

03081

8
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

LA DINAMICA DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA E INFLAMATORIA PULMONAR
INDUCIDA POR ANTIGENOS PROTEICOS DE Mycobacterium tuberculosis.

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica

presenta

Rogelio Hernández Pando

Tesis dirigida por el Dr Raúl Mancilla Jiménez
en el Departamento de Inmunología
del Instituto de Investigaciones Biomédicas

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

I.- RESUMEN.

II.- INTRODUCCION Y REVISION DE LA LITERATURA.

1. DESARROLLO HISTORICO DE CONOCIMIENTOS.
2. RESPUESTA INMUNOLOGICA EN TUBERCULOSIS.
 - Estructura antigénica de M. tuberculosis
 - Respuesta inmunológica celular y humoral
3. EL SISTEMA INMUNOLOGICO DEL PULMON.
4. PATOGENIA Y ANATOMIA PATOLOGICA DE LA TUBERCULOSIS.
5. INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.
 - Lesión tisular
 - Activación policlonal de linfocitos
 - Autoinmunidad
 - Inmunosupresión
6. INFLAMACION GRANULOMATOSA.

III. OBJETIVOS

IV. MATERIALES Y METODOS

1. Animales de experimentación.
2. Inmunizaciones.
3. Bacterias y antígenos.
4. Modelos experimentales de inflamación pulmonar.
5. Estudios histológicos y morfométricos.

6. Estudios de las subpoblaciones de linfocitos T con técnicas de inmunohistoquímica.
7. Identificación citoquímica de macrófagos.
8. Estudio de la respuesta inmune humoral en contra del extracto proteico de M. tuberculosis (EPS) y albumina sérica bovina metilada (BSAm) por inmunoensayo enzimático (ELISA) en animales con inflamación pulmonar experimental.
9. Estudio de la respuesta de hipersensibilidad retardada cutánea (HRC) a EPT y BSAm en ratones con inflamación pulmonar experimental.
10. Manipulación farmacológica de la respuesta inflamatoria pulmonar.

V. RESULTADOS

1. Histopatología y morfometría de los granulomas pulmonares inducidos por EPT y BSAm acoplados a esferas de Sefarosa.
2. Cuantificación celular y tipos de células inflamatorias obtenidas por

lavado bronquial en granulomas inducidos por antígenos acoplados a sefarosa.

3. Inmunotipificación de las células linfoides en lesiones granulomatosas inducidas por antígenos acoplados a Sefarosa.
4. Cuantificación por ELISA del título de anticuerpos sericos específicos de clase IgG en contra de EPT y BSAm en animales con granulomas inducidos por antígenos acoplados a sefarosa.
5. Determinación de HRC en contra de EPT y BSAm en ratones con granulomas inducidos por antígenos acoplados a Sefarosa.
6. Histopatología y morfometría de los granulomas producidos por EPT acoplado a sefarosa y manipulados farmacologicamente con ciclofosfamida(CF) e indometacina(ID).
7. Cuantificación celular y tipos de células inflamatorias en lavados bronquiales de granulomas producidos por EPT unido a sefarosa en animales con manipulación farmacologica.

8. Determinación de HRC en ratones con granulomas inducidos por antígenos acoplados a sefarosa y manipulados farmacológicamente.
9. Histopatología de la inflamación pulmonar inducida por EPT y antígenos puros de M tuberculosis incorporados en nitrocelulosa.
10. Cuantificación celular y tipos de células inflamatorias obtenidas por lavado bronquial en las lesiones pulmonares producidas por antígenos micobacterianos incorporados a nitrocelulosa.
11. Inmunotipificación de las células linfoides en la inflamación inducida por EPT y antígenos micobacterianos puros.
12. Cuantificación por ELISA del título de anticuerpos séricos en contra de EPT en animales con granulomas pulmonares producida por antígenos de M tuberculosis incorporados en nitrocelulosa.

13. Determinación de HRC en contra de
EPT en ratones con lesión pulmonar
inducida por EPT y antígenos puros
de M. tuberculosis.

14. Determinación de HRC en contra
de EPT en ratones con inflamación
pulmonar inducida por antígenos
micobacterianos incorporados en
nitrocelulosa y tratados con CF e
ID.

VI. DISCUSION

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFIA

IX. APENDICE

I. RESUMEN.

La característica más importante de la tuberculosis desde el punto de vista histopatológico, es la inflamación granulomatosa. Se define al granuloma como una colección organizada de macrófagos y linfocitos T, en torno a material poco biodegradable. En el caso de la tuberculosis dicha inflamación, se considera también como la manifestación tisular de inmunidad celular establecida en contra del bacilo tuberculoso. Múltiples estudios se han realizado con el fin de establecer los componentes de la micobacteria capaces de inducir la formación de granulomas, con resultados conflictivos.

En la presente tesis se demuestra que antígenos proteínicos de *M. tuberculosis* acoplados a esferas de sefarosa, inyectados intratraquealmente en ratones sensibilizados BALB/C inducen inflamación granulomatosa organizada alrededor de las esferas. Con técnicas inmunohistoquímicas se observó que, en el momento de máxima respuesta inflamatoria (3 y 7 días después del reto traqueal), existe predominio de linfocitos T supresores/citolíticos y disminución acentuada de anticuerpos séricos e hipersensibilidad retardada cutánea en contra de los antígenos proteicos micobacterianos, lo cual es totalmente revertido con la eliminación farmacológica de linfocitos T supresores (dosis bajas de ciclofosfamida) e inhibición de la síntesis de prostaglandinas (administración de indometacina). Con el objetivo de identificar el o los antígenos micobacterianos capaces de inducir inmunosupresión, se inyectó intratraquealmente varios antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis* incorporados

en nitrocelulosa en ratones BALB/C sensibilizados. De los varios antígenos probados solamente las proteínas de choque termico de 65 y 70 kD produjeron reclutamiento preferencial de linfocitos T supresores/citolíticos y disminución acentuada de la respuesta de inmunidad celular explorada por pruebas de hipersensibilidad tardía cutánea, la cual fue revertida totalmente con la eliminación farmacológica de linfocitos T supresores y en menor grado con la administración de indometacina.

Se concluye que antígenos proteínicos de *M. tuberculosis* son granulomatogénicos y que algunos de ellos (ie, las proteínas de choque termico de 65 y 70 kD) son capaces de reclutar preferencialmente linfocitos T supresores/citolíticos capaces de suprimir preferencialmente y en forma sistémica a la inmunidad celular.

ABSTRACT.

The tuberculosis hallmark lesion is the granulomatous inflammation. Its define granuloma as an organized collection of macrophages and lymphocytes induced by poor biodegradable material; in the case of tuberculosis it has also been considered as the tissue manifestation of cellular immunity against the tuberculous bacillus. Several studies has been done with the objective to define which are the mycobacterial moieties capable to induce granuloma formation, with conflictive results. In the present thesis its showed that M tuberculosis protein antigens coupled to sepharose beads injected toward the trachea in sensitized BALB/c mice, induce granulomatous inflammation surrounding sepharose beads. With immunohistochemistry techniques, its showed that during the peak of inflammatory response (3 and 7 days after intratracheal challenge) there is a predominance of suppresor/cytolytic T lymphocytes with an acentuated decay of seric antibodies and cutaneous delayed hypersensitivity against the mycobacterial protein antigens. These phenomena is completly reverted with the pharmacologic elimination of T suppressor cells(low doses of cyclophosphamide) and with the inhibition of prostaglandin synthesis(indometacin administration). With the aim to identify the mycobacterial antigens able to induce immunosuppresion, mice were intratracheally challenged with several pure and immunodominant mycobacterial antigens incorporated to nitrocellulose microscopic fragments. Among several antigens, only the mycobacterial heat shock proteins of 65 and 70 kD were able to induce a preferential recruitment of suppressor T lymphocytes associated to pronounced

decay of delayed hypersensitivity which was totally reverted with the administration of low doses of cyclophosphamide and in lower degree with the injection of indometacin.

Its conclude that M. tuberculosis protein antigens are granulomatogenic and some of them(ie, heat shock proteins of 65 and 70 kD) are able to induce a preferential recruitment of suppressor Lymphocytes which suppress the cellular immunity.

INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, habitualmente cronica producida por la bacteria M. tuberculosis, la cual afecta generalmente en forma inicial a los pulmones pero que puede lesionar cualquier organo o tejido corporal. Esta enfermedad ha sido importante para la humanidad aun desde antes de los tiempos biblicos, pues desde entonces ha sido una de las causas mas importantes de morbilidad y mortalidad. Se ha estimado que en el mundo hay mas de 50 millones de personas que tienen o han tenido la enfermedad. La incidencia anual en paises desarrollados es de 5 a 10 casos por 100, 000 habitantes y en el tercer mundo es entre 80 y 165. Anualmente en el mundo aparecen 8 millones de nuevos casos de los cuales la mitad son contagiosos (1, 2) y 3 millones de enfermos mueren cada año a consecuencia de esta enfermedad. La frecuencia de la tuberculosis es mayor sobre todo en paises subdesarrollados, en donde constituye un verdadero problema de salud publica. Hay tambien preocupacion e interes en esta enfermedad en paises desarrollados en donde la sanidad y asistencia medica han disminuido la frecuencia de la infeccion pero la vejez de la poblacion y las enfermedades inmunosupresoras como la diabetes y la infeccion por el virus de la inmunodeficiencia humana la infeccion y enfermedad por M. tuberculosis(2, 3).

La tuberculosis ha sido tambien el foco de atencion de mucho trabajo de investigacion biomédica durante los siglos IX y XX. Inicialmente, grandes avances fueron hechos en el aislamiento e identificacion de M. tuberculosis y de microorganismos

relacionados. En efecto, el descubrimiento por Roberto Koch de que la tuberculosis era producida por un agente infeccioso revolucionó el pensamiento médico sobre la enfermedad. Los postulados de Koch fueron desarrollados con trabajo experimental en tuberculosis y estos se constituyeron en un elemento crucial para mucho del avance realizado en microbiología y medicina.

La investigación con micobacterias fue también un elemento central de donde se originaron nuevos y revolucionarios conceptos en inmunología, Koch mostró que la exposición a *M. tuberculosis* producía un estado de hipersensibilidad cutánea a antígenos del microorganismo. Posteriormente, en la década de los 40, Merrill Chase mostro concluyentemente que la hipersensibilidad a la tuberculina podía ser transferida por células linfoides, lo cual genero gran interes en la inmunología celular; también por esta época Jules Freund utilizó a la micobacteria mezclada con aceites como adyuvante con el fin de inducir una respuesta inmunológica aumentada

A pesar del advenimiento de la estreptomycinina y de otros antimicrobianos eficaces en el tratamiento de la tuberculosis, el interes en la investigación en esta area no termino. Los inmunologos usaron antígenos de la micobacteria como herramientas para la disección de mecanismos inmunológicos básicos, sobre todo de inmunidad celular; así por ejemplo, al final de la década de los 60, Barry Bloom un estudiante graduado de Merryl Chase utilizó antígenos de *M tuberculosis* para estimular linfocitos y obtener mediadores quimicos producidos por estas células, tal es el caso del factor de inhibición de la migración macrofágica, la

primera linfoquina descubierta.

De esta manera muchos avances importantes se han realizado utilizando a M tuberculosis como patógeno o como un instrumento para diseccionar algunas de las facetas de la respuesta inmunológica. Durante los últimos 10 años grandes avances han sido hechos en esta área, estos incluyen un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos con el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, la producción de anticuerpos monoclonales y la clonación de células T entre otros. Actualmente es necesario continuar con la investigación en tuberculosis no solo porque en nuestro país es un problema de salud pública importante, sino también porque todavía no se conocen completamente los mecanismos a través de los cuales el microorganismo interactúa con el sistema inmunológico para causar enfermedad o inmunidad.

El presente trabajo tiene relación con uno de las varias alteraciones inmunopatológicas producidas por M. tuberculosis que es la inmunosupresión y la respuesta tisular característica de esta enfermedad, la inflamación granulomatosa.

DESARROLLO HISTORICO DE CONOCIMIENTOS.

La medicina hipocratica consideraba a la tuberculosis como el producto de una flema acrida que goteaba desde el cerebro hasta el pulmón o como un tipo especial de hemorragia pulmonar confundiendo así la causa con el efecto de la enfermedad. Galeno consideró a la hemorragia pulmonar de la tuberculosis era producida por ruptura vascular o por ulceración local que cuando se asociaba a caquexia se constituía en una enfermedad específica: tisis o tuberculosis(4). Galeno tomo de la medicina hipocratica la descripción de los tuberculos o granulomas, sin embargo el trato de explicarlo de otra forma, atribuyendolos a coagulación local con lo que se impedía el paso de los jugos o secreciones corporales a las venas, su concepción de la tuberculosis fue por lo tanto vaga y confusa y ciertamente ninguna observación importante fue aportada hasta que Silvio empezó a hacer autopsias 15 siglos despues(5).

Francisco Silvio (1614-1672), nació en Hannover Alemania, estudió en Basilea, fue profesor en Leyden desde 1648 hasta su muerte. A Silvio se le atribuye la primera y mas completa descripción anatomopatológica de la tuberculosis. Silvio relacionó correctamente la presencia de los tuberculos en el pulmón con la enfermedad y describió la progresión de estos hasta convertirse en cavernas, separandola además de la forma miliar o generalizada. Una de sus mas importantes contribuciones fue la descripción de la tuberculosis ganglionar del mediastino, cuello y mesenterio. Silvio estuvo de acuerdo con el concepto etiológico de la tuberculosis establecido por Hipocrates y Galeno, agregando

sus propios conceptos de patología química humoral considerandola además una enfermedad hereditaria.

Thomas Willis de Londres (1621-1675), cuyo nombre se hizo inmortal por la descripción del "polígono de Willis", no solo se interesó en la anatomía, pues también fue un excelente clínico y anatomopatólogo. Su contribución en tuberculosis fue la descripción de la forma miliar: "pequeños tuberculos como arenillas distribuidas difusamente en los pulmones".

Otro trabajo importante sobre tuberculosis realizado en esta época fue el texto "Tisiología" de Richard Morton (1635-1698), el cual a pesar de ser repetitivo y de tener explicaciones humoralistas fantásticas, es un tratado con una descripción clínica detallada. A partir de su descripción anatómica es posible interpretar la forma acino-nodosa, ulcerativa y caseosa-calcificada de la tuberculosis pulmonar además de la descripción de la tuberculosis renal.

Uno de los problemas más importantes de la patología especial a la que la medicina francesa le dio más importancia fue precisamente la tuberculosis. Dos de los alumnos más destacados del eminente profesor francés Corvisart, Gaspar Laurent Bayle y Rene Teofilo Jacinto Laennec trabajaron intensamente en este problema.

Bayle (1774-1816) fue el autor del texto "Investigaciones Sobre Tisis Pulmonar", publicado en 1810, después de años de estudiar pacientes con tuberculosis al lado de la cama y en la mesa de autopsias, de donde escogió 54 casos para escribir su tratado.

Bayle describió 6 tipos de tuberculosis pulmonar: granular (la

forma miliar o generalizada), ulcerosa (abscedada), calculosa (calcificada) y cancerosa (acino-nodosa), mejorando todas las descripciones previas de los tuberculomas y enfatizó mas la relación entre la tuberculosis pulmonar con la tuberculosis en otros organos como riñon y laringe. Su principal error fue considerar a la tuberculosis como una consecuencia o secuela de fiebres eruptivas, enfermedades infecciosas agudas pulmonares, un tipo especial de sífilis y como una complicación mas de las enfermedades cardiacas.

El sucesor mas importante de Bayle fue Laennec(1781-1826), el famoso inventor del estetoscopio, quien hizo del estudio de la patología de la tuberculosis una obra maestra y con ello reformó toda la conceptualización de la patología pulmonar. Nativo de Britania, Laennec estudió medicina en Nantes cuando tenía tan solo 14 años bajo la tutela de los lideres de la medicina francesa de la epoca como lo fueron Corvisart en la Charite y Pinel en la Salpetriere, tambien tomo cursos con Bichat quien lo influyo profundamente y con el cirujano Dupuytren con quien posteriormente tuvo agrias diferencias.

Laennec estudio al tuberculo desde su formación mas incipiente en forma de una pequeña semilla grisacea hasta formar un conglomerado, reblandeciendose y necrosandose en la parte central hasta cavitarse; con esto estableció el concepto unitario en la tuberculosis, al considerar al tuberculoma o granuloma como la unidad. Ademas reconoció edades y estadios de la enfermedad, pero al igual que Bayle creyó erroneamente que la tuberculosis era una enfermedad hereditaria. Fue precisamente otro frances Cruveilhier

el primero en considerar a la tuberculosis como una enfermedad inflamatoria crónica.

El principio de las investigaciones que condujeron a descubrir la verdadera causa de la tuberculosis fueron realizadas por otro frances, Juan Antonio Villemin(1827-1892), al demostrar que la tuberculosis podia ser transmitida del hombre a los animales y de los animales a otros animales indefinidamente con la simple inyección de material caseoso proveniente de una lesión tuberculosa . Esta prueba, a pesar de ser definitiva no convenció a personajes tan importantes como Rodolfo Virchow, sin embargo, fue precisamente uno de los dicipulos de Virchow, Julius Cohnheim (1839-1884), quien al inocular material tuberculoso dentro de la cámara anterior del ojo de conejos pudo observar dia a dia y directamente el desarrollo de la enfermedad. Con este experimento probablemente nació la patología experimental.

En agosto de 1881, Roberto Koch (1843-1910) enfocó su atención en la tuberculosis(6, 7). En esta epoca todo médico sabía que solo unas cuantas familias se escapaban de sufrir la enfermedad. Koch expresó su interes por la tuberculosis a la Oficina Imperial de Salud con el siguiente comentario: "Si el número de victimas que clama una enfermedad es medida de su importancia, entonces aun las enfermedades infecciosas mas mortiferas como la peste bubonica o el colera asiatico deben de considerarse secundarias en relación con la tuberculosis. Las estadisticas nos enseñan que una septima parte de toda la población humana muere por tuberculosis, y si se considera solamente a las personas que se encuentran en edad productiva, la tuberculosis retira un tercio o

aun mas de este grupo de edad".

Robert Koch nacio en Klausthal Alemania, se graduó de médico en la Universidad de Gottingen y sirvió como médico militar en la guerra Franco-Prusiana (1870-1871). Posteriormente se estableció como médico rural en Alemania Oriental. Sin ninguna relación con un centro academico y sin preparación previa para realizar investigación realizó diversos estudios en bacteriología particularmente en relación con el Bacilus antracis, estudios por los que fue invitado por el director de la Universidad de Breslau para exponer sus resultados. Despues de 3 dias de estancia en la mencionada Universidad publicó el trabajo titulado "La etiología del antrax basada en el desarrollo del bacilo del antrax" con lo que inició su carrera científica.

El 18 de agosto de 1881 Koch inoculo 2 cobayos con material tuberculoso obtenido de un mono; en octubre el bacilo creció en forma pura, pero la demostración visual del mismo no fue posible, pues todos los métodos de tinción fallaron, Koch probó el azul de metileno, colorante que habia sido utilizado con exito por su compatriota Paul Ehrlich (1854-1915) quien lo uso para teñir las células de la sangre 4 años antes. Finalmente despues de 271 experimentos de tinción, la doble tinción con azul de metileno mas hidróxido de potasio al 10% y contrateñido con vesuvin un colorante ácido de color cafe que decoloraba todo excepto al bacilo tuberculoso, se pudo realizar por primera vez la observación microscópica directa del agente causal de la tuberculosis. Con gran cuidado Koch continuó sus investigaciones y antes de considerar el trabajo listo para publicación,

estableció los requisitos para considerar a un agente infecciosos como causante de una enfermedad. Estos requisitos son mundialmente aceptados y se les conoce como los postulados de Koch:

- 1.-El microorganismo esta presente y es demostrable siempre en todos los casos de la enfermedad.
- 2.-Debe ser cultivado en forma pura.
- 3.-La inoculación del producto del cultivo debe de producir la enfermedad en animales susceptibles.
- 4.-El agente debe ser recuperado de los animales inoculados y debe ser cultivado.

Koch tuvo dificultades para cultivar al bacilo tuberculoso en diferentes medios, hasta que uso el suero bovino, necesito 10 dias a 37° C. Para estar seguro Koch mantuvo 70 generaciones, pasandolo del cultivo a diferentes animales de experimentación. En efecto, de agosto de 1881 hasta mediados de marzo de 1882, Koch y sus ayudantes infectaron 172 cobayos, 32 conejos y 5 gatos, todos ellos mostraron las alteraciones anatomopatológicas características de la tuberculosis al realizarles la autopsia.

El 24 de marzo de 1882 Koch presento' los resultados de su investigación ante la Sociedad Fisiológica de Berlín, Rodolfo Virchow habia sido invitado pero no asistió a la demostración privada realizada por la tarde y tampoco estuvo en la reunión de la noche cuando Koch explico' con lujo de detalles sus investigaciones concluyendo que un bacilo específico era la causa de la tuberculosis(8, 9). Para la demostración llevo su microscopio y 200 laminillas, en cada una de las cuales se veia

claramente al bacilo. Pablo Ehrlich quien estaba entre el auditorio comentó:

"Esa tarde la mantengo permanentemente en mi memoria como el evento científico de mayor majestuosidad de todos los que he presenciado".

El bacilo tuberculoso es ahora llamado *Mycobacterium tuberculosis*, pertenece al orden de los Actinomycetales, es ácido resistente, no móvil, no forma esporas, tiene crecimiento muy lento, es resistente a desinfectantes químicos y tiene la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos. En 1905 Roberto Koch recibió el premio Nobel de Medicina y Fisiología por ser el fundador de la Bacteriología moderna y descubridor de *M. tuberculosis*. En 1910 Roberto Koch muere de enfermedad cardíaca a los 67 años de edad.

Posteriormente mucha investigación inmunológica se ha llevado a cabo con el estudio de la tuberculosis. El campo de la inmunidad celular fue abierto cuando los experimentos clásicos de Chase y Landsteiner mostraron que la respuesta de hipersensibilidad retardada a la tuberculina podía ser transferida a animales no sensibilizados con células de animales inmunizados. Poco tiempo después Lefford demostró que las células sensibilizadas a la tuberculina eran linfocitos T.

Mackness demostró que los linfocitos eran reactivos a bacterias intracelulares facultativas como *M. tuberculosis*, que reclutaban macrófagos en los sitios en donde existían bacterias e inflamación y además se incrementaba la función bactericida de los mismos (10).

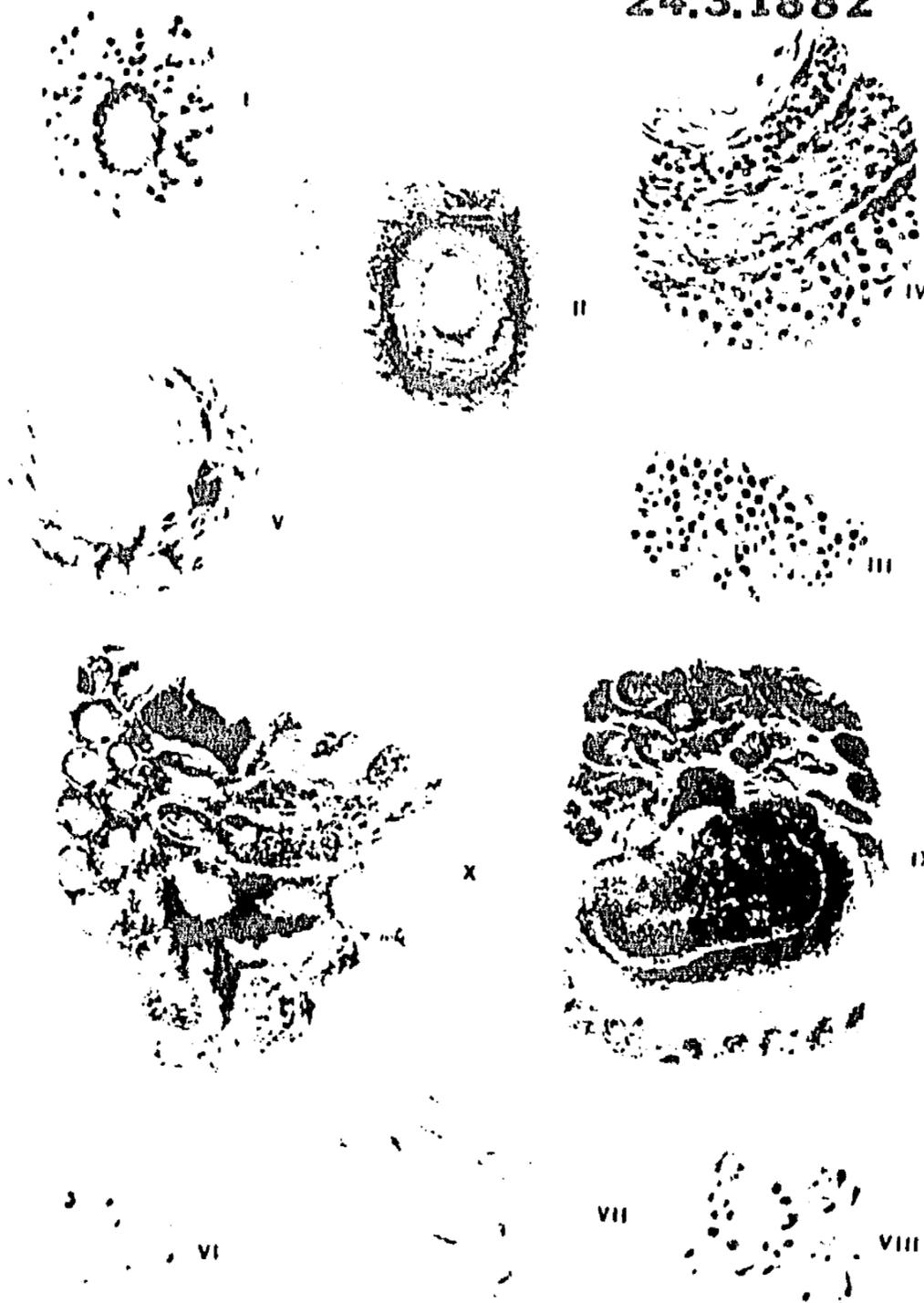
Bloom y Bennet posteriormente mostraron que la generación de un factor químico llamado factor inhibidor de la migración macrofágica producido por los linfocitos sensibilizados con antígenos micobacterianos, evitaba que los macrófagos abandonaran el sitio de reactividad inflamatoria; la producción de otras hormonas linfocitarias inducían además la formación de células gigantes, quimiotaxis y activación macrofágica.

