

# CARACTERIZACION DE FRACCIONES SOMATICAS DE MICOBACTERIAS CON CAPACIDAD INFLAMATORIA<sup>1</sup>

DRES. LUIS F. BOJALIL,<sup>2, 3</sup> LIBRADO ORTIZ-ORTIZ,<sup>3</sup> CARLOS RIVAS-GÓMEZ<sup>3</sup> Y JOSÉ LUIS MOLINARI<sup>3</sup>

Se estudiaron las propiedades químicas y biológicas de una fracción somática del *Mycobacterium bovis* (cepa BCG) que precipitaba a un pH de 3. Por cromatografía en columna de intercambio, fue posible separar cuatro componentes. El primero de ellos (fracción I) contenía sólo proteína y fue capaz de inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía en cobayos sensibilizados a BCG. Las tres fracciones restantes, contenían cantidades variables de ácidos nucleicos y proteína y manifestaron una mayor capacidad inflamatoria en animales sensibilizados al microorganismo mencionado que en los controles, sugiriendo la participación tanto de los mecanismos humorales como de una actividad citotóxica de los componentes de estas fracciones. (GAC. MÉD. MÉX. 99: 1155, 1969).

LA ALERGIA se presenta prácticamente en todas las enfermedades infecciosas, su manifestación es sin embargo, más notable en unas que en otras.

El concepto de alergia fue introducido por Von Pirquet,<sup>1</sup> quien la describe de la siguiente manera, "los individuos vacunados reaccionan a las vacunas; el paciente tuberculoso a la tuberculina; los individuos inyectados con suero a tales sueros; cada uno de ellos reacciona de una manera dife-

rente a los individuos que no habían tenido contacto previo con el agente en cuestión. Ellos están lejos de ser insensibles, todo lo que podemos decir es que su potencia de reaccionar está alterada. Para este concepto general de una capacidad alterada a reaccionar, propongo el término "alergia"... Actualmente la palabra hipersensibilidad, acuñada por la literatura anglosajona, se usa, con el mismo significado que alergia y han llegado a ser sinónimos.

Desde 1890 en que Roberto Koch describió el fenómeno de alergia tuberculosa a la tuberculina y posteriormente con el reconocimiento de la

<sup>1</sup> Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 23 de julio de 1969.

<sup>2</sup> Académico numerario.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

reacción focal que produce la tuberculina en individuos sensibles,<sup>2</sup> la investigación sobre alergia del tipo retardado se centró casi exclusivamente sobre la reacción tuberculínica.

Zinsser,<sup>3, 4</sup> fue quien con mayor precisión separó los conceptos de las alergias bacterianas del tipo retardado de las reacciones anafilácticas, al comprobar que la alergia de tipo tuberculínico no podía ser transferida pasivamente por sueros, aun conteniendo elevadas cantidades de anticuerpos, definiéndose así una de las características fundamentales de la hipersensibilidad retardada y una de las grandes diferencias con la hipersensibilidad inmediata.

La alergia de tipo retardado no es posible transferirla por suero, pero en cambio es posible hacer la transferencia pasiva con células, como fue primero demostrado por Landsteiner y Chase en 1942.<sup>5</sup> Seguido por la descripción de Chase<sup>6</sup> de la transferencia por células de la alergia tuberculínica. Si hasta hace muy poco tiempo se pensaba que las alergias de tipo tardío eran una manifestación de procesos infecciosos, o de algún tipo de sensibilidad por contacto, actualmente al describirse su aparición en un gran número de otros procesos hace pensar que se trata de un fenómeno importante para la integridad del individuo.

Ahora se reconoce la relación que existe entre el rechazo de injerto y la hipersensibilidad retardada,<sup>7</sup> pensándose también que este mecanismo es importante en las enfermedades autoalérgicas.<sup>8</sup>

El estudio de la hipersensibilidad retardada tiene fundamental importan-

cia en muchos campos de la medicina y biología, sin embargo, a pesar de los intentos que se han hecho para entender los mecanismos por los cuales se establece la alergia, existen múltiples lagunas en nuestros conocimientos. Así por ejemplo no se ha demostrado la presencia de intermediarios químicos, anticuerpos o agentes farmacológicos para que la reacción se lleve a cabo.

