Heron. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* durin Growth. **Infection and Imm.** June p.1905-1910.
5. Andersen, P., A. B. Andersen, A. L. Sorensen & S. Nagai. 1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Immunol**. 154:3359-3372.
6. B. M. Saunders., A. A. Frank and I. M. Orme. 1999 Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunology**. 98. 324-328.
7. Bach Francois. J. 1984. La Inmunomodulación. **Inmunología**. Cap. 33. p. 851-872. Ed. Limusa.
8. Barnes P.F., Grisso C. L., Abram J, S., Bamd J. Rea, T. H. Modlin. 1992. $\gamma\delta$ T lymphocyte in human tuberculosis. **J. Infect. Dis**. 165:506-512.
9. Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane & P. M. Small. 1994. Comparative genomics BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. **Science**. 284:1520-1523
10. Belisle J.T, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra G. S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**. 1997 May 30;276(5317):1420-2.
11. Breivik T. and Rook A. W. 2000. Prevacination with SRL172 (heat-killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. **Clin. Exp. Immunol**. Feb. 120: 463-467.
12. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, *et al*. Dicephering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature** 1998; 393: 537-544.
13. Corlan E., Marica C., Macavei C., Stanford J. L. And Stanford C. A. 1997. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* in the treatment of tuberculoisi in Romania. 2. Chronic or relapsed disease. **Respir. Med**. Jan;(1):21-9.
14. Crubezy E., Ludes B., Poveda J. D., Clayton J., Crouau Royb and Montagnon D., 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian pott's disease of 5.400 years old. **C. R. Acad. Sci. III**. Nov; 321(11): 941-51.
15. D. Wessel and U. I. Flügge. 1983. A Method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergente and lipids. Analytical. **Biochemistry**. 138; 141-143.