En el momento actual la investigación en tuberculosis sigue activa, la utilización de técnicas modernas como la producción de anticuerpos monoclonales o la clonación de genes micobacterianos que codifican antígenos inmunodominantes entre otras, permitirán conocer mejor la patogenia de una de las enfermedades infecto-contagiosas más importantes que aun aquejan a la humanidad.



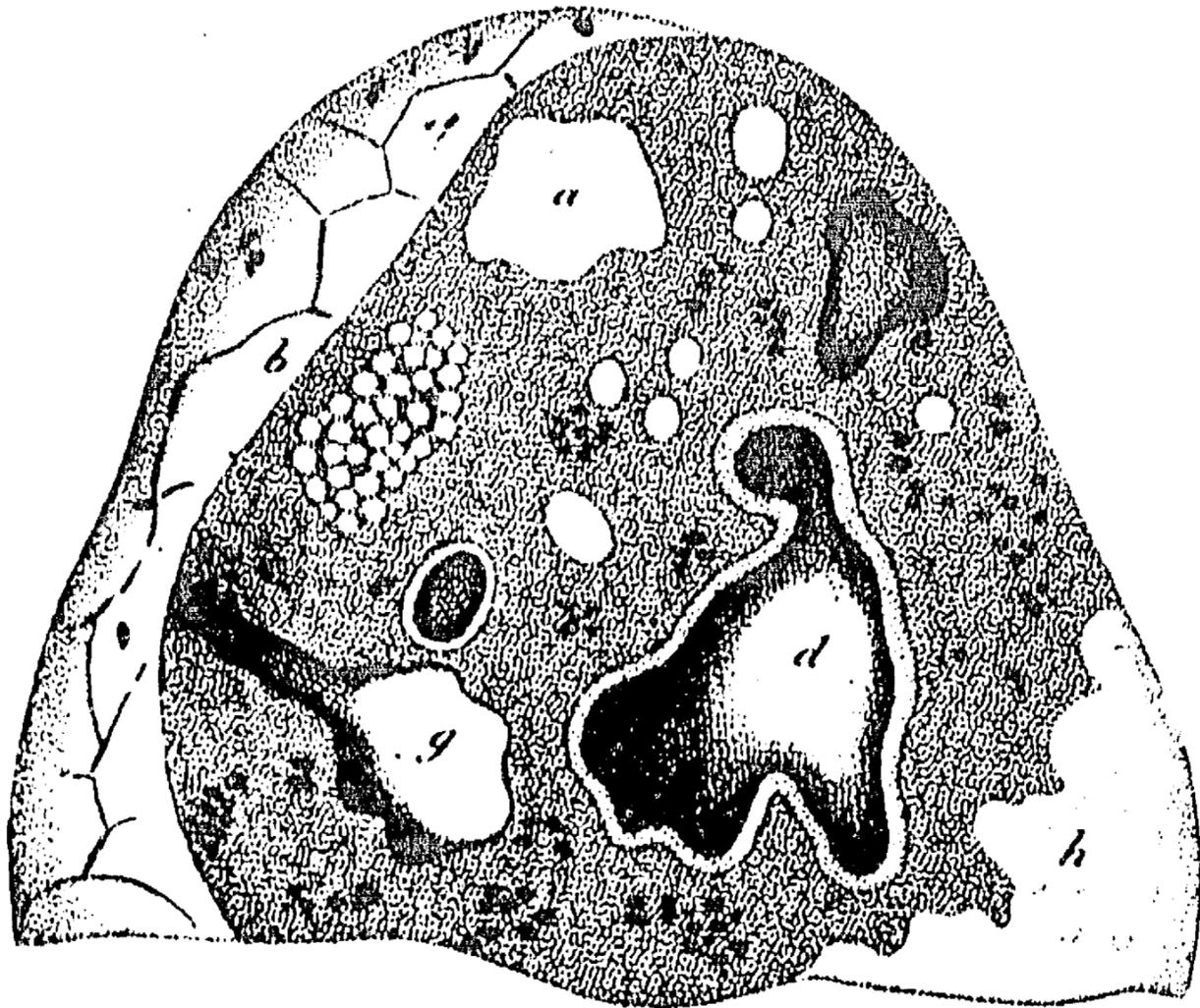
Roberto Koch (1843-1910)

24.3.1882



Esquemas que utilizó Roberto Koch en su publicación de 1884, sobre el descubrimiento de M. tuberculosis.

- I.- Una célula gigante con bacilos.
- II.- Arteria de distribución rodeada por bacilos tuberculosos.
- III.- Paquimeningitis tuberculosa basal.
- IV-V.- Arteritis fímica basal en cerebro.
- VI-VIII.- Bacilos tuberculosos en esputo.
- IX-X.- Pared de una caverna tuberculosa pulmonar.



Pulmon Tuberculoso. Treatise on Diseases of the Chest.

Autor: Rene-Theophile-Hyacinthe Laennec. 1823.

RESPUESTA INMUNOLOGICA EN TUBERCULOSIS.

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa potencialmente muy seria, que afecta los mecanismos de defensa inmunológicos profundamente y por largo tiempo. Cuando M. tuberculosis ingresa al aparato respiratorio o a otro organo, ocurren cambios en el sistema inmunológico encaminados a proteger al huesped, tanto del desarrollo de la infección como de las posibles futuras infecciones o reinfecciones producidas por el mismo agente. En general, está bien establecido que la protección en contra de las micobacterias es un proceso de inmunidad mediado por células o de hipersensibilidad retardada, que se inicia cuando linfocitos T sensibilizados reconocen antígenos bacterianos expresados por las células presentadoras de antígeno (11); en este proceso los macrófagos son las células efectoras y los linfocitos las células mediadoras, lo cual se ha corroborado experimentalmente al transferir la protección por transfusión de células linfoides sensibilizadas y no por suero hiperinmune (12, 13).

Por otro lado el bacilo tuberculoso es un microorganismo complejo en muchos aspectos debido a la multiplicidad de antígenos de diversa naturaleza química que lo conforman los que poseen diversos grados de inmunogenicidad y de capacidad para inducir múltiples alteraciones en el sistema inmunológico del huesped como son activación macrofágica, toxicidad, adyuvancia, inmunosupresión, autoinmunidad e inducción de inflamación granulomatosa entre otras (14).

A continuación se describen los antígenos micobacterianos de constitución lipídica, polisacárida y proteica mejor conocidos

asi como sus efectos sobre el huesped y la respuesta inmunológica tanto humoral como celular que inducen.

ESTRUCTURA ANTIGENICA DE M. TUBERCULOSIS.

El estudio de los antígenos de las micobacterias ha sido realizado con material obtenido por filtrado del medio de cultivo y/o de extractos obtenidos del bacilo completo. Actualmente hay un acuerdo general de que aparentemente no existen diferencias antigénicas cualitativas significativas entre el filtrado de cultivo y extractos celulares, aunque hay obvias diferencias cuantitativas (15).

Recientemente nuevas estrategias para la obtención de antígenos particularmente de naturaleza proteica han venido implementandose, sobre todo con la aplicación de tecnología de la biología molecular, lo que sin duda repercutira en el establecimiento de mejores pruebas diagnosticas, ademas de que permitirán una mejor disección de los eventos inmunoregulatorios generados durante el curso de la infección.

M. tuberculosis tiene una pared celular muy gruesa y de estructura quimica muy compleja, en la que se encuentran casi todos los elementos asociados con la patogenia, respuesta inmunológica e inmunopatológica de la tuberculosis, como son la necrosis caseosa, la inducción de protección e hipersensibilidad retardada asi como la promoción de la generación de anticuerpos y de toxicidad(16).

Inmunologicamente se sabe que la respuesta de anticuerpos esta primariamente dirigida a polisacaridos de la pared especificamente a las unidades alfa D arabino-manosil del

complejo peptidoglicano unido a arabinogalactan y a lipoarabinomanan, así como en menor grado a los residuos terminales manopiranosil del fosfatidil inositol manósido de la membrana citoplasmica(16). Otros antígenos importantes de naturaleza lipopolisacárida con componentes lipídicos que se encuentran en la pared celular son los micósidos; una de las características bioquímicas más importante de estos compuestos es la ausencia de aminoácidos. El representante más importante de estos compuestos es el glicolípido fenólico, componente que se ha relacionado con la capacidad de inmunosupresión, bloqueo de la actividad de radicales libres de oxígeno y de la expresión de proteínas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad en los macrófagos(17).

Entre los antígenos micobacterianos de naturaleza lipídica, más importantes está el muramil dipeptido que también está presente en la pared celular; de este elemento depende en gran parte la capacidad adyuvante de las micobacterias. La toxicidad depende sobre todo del factor cuerda también localizado en la pared celular(18), así como de los sulfátidos, componentes que han sido correlacionados con el grado de virulencia(19, 20). Otros glicoconjugados altamente inmunogénicos de la pared celular son los glicopeptidolípidos, lipo-oligosacáridos y glicolípidos fenólicos que contribuyen además a la constitución de la barrera hidrofóbica externa de la bacteria.

Además hay lípidos en el citoplasma de M. tuberculosis, pero es con mucho la pared celular el sitio en donde se concentra la mayor parte de estas sustancias. Otros lípidos de importancia antigénica son: el ácido micólico, los fosfolípidos, la cera D y

los micósidos, los que están presentes también en la pared celular. El efecto de los lípidos micobacterianos sobre el huésped son fundamentalmente de toxicidad. La virulencia de *M. tuberculosis* se ha relacionado a dos glicolípidos de pared: el factor cuerda y los sulfátidos(18-21). El factor cuerda (trehalosa 6-6' dimicolato) es letal cuando se inyecta intraperitonealmente en ratones(18), induce activación de la vía alterna del complemento(22), inhibe la migración de leucocitos polimorfonucleares, estimula la actividad de la enzima nicotinamida adenina dinucleotidasa(lo cual resulta en decremento de la actividad de NAD en los tejidos infectados)(23) deprime el metabolismo del glucógeno y piruvato en hígado y músculo(24), produce hinchamiento y fragmentación de las crestas mitocondriales con lo cual altera el flujo de electrones de la cadena de fosforilación oxidativa probablemente por reacciones específicas entre los grupos hidroxilo del mismo y las enzimas de la cadena respiratoria(25). El factor cuerda hace contacto a través de sus dominios hidrofóbicos con la interfase acuosa, lo que facilita la adsorción de proteínas, preferentemente de fibrinógeno con lo cual cataliza la formación de trombina que a su vez libera fibrinopeptido B, este peptido es quimiotáctico para macrófagos y neutrofilos(26); el incremento en la estabilidad de la fibrina promueve la persistencia de inflamación y origina hemorragia por inhibición de la coagulación sanguínea secundaria a el efecto anticoagulante de los productos de degradación de la fibrina. Tal vez el efecto de virulencia más importante del factor cuerda es la capacidad de bloquear la

fusión fagosoma-lisosoma permitiendo que la micobacteria escape del efecto citolítico del macrófago.

Los sulfátidos son esteres de trehalosa sulfato substituidos con metil ácidos ramificados; existen 5 tipos diferentes: SL-1, SL-1', SL-II, SL-II' y SL-III; el más importante es el SL-I. En general existe correlación entre la producción de sulfátidos y el grado de virulencia(20), los sulfatidos pueden bloquear la fusión lisosoma-fagosoma debido a que son muy electron negativos y a sus propiedades anfifáticas(21). Otros lípidos han sido considerados como potenciales factores de virulencia, tal es el caso de los ácidos micolipénicos, ácido pteicoico, micocerusico, ptioccerol y dimicocerosatos(19). Sin embargo en comparación con el factor cuerda y los sulfátidos ninguno de ellos es capaz de bloquear la fusión fagosoma-lisosoma.

La cera D es un péptido glicano constituido por micoloilarabinogalactan unido por enlaces peptídicos y fosfodiéster a ácido murámico; el componente muramil-dipeptido tiene capacidad adyuvante(27), induce inflamación granulomatosa(28), necrosis en cobayos(29), incrementa la proliferación de precursores de granulocitos y macrófagos en médula ósea(30), y experimentalmente a dosis bajas produce linfopoyesis, mientras que dosis altas induce linfopenia, aumento de monocitos y neutrofilos en banda así como activación macrofágica(31), además se ha observado que el 'muramil dipeptido deprime la respuesta inmunológica tanto humoral como de citotoxicidad(32), y que genera células T esplénicas con actividad supresora, cuando el muramil dipeptido se acopla a 6-0-micoloil tiene efecto supresor selectivo para IgE (33).

Los antígenos de naturaleza proteica son de gran significado inmunológico debido a que son los componentes químicos reconocidos por los linfocitos T y constituyen por lo tanto la base de la reactividad inmunológica protectora. Con la utilización de diferentes formas de extracción química se purifica un polipeptido de la pared celular(34), el cual esta aparentemente unido a ácido diaminopimélico, ácido murámico y a glucosamina, el cual participa en la capacidad de adyuvante y en la inducción de hipersensibilidad retardada.

En el citoplasma, membrana y pared de todas las micobacterias existen un gran número de proteínas antigénicas. El trabajo pionero de Florence Seibert con extractos similares a los que obtuvo Robert Koch filtrando los medios de cultivo y precipitándolos con alcohol y ácido acético le permitió obtener 3 proteínas antigenicas mayores (A, B y C) y dos polisacáridos (I y II). Estos estudios fueron fundamentales en el desarrollo del conocimiento de las proteínas antigenicas de M. tuberculosis(35). Desde el punto de vista inmunológico los 3 antígenos proteicos fueron capaces de inducir hipersensibilidad retardada mientras que los polisacáridos no tuvieron esta capacidad(36). Los antígenos proteicos han sido estudiados con técnicas bioquímicas modernas como la inmunolectroforesis(37), el fraccionamiento fisicoquímico por solubilidad, carga y peso molecular(38) entre otros; con esta metodología se ha demostrado que M. tuberculosis tiene muchos antígenos proteicos, algunos de los cuales son especie específicos y otros no lo son, además muchas de estas proteínas interaccionan con los elementos del sistema

inmunológico y pueden ser la base para la producción de nuevos reactivos con fines diagnósticos y herramientas esenciales para la comprensión de la patogenia.

Uno de los enfoques novedosos para estudiar la inmunodominancia de antígenos proteicos de M. tuberculosis ha sido la producción de anticuerpos monoclonales(39), Con esta y otras metodologías se han identificado antígenos interesantes en cuanto a su inmunodominancia y potencial patogenico, tal es el caso de las proteínas de 65, 70, 38, 19 y 14 kD entre otras. El analisis de la respuesta inmune a antígenos ha demostrado la existencia de anticuerpos y de linfocitos T tanto en humanos como en animales de experimentación.

La proteína de 65 kD es un antígeno que esta presente en una gran variedad de bacterias(40), con el uso conuinado de anticuerpos monoclonales y la comparación en la secuencia del DNA que la codifica, esta proteína fue identificada como el producto homologo del gen gro EL de E. coli con la que guarda una homologia del 65% y hasta del 95% con la de M. lepra(41). Ha sido purificada de linfocitos humanos(42).La proteína de 65 kD pertenece a la familia de proteínas de stress o choque termico(HSP). En M. tuberculosis gran parte se encuentra asociada a la pared celular, ya que se obtiene de la fracción insoluble remanente despues de la disrupción de las células bacterianas. Se trata de una proteína con estructura secundaria alfa helice, y sin regiones hidrofóbicas ni residuos de cisteina, se han desarrollado varios hibridomas que reconocen epítopes diversos en la misma molécula, hay algunos exclusivos de M. tuberculosis. Tambien se han clonado células T que reconocen

determinantes antigénicos de esta molécula, capaces de generar respuestas de hipersensibilidad retardada(43). Sin embargo hasta el momento no se ha descrito si los linfocitos que reconocen a este antígeno son estimulatorios o supresores in vivo, aunque esta bien demostrado que induce una intensa respuesta inmunológica tanto humoral como celular y desde el punto de vista patológico una vigorosa respuesta inmunológica puede originar autoinmunidad cruzada y enfermedades autoinmunes como es el caso de la artritis por adyuvante (44).

Otro antígeno de gran interes es la proteina de 70 kD, que al igual que la de 65 kD es una proteina de choque termico, ampliamente distribuido en la naturaleza(45) con homologos estructurales como la proteina de E. coli Dna K (46). Las proteinas de choque termico son sobresintetizadas en respuesta a elevación de la temperatura, por metabolitos oxidativos y por tóxicos quimicos (45). La función de estas proteinas es aun especulativa pero es probable que sean capaces de utilizar energía a partir de la hidrólisis de ATP para ligarse a otras proteinas con el fin de estabilizar su conformación molecular, promover su correcto ensamblaje para la formación de subunidades y translocación a diferentes componentes subcelulares(45, 46). Las proteinas de 65 y de 70 kD son pues importantes en el ensamblaje y desensamblaje de proteinas o complejos proteicos, actividad que esta aparentemente dirigida a procesos de adaptación ante un medio hostil como es el caso de M. tuberculosis despues de ser fagocitada por el macrófago, posteriormente debe de existir una red compleja de interacciones

entre el sistema inmunológico y la bacteria que pueden concluir en el establecimiento de inmunidad protectora o en la generación de procesos inmunopatológicos como autoinmunidad(44).

La proteína de 38 kD tiene 30% de homología con la proteína Pho S de E. coli que une fosfatos (47), aparentemente funciona como un transportador de fosfatos en la bacteria(47), por su capacidad de unirse a concavalina A se ha definido como una glicoproteína. Se trata de un antígeno de gran interés pues en estudios serológicos es la que han dado los mejores resultados (48).

El complejo proteico de 30-31 kD ha despertado mucho interés por su capacidad de unirse a fibronectina (49), lo cual puede ser de gran importancia biológica sobre todo en el proceso de adherencia a la membrana macrofágica como evento inicial de la fagocitosis. Al igual que con los experimentos de inmunidad celular, el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido identificar con anticuerpos monoclonales, epitopes B específicos en diversos antígenos micobacterianos(50).

RESPUESTA INMUNOLOGICA CELULAR Y HUMORAL EN TUBERCULOSIS.

La infección por M. tuberculosis puede afectar los mecanismos inmunológicos profunda y prolongadamente. Cuando el bacilo tuberculoso penetra al aparato respiratorio o a otro organo se generan cambios en el sistema inmunológico dirigidos a proteger o limitar la enfermedad, de manera que no en todos los casos el contacto inicial con la bacteria produce enfermedad, varios factores son importantes para controlar la enfermedad. La inmunidad protectora en tuberculosis es mediada por células, los macrófagos son las células efectoras y los linfocitos T son las células mediadoras.

Los macrófagos son elementos celulares fundamentales en el proceso de reconocimiento y destrucción del bacilo tuberculoso. En efecto, esta bien establecido que la capacidad del Bacilo de Koch para producir enfermedad depende de su virulencia y de la capacidad microbicida del macrófago (51). La respuesta inmunológica se establece despues de que los macrófagos han fagocitado y procesado los antígenos bacilares, de esto resulta acumulación y activación de los macrófagos en sujetos con hipersensibilidad retardada como resultado de vacunación o infección previa con bacilo tuberculoso(52). Esta respuesta rápida generalmente inhibe la proliferación del bacilo tuberculoso con lo cual se evita la enfermedad . Si los macrófagos permiten que el bacilo proliferare intracelularmente , estos moriran y la lesión tisular se hara mayor con la posibilidad de que se disemine los bacilos por via hematogena lo cual puede provocar la muerte (52). Existe variabilidad

individual en la respuesta microbicida de los macrófagos (12).

La lisis del bacilo tuberculoso por los macrófagos depende inicialmente de la ingestión de la bacteria y posteriormente de la fusión fagosoma-lisosoma . Uno de los factores genéticos mas importantes relacionados con la resistencia o susceptibilidad es la capacidad del macrófago para destruir a la bacteria(53, 54).

La inmunidad celular protectora inicialmente se produce localmente; los macrófagos ingresan al sitio de lesión en un estado no activado, donde se activan y desarrollan resistencia. Entre mayor sea la acumulación de macrófagos y su grado de activación, habra mas destrucción del bacilo (12).

La interacción del bacilo con macrófagos no activados produce con frecuencia la muerte de estos y la liberación de bacterias; posteriormente los macrófagos se activan como consecuencia de la presencia de las interleucinas producidas por linfocitos y por los macrófagos mismos. Las células activadas en consecuencia fagocitan y destruyen al bacilo con gran eficiencia(53).

Hay un recambio constante de macrófagos en la lesión tisular, muchos mueren y otros emigran a travez de los vasos linfaticos. Sin embargo muchos macrófagos permanecen en la lesión y se activan, este fenómeno se produce en paralelo con el desarrollo de hipersensibilidad retardada debido a la presencia de una gran cantidad de antígenos que estimulan la producción de linfocinas por los linfocitos T acumulados en la lesión.

Antes de que se desarrolle la hipersensibilidad celular relativamente pocas células T con receptores específicos para los antígenos de la micobacteria estan presentes ya que la expansión

clonal todavía no ha ocurrido. Después de que la mayoría de los bacilos han sido destruidos, disminuye el estímulo antigénico y en consecuencia escasa cantidad de sustancias quimiotácticas y linfocinas activadoras de macrófagos de manera que son pocos los macrófagos que ingresan a la lesión (51).

Todo este proceso inductivo establecido por la expansión de células T e incremento de macrófagos activados se conoce con el término de inmunidad celular(51), la cual capacita al sistema inmune para destruir al bacilo; se trata pues de una respuesta benéfica supuestamente producida porque existe relativamente poco antígeno bacilar en los tejidos. Cuando existe mucho antígeno bacilar la respuesta de inmunidad celular es mas energética, produciéndose entonces necrosis tisular lo que se conoce como hipersensibilidad retardada (55).

El número de linfocitos y macrófagos activados disminuye con el tiempo al reducirse la carga bacilar, sin embargo la reactividad celular puede reestablecerse rapidamente por reexposición a los antígenos bacilares(56), ya que desde la primera exposición, el individuo infectado retiene un buen número de células T clonalmente expandidas las cuales tienen receptores específicos para esos antígenos. Después de la reexposición, estas células de memoria producen linfocinas con lo cual hay una acelerada acumulación y activación de macrófagos, e incluso estos pueden destruir en forma inespecífica una gran variedad de microorganismos facultativos intracelulares, de manera que la especificidad de la inmunidad mediada por células reside completamente en los linfocitos T no en los macrófagos.

Una vigorosa respuesta de hipersensibilidad retardada cutanea producida ante la presencia de antígenos proteicos del bacilo tuberculoso se presenta aun años despues del contacto primario, lo cual probablemente se explica por la presencia de bacilos en estado latente en la lesión cicatrizal. Parece ser que dichos bacilos se liberan de tiempo en tiempo, siendo rapidamente destruidos, lo cual mantiene la sensibilidad a los antígenos bacilares.

Existen un grupo cada vez mas numeroso de glicoproteinas de membrana en los linfocitos y macrofagos conocidas como antigenos de grupos de diferenciacion (CD); algunas de estas moléculas pueden ser utilizadas como marcadores fenotípicos para identificar subfamilias en sangre, fluidos corporales y tejidos. Parece ser que todos los linfocitos maduros expresan los determinantes CD-2 y CD-3; las subfamilias expresan determinantes casi exclusivos de ellas, como la glicoproteina de 57 kD denominada L3T4 en los ratones y CD-4 en humanos la cual se expresa en la membrana de las células T cooperadoras y de la glicoproteina de 32 kD denominada Lyt-2 en ratones y CD-8 en humanos expresada en células T que pertenecen a la familia supresora/citolitica(57).

Los estudios inmunohistológicos realizados para estudiar la respuesta inflamatoria inducida por la inyección de antígenos proteicos de M. tuberculosis(derivado proteico purificado o PPD) han demostrado que en las primeras horas post-inoculo(48-96 hr) la mayoría de las células T expresan el fenotipo cooperador y muy pocas el supresor/citolitico y una alta proporción de células

mononucleares expresan proteínas de clase II de CMH con rápida movilización de las células de Langerhans desde la unión dermoepidérmica a los espacios perivasculares de la dermis(58, 59). Es posible que sea la célula de Langerhans la que inicie la respuesta de hipersensibilidad retardada, mientras que en el pulmón probablemente lo sea el macrófago alveolar, el cual además de destruir al bacilo, procesa y presenta antígenos seleccionados a las células T y produce interleucina I(IL-1). El linfocito T produce interleucina 2(IL-2), que induce proliferación de linfocitos T y B, activa células NK y macrófagos, colaborando con el interferón gamma (12). El conjunto de linfocitos T y macrófagos reunidos en el sitio de reactividad inmunológica inducida por los antígenos del bacilo constituye al granuloma, expresión histopatológica característica de la tuberculosis. Al menos en la tuberculosis experimental en ratón, se ha demostrado recientemente que tanto los linfocitos T cooperadores como los Lyt 2 con funciones citolíticas son generados y ambos participan en la protección y patogénesis de la enfermedad (60). Los dos tipos celulares producen interferón gamma pero además las células Lyt 2 son capaces de lisar a macrófagos infectados con micobacterias con lo cual quedan libres las bacterias para ser fagocitadas y destruidas por macrófagos activados, ya que los macrófagos con micobacterias intracitoplasmáticas incapaces de destruirlas se convierten en nichos de protección para el patógeno(61).