La alergia tuberculosa se pone de manifiesto con el empleo de tuberculinas, que contienen proteínas del bacilo tuberculoso. Estas preparaciones obtenidas del medio de cultivo donde se han hecho crecer los bacilos, contienen varios tipos de proteínas, además de otros componentes.

En el presente trabajo nos propusimos separar los componentes del soma bacteriano, en un intento de estudiar las propiedades biológicas y químicas del material somático del BCG. Con especial referencia a las fracciones responsables tanto de la hipersensibilidad inmediata y tardía, así como de aquellas capaces de producir respuestas de tipo no específico.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una cepa de BCG (Glaxo) obtenida del Instituto Nacional de la Salud de los EE. UU. Varicos lotes de 20 g de este material fueron suspendidos en 200 ml de solución salina (0.85%) y las células se rompieron pasando 2 veces en el aparato de Ribi (New Brunswick, Sc. Co.) a 50,000 psi.

El material obtenido fue centrifugado a 20,000 rpm y pasado a través de un filtro Zeitz de tipo clarificante.

El material filtrado fue tratado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80% de saturación, con agitación constante durante 3 hs. a temperatura ambiente y manteniendo el pH a 7. Una mayor concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no aumenta apreciablemente la cantidad de proteína precipitada. El  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue eliminado a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala); de este material libre de sulfatos se separó la fracción que precipitaba a un pH de 3 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.1 M. El precipitado fue redisoluto en agua alcalinizada con NaOH 0.1 M a pH de 8 y dializado contra un amortiguador de fosfatos 0.0175 M de pH 6.5 y pasado a través de una columna de DEAE-Sephadex, de 40-120 mu (Pharmacia, Uppsala). El material eluido de la columna fue leído a 260 y 280 mu en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

*Determinación de azúcares:* El método usado fue el de la antrona.<sup>9</sup>

*Determinación de proteínas:* Las determinaciones fueron realizadas por el método de Lowry y colaboradores.<sup>10</sup>

*Determinación de ácido ribonucleico (RNA):* Se usó la técnica del orcinol.<sup>9</sup>

*Determinación de ácido desoxiribonucleico (DNA):* Se utilizó la prueba de la para-nitrofenilhidrazina.<sup>11</sup>

*Doble difusión en agar:* Fue realizada de acuerdo a Ouchterlony,<sup>12</sup> usando Agar Noble (Difco, Detroit, Mich.) a una concentración del 1% en solución salina (0.85%).

*Sensibilización:* Los animales se sensibilizaron por inyecciones repetidas de vacuna BCG. Se utilizó 1 g de BCG suspendido en 1 ml de solución salina, que se inyectó subcutáneamente en 4

puntos diferentes. Una semana más tarde, se repitió la operación.

*Prueba de la tuberculina:* Cada 0.1 ml de la tuberculina (PPD) usada, contenía 10 ug de proteína y fueron inyectados intradérmicamente en los animales sensibilizados y en los controles. Se anotó la respuesta a los 60 minutos, 4 y 24 horas.

## RESULTADOS

*Fraccionamiento del material somático de BCG precipitado a pH 3, a través de una columna de intercambio iónico:* La columna de DEAE-Sephadex A-50,  $1 \times 50$  cm, equilibrada con buffer de fosfatos de pH 6.5, fue cargada con 11 mg del material somático precipitado a pH 3 y tratado como se mencionó anteriormente (ver material y métodos). El material depositado en la columna fue eluido primero con 100 ml del buffer de fosfatos y después con 1,000 ml de un gradiente de buffer de fosfatos de pH 6.5 y KCl 1 M. Se recogieron volúmenes de 5 ml por tubo en el colector de fracciones. De esta forma se obtuvieron 4 fracciones, a las que denominaremos I, II, III y IV. La fracción I, terminó de eluir cuando la molaridad correspondía a 0.4, mientras que la fracción II eluia a 0.6 M. A una molaridad de 0.7 comenzó a eluir la fracción III y sólo hasta que la molaridad se elevó a 0.8, eluyó la fracción IV. Las molaridades de las diferentes fracciones obtenidas fueron determinadas en un conductímetro LKB (Estocolmo, Suecia).