Se ha demostrado que durante la infección por *M. bovis* aparecen células NK (62). Un incremento en la actividad de estas células

en pacientes con tuberculosis pulmonar ha sido demostrado(63). En animales con deficiencia natural de células NK como el ratón beige C57 Bl/6j-bgj/bgj hay mayor susceptibilidad a la tuberculosis, lo que sugiere su participación en la protección en contra de M. tuberculosis(64).

El leucocito polimorfonuclear es otra célula importante en la protección; es muy abundante durante la etapa inflamatoria exudativa inicial de la infección por M. tuberculosis. Su presencia en los pulmones es debida aparentemente a la liberación de factores quimiotacticos por macrófagos alveolares(65). Los neutrofilos preceden a los monocitos sanguineos en la inflamación granulomatosa(66) y liberan sustancias quimiotacticas que atraen a los monocitos(67). Ademas los leucocitos polimorfonucleares pueden influir indirectamente en la activación de los macrófagos puesto que estos utilizan peroxidasa de los neutrofilos muertos para incrementar la iodinación lo cual amplifican la capacidad microbicida mediada por peróxido de hidrogeno(68).

En relación con la respuesta inmune humoral en tuberculosis, esta es inicialmente dada por incremento en anticuerpos de clase M seguido de aumento y persistencia de IgG(69). Aparentemente el nivel de IgA se correlaciona con la enfermedad, puesto que los enfermos con títulos altos sufren de enfermedad mas severa(70), en estos pacientes hay ademas hipergamaglobulinemia policlonal. En efecto, se ha establecido que existe un espectro de la enfermedad, que va desde pacientes con inmunidad celular muy eficiente, hasta la anergia en la cual la cantidad de anticuerpos

se incrementa y la inmunidad celular disminuye paralelamente(71) Existen en la literatura otros reportes en los que se informa que el título de anticuerpos se incrementa durante el tratamiento en correlación con una mejoría clínica(72); también se ha reportado un peor pronóstico en enfermos con serología negativa(73).

Existen múltiples trabajos con diferentes microorganismos en los que se sugiere que los linfocitos B y los anticuerpos pueden tener una función fundamental en la regulación de la respuesta inmunológica mediada por células(74). En tuberculosis se ha demostrado que se puede suprimir la respuesta de hipersensibilidad tardía a BCG por linfocitos B que producen anticuerpos anti-PPD, que a su vez estimulan a linfocitos B a producir anticuerpos anti-idiotipo, estas células activan a linfocitos T supresores los cuales inactivan la respuesta celular efectora antígeno específica, los anticuerpos anti-idiotipo son por lo tanto un elemento integral del circuito inmunosupresor(74).

Experimentalmente se ha demostrado que linfocitos B obtenidos del bazo de ratones infectados por vía intravenosa con BCG y transferidos a ratones receptores singénicos también infectados inducen una disminución acentuada de la respuesta inflamatoria granulomatosa(74). En conclusión parece ser que la supresión de la respuesta inmunológica celular en tuberculosis es mediada por linfocitos B anti-PPD, por linfocitos B anti-idiotipo y por linfocitos T supresores, estas células aparecen en diferentes momentos durante el proceso infeccioso y parece ser que

pertenece al mismo circuito de inmunosupresión, sin embargo otros mecanismos podrían también estar relacionados(75, 76).

El complemento hemolítico total está incrementado en pacientes con tuberculosis(77), y se han demostrado complejos inmunes(78) constituidos por IgG, IgA e IgM(79). A mayor cantidad de estos peor pronóstico. Esto podría estar relacionado con virulencia de la micobacteria(79). Los complejos inmunes circulantes pueden producir glomerulonefritis(80) y participan en la formación del granuloma.

La existencia de factores genéticos relacionados con la susceptibilidad a la infección por micobacterias ha sido propuesta desde hace mucho tiempo. Hay diferencias raciales en la susceptibilidad(54), susceptibilidad semejante en gemelos y cosegregación de marcadores cromosómicos conocidos(81). Por varios motivos ha sido difícil estudiar este problema en población humana y la mayoría de la información es circunstancial(81); sin embargo los modelos animales en los cuales la influencia de los factores ambientales puede ser controlada han aportado evidencia directa de este tipo de regulación(82). El primer análisis genético se realizó en una colonia de conejos que fueron selectivamente cruzados para resistencia o susceptibilidad. El rasgo genético de resistencia a la tuberculosis se mostró a través del análisis mendeliano de ser dominante, múltiple y aditivo sobre el de susceptibilidad(82). La expresión fenotípica de resistencia se manifiesta por una mayor capacidad de los macrófagos alveolares para fagocitar, destruir al bacilo y generar respuesta inmunológica. El gen

relacionado con esta actividad ha sido caracterizado en ratones y se le ha denominado gen BCG(83).

Existe variación entre las diferentes cepas de ratón en la expresión de este gen; algunas son susceptibles(C 57 BL/6J) y otras resistentes (Suiza) (81, 83). El gen BCG es unico, autosómico, dominante y esta localizado en el cromosoma 1 cerca del centromero. En los humanos también existe y esta localizado en el cromosoma 2 (83); este gen regula también resistencia contra S tiphy y L donovani (83)que al igual que M tuberculosis son patógenos intracelulares facultativos de macrófagos.

EL SISTEMA INMUNOLOGICO DEL PULMON.

Los pulmones son unicos en que estan expuestos al aire del medio ambiente externo y al medio ambiente interno representado por la sangre. Con el aire inhalado no solo se obtiene oxígeno sino también muchas particulas extrañas incluso agentes biológicos infecciosos cuya eliminación depende de las células del sistema inmunológico local representado por pequeños acumulos de linfocitos y macrófagos dispersos en la lamina propia de los bronquios y denominado con el termino de tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial(TLAMB) (84). En la rata éste esta constituido por 30 a 50 agregados linfoides ubicados en la bifurcación entre la arteria y el bronquio; generalmente son atravezados por un nervio y en ocasiones es posible observar celulas ganglionares en la periferia. Además del TLAMB, los macrófagos alveolares e intersticiales son elementos de gran significado funcional en el sistema inmunológico del pulmón.

El TLAMB esta constituido por folículos linfoides los cuales estan poblados tanto por linfocitos B como T, su distribución es indeterminada y variable. Además hay en los folículos fibroblastos, celulas reticulares, macrófagos, células interdigitantes y células dendríticas foliculares, asi como venulas de endotelio alto y linfáticos eferentes que rodean al folículo y drenan en vasos periféricos semejantes a sinusoides los cuales se comunican con linfaticos de mayor tamaño. No hay vasos linfaticos aferentes bien definidos(84, 85).

En el conejo, ratón y rata el TLAMB aparece despues del cuarto dia de nacimiento, aunque antes existen linfocitos T y B en el

estroma pulmonar(86). El primer evento en la histogénesis del TLAB es la congregación de células reticulares en el tejido conectivo submucoso; posteriormente hay infiltración de células B y plasmáticas; en etapas tardías aparecen linfocitos T . Al mismo tiempo hay formación de vasos sanguíneos así como venulas de endotelio alto y poco a poco las células linfoides atraviezan la muscular de la mucosa para establecerse en la lamina propia(86). Poco después los linfocitos infiltran al epitelio lo cual es acelerado por la presencia de antígenos aunque su formación es independiente de la presencia de estos(84, 87). Se observan áreas definidas de células T y B solo después de la semana 12, el tamaño de los folículos se incrementa después de la estimulación antigénica(88), de hecho los antígenos determinan la organización interna de los dominios T y B.

El epitelio que cubre al TLAB es diferente al resto que reviste al árbol bronquial representado por las células ciliadas, De Clara, Kultschitzky, caliciformes, intermedias, serosas y en cepillo(89). En el epitelio que cubre a los folículos linfoides hay una ausencia relativa de células caliciformes, disminución en el número de células ciliadas y predominio de células con microvellosidades cortas. Se han descrito cambios en la morfología y composición de estas células durante la estimulación antigénica(90). Muchas células linfoides infiltran normalmente el epitelio, la mayoría de ellas son linfocitos T con fenotipo cooperador(91) y ocasionalmente hay células T supresoras.

Las células epiteliales que cubren a los folículos linfoides del TLAMB captan partículas antigénicas solubles, agregadas e

inertes(90). Dichas células se caracterizan por tener gran núcleo, abundantes ribosomas, cisternas cortas de retículo endoplasmico rugoso y escaso desarrollo del aparato de Golgi; tienen además numerosas vacuolas electronlucidas en su porción apical y vesículas endocíticas, poseen microvellosidades de forma irregular. Debido a su función, estas células se encuentran en estrecho contacto con linfocitos y macrófagos además de que la membrana basal subyacente es acentuadamente porosa, lo que favorece el paso de células y antígenos(92). El epitelio que cubre al TLAB expresa proteínas de clase II despues del estímulo antigénico, por lo que podría ser capaz de presentar antígeno(93). Linfocitos, neutrofilos y macrófagos infiltran al epitelio lo cual parece depender de la carga antigénica(93). También bajo estas condiciones aparecen macrófagos con proteínas de clase II en la membrana (94), además de células dendríticas ubicadas entre las células epiteliales con morfología idéntica a las de las células de Langerhans de la unión dermoepidérmica; están ubicadas tanto en traquea como en bronquios de humano y ratón(94).

En el TLAB las células B se organizan formando folículos, mientras que las células T se concentran en las áreas inter y parafoliculares; una tercera área es la que se encuentra por debajo del epitelio en la que hay una mezcla de células T y B (95). Linfocitos B con IgG e IgM en la membrana se encuentran en proporciones semejantes(95); los linfocitos con IgA son muy escasos. Cuando menos en la rata los linfocitos T cooperadores duplican a los linfocitos T supresores/citolíticos(95, 96).

La población de macrófagos del TLAB es heterogénea tanto desde el punto de vista morfológico como funcional(96). Esta población macrofágica es una de las tres subpoblaciones que posee el pulmón, las otras dos son los macrófagos alveolares y los del intersticio pulmonar(97).

Otro componente celular del TLAB con importante actividad inmunológica son las células reticulares, que se caracterizan por expresar proteínas de clase II de CMH; tienen prolongaciones citoplasmicas que contactan con las membranas de los linfocitos T y poseen además actividad de fosfatasa acida(97). Las células dendriticas foliculares captan complejos inmunes en sus membranas son mas abundantes despues de la estimulación antigénica(98). Componentes fundamentales del sistema inmunológico que no pertenecen propiamente al TLAMB son los macrófagos intersticiales los cuales dan origen a los macrófagos alveolares. Estos estan ubicados estrategicamente en la interfase aire-tejido a nivel alveolar y son las primeras células que interactuan con los antígenos inhalados. Se trata de una población heterogénea dependiendo de la edad y grado de diferenciación celular. Existen diferencias evidentes en su capacidad microbicida en comparación con otras poblaciones de macrófagos; por ejemplo el monocito sanguineo parece que tiene mayor capacidad microbicida mientras que los macrófagos intersticiales son poco bactericidas e incluso refractarios a ser estimulados por linfocinas.

Los macrófagos alveolares son células de una gran importancia inmunológica. Las funciones mas importantes que se les ha atribuido son la eliminación de antígenos antes de que contacten

al sistema inmunológico. Los macrófagos alveolares son capaces de emigrar a los ganglios linfáticos cercanos en donde inducen respuestas inmunológicas eficientes(99), suprimen la respuesta inductora inmunológica debido a que tienen poca capacidad de presentación antigénica y producen constantemente mediadores inmunosupresores principalmente prostaglandina E.

Todos estos constituyentes celulares y moleculares entran en juego de manera sumamente compleja ante la presencia de el bacilo tuberculoso. Del establecimiento de sus funciones e interacciones depende en gran parte el desarrollo de eventos de protección e inmunopatológicos.

PATOGENIA Y PATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.

La puerta de entrada del bacilo de Koch es habitualmente la vía respiratoria. En ocasiones la tuberculosis puede adquirirse por ingerir alimentos contaminados (particularmente leche) o por inoculación accidental con objetos contaminados a través de la piel.

Cuando las partículas infecciosas son inhaladas, solo las gotas que tienen de 1 a 3 bacilos son capaces de iniciar la infección, esto porque se mantienen en suspensión en el flujo de aire que entra al espacio alveolar. Partículas más grandes se adhieren a la superficie epitelial de la nasofaringe o de la tráquea, los cilios las desplazan y con frecuencia son deglutidas o expectoradas, en general es poco frecuente que la mucosa respiratoria o gastrointestinal se infecten, solo en el caso de que exista una gran cantidad de bacilos (52).

El bacilo tuberculoso es labil, rápidamente pierde su capacidad de virulencia y muere si se seca o si se expone a la luz solar. La infección pulmonar empezará solo cuando bacilos virulentos son fagocitados por macrófagos alveolares débiles. No se sabe con exactitud cuántas gotas con bacilos deben de ser inhaladas para la infección, en los seres humanos se ha calculado que la cantidad varía de 5 a 200.

Al multiplicarse el bacilo dentro del macrófago alveolar con frecuencia lo lisa; los bacilos liberados son fagocitados de nuevo por otros macrófagos los cuales son atraídos al igual que los monocitos sanguíneos por detritus celulares y por diversos factores quimiotácticos. Durante el inicio de la infección

macrófagos y bacilos viven aparente armonía de manera que no se produce demasiada necrosis; posteriormente, en aproximadamente 2 a 4 semanas se establece la respuesta de inmunidad celular y como consecuencia la hipersensibilidad retardada, en este momento es cuando los macrófagos adquieren su máxima capacidad microbicida pero también muchos mueren por las propias capacidades de virulencia del bacilo y en el tejido se organiza un proceso inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos con necrosis central(necrosis caseosa) llamado tuberculo. Los macrófagos no pueden penetrar al centro necrotico ya que este es avascular, pues un gran numero de vasos sanguineos se trombosan(100). Hay ademas un pH acido, baja tensión de oxígeno y alta concentración de bacilos. Debido a la baja tensión de oxígeno los bacilos también mueren y los macrófagos de la periferia poco a poco fagocitan y eliminan los detritus celulares. En general se ha considerado que el principal culpable de la necrosis tisular es la respuesta de hipersensibilidad retardada(52).

Durante esta primera exposición al agente infeccioso, es posible que los bacilos alcancen el torrente sanguineo y se diseminen a organos distantes, sitios en donde pueden morir, quedar en un estado latente o producen una forma grave de la enfermedad por diseminación extensa e infección de varios organos (101). La infección de un individuo sin contacto previo con el bacilo se le llama primoinfeccion y si desarrolla la enfermedad tuberculosis primaria la cual se manifiesta anatomopatologicamente por la triada de neumonitis focal con linfangitis y adenitis(complejo primario de Ratke). La neumonitis

focal se denomina nódulo de Gohn, el cual se encuentra por debajo de la pleura en la parte inferior de los lóbulos superiores o en la parte superior de los lóbulos inferiores. Los focos múltiples o bilaterales son raros. El foco de Gohn activo es un nódulo de 1 a 1.5cm, blanco grisáceo de consistencia media, histológicamente esta formado por granulomas.

En sujetos con respuesta inmunológica adecuada, la infección primaria es limitada y los granulomas terminan en una cicatriz fibrotica y calcificada. Sin embargo los bacilos no se eliminan por completo, pueden persistir por años, quizá por toda la vida del sujeto infectado.

La tuberculosis primaria progresiva afecta sobre todo a niños. El foco primario es generalmente de localización pulmonar, crece rápidamente, erosiona la pared bronquial y se disemina a travez de las vias aereas dando origen a lesiones; los ganglios linfaticos regionales aumentan mucho de tamaño; es factible que los bacilos se diseminen por via hematógica dando origen a la forma miliar o generalizada que es la forma mas grave de la enfermedad.

Cuando la tuberculosis se presenta en un individuo previamente sensibilizado o infectado se le llama tuberculosis secundaria. La mayoría de los casos se deben a reactivación de tuberculosis primaria secundaria endógena) y puede ocurrir en cualquier momento posterior a ella, con frecuencia años despues como consecuencia de un estado de inmunosupresión. Menos frecuente es la tuberculosis secundaria exógena proveniente por una nueva carga bacilar obtenida del medio ambiente. La tuberculosis

secundaria se establece en la porción apical posterior de uno o de ambos lobulos superiores(focos de Simmonds); probablemente se producen durante el periodo temprano de la bacteremia favorecido por una alta tension de oxígeno local.

De acuerdo a la evolución patogénica de la enfermedad, la expresión anatomopatológica de la tuberculosis puede ser:

- 1.-Lesion apical, es limitada, sana, cicatriza y se calcifica, da origen a la tuberculosis inactiva fibrocalcificada.
- 2.-La infección inicial del parenquima pulmonar puede extenderse a otras areas en el mismo pulmon, dando lugar a la tuberculosis pulmonar progresiva(neumonía fímica).
- 3.-La lesión en el parenquima pulmonar puede extenderse a la pleura, produciendo derrame pleural(empiema fímico) y en la fase crónica fibrosis y adherencias pleurales.
- 4.-Cuando las lesiones fímicas erosionan los bronquios, el material caseoso puede sembrar bacilos en la mucosa de bronquiolos, bronquios y traquea(tuberculosis traqueo-bronquial)e incluso en la laringe(laringitis tuberculosa).
- 5.-Los bacilos expectorados pueden llegar a la orofaringe y son deglutidos, alcanzando la mucosa intestinal y ganglios mesentericos produciendo tuberculosis intestinal.
- 6.-Cuando los bacilos inicialmente en el pulmón se diseminan a organos distantes a travez de los vasos sanguineos y/o linfáticos se produce tuberculosis miliar. El termino miliar es debido al aspecto de las lesiones, macroscopicamente son nodulos pequeños blanco grisaceos como granos de mijo. La diseminación de la enfermedad puede afectar practicamente

cualquier organo, los mas frecuentemente lesionados son: ganglios linfáticos sobre todo cervicales que incluso pueden fistulizarse con la piel(escrófula), meninges, riñones, huesos etc.

La presentación clinica es muy variable, sin embargo correlaciona bien con el estado de respuesta inmunológica del sujeto infectado. Como sucede con la lepra, la tuberculosis tambien tiene un aspecto inmunoclínico(68), en uno de los extremos polares de la enfermedad los pacientes se caracterizan por tener lesiones localizadas, responden adecuadamente a la terapia y tienen respuestas cutaneas positivas a la inoculacion de PPD asi como activacion blastogénica in vitro de linfocitos T ante la presencia de antígenos proteicos micobacterianos y bajo título de anticuerpos contra los mismos, anatomopatológicamente corresponde a la tuberculosis localizada micronodular. En el otro extremo polar se encuentran los pacientes con enfermedad diseminada, gran cantidad de bacilos, sin respuestas de hipersensibilidad cutanea al PPD ni estimulación blastogénica in vitro de linfocitos T con altos títulos de anticuerpos en contra de antígenos bacilares sin respuesta adecuada al tratamiento, desde el punto de vista anatomopatológico no hay formación adecuada de granulomas, corresponde a la forma miliar de la enfermedad. Existen pacientes intermedios entre estas dos formas polares, anatomopatológicamente corresponden a la tuberculosis nodular o micronodular localizada, cavitada con linfadenopatía unilateral o bilateral o serositis tuberculosa(forma intermedia reactiva), hay otra forma intermedia, la tuberculosis crónica difusa nodular o micronodular con cavitación o fibrosis asi como la adenopatía complicada con formación de fístulas(intermedia no reactiva).

INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.

Las alteraciones inmunopatológicas producidas por M. tuberculosis son diversas, localmente la presencia del bacilo y la producción de factores químicos de origen macrofágico y linfocitario se han relacionado con la necrosis tisular. Algunos productos bacilares son inductores de activación policlonal B, y hay componentes antigénicos de la micobacteria capaces de inducir inmunidad cruzada y enfermedades autoinmunes(102). Son interesantes también los estudios realizados sobre la capacidad inmunoregulatoria que poseen componentes micobacterianos, sobre todo en la inducción de anergia o inmunosupresión, aspecto en el que se centra en su mayor parte el trabajo experimental de la presente tesis.

LESION TISULAR.

En la lesión tuberculosa inicial hay poca necrosis tisular, pues M. tuberculosis aparentemente vive dentro de los macrófagos en un estado latente(103). Después de 2 a 4 semanas se establece la respuesta de inmunidad celular e hipersensibilidad retardada; en este momento muchos macrófagos incrementan su actividad microbicida pero también muchos de ellos mueren. No se conoce con exactitud que es lo que produce la muerte de los macrófagos; el bacilo intacto no parece ser tóxico, una posibilidad interesante es la producción tanto por la bacteria como por el macrófago mismo, de proteínas de stress o choque térmico, particularmente la proteína de 65 kD, conduzca a la lisis por células T con receptor de antígeno gamma-delta.

Otros factores que pueden estar relacionados con el daño tisular

local son los mediadores químicos producidos por los linfocitos T como el interferón gamma, el cual puede incrementar la capacidad de crecimiento de M. tuberculosis en los macrófagos(104) y el factor de necrosis tumoral (FNT) fundamentalmente producido por los macrófagos, este tiene una relación directa con la vitamina D3 activa para inducir una mayor liberación de radicales libres de oxígeno(105), es de gran interés que la vitamina D activa sea producida a partir de la captación del precursor y por hidroxilación en macrófagos activados por el interferón gamma lo cual constituye un ejemplo de estimulación autocrina(105). De esta forma interferón gamma y vitamina D3 activa estan relacionados en la actividad protectora(104) sin embargo este mecanismo puede ser importante desde el punto de vista inmunopatológico ya que puede originar necrosis caseosa y licuefacción puesto que el interferón gamma y la vitamina D3 activa inducen al macrófago para que sintetize y secrete factor de necrosis tumoral. Este mediador además de necrosis también produce fiebre y un balance nitrogenado negativo manifestado por caquexia, signos clínicos siempre presentes en la tuberculosis. El factor de necrosis tumoral produce perdida de la actividad coagulativa normal del endotelio vascular y en consecuencia se produce trombosis de vasos sanguíneos y necrosis, este proceso probablemente sea también favorecido por la presencia de interleukina 1, hormona que comparte diversas funciones con el factor de necrosis tumoral(106). Otros factores que pueden también participar en la necrosis tisular son los componentes toxicos de la bacteria, por ejemplo el factor cuerda que es

liberado por los bacilos muertos. Las reacciones locales antígeno-anticuerpo pueden activar al complemento y a travez de este lesionar células. Las enzimas hidrolíticas lisosomales asi como los metabolitos reactivos de oxígeno producidos y liberados por macrófagos y neutrófilos pueden contribuir también a la lesión tisular(52).

ACTIVACION POLICLONAL DE LINFOCITOS POR M. TUBERCULOSIS Y SUS PRODUCTOS

Las proteínas que constituyen a la tuberculina asi como los componentes químicos de la pared celular de la micobacteria son inductores de mitogénesis específica para las células B en animales normales, no infectados ni sensibilizados (107). La respuesta es rápida y optima cuando se utilizan niveles altos de PPD; in vitro no solo se estimula la actividad blastogénica sino también síntesis inespecífica de anticuerpos(107), de forma independiente de los linfocitos T(108). En estudios realizados para determinar las subpoblaciones de células B activadas por PPD, fue posible demostrar que este complejo proteico estimula predominantemente a las células B maduras(106). El mismo complejo antigénico puede estimular la síntesis y liberación de factor de inhibición de la migración macrofágica por células T en animales sensibilizados y por linfocitos B en mayor cantidad en animales no sensibilizados(109).

El PPD inyectado en ratones induce la producción de anticuerpos en contra de globulos rojos y de otros autoantigenos como DNA(110, 111). En linfocitos humanos tambien se ha demostrado la capacidad de estimulador policlonal del PPD(106), fenómeno que

en parte parece ser dependiente de células T cooperadoras. Otros componentes químicos de la micobacteria a los que se les ha atribuido capacidad de activadores policlonales son aminoazúcares, azúcares neutros y aminoácidos unidos en forma oligomérica y solubles en agua (fracción soluble en agua), aunque en general actúan más como adyuvantes que como activadores policlonales(112). La cera D tiene actividad mitogénica para las células B y el ácido micólico puro también la tiene aunque en menor proporción(113).

INMUNOSUPRESION EN TUBERCULOSIS.

Es de interés que en el 20% de los pacientes con tuberculosis y sobre todo los que sufren tuberculosis miliar, pleural o meníngea no sean reactivos a la prueba de la tuberculina(114). En algunos pacientes la anergia es específica y se asocia con un incremento en los niveles séricos de anticuerpos antimicobacterianos. Histopatológicamente no hay formación de granulomas sino acumulos masivos de macrófagos con micobacterias. Las pruebas in vitro con linfocitos de estos pacientes han demostrado menor capacidad proliferativa cuando son estimulados con fitohemaglutinina o con PPD(115).

Los mecanismos que producen inmunosupresión o anergia son desconocidos (116). Se han propuesto varias hipótesis al respecto:

1.- Compartimentalización.- Es posible que los linfocitos sensibilizados sean secuestrados en o cerca del sitio de la lesión tuberculosa y por esto no se encuentren disponibles para participar en reacciones de hipersensibilidad retardada inducida en sitios alejados (117).

2.- Participación de linfocitos T supresores.- Linfocitos T con receptores para Fc de IgG han sido observados en gran cantidad en la sangre periférica de pacientes con tuberculosis(118), estos pacientes son anérgicos a la prueba de hipersensibilidad cutánea con PPD, la supresión podría estar mediada por la secreción de factores de supresión, específicos o inespecíficos(119, 120).

3.-Participación de macrófagos.- La eliminación experimental in vitro de las células adherentes incrementa significativamente la respuesta mitogénica a PPD por lo que los macrófagos podrían ser generadores de inmunosupresión probablemente a través de la secreción de factores químicos inductores de supresión como las prostaglandinas o por la carencia de expresión de proteínas de clase II de CMH, entre otros posibles mecanismos(121).

4.-Participación de linfocitos B y anticuerpos.- Las células B pueden también secretar factores de supresión en tuberculosis(122); la participación de anticuerpos anti-idiotipo que activan a linfocitos T supresores ha sido bien demostrada(123).

AUTOINMUNIDAD EN TUBERCULOSIS.

Autoinmunidad es una condición patológica en la cual el sistema inmunológico daña a los componentes tisulares normales del propio organismo. Es el resultado de múltiples factores: defectos inmunológicos(deficiencias del sistema del complemento y de las células T supresoras), alteraciones hormonales(niveles altos de estrógenos), estructura genética y elementos ambientales como drogas, radiación ultravioleta y agentes infecciosos, tanto virus, como bacterias y parásitos pueden participar en el proceso. La infección por M. tuberculosis puede inducir autoinmunidad

quizá por la existencia de antígenos compartidos entre las micobacterias y constituyentes propios.

El 47% de enfermos con formas activas o crónicas de tuberculosis tienen anticuerpos anti-DNA(102); y factor reumatoide en el 13%(102). Hay además anticuerpos en contra de globulos rojos, espermatozoides y tiroglobulina(102). Los anticuerpos monoclonales anti-DNA producidos por células de ratón y también humanas reconocen antígenos micobacterianos(124) y a la inversa los anticuerpos monoclonales de ratón generados en contra de la micobacteria reconocen antígenos tales como tiroglobulina, miosina, actina y colagena(124).

Estudios enfocados en defectos de glicosilación de IgG serica han mostrado similitudes entre pacientes con artritis reumatoide y tuberculosis. Una de las caracterizticas esenciales de la IgG es la conservación del sitio para glicosilación en el dominio CH2 específicamente en la posición 297 que corresponde a una aspargina; los oligosacaridos unidos en este sitio consisten de dos ramas de oligosacaridos que parten de una manosa. Los pacientes con artritis reumatoide tienen una forma truncada en las cadenas de oligosacaridos ya que las porciones terminales carecen de galactosa, esta modificación bioquímica expone porciones de la molecula que normalmente estan ocultas y además les confiere mayor actividad para agregarse(125). La mayoría de los pacientes con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y tuberculosis tienen este defecto, lo cual constituye un nexo entre estas enfermedades(44).

Las similitudes antigénicas entre constituyentes micobacterianos

y constituyentes propios a nivel humoral, se ha extendido a la inmunidad celular. El modelo mas estudiado es la artritis por ayuvante, el cual consiste en la administracion de adyuvante completo de Freund a ratas, despues de 3 a 4 semanas los animales desarrollan inflamación articular, clínica e histopatologicamente identica a la artritis reumatoide humana. En este modelo experimental se han aislado y caracterizado clones de linfocitos T especificas para antígenos de M. tuberculosis las cuales son inductoras de artritis cuando son transferida a ratas no sensibilizadas(126), La importancia clinica del mimetismo molecular entre la micobacteria y componentes propios ha sido enfatizada por la observación hecha en pacientes tratados con BCG que desarrollan artritis severa(102). La base molecular de este fenómeno ha sido recientemente caracterizado, la proteina micobacteriana de stress de 65kD tiene una secuencia de 8 aminoacidos(residuos 180-188) que presentan una alta homología con la proteina central y de unión de proteoglicanos de la matriz articular, de manera que al inducir la micobacteria respuesta inmunológica contra este antígeno, las células T reactivas no solo raccionan contra la micobacteria sino también en contra de componentes articulares, Un grupo importante de enfermedades con alteraciones inmunológicas que sugieren participación de fenómenos de autoinmunidad, para las cuales no se conoce hasta el momento actual una causa bien definida como la enfermedad de Crohn o la arteritis de Takayasu, bien pudieran las micobacterias participar en su patogenia a travez de mecanismos semejantes a los descritos en la artritis por adyuvante(127).

LA INFLAMACION GRANULOMATOSA.

La inflamación granulomatosa fue reconocida como un tipo distintivo de inflamación desde principios del siglo XIX y desde entonces se ha mantenido un gran interes en ella. El termino granuloma fue inicialmente acuñado por Virchow, quien lo describió como una masa parecida a un tumor o nódulo de tejido de granulación. (128). Puede definirse el granuloma como un tipo de inflamación crónica constituido por una colección compacta, organizada y focal de linfocitos y macrófagos producida por substancias poco biodegradables(128, 129).

Existen muchas enfermedades de causas muy diversas que se caracterizan por inducir inflamación granulomatosa, sin embargo el prototipo de enfermedad granulomatosa es la tuberculosis(128). Como fue establecido por Baillie en 1807 "No hay una lesión pulmonar mas caracteriztica que los tuberculos, estos consisten en nódulos blancos y firmes distribuidos en el parenquima". Pero en efecto, aunque M. tuberculosis es el arquetipo de la inflamación granulomatosa, existen varios agentes de diversa naturaleza que son inductores de granulomas, estos van desde organismos con capacidad de reproducción intracelular(bacterias, hongos, metazoarios) hasta substancias inorgánicas como metales, y existe un grupo numeroso de entidades médicas clinico patológicas de causa desconocida que se caracterizan histopatológicamente por presentar granulomas(sarcoidosis, arteritis de Takayasu, enfermedad de Crohn etc)(128, 129, 130). La evolución, duración, severidad y tipo de inflamación granulomatosa depende en gran parte de la naturaleza del agente

inductor, por ejemplo los granulomas de cuerpo extraño, el agente inductor es fagocitado por los macrófagos pero no se biodegrada, en consecuencia los macrófagos son destruidos lo que ocasiona liberación de enzimas lisosomales que producen daño tisular. En comparación el granuloma inmunológico es producido generalmente por agentes biológicos poco biodegradables los cuales producen hipersensibilidad retardada.

Morfologicamente el granuloma tiene límites precisos, está constituido por varios tipos de células entre las cuales hay muy poca sustancia intercelular(128). Esta forma de organización facilita la emisión y recepción de mensajes químicos, es decir, el granuloma es una lesión dinámica con cambios constantes en su composición celular a través de sus diversas fases de evolución hasta llegar a la involución.

Desde el punto de vista histopatológico, el granuloma está constituido por:

1.-Linfocitos, son los elementos celulares básicos en la formación del granuloma inmunológico el cual se asocia característicamente al desarrollo de hipersensibilidad retardada. Los linfocitos pueden no estar presentes en el granuloma de tipo cuerpo extraño. Está bien demostrado que los linfocitos T cooperadores tipo I productores de interferón gamma e IL-2 son los iniciadores de la formación del granuloma y de la hipersensibilidad retardada en el sitio de la estimulación antigénica(131).

La aplicación de técnicas inmunohistológicas en granulomas experimentales han aportado información limitada acerca de el número, tipo y cinética de incorporación de linfocitos, en

esquistosomiasis experimental, por ejemplo, se ha observado que en el momento de máxima inflamación solamente se observan linfocitos T mientras que en la fase crónica hay una cantidad proporcional de células T y B(132). Aparentemente los linfocitos forman microambientes aislados dentro de los granulomas, puesto que los linfocitos cooperadores tienden a agruparse en el centro del granuloma mientras que las células T supresoras/citolíticas se organizan en la periferia. Las modificaciones cinéticas de los diferentes tipos de linfocitos deben ser decisivas en la evolución del granuloma inmunológico por lo que la caracterización experimental de las modificaciones en la composición celular durante su curso es de gran importancia en la investigación experimental básica en esta área.

2.-Macrófagos, son un constituyente celular fundamental tanto en los granulomas inmunológicos como en los de tipo cuerpo extraño. Su larga vida media, la capacidad de multiplicarse y transformarse en macrófagos modificados tales como macrófagos activados, células epitelioides y células gigantes, los convierten en las células más características en la constitución del granuloma y en los elementos de mayor importancia en la eliminación del agente inductor de la inflamación granulomatosa. Todos los tipos de macrófagos que forman los granulomas son originados aparentemente a partir del monocito circulante, el cual es reclutado en el sitio de la inflamación(129).

Desde el punto de vista morfológico, las células epitelioides muestran buen desarrollo de organelos relacionados con la biosíntesis de proteínas(retículo endoplasmico rugoso) y de

componentes de secreción (aparato de Golgi). El citoplasma contiene además un gran número de vacuolas electrón lúcidas que no corresponden a lisosomas, cuyo contenido se desconoce; tan solo se sabe que contienen enzima convertidora de angiotensina y mucopolisacaridos (133). Generalmente en el granuloma inmunológico la membrana celular de las células epitelioides esta en contacto con la membrana de linfocitos T.

Las células gigantes multinucleadas se observan con frecuencia en el centro de los granulomas y son el resultado de la fusión de varios macrófagos. Morfológicamente, en general las células gigantes presentes en los granulomas de tipo cuerpo extraño, se caracterizan por tener los núcleos dispersos en toda la célula, mientras que en los granulomas inmunológicos, los núcleos se distribuyen ordenadamente en la periferia de la célula (célula gigante tipo Langhans). La función de estas células es en gran parte desconocida, se ha sugerido que se forman por la incapacidad de los macrófagos aislados para fagocitar y eliminar antígenos.

3.-Polimorfonucleares, son células generalmente presentes al inicio de la formación del granuloma; son particularmente abundantes y se mantiene su presencia por mas tiempo en los granulomas inducidos por sustancias irritantes no biodegradables que inducen granulomas de tipo cuerpo extraño. En los granulomas inmunológicos generalmente son sustituidos rapidamete (3 o 4 dias), por macrófagos y linfocitos.

4.-Fibroblastos, son células que aparecen en los estadios crónicos de la inflamación granulomatosa, atraídos e inducidos en proliferación celular y secreción de colágena por factores

hormonales de origen macrofágico como IL-1 y TNF, los fibroblastos en general participan en el proceso de fibrosis y hialinización del granuloma.

En general se acepta que la inflamación granulomatosa representa un mecanismo de defensa o protección del individuo infectado debido a que aísla al microorganismo, lo cual evita su diseminación. Además, en el seno del proceso inflamatorio se generan actividades de inmunidad celular e hipersensibilidad retardada. Sin embargo la respuesta granulomatosa puede ser incapaz de destruir al bacilo tuberculoso e incluso debido a lo circunscrito del granuloma puede proteger a la micobacteria aislandola e impidiendo su destrucción, aunque el hecho de que este tipo de reacción inflamatoria no siempre sea capaz de limitar o eliminar la infección no significa que no sea potencialmente protectora(130).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la capacidad de los antígenos de naturaleza proteínica de M. Tuberculosis para inducir inflamación granulomatosa pulmonar.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Desarrollar modelos experimentales útiles para estudiar la capacidad granulomatogénica en el pulmón de los antígenos proteínicos de M. tuberculosis.
- 2.- Analizar la cinética y el fenotipo de los linfocitos en el curso del proceso inflamatorio.
- 3.- Investigar si el proceso granulomatoso pulmonar repercute en la respuesta inmune antimicobacteriana sistémica.
- 4.- Comparar la capacidad granulomatogénica de proteínas micobacterianas individuales.

III. MATERIALES Y METODOS.

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Ratones singénicos BALB/C machos de 6 a 8 semanas, con peso promedio de 25 gr fueron utilizados en este estudio, dichos animales fueron alimentados y mantenidos bajo condiciones standard en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional de Mexico.

2. BACTERIAS Y ANTIGENOS.

Obtencion de un extracto proteínico total de M. tuberculosis (EPT).

La cepa virulenta de M. tuberculosis H37/Rv se obtuvo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. El bacilo se cultivó en el medio sintético de Proskauer y Beck modificado por Youmans(134). Despues de 6 semanas de cultivo los antígenos se obtuvieron por filtración del medio de cultivo, primero a travez de un filtro Whatman No 3 y despues a travez de filtros de 1.2, 0.45 y 0.22 μ (Millipore Corp., Bedford Mass). Las proteínas del filtrado se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g/ml) a 4° C y se centrifugaron a 10, 000 g por 30 minutos para obtener el extracto proteico total (EPT). La albúmina sérica bovina metilada (BSAm) utilizada como antígeno comparativo, fue obtenida de los laboratorios Sigma.

Obtencion de antígenos individuales de M. tuberculosis.

Los antígenos obtenidos del filtrado o por fraccionamiento acido-alcoholico con lo cual se obtienen fracciones enriquecidas de un antígeno en particular(48) fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, bajo

condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol de acuerdo al método de Laemmli(135). La separación electroforética se llevo a cabo en geles de acrilamida al 10%, 375 mM de tris-HCl pH 8.8 y DSS al 0.1% para el gel separador y 3% de acrilamida, 125 mM de Tris-HCl pH 6.8 y 0.1 % de DSS para el gel concentrador con 0.05% (v/v) de TEMED y 0.05% (P/V) de persulfato de amonio como polimerizadores. A las muestras se les agregó coctel de elctroforesis (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, DSS 0.1% y glicerol 0.1%) y se hirvieron durante 5 min en baño maria. El amortiguador de corrida estaba constituido por glicina 50 mM pH 8.3 y 0.1% de DSS. La electroforesis se corrió a 20-40 mA durante 3-4 hr. Posteriormente los geles fueron montados en una cámara de electrotransferencia (Idea Scientific, Corvallis, PA, USA) y transferidos a nitrocelulosa (Bio Rad Laboratories, Richmond, VA) de acuerdo al metodo descrito por Towbin (136). La eficiencia de la transferencia fue comprobada por tinción de una tira con amido negro. Las bandas que contenian a las proteínas de 30-31, 38 y 70 kD fueron cortadas y disueltos en dimetilsulfoxido (Sigma Chemical Co, San Louis, Mo) para cada 2 cm se uso 250 ul de DMSO, el segmento de papel es multifragmentado con una navaja depositado en un vial de Eppendorf al cual se le agrega DMSO, se vortexea y se deja por una hora a temperatura ambiente, fragmentos microscópicos de nitrocelulosa con el antígeno incorporado se precipitan con la agregación de un volumen igual de amortiguador de carbonatos (137)por goteo lento, posteriormente se centrifuga a 10, 000 rpm por 5 min, se elimina el DMSO con jeringa Pasteur y se lava por 5 veces con PBS.

3.- INMUNIZACION.

A los animales de experimentación se les sensibilizó con 50 μ gr de EPT disueltos en 50 μ lt de amortiguador de fosfatos (PBS) emulsificados con 50 μ lt de adyuvante completo de Freund, la mezcla total fue inyectada subcutáneamente en ambas regiones inguinales y en la base de la cola. Dos semanas después se les administró por vía intraperitoneal 25 μ gr del EPT disuelto en 500 μ lt de PBS. Para fines comparativos otros animales fueron sensibilizados por separado con BSA_m bajo el mismo esquema.

4.- MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACION PULMONAR.

Se desarrollaron dos modelos experimentales de inflamación pulmonar, en el primero se utilizaron esferas de sefarosa como vehículo de los antígenos y en el segundo se empleó partículas de nitrocelulosa con el mismo fin.

Inducción de granulomas pulmonares con Sefarosa cubierta con proteínas de M. tuberculosis.

El primer modelo se desarrolló con el fin de estudiar la capacidad granulomatogénica de las proteínas de M. tuberculosis y consiste en acoplar el EPT a esferas de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno lo cual se logra lavando varias veces a la sefarosa seca (Sigma Chemical Co, St Luis Mo) con una solución de HCl 0.001 M, pH 2.0 posterior a lo cual se incubó con el EPT en una relación de 5-10 mg de proteína por ml de gel en amortiguador de carbonatos NaCl 0.5M y NaHCO₃ 0.1M pH 8.3. Posteriormente se bloquean los sitios reactivos libres de la sefarosa con solución de glicina 0.1 M pH 8, se lava alternadamente con una solución de acetato de sodio 0.1 M pH 4 y NaCl 0.5 M pH 8; finalmente la

esferas se almacenan en PBS. El mismo procedimiento fue utilizado para obtener sefarosa acoplada con BSAm.

A los animales experimentales previamente sensibilizados se les anestesia con pentobarbital, 22 μ lt por via peritoneal con jeringa de Hamilton, despues de colocarlos en la tabla de disección en posición de decubito supino se les extiende el cuello a travez de tracción de una asa de hilo colocada alrededor de los dos incisivos superiores, se escinde la piel, se separa con disección roma la fascia muscular pretraqueal, se expone la traquea y se inyecta con jeringa de insulina acoplada a aguja del 22, 100 μ lt de PBS con aproximadamente 15, 000 esferas de sefarosa que contienen aproximadamente 15 μ gr de EPT, por observación directa con microscopio de disección. Bajo el mismo procedimiento quirurgico y por separado se inyectó intratraquealmente BSAm acoplada a sefarosa en los animales sensibilizados con este antígeno. El grupo control fue representado por animales sensibilizados a los que se les inyectó esferas de sefarosa cuyos grupos químicos activos fueron bloqueados con glicina.

Inducción de granulomas pulmonares con antígenos individuales de M. tuberculosis incorporados en nitrocelulosa.

Con el objetivo de estudiar el proceso inflamatorio pulmonar y sus repercusiones inmunológicas sistemicas originado por proteinas puras e inmunodominantes de M. tuberculosis se desarrollo un segundo modelo experimental, el cual consiste en inyectar intratraquealmente particulas de nitrocelulosa como vehiculo del antígeno en ratones sensibilizados bajo el esquema descrito y con el mismo procedimiento quirurgico.

El antígeno preparado como se describió previamente, se inyecta intratraquealmente en 100 μ l de volumen con aproximadamente 5 μ gr de antígeno por animal. Como control negativo fue utilizado el papel de nitrocelulosa solo y como control positivo el EPT el cual fue depositado y adsorbido directamente sobre la tira de nitrocelulosa, al igual que la proteína de 65 kD de *M leprae*, la cual fue donada por el Dr Alberto Palacios Boix del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición, dicho antígeno fue obtenido por Lamb (138) mediante subclonación del fago Lambda gt 11, que contenía la totalidad del gene que codifica para la proteína en el plasmido pUC8. Las cepas recombinantes de *E. coli* producen grandes cantidades del antígeno el cual fue purificado a partir de geles de acrilamida con urea; la proteína de 65 kD de *M leprae* tiene una homología de mas del 95% con la de *M. tuberculosis* y una gran cantidad de reacciones cruzadas entre ellas han sido descritas.

5. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.

Recolección y procesamiento de tejido para análisis histológico. Grupos de tres animales fueron sacrificados por exsanguinación, 1, 3, 5, 7, 14, 21 y 28 días después de la inyección traqueal de los antígenos. Las suturas fueron retiradas, la traquea fue expuesta lo mismo que los pulmones después de retirar la parrilla costal, 1.5 ml de formaldehído al 10% en PBS fue inyectado con jeringa de insulina previa inmovilización de la aguja con pinza de mosco directamente a través de la traquea. Una vez que los pulmones se infiltraron totalmente se retira la aguja y se pinza la traquea, los pulmones completos conjuntamente con la traquea y

los bronquios principales son retirados cuidadosamente despues de cortar las inserciones claviculoesternales y sumergidos totalmente en el mismo fijador. Despues de deshidratarlos con alcoholes de concentración creciente son incluidos en parafina, cortes de 4 a 5 μ teñidos con Hematoxilina y Eosina en tres niveles diferentes fueron estudiados microscopicamente con el fin de analizar la constitución del infiltrado inflamatorio, la participación de los elementos vasculares, intersticiales y del tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial asi como la estructura histológica de los ganglios peritraquebronquiales.

Determinación de la superficie de los granulomas pulmonares.

El tamaño de las lesiones producidas por la inyección intratraqueal de los antígenos de M.tuberculosis acoplados a las esferas de sefarosa fue determinado por tecnicas morfométricas. En cuando menos 20 granulomas por animal estudiados al azar fue determinada el area total con una rejilla micrométrica adaptada al ocular del microscopio. El número de cuadros que contenía la lesión observada con el objetivo de 40x fue multiplicada por el factor 248 con lo cual se obtiene el area total en micras cuadradas, esta fue sustraída del area ocupada por la esfera con lo cual se obtiene el area de la lesión. La superficie en micras cuadradas de cuando menos 20 granulomas por pulmón son sumadas y promediadas en cada raton de los tres que conforman al grupo experimental de cada intervalo de tiempo. Esta valoración fue hecha tanto para las lesiones producidas por el EPT como las originadas por BSAm en tres a cuatro experimentos diferentes. La valoración morfométrica no fue posible llevarla a cabo en el

modelo experimental para estudiar el efecto de las proteínas puras debido, a que la respuesta inflamatoria es de límites imprecisos.

6. ESTUDIOS CITOLÓGICOS DE LAVADOS PULMONARES.

Con el fin de estudiar cuantitativamente el tipo y la cinética de las células inflamatorias en cada uno de los intervalos de tiempo establecidos y para cada uno de los antígenos inoculados se realizaron cuentas totales y recuentos diferenciales de células obtenidas por lavados bronquiales.

Recolección de las células inflamatorias.

Grupos de tres ratones de cuando menos tres experimentos diferentes fueron sacrificados por exsanguinación en los periodos de tiempo establecidos. Con el animal en decubito supino se eliminaron las suturas y se expuso la traquea la cual se escindió en su parte media en un 80%. Con este procedimiento se deja una abertura a travez de la cual se introdujo una cánula adaptada a una aguja de insulina; una vez colocada la cánula, ésta se inmovilizo con hilo de seda. Posteriormente se expusieron los pulmones despues de retirar la parrilla costal y a travez de la cánula se inyectó 1 ml de PBS el cual fue inmediatamente retirado por aspiración con la misma jeringa. Este proceso se repitio 6 veces; el liquido recolectado fue depositado en un tubo cónico y centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue colectado en un tubo por separado y el paquete celular se resuspendió en 400 μ l de PBS, de los cuales se tomaron 100 μ l que se mezclaron con un volumen igual de azul tripano con el fin de determinar el numero total de células con la ayuda de un

hemocitómetro de Newbauer. Los 300 μ l restantes fueron repartidos en 10 portaobjetos, después de dejarlos secar a temperatura ambiente las células fueron fijadas con acetona absoluta por 5 min a 4° C, una de estas preparaciones fue teñida con Giemsa para realizar un recuento diferencial de las células inflamatorias, el resto de las laminillas fueron almacenadas a -70° C con el fin de realizar técnicas inmunohistoquímicas para determinar los subtipos de células T.

7. ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CON TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Con el fin de estudiar la cinética de las subpoblaciones cooperadoras y citolítica/supresora de células T así como su distribución en los pulmones de los animales experimentales se realizó inmunohistoquímica, tanto de las células obtenidas por lavados pulmonares como de los cortes histológicos, con anticuerpos monoclonales y el sistema de avidina biotina-peroxidasa.

Obtención y marcaje de los anticuerpos monoclonales para determinar los fenotipos de células linfoides.

El hibridoma de ratón productor de anticuerpos monoclonales dirigidos en contra del marcador pan-T CD3 (línea 13.4.6), el hibridoma de rata con capacidad de reconocer el determinante L3T4 marcador de linfocitos T cooperadores (línea GK 1.5) y el hibridoma también de rata dirigido en contra del antígeno de membrana Lyt 2 marcador de linfocitos T citolítico/supresor (línea 53.6.72) fueron donados por el Dr Rafael Saavedra de la Universidad Libre de Bélgica. Dichos hibridomas fueron

descongelados y crecidos en medio esencial minimo en cajas de cultivo. Despues de dos semanas de crecimiento los sobrenadantes fueron colectados, precipitados con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ saturado pH 7 al 50% bajo agitacion en hielo, despues de una hora se centrifugo a 10 000 rpm por 30 minutos, el precipitado fue resuspendido en agua destilada y dializado contra PBS. Posteriormente los anticuerpos fueron biotinilados al incubar el ester de biotina disuelto en DMSO con los anticuerpos monoclonales, en una proporcion de 1mg de proteina por 2.5 mgr de biotina en amortiguador de carbonatos 0.5 M pH 9 en agitacion por 4 hr a temperatura ambiente; la reaccion de union biotina proteina fue detenida con una solucion de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ 1M a una concentracion final de 0.1 M en la mezcla reaccion. La biotina libre fue eliminada por dialisis extensa contra PBS. Los anticuerpos marcados fueron alicuoteados y almacenados a 4°C hasta su uso.

Preparación del material histológico para realizar el estudio inmunohistoquimico.

Grupos de 3 animales para cada uno de los intervalos de tiempo escogidos fueron sacrificados por exsanguinación en 3 a 4 experimentos diferentes. La traquea y los pulmones fueron expuestos y a travez de la traquea se inyectó con jeringa de insulina y aguja del 22 , 1.5 ml de OCT disuelto en agua destilada en proporción de 1 a 1. Una vez que los pulmones se distendian completamente se retiró la aguja e inmediatamente se pinza la traquea, posteriormente los pulmones fueron extraidos y sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido, envueltos en papel alumino y se almacenaron en viales de vidrio a -70 C hasta

obtener cortes en criostato de 7 a 8 μ de espesor, los cortes se montan en portaobjetos cubiertos con albumina y se fijan con acetona absoluta por 5 min a temperatura ambiente.

Técnica de inmunohistoquímica utilizada.

La técnica inmunohistoquímica consistió en: rehidratar con PBS e inactivar la peroxidasa endogena con H₂O₂ al .03% en metanol. Los cortes histológicos y los extendidos celulares obtenidos de lavados bronquiales fueron encubados en cámara húmeda por 3 horas a temperatura ambiente con cada uno de los anticuerpos monoclonales biotinilados y con anti IgG y anti-IgM de ratón producido en cabra unido a peroxidasa (Cappel, Durham, NC) para determinar linfocitos B. Después de lavar con PBS se incubaron con estreptoavidina-peroxidasa (Zymmed Laboratories) diluido 1/200 por una hora. La peroxidasa fue revelada con ortocloronaftol (3 mg disueltos en 1 ml de metanol) y 5 μ l de H₂O₂ en 5 ml de PBS. Después de 10 min la reacción fue detenida al lavar con PBS, Se utilizó verde de metilo al 1% en agua destilada como contracolorante. Los controles positivos fueron cortes de bazo de ratón procesados en paralelo, los controles negativos fueron cortes y extendidos del mismo animal en los que el primer anticuerpo fue sustituido por suero normal de ratón.

Determinación del porcentaje de subtipos de linfocitos T en los granulomas pulmonares.