*Purificación del material precipitable a pH 3:* Cuando el material precipitado con ácido acético a pH 3, dializado

líoilizado y resuspendido en buffer de fosfatos fue ensayado por medio de una reacción de doble difusión en agar, contra un antisuero de *M. bovis*, se observó una banda de precipitación idéntica a la mostrada por la fracción I obtenida del mismo material. Estos dos componentes mostraron una banda de identidad con el polisacárido I de micobacterias.<sup>13</sup> Las fracciones II, III y IV no presentaron precipitación alguna, quizá debido a la menor concentración de azúcares que contenían.

Con el objeto de eliminar los azúcares a los cuales se les atribuye la reacción de precipitación, el material obtenido después de la precipitación con ácido acético a pH 3, fue redissuelto en agua alcalinizada con NaOH 0.1 N (pH 8) y precipitado nuevamente con ácido acético (pH 3). La operación se repitió 2 veces más y el precipitado redissuelto en buffer de fosfatos de pH 6.5, se corrió en una columna como se describió anteriormente. De nuevo se obtuvieron las 4 fracciones que eluyeron a las mismas molaridades mencionadas en el caso del material precipitado una sola vez con ácido acético.

El material purificado no dio precipitación en agar contra el antisuero de *M. bovis*, indicando la eliminación de los azúcares responsables de la precipitación.

*Análisis químico del material purificado:* El estudio de la composición química de las fracciones mostró que: la fracción I contenía 100% de proteínas; la fracción II, 41.6% de proteína, 55% de RNA y 3.4% de DNA; la fracción III, 18.4% de proteína, 73.8% de RNA y 7.8% de DNA y la fracción IV,

23.2% de proteína, 32.8% de RNA y 44% de DNA. La reacción de carbohidratos fue negativa con todas las fracciones.

*Pruebas biológicas:* Las diferentes fracciones fueron ensayadas para probar su capacidad inflamatoria en cobayos previamente sensibilizados con vacuna BCG. Las pruebas cutáneas fueron realizadas usando el equivalente a 10 ug de proteína de cada fracción, utilizando como control 10 ug de PPD.

Se observó que tanto el PPD como la fracción I se comportaron de una manera similar, aunque la respuesta producida por la fracción I fue más intensa que la del PPD. Estas sustancias no produjeron ninguna reacción en cobayos normales.

La fracción II mostró una respuesta de tipo inmediato en los animales sensibilizados, pero no manifestó una respuesta de tipo tardío. Los animales normales no presentaron reacción alguna.

Las fracciones III y IV indujeron una clara respuesta inflamatoria de tipo inmediato en los animales sensibilizados. La respuesta fue visible desde la primera hora, manteniéndose en la mayoría de los animales hasta las 24 horas, provocando en algunos casos necrosis. Los animales normales presentaron también un fenómeno inflamatorio, el cual fue de menor intensidad cuando se les comparó con los animales sensibilizados.

## DISCUSIÓN

Todos los intentos que se hicieron con anterioridad en nuestro laboratorio para separar los componentes del BCG, que mostraran actividad inflama-

toria, tuvieron poco éxito. Cuando se usó el método del sulfato de amonio, se lograron separar varias fracciones proteicas, todas ellas capaces de inducir en el cobayo sensibilizado una respuesta de hipersensibilidad tardía; pero no quedó claro si esta respuesta era provocada por una o varias proteínas del soma bacteriano, debido probablemente a que no se logró una completa separación de los componentes somáticos.<sup>14</sup>

Con el objeto de lograr una mejor separación se usaron varios tipos de columnas y después de varias pruebas se concluyó que el DEAE-Sephadex presentaba ventajas sobre otras. Cuando se hizo pasar por esta columna el extracto completo del BCG, se lograron separar de 7 a 10 fracciones, pero otra vez, todas ellas fueron capaces de provocar una respuesta de tipo tardío en los animales sensibilizados.<sup>15</sup>

Se consideró que era necesario tratar de purificar estos componentes, para probar alguno de estos hechos: a) que la sensibilización se hace a varias proteínas de la micobacteria y no sólo a una de ellas, lo cual plantearía la necesidad de demostrar si se produjo una especificidad amplia o igual a la que se produce en la respuesta de anticuerpos y b) que sólo se sensibiliza a un tipo de proteínas, lo cual indicaría una especificidad limitada a la proteína sensibilizante y a aquellas que tuvieran características similares. Esto quiere decir que podríamos encontrar proteínas capaces de despertar la respuesta alérgica y también otras a las cuales el animal no estuviera sensibilizado. Si esto fuera así, entonces se podrían estudiar las diferencias entre las proteínas

sensibilizantes y las no sensibilizantes y también definir las características químicas y biológicas de este tipo de proteínas con mayor precisión.