En los cortes histológicos se estudió la distribución topográfica de los diferentes subtipos de linfocitos así como el porcentaje aproximado de los mismos en los granulomas producidos por la inyección intratraqueal de EPT y BSAm acoplados a sefarosa. Para

este fin se contó el número total de células localizadas alrededor de la esfera de sefarosa con lo cual se obtuvo el 100%, después se contó el número de células positivas y se estableció la relación porcentual para cada uno de los marcadores de superficie linfocitarios en todos los intervalos de tiempo seleccionados. Cuando menos 10 granulomas por pulmón se estudiaron de esta manera.

Determinación del porcentaje de subtipos de linfocitos obtenidos por lavado bronquial.

En los frotis obtenidos de lavados pulmonares se contaron al azar las primeras 100 células de morfología linfoide con y sin marca de membrana con lo cual se obtuvo un estimado numérico porcentual de los diferentes subtipos de linfocitos.

8. IDENTIFICACION CITOQUIMICA DE MACROFAGOS.

Una de las propiedades más características de macrófagos y monocitos es su alta actividad de esterasa inespecífica, enzima que cataliza reacciones de tipo $COOR + H_2O \rightarrow RCOOH + R'OH$

Una enzima se caracteriza como esterasa inespecífica, cuando un ester simple como el metil butirato o-naftil acetato es usado como substrato. Su detección por métodos de histoquímica enzimática, fue utilizada para estudiar la cinética y distribución tisular de los macrófagos en cortes histológicos de los animales experimentales.

Los cortes de pulmón obtenidos por congelación fueron fijados en metanol por 12 hr a 4°C, después de rehidratarlos en PBS se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con una solución de 2 ml de alfa naftil acetato (Sigma Chemical Co, San Louis, Mo) al

1% disuelta en acetona y agua destilada volumen a volumen mezclada con 20 mgr de 4 cloro-o-toluidina diacetato (fast red TR) en 15 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.5 y 15 ml de agua destilada. Posteriormente las laminillas fueron lavadas con agua, contrateñidas con verde de metilo al 1% en agua destilada y montadas con gelatina glicerizada.

9. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL A EPT Y BSAm POR INMUNOENSAYE ENZIMATICO (ELISA) EN ANIMALES CON INFLAMACION PULMONAR EXPERIMENTAL.

Se analizaron por separado los sueros de ratones con lesiones pulmonares inducidas por la inyección traqueal de antígenos micobacterianos y BSAm. Como testigos se utilizaron los sueros de animales sensibilizados a los que se les había inyectado sefarosa cuyos grupos reactivos habían sido bloqueados con glicina para el primer modelo y los que recibieron fragmentos de nitrocelulosa sin antígenos para el segundo modelo experimental. Los sueros se procesaron en una sola sesión por duplicado. Se utilizaron placas de 96 pozos Inmulon II (Dynatech Industries, Inc., Mclean, Va). Los pozos se sensibilizaron con 5 µgr de EPT o BSAm disuelto en 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6 a 37° C toda la noche. Posteriormente, las placas se bloquearon con albumina serica bovina al 1% en PBS durante 1 hr a 37° C, en el caso de las placas sensibilizadas con BSAm se bloqueo con tween al 0.5% por 1 hr a 37° C, despues de decantar las soluciones bloqueadoras, se aplicaron los sueros diluidos 1/1000 en PBS-Tween por 1 hr a 37° C. Despues de lavarlas con PBS-Tween, las placas se incubaron con anticuerpo anti IgG de ratón peroxidado dilución 1/1000 en PBS

durante 1 hr a 37°C. La peroxidasa se reveló con 1mgr/ml de ortofenilendiamina en amortiguador de citratos pH 5 y se leyó a 490 de DO en un lector de ELISA. Las lecturas de los sueros de los diferentes animales que conforman al grupo de cada intervalo de tiempo fueron sumados, obtenido el promedio y desviación standard para su representación gráfica.

10. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A EPT Y BSAm EN RATONES CON LESIONES PULMONARES EXPERIMENTALES.

Con el objetivo de estudiar la respuesta de inmunidad celular in vivo en contra del EPT en animales con lesiones pulmonares granulomatosas se llevaron a cabo estudios de hipersensibilidad retardada cutanea(HRC). En tres experimentos por separado se inducieron lesiones granulomatosas experimentales en la forma descrita, en cada uno de los intervalos de tiempo establecidos se tuvieron grupos de cuatro ratones a los cuales se les inyectó subcutáneamente en el cojinete plantar de la pata trasera derecha 25 µg de EPT disueltos en 25 µl de PBS; el mismo volumen de PBS sin antígeno fue inyectado en el cojinete plantar izquierdo usado como control negativo. Con un calibrador de ingeniero se midió el espesor de ambas patas traseras en dos ocasiones, la primera antes de inyectar el antígeno y la segunda 24 hr despues de haber aplicado el mismo. Dichas mediciones se hicieron en tres ocasiones seguidas tomando como parametros de colocación del calibrador los limites de las papilas posterior y anterior del cojinete plantar. Las tres mediciones se sumaron y se promediaron, el promedio de la determinación despues de 24 hr de haber inyectado el antígeno fue restado del promedio obtenido

antes de depositar al mismo. El resultado fue multiplicado por con lo cual se obtuvo el incremento del grosor del cojinete plantar debido a inflamación expresado en micras.

El mismo procedimiento fue realizado con BSAm, así como en los experimento de manipulación farmacológica (vease despues) y en el modelo de inflamación pulmonar inducido con antígenos proteínicos puros de M.tuberculosis.

11. MANIPULACION FARMACOLOGICA DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA PULMONAR.

Debido a la observación de una aparente inmunosupresión en los modelos de inflamación pulmonar estudiados, que se presentara y comentara mas adelante, se estudio el efecto de la administración de ciclofosfamida en bajas dosis con lo cual se eliminan células T supresoras (139) y de indometacina cuyo efecto es suprimir la síntesis de prostaglandinas, agentes farmacológicos con multiples efectos inmunosupresores en diversas facetas de la respuesta inmunológica y producidos normalmente en abundantes cantidades por los macrófagos alveolares (140).

Método de administración de Ciclofosfamida.

La ciclofosfamida (obtenida de Sigma Chemical Co) fue disuelta en solución salina, cada ratón fue inyectado intraperitonealmente una sola vez, un dia antes de inyectar el antígeno intratraquealmente, la dosis utilizada fue de 20 mgr/kg en 1ml de volumen total.

Método de administración de Indometacina

La dosis utilizada de indometacina fue de 5mgr/kg. Inicialmente se prepararon alicuotas de 8mg de indometacina disueltas en 0.1 N

de NaOH; posteriormente esta se diluyó en solución salina fisiológica y se inyectó diariamente por vía intraperitoneal durante todo el periodo de observación experimental.

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

1. HISTOPATOLOGIA Y MORFOMETRIA DE LOS GRANULOMAS PULMONARES INDUCIDOS POR EPT Y BSA_m ACOPLADOS A ESFERAS DE SEFAROSA.

El estudio histológico de los pulmones 24 hr después de la administración intratraqueal de Sefarosa con EPT en ratones sensibilizados, mostró infiltrado inflamatorio alrededor de las esferas de sefarosa constituido predominantemente por leucocitos polimorfonucleares así como linfocitos y macrófagos en menor cantidad. El área promedio en micras cuadradas de estas lesiones fue de $6,4 \times 10^3 \mu^2$. En el día 3 después de la administración intratraqueal del antígeno la respuesta inflamatoria fue de mayor magnitud; el promedio del área ocupada por cada granuloma fue de $18,5 \times 10^3 \mu^2$ que correspondió al tamaño máximo observado (Fig 1 y 2), las células predominantes que los constituyeron fueron linfocitos, muchos de los cuales muestran signos de activación manifestados por incremento de volumen celular, núcleos grandes de cromatina extendida con uno o dos nucleolos así como indentación de la membrana nuclear, el citoplasma es más abundante y ligeramente basófilo. Células macrofágicas también están presentes en gran número dispersas entre los linfocitos, la mayoría de ellas son de aspecto epitelióide con abundante citoplasma acidófilo y núcleo paracentral de cromatina marginada hacia la membrana nuclear; no se observaron células gigantes. En este tiempo la mayoría de los polimorfonucleares han desaparecido y solo se observaron en forma ocasional (Fig 2).

En el día 7 la respuesta inflamatoria continuó siendo intensa pero en menor proporción que en el día 3, con $8,8 \times 10^3 \mu^2$ de área

promedio. Histologicamente hubo predominio de linfocitos y macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares han practicamente desaparecido por completo. En el dia 14 se observó disminución notable de la respuesta inflamatoria; cada granuloma tuvo en promedio $4.5 \times 10^3 \mu^2$ de superficie. Progresivamente en el dia 21 y 28 la inflamación organizada alrededor de las esferas de sefarosa disminuyó aun mas con 2.7×10^3 y $2 \times 10^3 \mu^2$ de superficie respectivamente de manera que en el ultimo intervalo de tiempo solo 4 o 5 capas de macrófagos con escasos linfocitos se observaron alrededor de las esferas de Sefarosa (Fig 1).

La respuesta inflamatoria tambien fue de gran intensidad en el intersticio pulmonar, abundantes linfocitos y células de aspecto monocitoide fueron observadas en los vasos capilares y en el intersticio pulmonar asi como en las luces alveolares sobre todo en los dias 1 y 3, intervalos de tiempo en los cuales también se observó gran cantidad de linfocitos adosados al endotelio y atravezando activamente la pared de venulas con la formación de gradientes celulares hacia la periferia de las esferas de sefarosa (Fig 2). El tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial muestra hiperplasia difusa asi como los ganglios linfáticos intertraquobronquiales.

Los granulomas inducidos por BSAm acoplada a esferas de sefarosa mostraron una cinética de crecimiento semejante pero fueron de menor tamaño que la producida por EPT (Fig 1). En relación con la constitución celular, en los granulomas inducidos por BSAm se observó una mayor proporción de macrófagos durante todo el periodo de observación experimental que la observada en los

granulomas por EPT. Tambien la intensidad de la inflamación intersticial, la venulitis y la hiperplasia del tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial y ganglionar fue menor en las lesiones inducidas por BSAm.

En comparación la inflamación inducida por la sefarosa sin antígeno cuyos grupos activos fueron bloqueados con glicina fue casi inexistente, solo 1 o 2 capas de macrófagos organizadas alrededor de las esferas de sefarosa fueron observadas (Fig 3), sin inflamacion intersticial o venular.

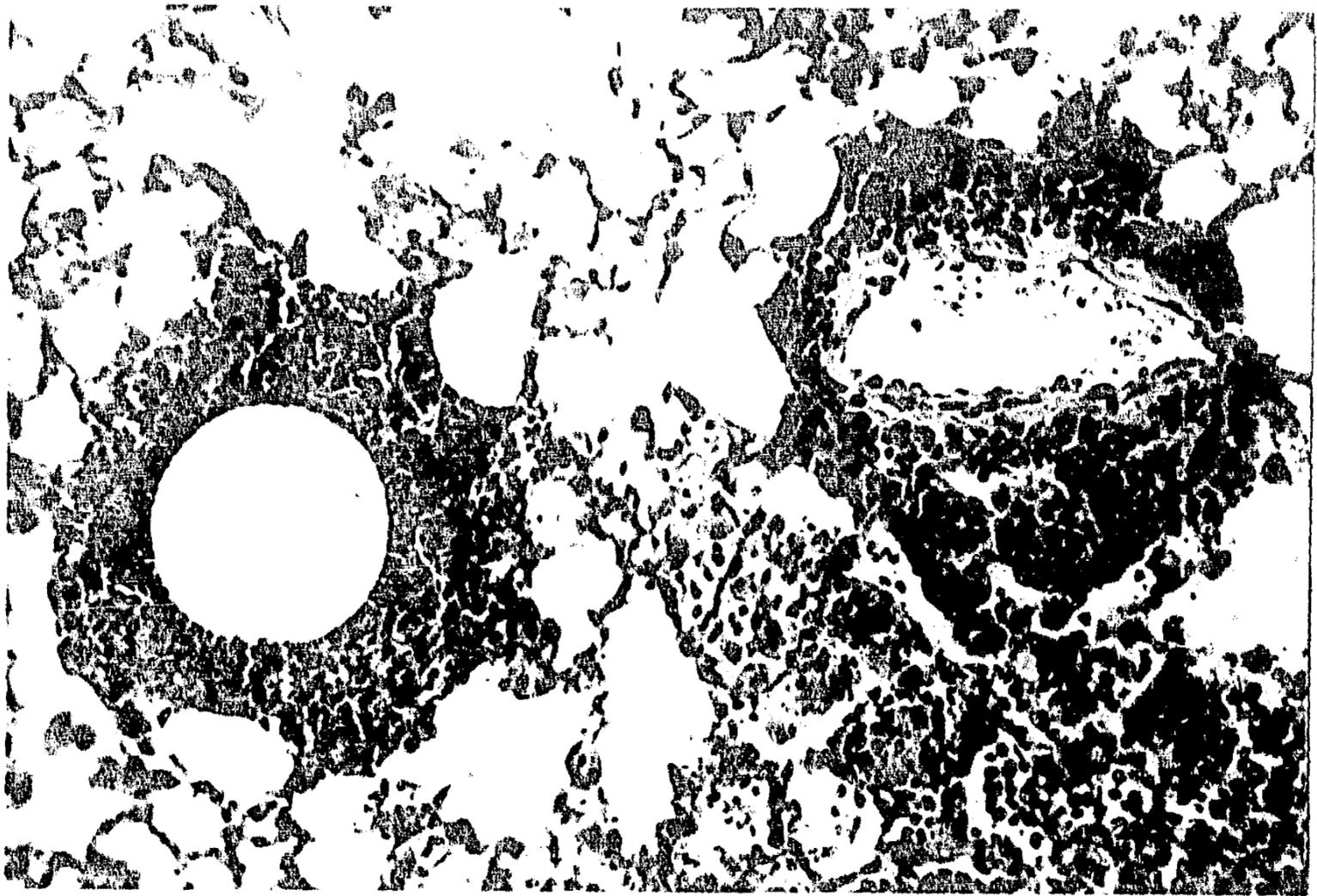


Fig 1. Imagen histológica del pulmón de un ratón sensibilizado con EPT, 3 días despues de haberle inyectado intratraquealmente sefarosa cubierta por EPT. Granulomas de gran tamaño constituidos por abundantes linfocitos, macrófagos de aspecto epitelioides y ocasionales neutrofilos se organizan alrededor de la sefarosa. Al lado derecho una venula con endotelio hiperplásico y gran cantidad de linfocitos en la pared.

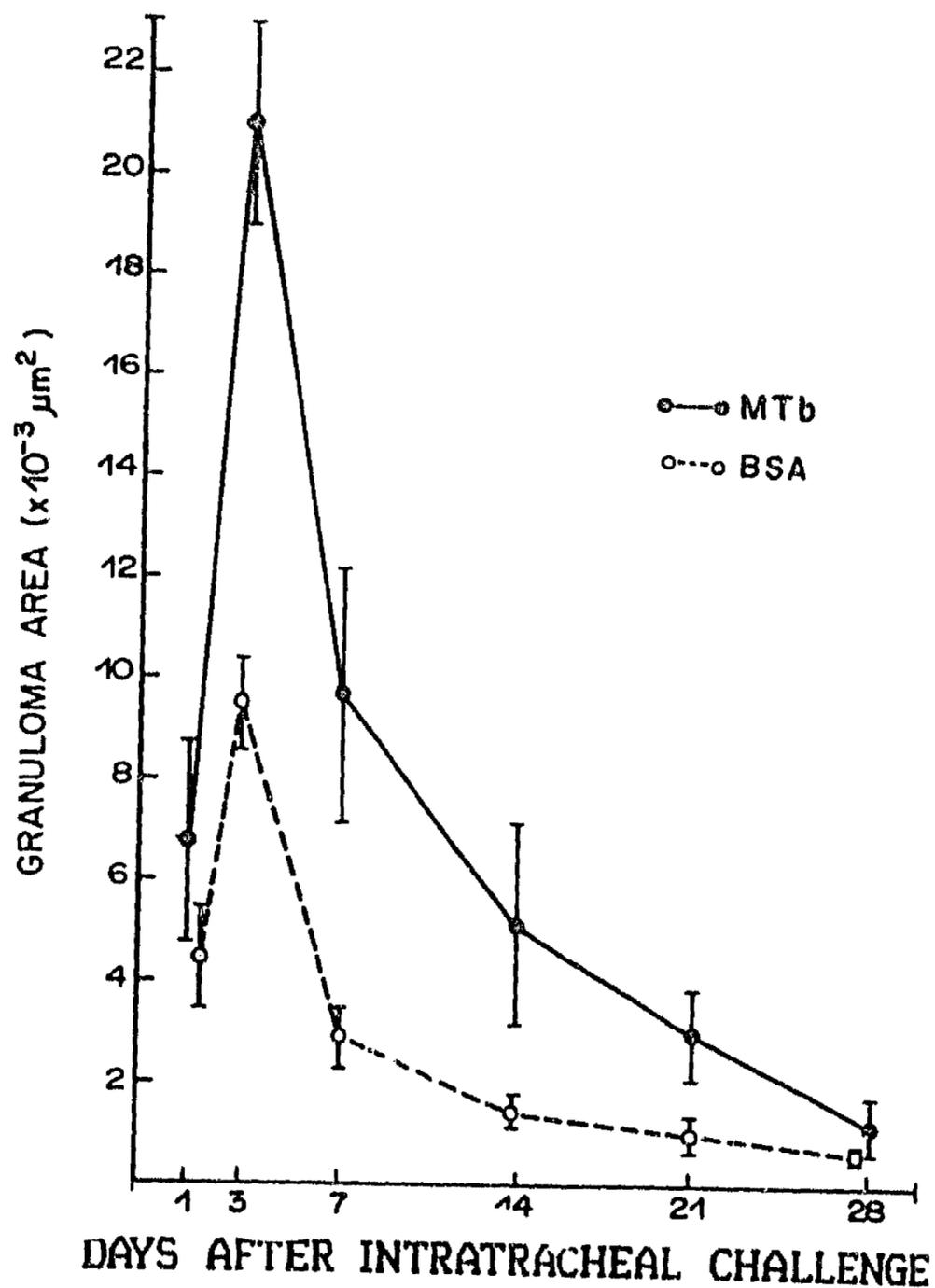


Fig 2. Estudio morfométrico comparativo EPT y BSA m. Animales sensibilizados por vía subcutánea e intratraqueal con EPT o BSA m, se les inyectó 10 días después sefarosa cubierta con su correspondiente antígeno, grupos de 3 animales fueron sacrificados en diferentes intervalos de tiempo, los pulmones fueron procesados por la técnica histológica ordinaria, cuando menos 10 granulomas al azar en cada pulmón fueron medidos en 3 experimentos distintos. EPT tiene mayor capacidad granulomatogénica.

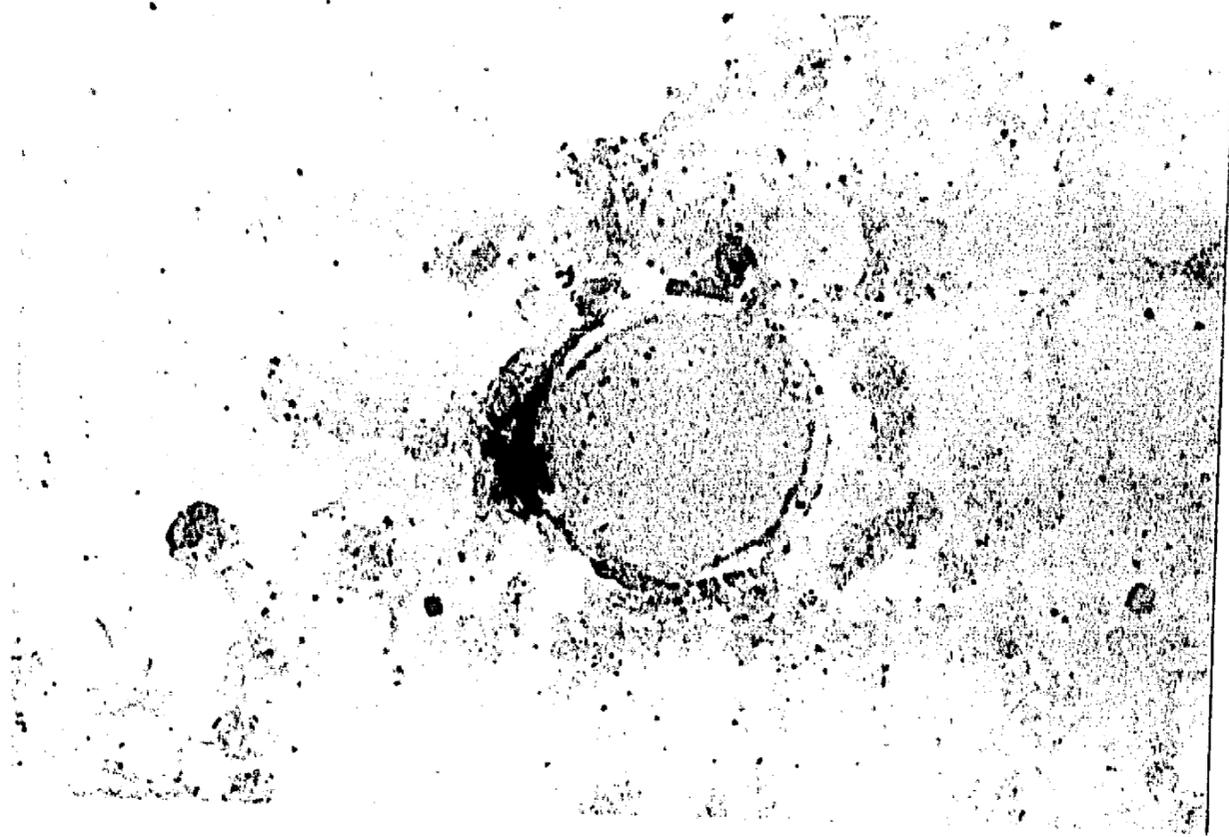


Fig 3. Reacción de histoquímica enzimática en el corte por congelación de un animal sensibilizado al que 3 días antes se le inyectó sefarosa cuyos grupos químicos fueron bloqueados con glicina. Tan solo 1 o 2 capas de macrófagos positivos a la reacción enzimática están presentes alrededor de las esferas.

2. CUANTIFICACION CELULAR Y TIPOS DE CELULAS INFLAMATORIAS OBTENIDAS POR LAVADO BRONQUIAL EN GRANULOMAS PULMONARES INDUCIDOS POR EPT Y BSAm ACOPLADOS A ESFERAS DE SEFAROSA.

El estudio de la cantidad y el recuento diferencial de las células obtenidas por lavado bronquial, en ratones sensibilizados con lesiones pulmonares inducidas por EPT acoplado a esferas de sefarosa, mostró un gran incremento de elementos celulares inflamatorios desde el primer día después de haber inyectado a los antígenos intratraquealmente, con promedio de 2.7×10^6 de células totales, con predominio de linfocitos y polimorfonucleares en un 70 % y 15 % respectivamente en concordancia a lo observado en los cortes histológicos (Fig 4). Esto representa un importante aumento si se compara con la cantidad promedio de células obtenidas por lavado pulmonar en ratones de la misma cepa y edad pero sin lesión pulmonar que es de 6.5×10^4 , de los cuales el 95% corresponde a macrófagos y el 5% a linfocitos.

Los granulomas inducidos por BSAm acoplada a sefarosa también indujeron un aumento notable de células inflamatorias obtenidas por lavado pulmonar, sin embargo en menor cantidad al producido por antígenos de *M. tuberculosis*. La cinética de la respuesta inflamatoria originada por granulomas de BSAm fue parecida a la observada con EPT, con predominio de polimorfonucleares un día después de la inoculación traqueal del antígeno. La diferencia más importante fue en relación con la cantidad de linfocitos y la relación macrófago/linfocito. En efecto, los granulomas producidos por BSAm tuvieron un predominio de macrófagos (fig 4).

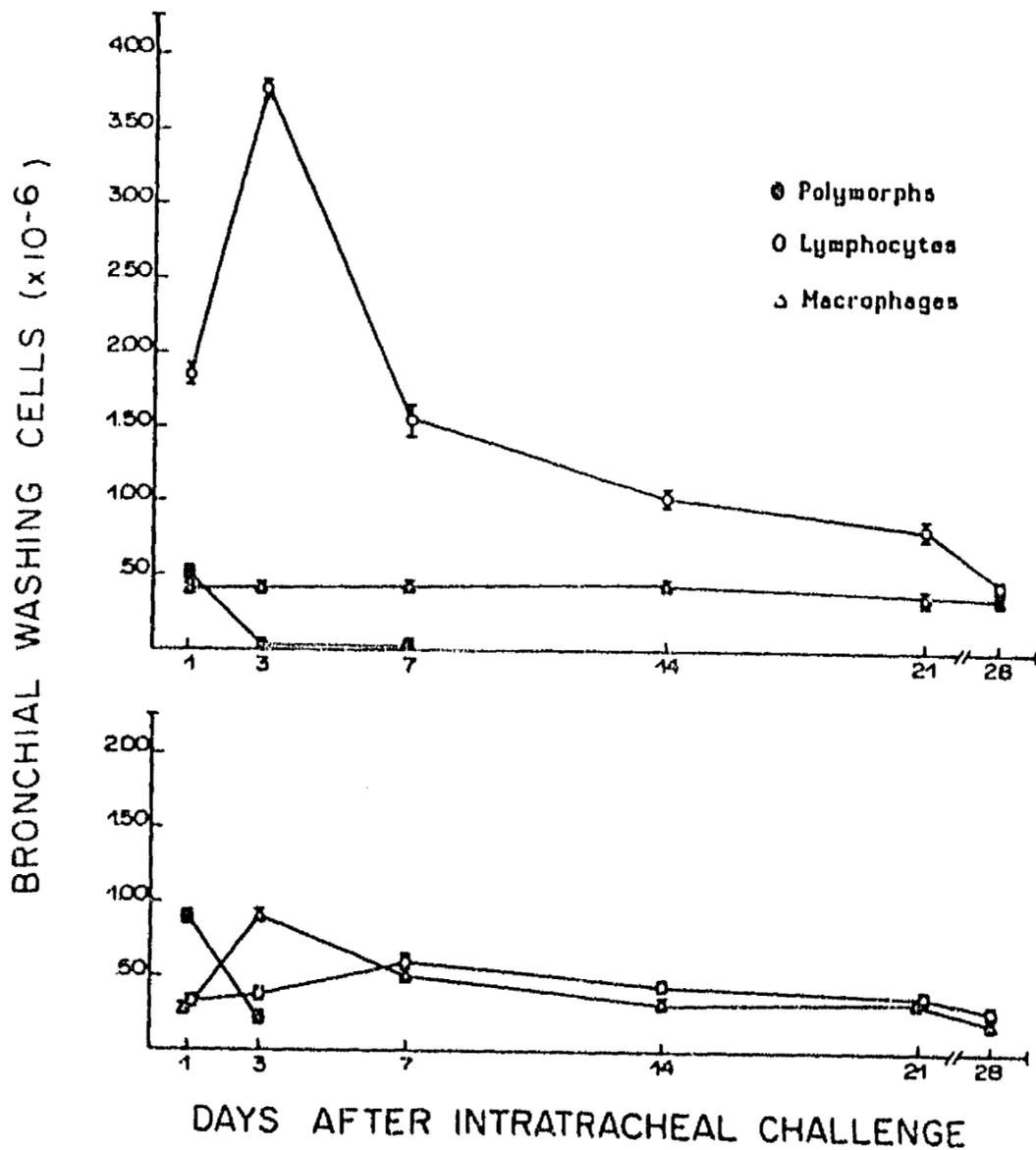


Fig 4. Cinética del infiltrado inflamatorio durante el curso del desarrollo de granulomas inducidos por EPT(panel superior) y BSAm(panel inferior). La cantidad de células inflamatorias producida por EPT acoplada a sefarosa es mayor que la inducida por BSAm, los linfocitos son la célula predominante en la inflamación originada por EPT, mientras que con BSAm los macrófagos son ligeramente más abundantes que los linfocitos. En el primer día después de la inoculación traqueal los polimorfonucleares son abundantes con ambos tipos de antígeno.

3. INMUNOTIPIFICACION DE LAS CELULAS LINFOIDES EN LESIONES GRANULOMATOSAS INDUCIDAS POR ANTIGENOS ACOPLADOS A SEFAROSA.

Con técnica de inmunoperoxidasa casi todas las células linfoides presentes en la inflamación pulmonar son células T. Un día después de la inyección traqueal de EPT acoplado a sefarosa el estudio inmunohistoquímico en cortes histológicos muestra que la mayoría de los linfocitos son T-cooperadores (15% del total de células inflamatorias que constituyen el granuloma) estos linfocitos se organizan alrededor de la esfera de sefarosa en contacto directo con ella, también se localizan en las capas media y parte de la porción externa. En menor porcentaje están presentes las células T citolíticas-supresoras (10%) igualmente distribuidas en torno a la sefarosa. Con la técnica citoquímica de esterasa inespecífica es llamativo la distribución central de los macrófagos, es decir en contacto directo con la sefarosa, estos también se encuentran en las capas medias pero en menor cantidad (Fig 5). El estudio inmunohistoquímico llevado a cabo en células obtenidas de lavado pulmonar también muestra predominio de las células T-cooperadoras (40%) sobre las células T supresoras (25%) tomando en cuenta a todas las células obtenidas por lavado bronquial con morfología de linfocitos (Fig 6).

En el día 3 cuando el proceso inflamatorio alcanza su máxima magnitud, las células T que predominan en los granulomas por EPT, son las Lyt-2 que corresponden al fenotipo citolítico/supresor (40%), en comparación con las células cooperadoras (25%), esta diferencia es menos acentuada en las células obtenidas por lavado bronquial en donde las células T supresoras/citolíticas

representaron el 38% y las cooperadoras el 30% (Fig 6). Con la reacción histoquímica de esterasa inespecífica se observaron numerosos macrófagos distribuidos en forma irregular alternando con los linfocitos y sobre todo en la periferia.

En el día 7, cuando aun el proceso inflamatorio es de gran magnitud, se continuó observando predominio de las células T supresoras/citolíticas sobre las cooperadoras en los granulomas inducidos por EPT(Fig 7). En los cortes histológicos fue de 40% sobre 25% y en las células obtenidas por lavado bronquial de 65% por 30%. Posteriormente, en los siguientes días de observación experimental se continuó observando un ligero predominio a favor de las células supresoras/citolíticas (Fig 6).

En comparación los granulomas producidos por BSAm siempre se observó predominio de linfocitos T cooperadores sobre los T supresores/citolíticos, sobre todo en el primer día después de la inyección traqueal del antígeno (Fig 6). La reacción de esterasa inespecífica mostró abundantes macrófagos, aparentemente más que en los granulomas por EPT, distribuidos irregularmente en toda la superficie del granuloma.



Fig 5. Reaccion de histoquímica enzimática para esterasa inespecífica en granulomas producidos por EPT acoplado a sefarosa un día despues de la inoculación traqueal. Numerosos macrófagos con reactividad citoplasmica positiva se encuentran en contacto directo con la sefarosa.

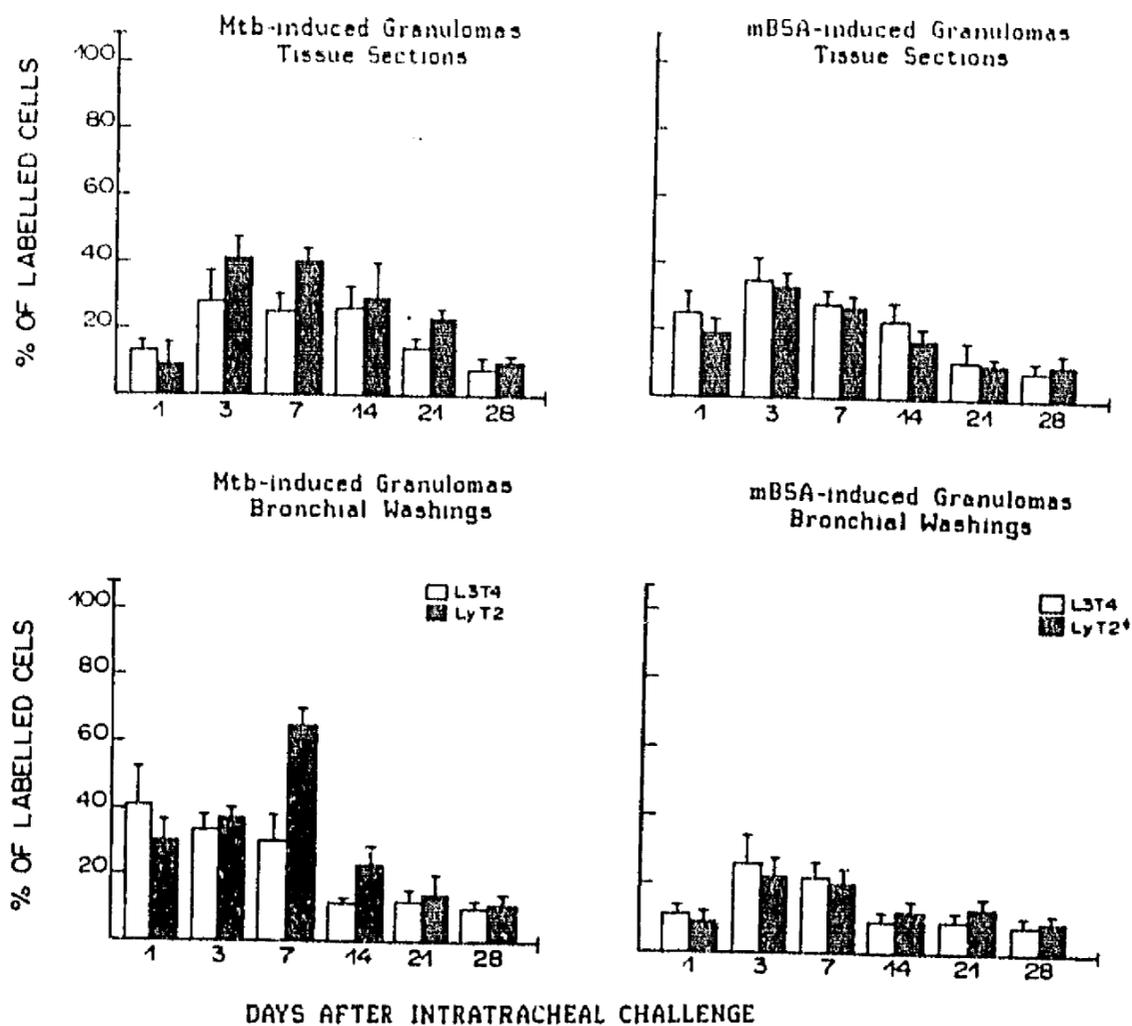


Fig 6. Porcentajes de las subpoblaciones de células T cooperadoras (L3 T4) y supresoras-citolíticas (Lyt 2), durante el desarrollo de granulomas pulmonares producidos por EPT (panel izquierdo) y BSAm (panel derecho), tanto en cortes histológicos como en células obtenidas por lavado bronquial. Con excepción del primer día, en todo los demás intervalos de tiempo estudiados los granulomas inducidos por EPT estuvieron constituidos por linfocitos supresores/citolíticos, sobre todo en los días 3 y 7 que corresponden al desarrollo de la máxima respuesta inflamatoria. En comparación en los granulomas producidos por BSAm se observó predominio de los linfocitos T cooperadores.

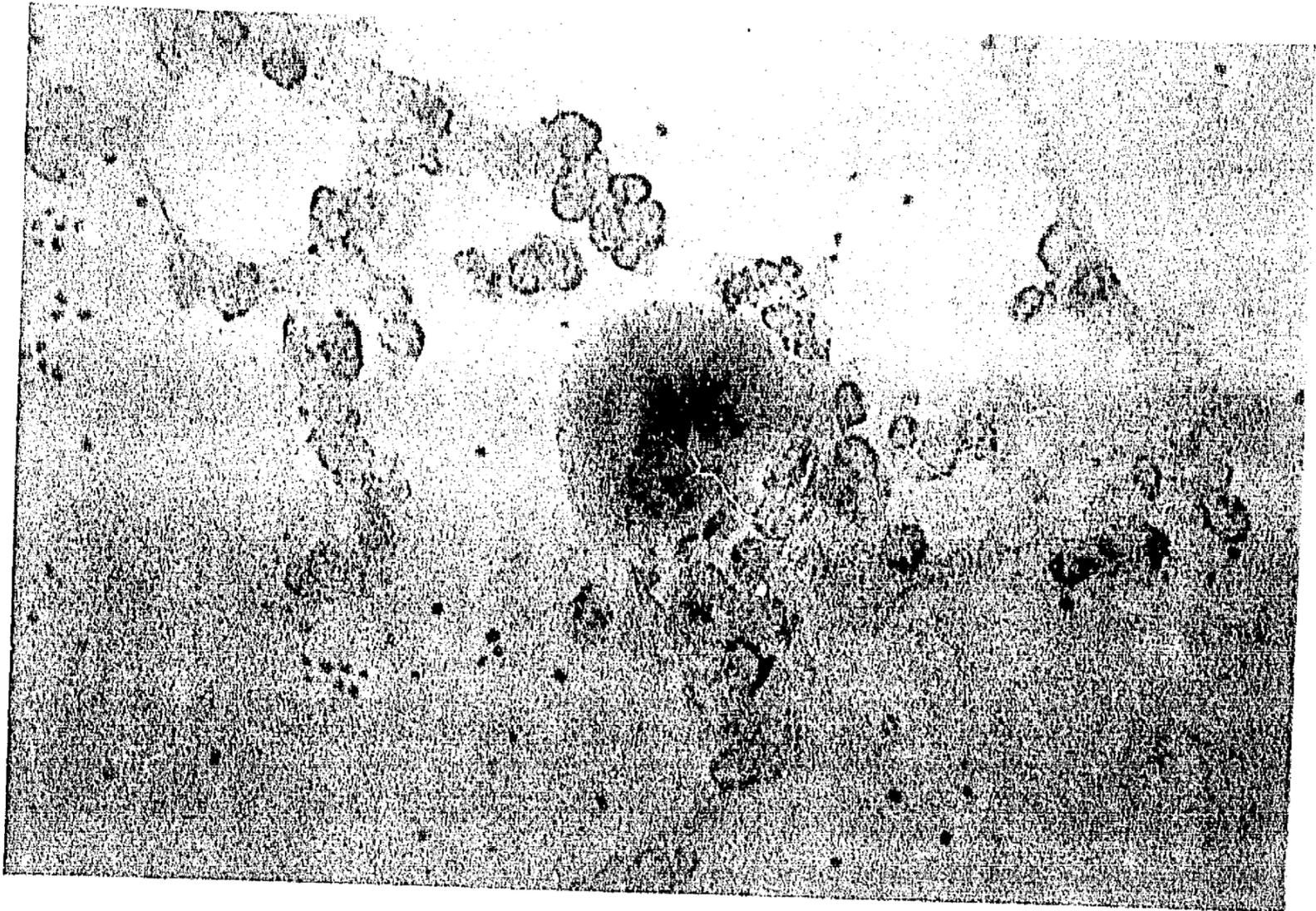


Fig 7. Corte histológico por congelación del pulmón de un ratón sensibilizado, 7 días después de la inyección traqueal de EPT acoplado a sefarosa, incubado con anticuerpo monoclonal anti-Lyt 2 para identificar células T supresoras-citolíticas. La mayoría de los linfocitos que rodean la esfera de sefarosa son positivos (denotado por la línea negra alrededor de las células).

4. CUANTIFICACION POR ELISA DEL TITULO DE ANTICUERPOS SERICOS ESPECIFICOS DE CLASE IgG EN CONTRA DE EPT Y BSAm EN ANIMALES CON GRANULOMAS INDUCIDOS POR ANTIGENOS ACOPLADOS A SEFAROSA.

Debido a que los animales estan sensibilizados, tienen un título promedio de anticuerpos séricos anti EPT de 250 unidades de densidad optica(DO), diez dias despues de haber recibido 50 mgrs de EPT por via subcutanea con 50 μ l de adyuvante completo de Freund, este nivel de anticuerpos en sangre lo consideramos como el título basal. Un dia despues de la inyección intratraqueal de EPT acoplada a sefarosa el título de anticuerpos decae hasta 70 DO, en el dia 3 se encuentra en 180 DO y a partir del dia 7 empieza a incrementarse por arriba del nivel basal en forma progresiva hasta alcanzar 800 DO en el dia 28(Fig 8). En comparación animales con el mismo esquema de sensibilización, pero a los que se les inyectó sefarosa bloqueada con glicina no muestran descenso en el título de anticuerpos séricos sino incremento progresivo, con títulos semejantes a los animales con granulomas pulmonares producidos por EPT acoplados a sefarosa en los dias 21 y 28(Fig 8). En comparación animales sensibilizados con BSAm y con granulomas pulmonares producidos por BSAm acoplado a sefarosa, presentan títulos basales de anticuerpos séricos semejantes a los animales con granulomas por EPT . Despues de la inyección intratraqueal de BSAm-sefarosa, los títulos de anticuerpos de clase IgG anti BSAm se incrementan rapidamente hasta 400 DO en los dias 1 y 3 y se mantienen en 420 DO desde el dia 7 hasta el 28 (Fig 9).

En la Fig 9 se muestra la comparacion en el titulo de anticuerpos

en suero en contra de sus respectivos antígenos entre animales con granulomas producidos por EPT y BSAm acoplados a sefarosa. La diferencia fundamental es el descenso en el título de anticuerpos en granulomas por EPT en el momento en el que la respuesta inflamatoria es máxima y existe predominio del fenotipo linfocítico supresor/citolítico, mientras que en los animales con granulomas originados por BSAm se observa incremento progresivo en el título de anticuerpos séricos.

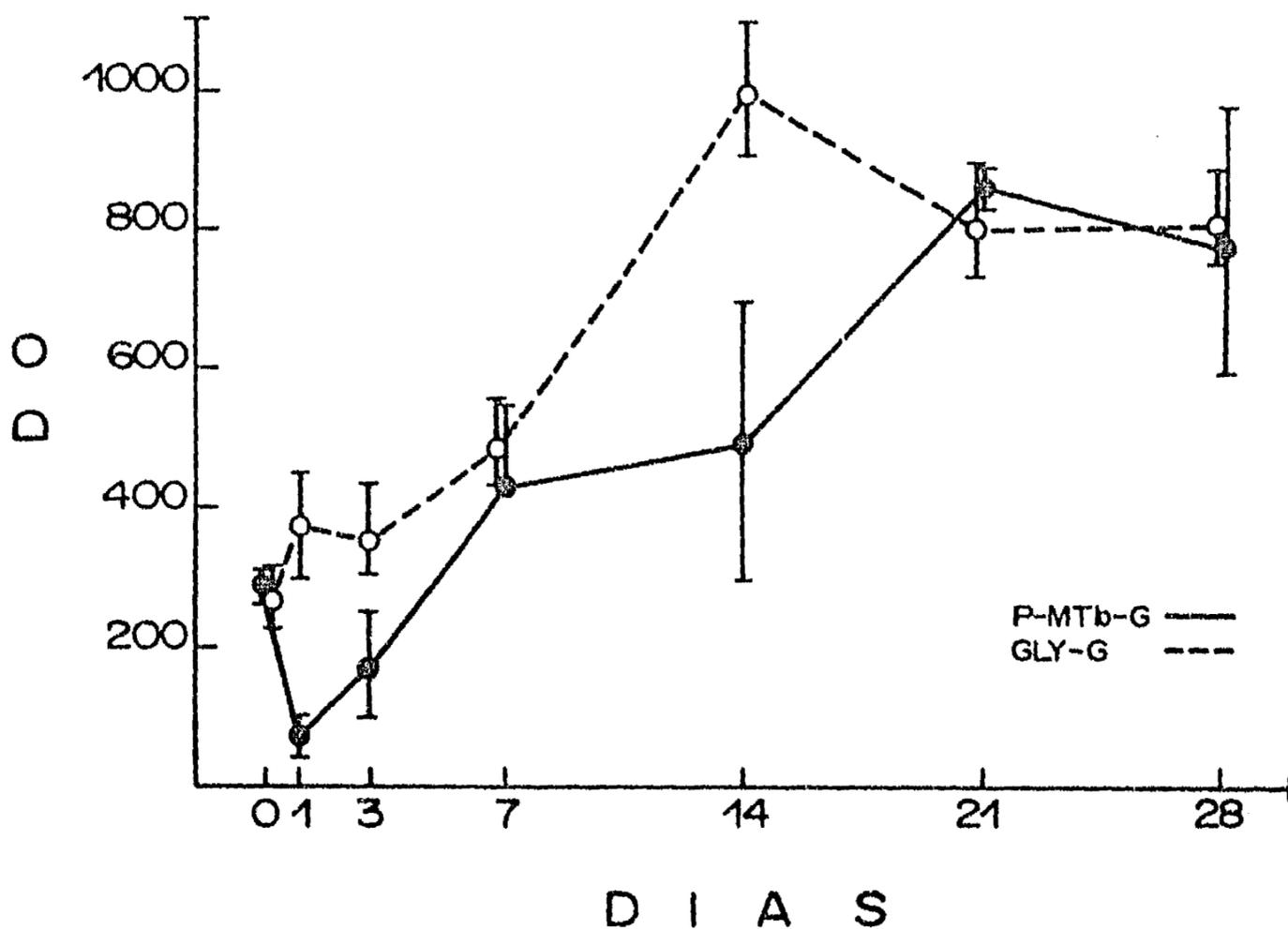


Fig 8. Grafica que ilustra el título de anticuerpos sericos de clase IgG anti-EPT, en animales con inflamación granulomatosa inducida por EPT acoplada a sefarosa (●) y en ratones sensibilizados a los que se les inyectó intratraquealmente sefarosa cuyos grupos quimicos activos fueron bloqueados con glicina(o). Existe disminución en el título de anticuerpos en animales con granulomas producidos por EPT, sobre todo en los dias 1, 3 y 7, en éstos dos ultimos tiempos es cuando predomina el fenotipo T supresor-citolítico en las lesiones pulmonares; en comparación en los ratones que recibieron sefarosa-glicina se observó aumento progresivo del título de anticuerpos séricos anti-EPT.

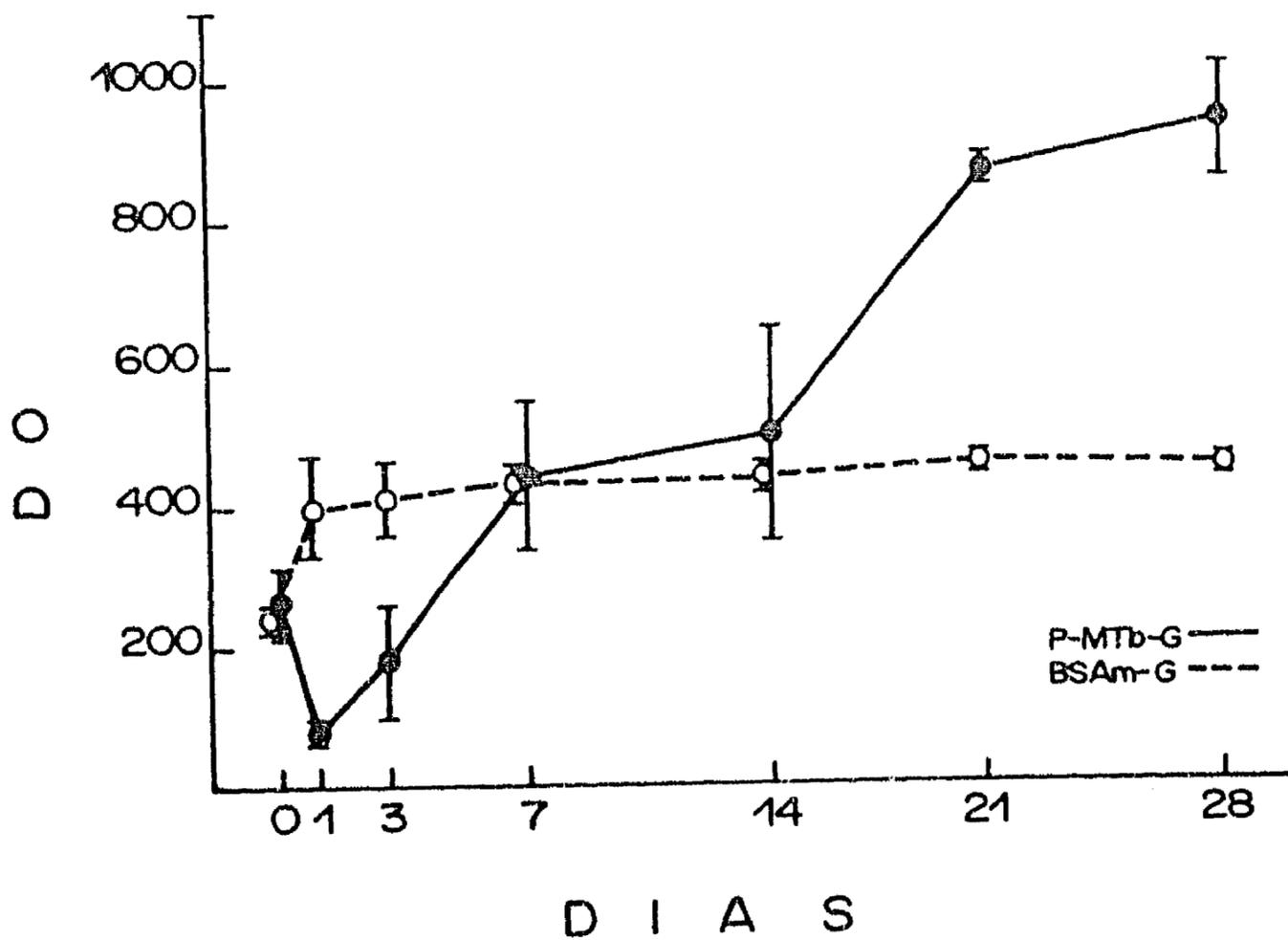


Fig 9. Gráfica que ilustra el título de anticuerpos séricos de clase IgG anti- EPT y BSAm, en animales sensibilizados con inflamación granulomatosa. Los ratones con granulomas producidos por EPT muestran una disminución rápida del título de anticuerpos séricos y recuperación posterior, en comparación en los animales con granulomas inducidos por BSAm se observa aumento rápido y mantenimiento del título de anticuerpos anti-BSAm.

5. DETERMINACION DE HRC EN CONTRA DE EPT Y BSA_m EN RATONES CON GRANULOMAS INDUCIDOS POR ANTIGENOS ACOPLADOS A SEFAROSA.

Animales sensibilizados con EPT por via subcutanea e intraperitoneal, responden originando inflamación que engrosa el cojinete plantar, en promedio de .30 mm un dia despues de haberles inyectado subcutaneamente EPT, éste es el nivel basal de inflamación obtenido en la prueba de HRC en animales sensibilizados pero sin lesión pulmonar. Un dia después de haber inyectado EPT acoplado a sefarosa la prueba de hipersensibilidad muestra disminución a .20 mm y decae aun mas hasta .1 mm en los dias 3 y 7. Posteriormente se recupera y llega a igualar el nivel de hipersensibilidad observado en el control negativo, representado por los animales sensibilizados con esferas de sefarosa en el pulmón cuyos grupos reactivos han sido bloqueados con glicina los cuales también muestran un ligero decremento, hasta .23 mm en el dia 3 y asi se mantiene hasta el dia 28 (Fig 10).

También los ratones con granulomas inducidos por BSA-m acoplada a sefarosa inducen disminución de la respuesta de hipersensibilidad retardada, la cual es mayor en los dias 1 y 3 después de la inoculación intratraqueal del antígeno y se mantienen por debajo del control negativo en los periodos de tiempo posteriores (Fig 11).