Debido a los problemas que representa la purificación del material somático total del BCG, se decidió emplear un solo componente del mismo, específicamente, el precipitable a pH 3, que al pasarlo por la columna de intercambio iónico mostró 4 fracciones. La fracción I era un componente proteico mezclado con polisacárido, demostrándose que esta última era la responsable de la precipitación en agar que se observó cuando se puso en presencia del antisero específico y que además correspondía al polisacárido I de las micobacterias. Fue posible purificar la proteína, la cual mostró ser capaz de provocar una respuesta alérgica en animales sensibilizados; no sabemos aún si se trata de una o varias proteínas.

Las fracciones II, III y IV, que contenían fundamentalmente ácidos nucleicos, mostraron una respuesta de tipo inmediato en animales sensibilizados. Sin embargo, también la producían con menor intensidad en animales normales. Probablemente la presencia de anticuerpos nos pudiera ayudar a explicar la mayor intensidad de la respuesta en los animales sensibilizados. También parece importante señalar que en muchos animales se produjo necrosis, quizá atribuible a la presencia de los ácidos nucleicos. Es posible que estos componentes participen como uno de los mecanismos de agresión de la micobacteria.

El método de estudio que se describe puede conducir a una mejor separación

de los componentes de la micobacteria, lo cual ayudará a un mejor conocimiento de sus propiedades biológicas.

# SUMMARY

The chemical and biological properties of a fraction precipitated at pH 3, from the bodies of BCG, was studied. Four fractions were obtained when the latter material was passed through a DEAE-Sephadex column. Fraction I, which eluted at low KCl-salt concentration, contained only protein and was responsible of a delayed-type of hypersensitivity. Fractions II-IV, that eluted later, contained protein and nucleic acid material and induced an inflammatory-type of reaction in sensitized and non-sensitized guinea pigs.

# REFERENCIAS

1. Pirquet, C. Von: *Allergie*. Münch. Med. Wschr. 53: 1457, 1906.
2. Mantoux, C.: *L'intradermo-réaction à la tuberculine et son interprétation clinique*. Press Med. 18: 10, 1919.
3. Zinsser, H.: *Bacterial allergies and tissue reactions*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 22: 35, 1925.
4. Zinsser, H. y Mueller, J. H.: *On the nature of bacterial allergies*. J. Exp. Med. 41: 159, 1925.
5. Landsteiner, K. y Chase, M. W.: *Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49: 688, 1942.
6. Chase, M. W.: *The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59: 134, 1945.
7. Brent, L.; Brown, J. y Medawar, P. B.: *Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity*. Lancet. 2: 561, 1958.
8. Waksman, B. H.: *Experimental allergic encephalomyelitis and the "autoallergic" diseases*. Int. Arch. Allergy. Suppl.
9. Kabat, E. A. y Mayer, M. M.: *Experimental immunochemistry*. Springfield, Charles C. Thomas. p. 527.
10. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
11. Webb, J. M. y Levy, H. B.: *New development in the chemical determination of nucleic acids*. Meth. Biochem. Anal. 6: 1, 1958.
12. Ouchterlony, O.: *Antigen - antibody reactions in gels*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26: 507, 1949.
13. Zamora, A.; Bojalil, L. F. y Bastarrachea, F.: *Immunologically active polysaccharides from Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis*. J. Bacteriol. 85: 549, 1963.
14. Solarolo, E. B.; Larralde, C. y Bojalil, L. F.: *Fracciones de micobacteria con actividad inflamatógena específica e inespecífica, inmediata y retardada*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol. 11: 33, 1969.
15. Bojalil, L. F.: *Manuscrito en preparación*.