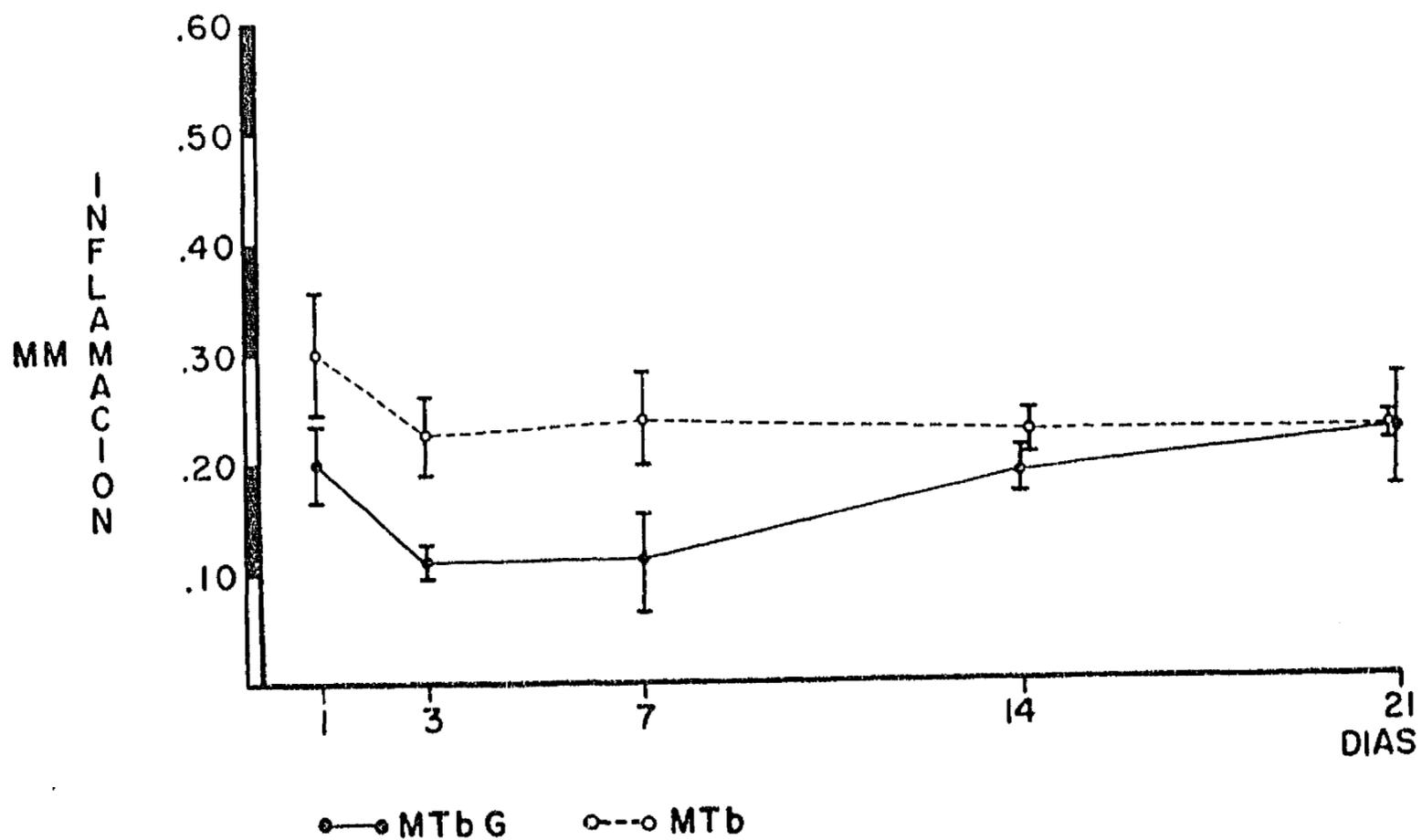


Fig 10. Gráfica que ilustra las mediciones de hipersensibilidad retardada cutanea a EPT, en ratones sensibilizados con granulomas pulmonares producidos por EPT(●) y sefarosa bloqueada con glicina(o). Los animales con lesiones pulmonares producidas por EPT muestran disminución de la respuesta de inmunidad celular, mas acentuada en los dias 3 y 7, intervalos de tiempo en los que la inflamación pulmonar es mas intensa y esta constituida fundamentalmente por linfocitos T supresores-citolíticos. En comparación los animales a los que se les inyectó sefarosa bloqueada con glicina, muestran ligero descenso y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la prueba de hipersensibilidad retardada cutanea.

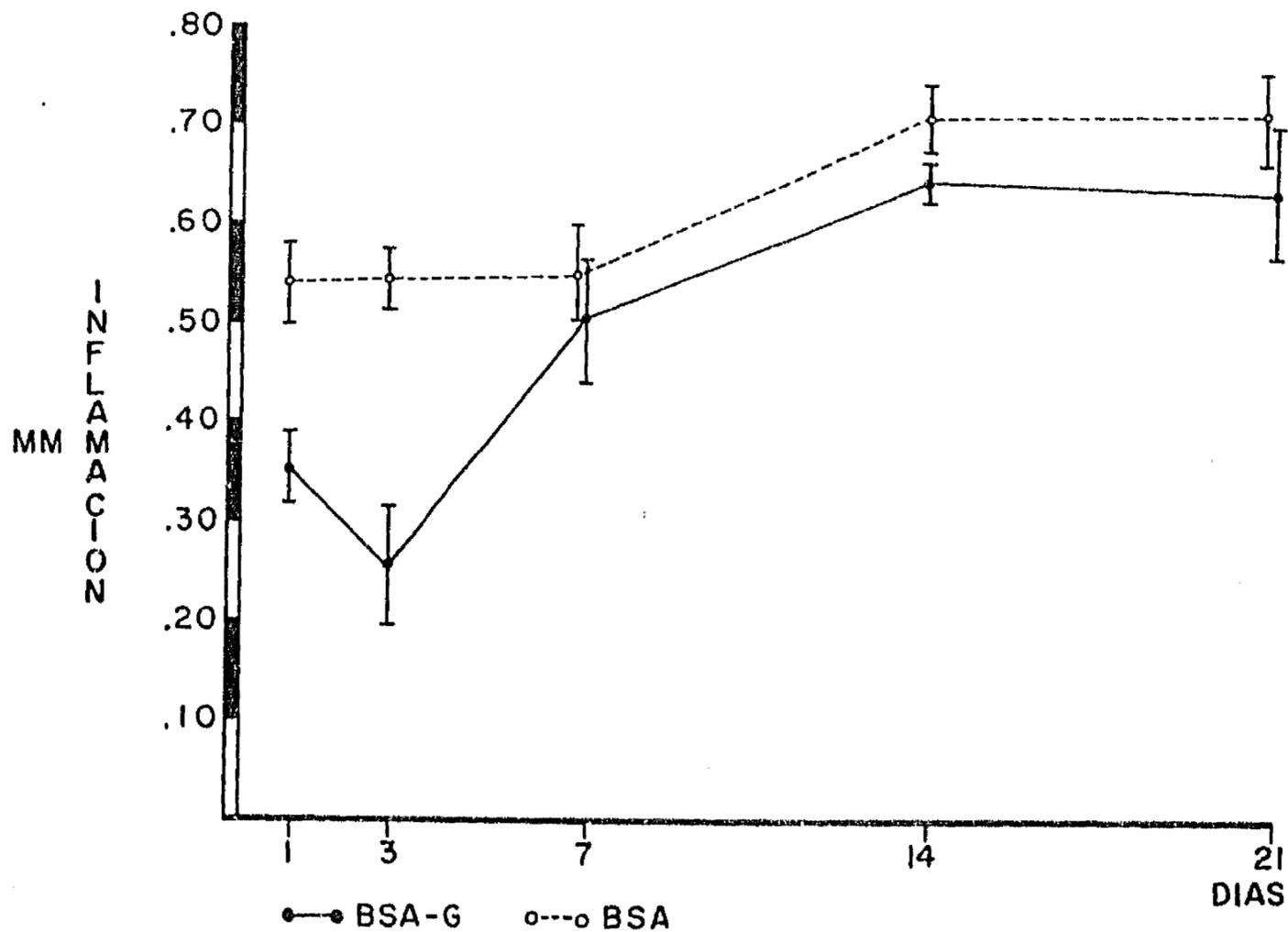


Fig 11. Gráfica que ilustra los resultados de la prueba de hipersensibilidad retardada cutanea, en animales con granulomas pulmonares inducidos por BSAm acoplado a sefarosa(●) y sefarosa bloqueada con glicina(o). Los ratones con inflamación pulmonar originada por BSAm, que tiene abundantes macrófagos, tienen disminución acentuada de las respuestas de inmunidad celular. Los animales con sefarosa-glicina en los pulmones, no muestran modificaciones de la hipersensibilidad retardada.

6. HISTOPATOLOGIA Y MORFOMETRIA DE LOS GRANULOMAS PRODUCIDOS POR EPT ACOPLADO A SEFAROSA Y MANIPULADOS FARMACOLOGICAMENTE CON CICLOFOSFAMIDA(CF) E INDOMETACINA(ID).

Debido al aparente estado de inmunosupresión observado, inducido por los granulomas pulmonares producidos por EPT acoplado a sefarosa, se realizaron experimentos con administración de farmacos para eliminar células T supresoras/citolíticas (dosis bajas de ciclofosfamida) y bloqueadores de la síntesis de prostaglandinas que son agentes inmunosupresores constantemente producidos por los macrófagos alveolares (con la administración de indometacina). Desde el punto de vista histopatológico los granulomas producidos por EPT acoplado a sefarosa en el pulmón de ratones sensibilizados y tratados con ciclofosfamida tuvieron una cinética parecida pero notablemente mas pequeños que los observados en animales sin manipulación farmacologica, en el día 3 por ejemplo los granulomas tuvieron menos de la tercera parte del tamaño de los no tratados (Fig 12), la constitución histológica fue tambien muy diferente ya que los granulomas en animales tratados con ciclofosfamida mostraron una cantidad mayor de macrófagos, muchos de ellos de aspecto epitelioides e incluso se observaron células gigantes, elementos celulares no observados en ratones sin tratamiento farmacológico(Fig 13). La magnitud de la inflamación en vasos sanguíneos y alrededor de bronquios también fue menor.

En los granulomas de animales tratados con indometacina también tuvieron la misma cinética y fueron de menor tamaño que los observados en animales sin tratamiento farmacológico, por ejemplo

en el momento de maxima respuesta inflamatoria, que corresponde al dia 3 tuvieron la mitad del tamaño (Fig 14). Comparativamente los granulomas de animales tratados con ciclofosfamida fueron de menor tamaño que los observados en animales tratados con indometacina, en estos ultimos también se observo modificación en su constitución histológica, a semejanza de lo observado en animales tratados con ciclofosfamida existió mayor cantidad de macrófagos con células gigantes en menor número, pero con abundantes linfocitos(Fig 14).

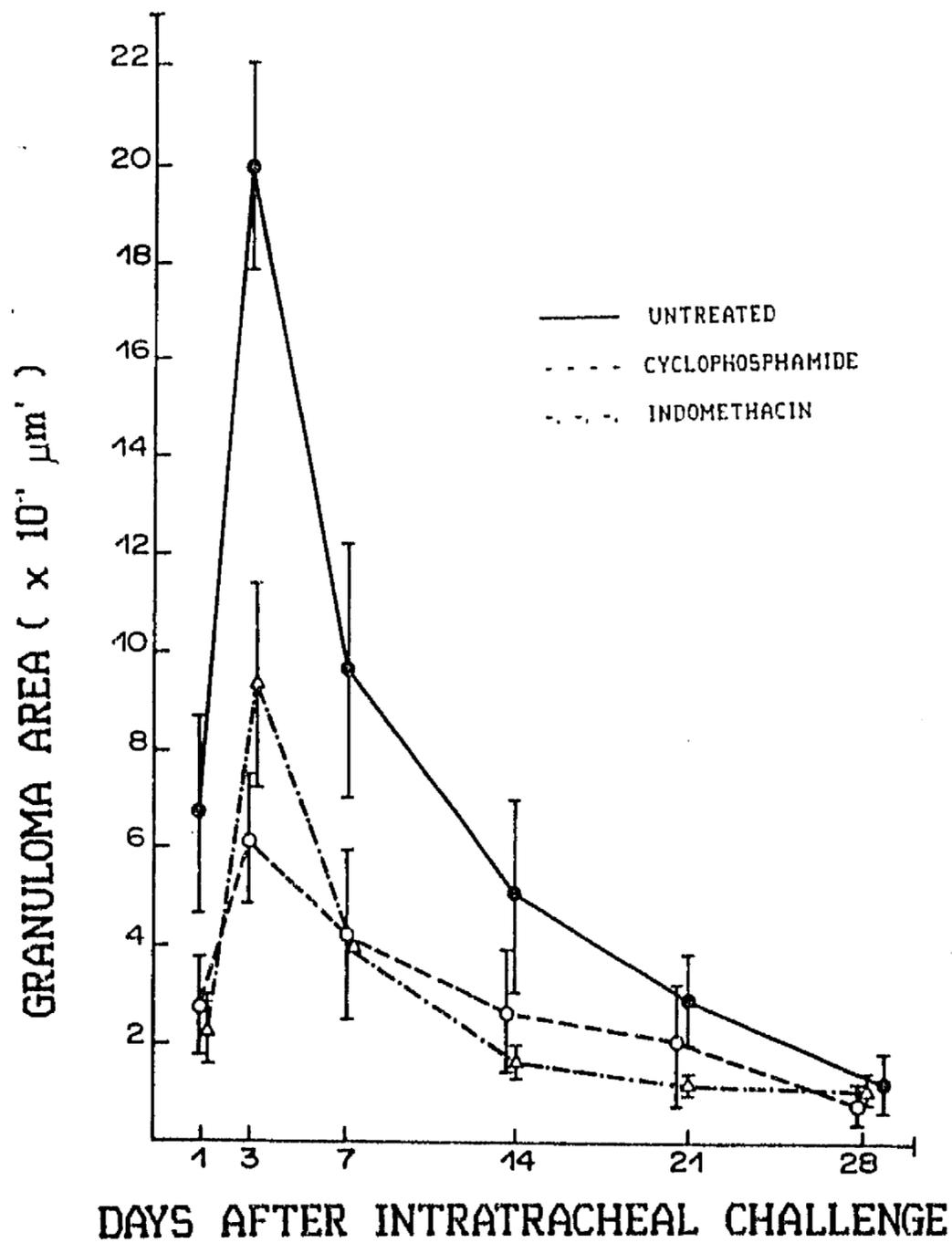


Fig 12. Estudio morfométrico de granulomas pulmonares, en ratones sensibilizados sin manipulación farmacológica(—), tratados con dosis bajas de ciclofosfamida(- - -) y con indometacina(-.-) Tanto los animales a los que se les inyectó indometacina y sobre todo los tratados con ciclofosfamida, mostraron granulomas de menor tamaño que los medidos en animales sin tratamiento farmacológico.

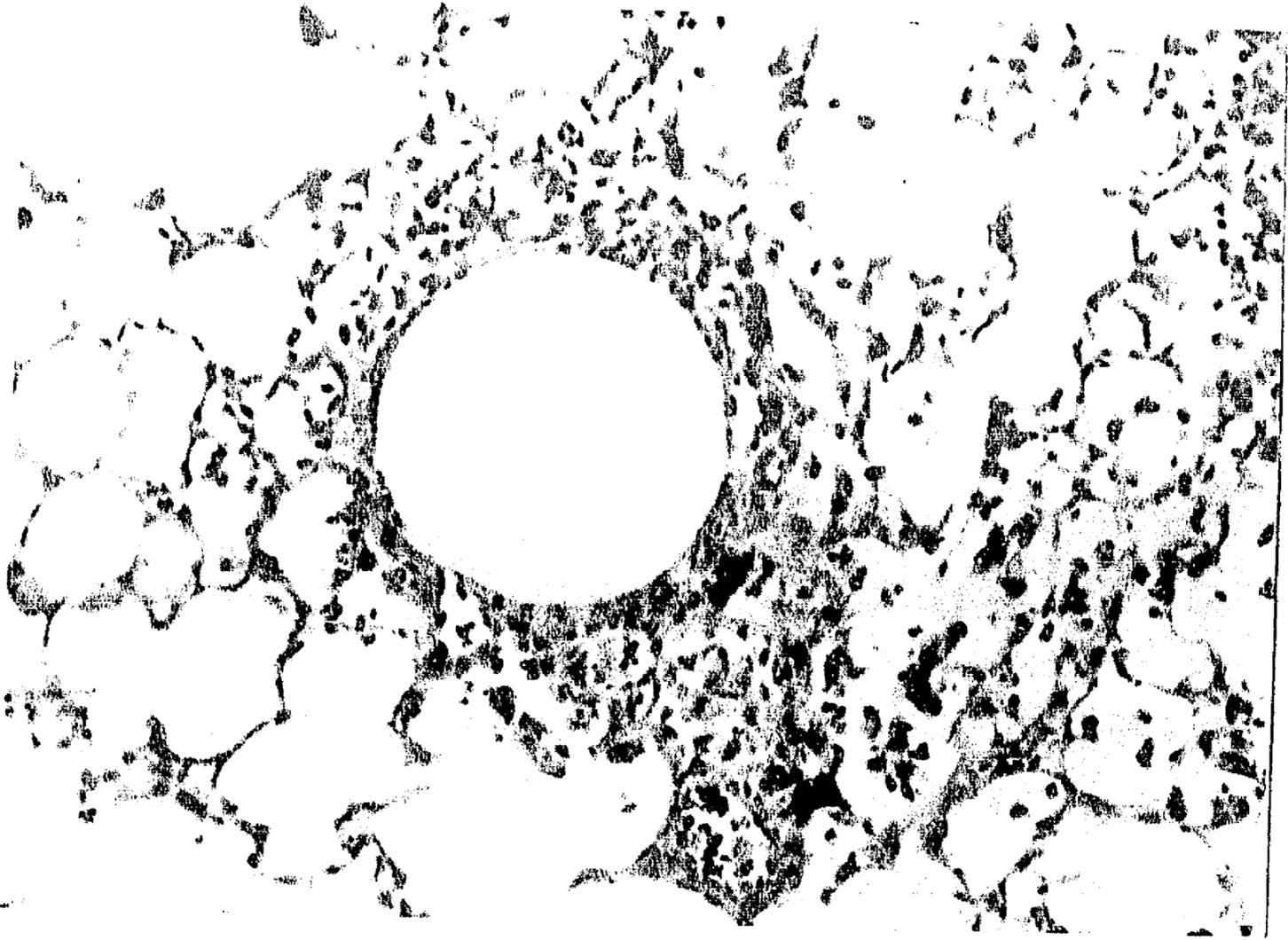


Fig 13. Imagen histológica de un granuloma de 3 días en un ratón manipulado farmacológicamente con dosis bajas de ciclofosfamida para eliminar células T supresoras. El area del granuloma es pequeña, las células inflamatorias que lo constituyen son fundamentalmente macrófagos, algunos de ellos con aspecto epitelióide, células gigantes, escasos linfocitos y polimorfonucleares.

7. CUANTIFICACION CELULAR Y TIPOS DE CELULAS INFLAMATORIAS EN LAVADOS BRONQUIALES DE GRANULOMAS PRODUCIDOS POR EPT ACOPLADO A SEFAROSA EN ANIMALES CON MANIPULACION FARMACOLOGICA.

En ratones sensibilizados por via subcutanea e intraperitoneal la presencia de sefarosa acoplada a EPT indujo abundante número de células inflamatorias, predominante linfocitos cuya cinética de aparición y cantidades promedio ya fueron descritos (Fig 4). En animales con el mismo manejo experimental pero con la administración de ciclofosfamida, el número de linfocitos disminuye acentuadamente, en el primer dia es 7 veces menor, en el dia 3 es 7.5 veces menos, en los dias posteriores existe aproximadamente la mitad, excepto en el dia 28 que se igualan al número de linfocitos presentes en ratones sin tratamiento con ciclofosfamida(Fig 15). El otro elemento celular inflamatorio cuya cantidad también se modifica son los leucocitos polimorfonucleares, en los animales a los que se les administró ciclofosfamida se triplico su número en comparación con los no tratados, mientras que los macrófagos practicamente no sufrieron modificaciones numéricas(Fig 15).

El tratamiento con indometacina provocó ligero decremento de linfocitos y macrófagos en todos los intervalos de tiempo estudiados en comparación con los animales sin tratamiento, los leucocitos polimorfonucleares duplicaron su número en los dias 1 y 3 (Fig 15).

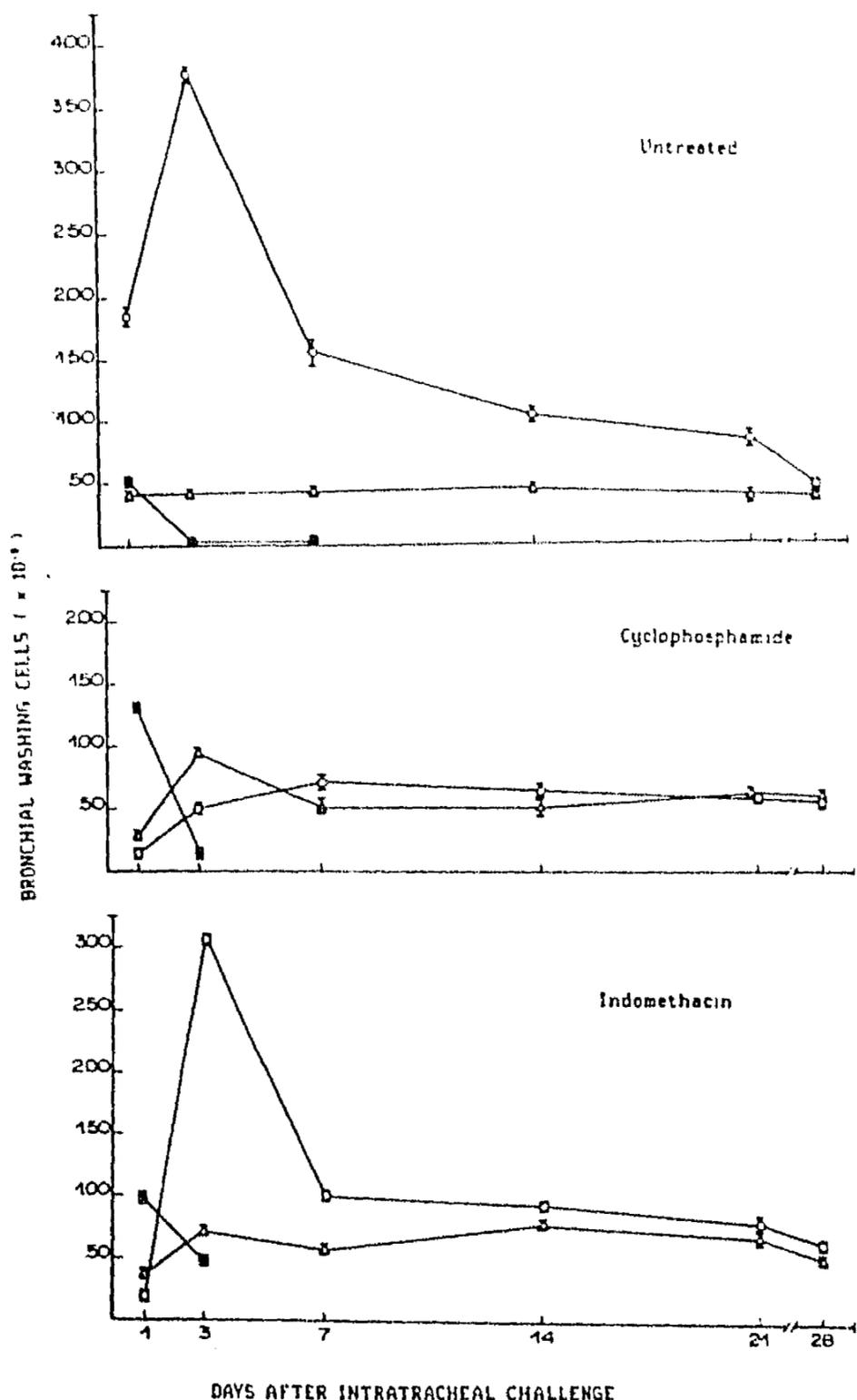


Fig 15. Recuento diferencial de células inflamatorias, obtenidas por lavado bronquial en ratones sensibilizados con granulomas pulmonares inducidos por EPT acoplado a sefarosa sin manipulación farmacológica (panel superior), tratados con dosis bajas de ciclofosfamida (panel central) y en ratones a los que se les inyectó diariamente indometacina (panel inferior). Los animales tratados con ciclofosfamida muestran acentuada disminución de linfocitos con aumento en el número de neutrofilos. Los animales tratados con indometacina muestran ligera disminución de linfocitos, sin cambio en macrófagos y polimorfonucleares.

8. CUANTIFICACION POR ELISA DEL TITULO DE ANTICUERPOS SERICOS ESPECIFICOS DE CLASE IgG EN CONTRA DE EPT EN RATONES CON GRANULOMAS PULMONARES INDUCIDOS POR ANTIGENOS ACOPLADOS A SEFAROSA Y TRATADOS CON CF E ID.

El fenomeno de disminucion acentuada de anticuerpos séricos anti EPT en animales con granulomas pulmonares inducidos por EPT acoplado a sefarosa es revertido totalmente con la eliminacion de células LyT-2 por el tratamiento con dosis bajas de ciclofosfamida. En el primer y tercer dia los animales tratados incrementan el título de anticuerpos 4 veces mas, en el dia 7 es 3 veces mas al del título determinado en los animales no tratados e incluso tambien supera a los títulos observados en los controles negativos que corresponden a los ratones sensibilizados a los que se les inyectó intratraquealmente sefarosa bloqueada con glicina (Fig 16).