## COMENTARIO OFICIAL

DR. FÉLIX CÓRDOBA<sup>1</sup>

EL TRABAJO del doctor Bojalil y colaboradores representa un paso más en el esfuerzo continuado por ellos desde hace varios años para sentar las bases inmunológicas e inmunopatológicas de la tuberculosis y de las infecciones por micobacterias. Estas investigaciones van acompañadas de grandes dificultades; algunas de las principales son las siguientes:

a) Las infecciones producen hipersensibilidad retardada como componente fisiopatológico fundamental en la enfermedad. Aquella, como es sabido, es de difícil comprensión, compleja y polimorfa y por tanto, el progreso en su definición y esclarecimiento, lento y tortuoso.

b) Para aislar los antígenos es menester cultivar y propagar gérmenes de crecimiento escaso y lento. Por otra parte, la extracción de los antígenos de los bacilos requiere instrumentos como la Prensa Ribi usada por los autores del trabajo. Esto da idea de las serias dificultades técnicas que deben superarse sólo para hacerse de material para el trabajo.

c) Las fracciones antigénicas crudas obtenidas en trabajos de esta naturaleza son, con escasas excepciones, mezclas de varias sustancias; por lo tanto no es posible aun el ideal químico de asignar un efecto biológico, digamos lesión cutánea, a una estructura antigénica definida. Además, como la infección y sensibilización por micobacteria inducen alteraciones locales y generales, se hace imperativo definir si las manifestaciones biológicas más relevantes, en relación con la enfermedad, aparecen en el animal de experimentación inyectado con dosis bajas de sus-

tancias mezcladas. En este sentido es de loar el éxito logrado por Bojalil, junto con Estrada-Parra y Zamora, en 1965, al caracterizar el antígeno de grupo de *Nocardia brasiliensis* como un polisacárido formado por D-galactosa 1,3 y D-arabinosa 1,2 y 1,3.

d) El peligro de trabajar con *Mycobacterium tuberculosis* hace necesario, por ahora, limitar los estudios inmunoquímicos a cepas atenuadas como el BCG. Los hallazgos aquí, sin embargo, pueden derivar a resultados imprecisos en relación a los verdaderos antígenos y sus manifestaciones en el enfermo tuberculoso. En el momento oportuno deberán aislarse y estudiarse otros antígenos.

Los investigadores nos presentan ahora un trabajo limpio y preciso, del aislamiento y purificación de varios antígenos somáticos del BCG. La fracción proteica (pico I), que produce una lesión retardada en la piel del cobayo sensibilizado, constituye un hallazgo interesante; parece ser uno de los pocos antígenos naturales de micobacteria que produce esta lesión en el cobayo, siendo además, más potente que el PPD. Es decir, han ampliado el espectro inmunoquímico de micobacteria ya que han purificado una proteína que induce lesiones cutáneas tardías en los animales sensibilizados, y por otro lado han demostrado la presencia de un polisacárido antigénico que reacciona con los anticuerpos humorales, tanto de conejos inmunizados con micobacteria, como en los enfermos tuberculosos. De confirmarse estos hallazgos, constituirán un avance importante para comprender la patogenia de las enfermedades por gérmenes ácido-alcohol resistentes y permitirán amplias investigaciones diagnósticas y clínicas.

No puedo, por ahora, comentar con igual

<sup>1</sup> Académico numerario Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

entusiasmo los resultados del aislamiento y ensayo de otros antígenos del BCG descritos en el trabajo. Son mezclas de proteínas y ácidos nucleicos del microorganismo, tanto RNA como DNA. Es difícil, o imposible, saber si las proteínas de las mezclas son las causantes de las lesiones cutáneas en los animales sensibilizados. Como por otra parte, los animales normales también presentan reacciones en la piel, se hace necesario hablar

de factores tóxicos inespecíficos. Como afortunadamente los autores hacen notar esto en su trabajo, es de esperar que sus estudios esclarezcan también el importante problema inmunológico de las lesiones debidas a otros componentes bacterianos.

Los éxitos anteriores de Bojalil y sus colaboradores en estas difíciles investigaciones dan confianza en los resultados que presentan y en el progreso logrado.

---