La administracion de indometacina revirtió aun mas la disminucion de los anticuerpos anti EPT, incluso casi se duplicó el título basal, en el dia 1 incremento 4 veces mas, en los dia 3 y 7 el incremento fue de 5 veces mas en comparacion a lo observado en animales no tratados (Fig 16), también supero los títulos determinados en los animales control.

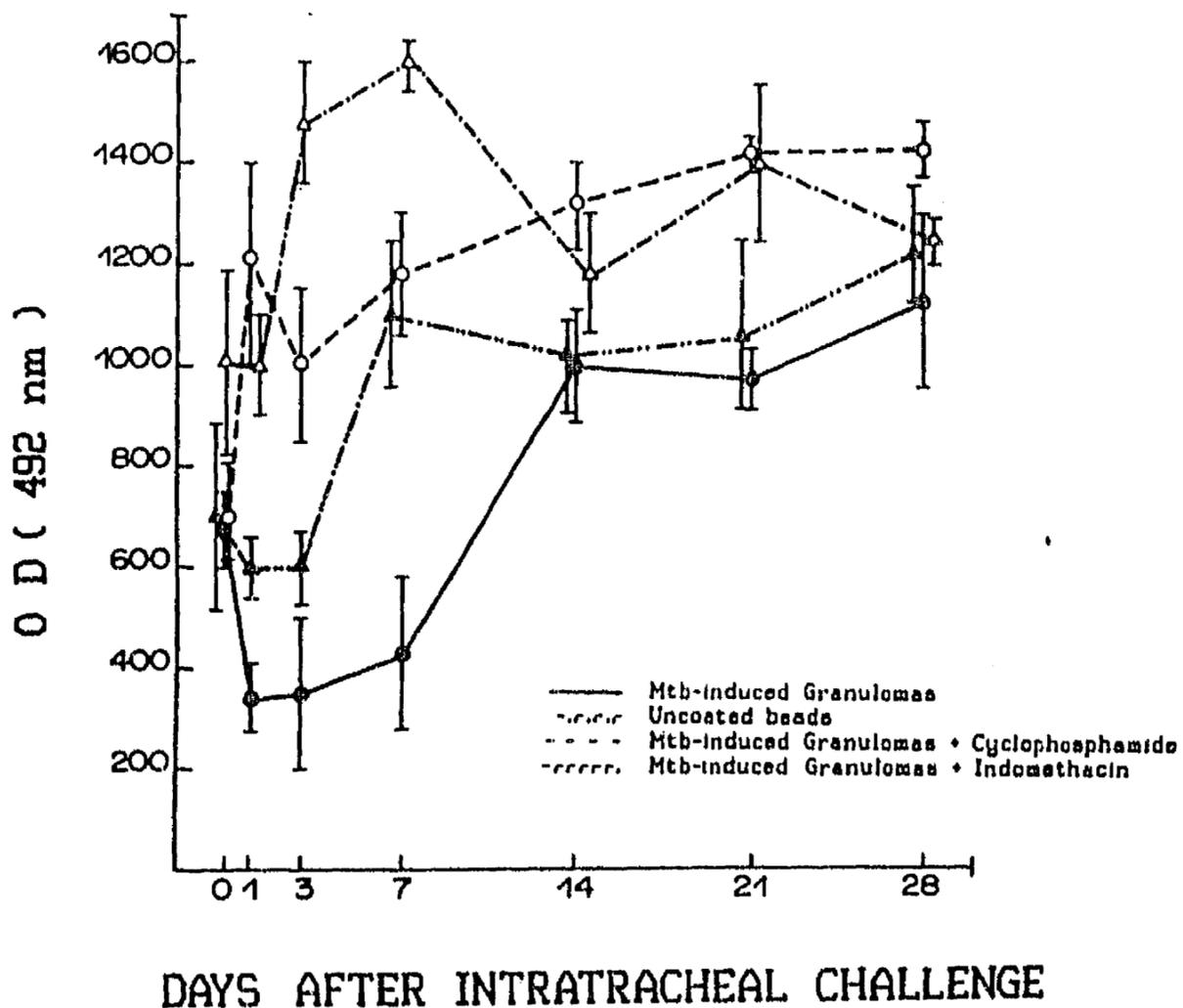


Fig 16. Gráfica que ilustra los títulos comparativos de anticuerpos séricos de clase IgG anti EPT en ratones sensibilizados, con granulomas pulmonares sin manipulación farmacológica(-----), con administración de ciclofosfamida(- - -) tratados con indometacina(-.-.-) y en animales con sefarsa bloqueada con glicina(-.-.-). Tanto ciclofosfamida y sobre todo indometacina revierten la disminución de anticuerpos séricos producida en animales con granulomas originados por EPT acoplado a sefarsa.

9. DETERMINACION DE HRC EN RATONES CON GRANULOMAS INDUCIDOS POR ANTIGENOS ACOPLADOS A SEFAROSA Y MANIPULADOS FARMACOLOGICAMENTE.

A semejanza de lo observado en la determinación del título de anticuerpos séricos en ratones modulados farmacologicamente, también la administración de ciclofosfamida revertió el efecto de supresión de la hipersensibilidad retardada en animales con granulomas pulmonares inducidos por EPT acoplado a sefarosa, duplicandola en los días 1 y 3 y cuatriplicandola en el día 7 (Fig 17). El bloqueo en la síntesis de prostaglandinas producido por la administración de indometacina, fue mas eficiente en revertir la supresión de la hipersensibilidad retardada observada en los animales no tratados farmacologicamente, ya que la incremento 3.5 veces mas en el día 3 y 5.5 veces mas en el día 7 (Fig 17).

En comparación la supresión de la hipersensibilidad retardada observada en los ratones con granulomas pulmonares inducidos por BSAm acoplada a sefarosa solo revertió acentuadamente con la administración de indometacina, triplicandose en el día 3 y cuatriplicandose en el día 7; la ciclofosfamida practicamente no tuvo efecto (Fig 18).

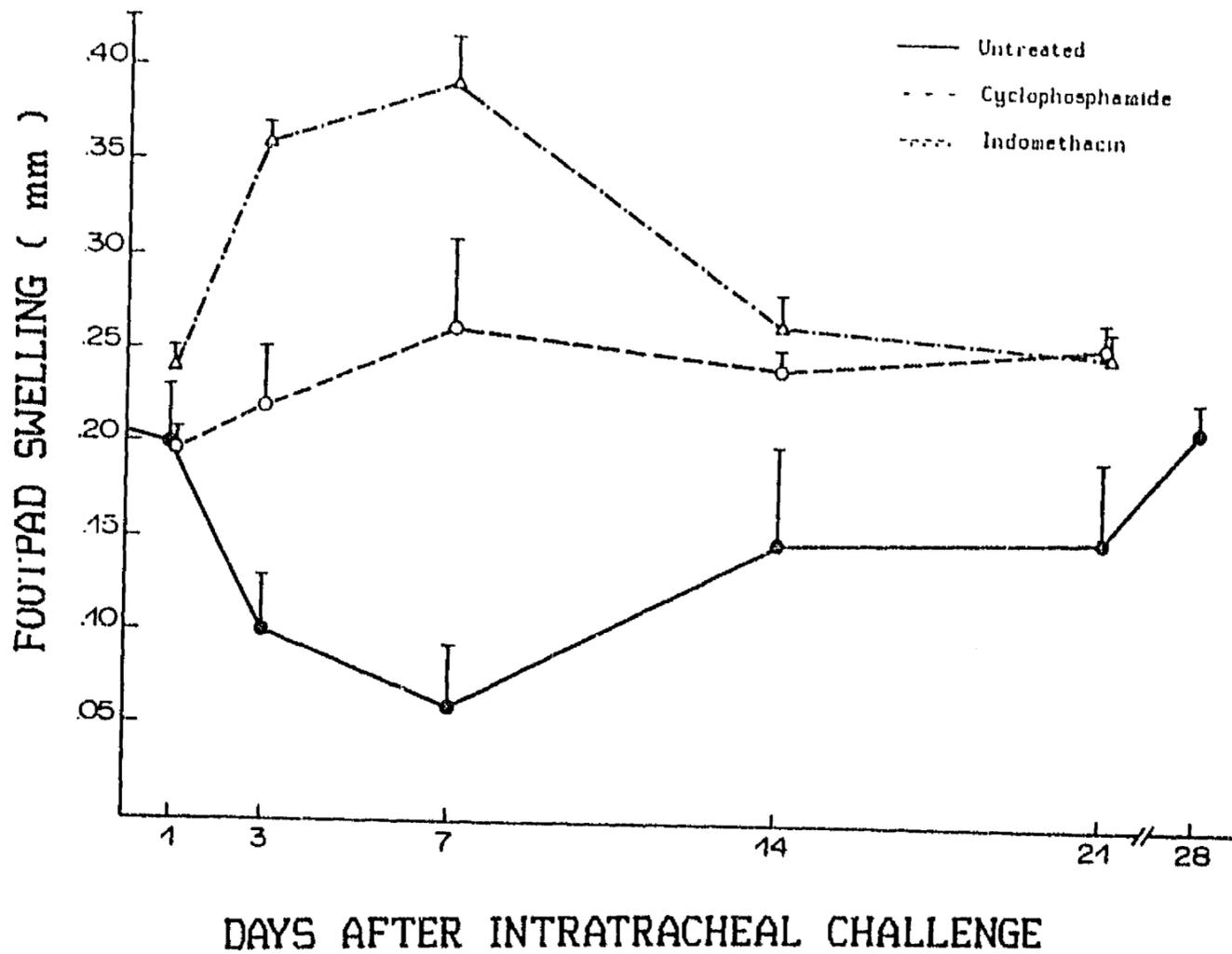


Fig 17. Prueba de hipersensibilidad retardada cutanea en ratones sensibilizados con granulomas pulmonares inducidos por EPT acoplado a sefarosa sin manipulaci3n farmacologica(—), con administraci3n de ciclofosfamida(- - -) y con inyecci3n intraperitoneal de indometacina(-.-.-). Ambos farmacos revierten totalmente la supresi3n de la inmunidad celular originada por la presencia de inflamaci3n pulmonar producida por EPT, siendo la indometacina mas eficiente. Dicha observacion implica que tanto c3lulas T supresoras como prostaglandinas estan involucradas en la inducci3n de supresi3n de la inmunidad celular.

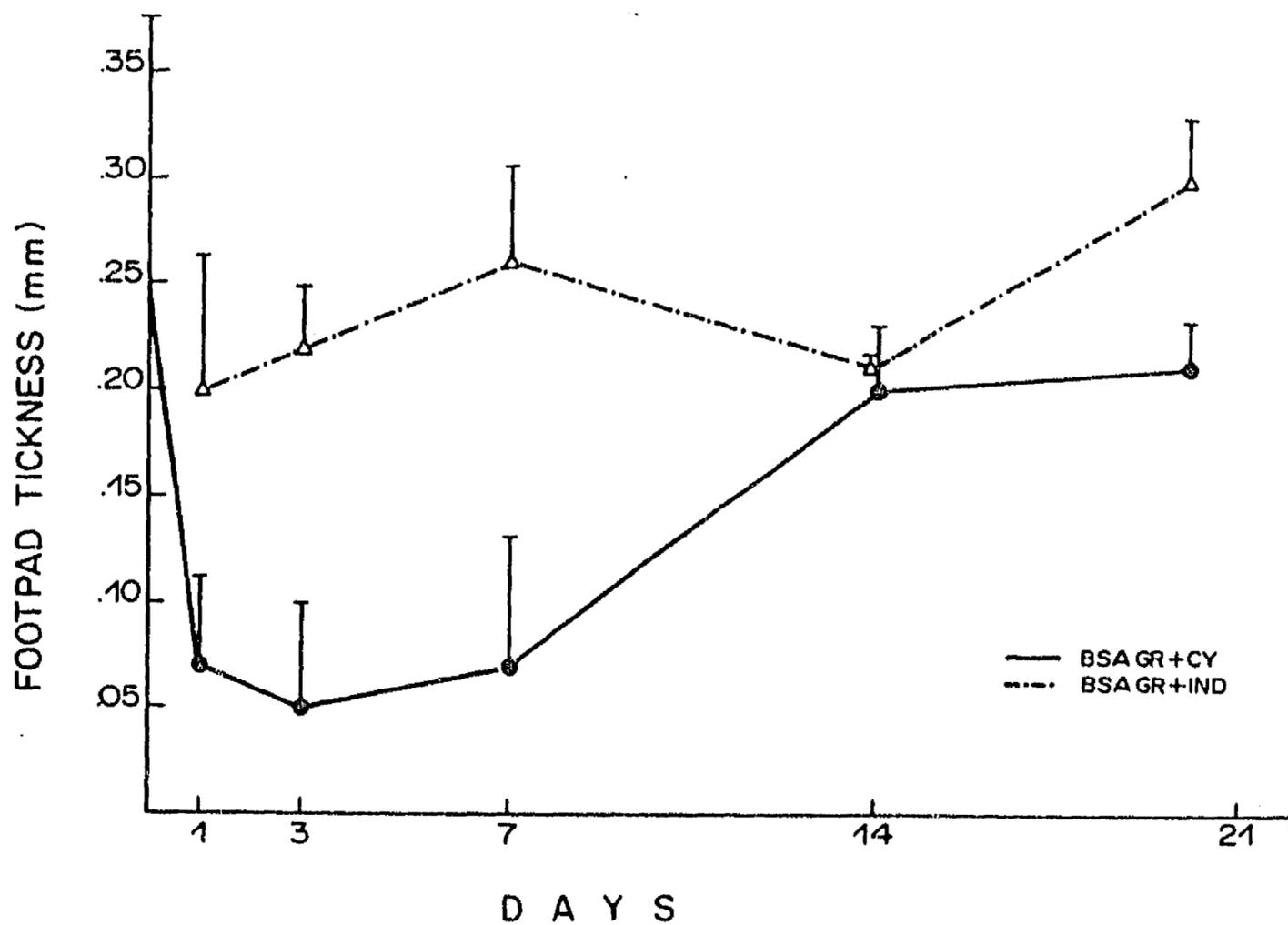


Fig 18. Prueba de hipersensibilidad retardada cutanea en ratones sensibilizados con granulomas producidos por BSA_m acoplada a sefarosa, en animales tratados con ciclofosfamida(—) e indometacina(-·-·-). La supresión de la inmunidad celular solo es revertida con el bloqueo de la síntesis de prostaglandinas y no con la destrucción de células T supresoras.

10. HISTOPATOLOGIA DE LA INFLAMACION PULMONAR INDUCIDA POR EPT Y ANTIGENOS PUROS DE M TUBERCULOSIS INCORPORADOS EN FRAGMENTOS DE NITROCELULOSA.

La respuesta inflamatoria originada por la presencia de antígenos proteicos de M.tuberculosis incorporados a fragmentos de nitrocelulosa en el pulmón de ratones sensibilizados fue muy intensa. Un día después de la inyección intratraqueal del antígeno se observó fundamentalmente infiltrado inflamatorio intersticial constituido predominantemente por leucocitos polimorfonucleares, abundantes linfocitos y macrófagos, la presencia de estos elementos celulares inflamatorios engrosa notablemente las paredes alveolares(Fig 19), el aspecto de los vasos capilares es de intensa congestión. Existen también manguillos de linfocitos alrededor de vénulas, arterias de distribución y sobre todo de bronquiolos; en los lumenes de numerosos alveolos hay macrófagos abundantes con partículas de nitrocelulosa en el citoplasma así como linfocitos y neutrófilos. En el día 3 y 7 la respuesta inflamatoria es de mayor intensidad con predominio de linfocitos pero también con abundantes macrófagos, muchos de los cuales son de aspecto epitelióide con abundante citoplasma y congregados en acúmulos; los ganglios linfáticos intertraqueobronquiales muestran hiperplasia difusa con dilatación sinusal, en la luz de éstos hay abundantes macrófagos de gran tamaño algunos de los cuales tienen fragmentos de nitrocelulosa en el citoplasma. En el día 14 la inflamación disminuye pero aun se observa infiltrado intersticial con venulitis y bronquiolitis, existen focalmente acúmulos de

macrófagos con tendencia a formar granulomas. En los días 21 y 28 la inflamación ha disminuido notablemente, todavía se observa focos de inflamación intersticial y granulomas bien constituidos con linfocitos, macrófagos y algunas células gigantes(Fig 20). Las alteraciones histopatológicas descritas fueron muy semejantes, practicamente identicas con todos los antígenos puros de M. tuberculosis estudiados, incluso también la nitrocelulosa sin antígeno que fue utilizada como control negativo invocó importante respuesta inflamatoria. Sin embargo si se observaron diferencias en cuanto a la magnitud de la inflamacion, ya que el EPT originó una respuesta de mucha mayor magnitud, la nitrocelulosa sin antígeno produjo menor inflamación con predominio absoluto de macrófagos y poca cantidad de linfocitos.

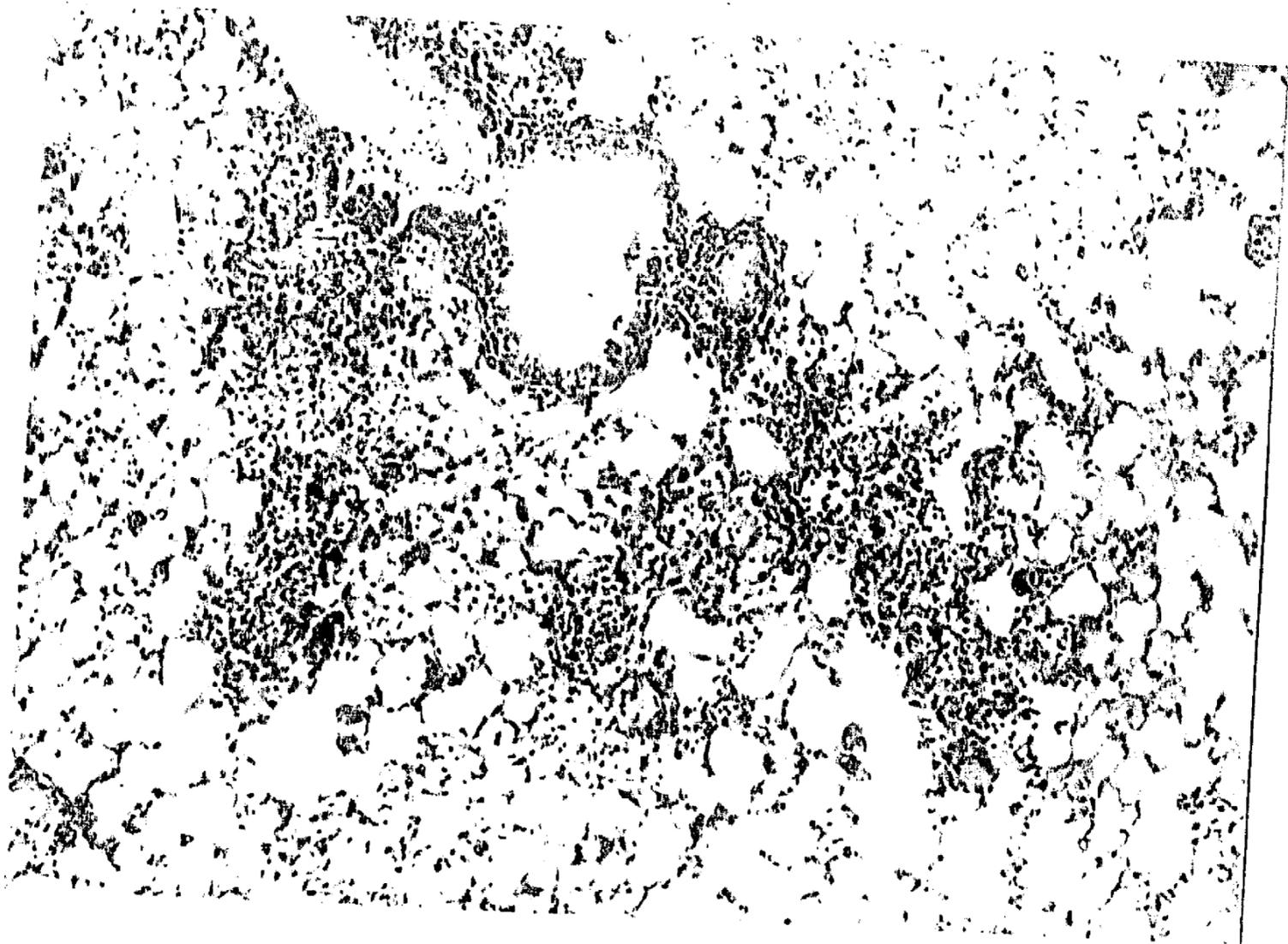


Fig 19. Imagen histológica del pulmón de un ratón que recibió 3 días antes EPT incorporado en nitrocelulosa por vía intratraqueal. Areas extensas de alveolitis y neumonitis intersticial pueden observarse, sobre todo alrededor de bronquios y bronquiolos.

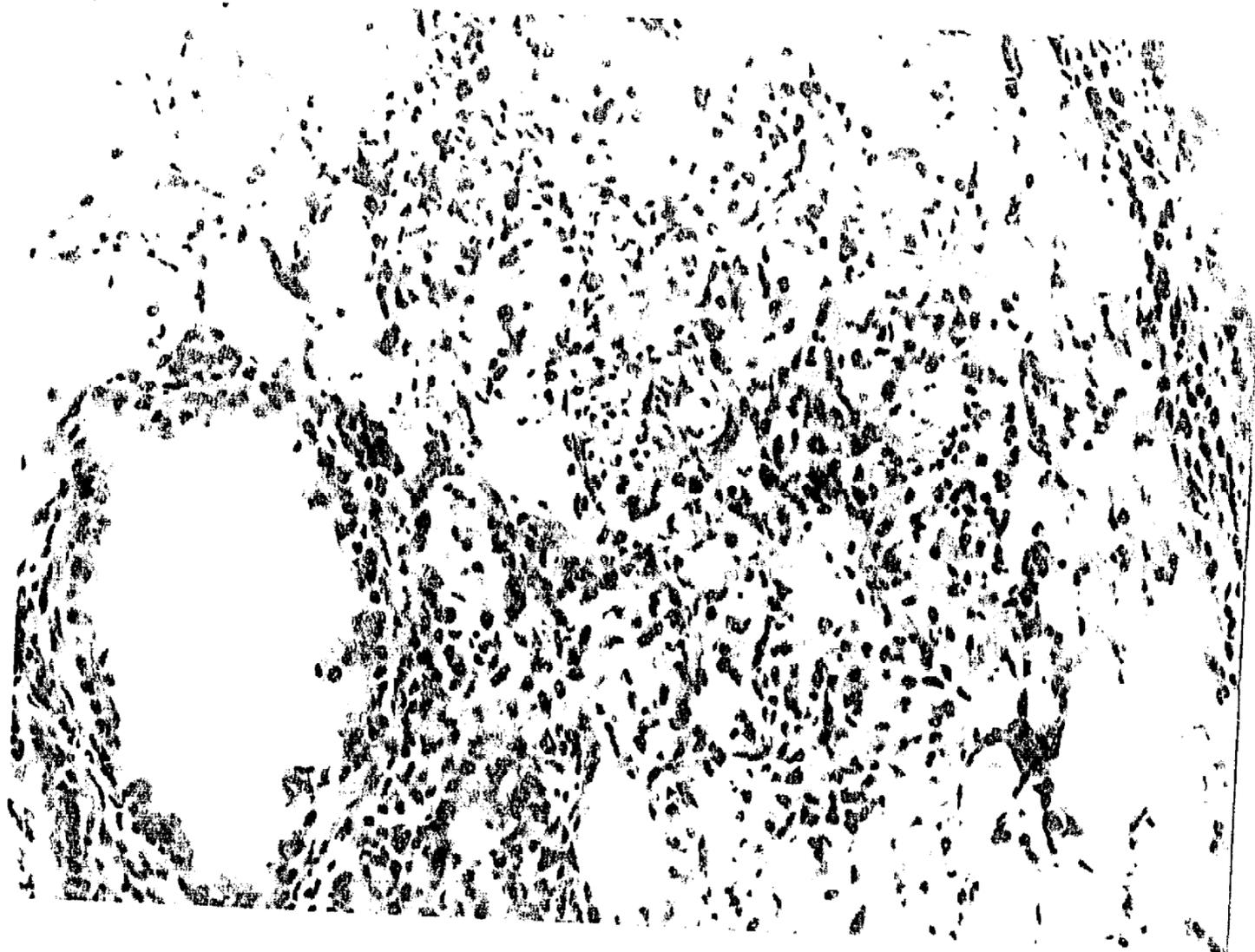


Fig 20. Imagen histológica a mayor aumento de las areas de inflamación producida por la presencia de EPT incorporada en nitrocelulosa, 3 días despues de la inyección intratraqueal. Existen abundantes macrófagos, algunos de aspecto epitelióide así como linfocitos y escasos neutrófilos.

11. CUANTIFICACION CELULAR Y PORCENTAJES DE CELULAS INFLAMATORIAS OBTENIDAS POR LAVADO BRONQUIAL EN LAS LESIONES PULMONARES PRODUCIDAS POR ANTIGENOS MICOBACTERIANOS INCORPORADOS EN NITROCELULOSA.

A semejanza de lo observado con EPT acoplado a sefarosa también este complejo antigénico incorporado en fragmentos de nitrocelulosa produjo acentuada inflamación pulmonar. En el primer día los leucocitos polimorfonucleares fueron el tipo celular mas abundante con promedio de 7.5×10^5 , seguidos de los macrófagos con 5.1×10^5 ; los linfocitos que en el primer día son en promedio $.9 \times 10^5$ células, incrementan su número notablemente en el día 3 hasta 1.4×10^6 constituyendose en el tipo celular mas abundante, su número decrementa a 1.3×10^6 en el día 7 y 1×10^6 en el día 14 sin embargo también en estos intervalos de tiempo es el tipo celular predominante. Los macrófagos también aumentan su cantidad importantemente, alcanzan su número máximo en el día 7 con 8.6×10^5 , en el día 21 su cantidad es igual al de los linfocitos (7×10^5) y en el día 28 son el tipo celular mas abundante con promedio de 7.2×10^5 (Fig 21).

En los animales que representan el control negativo en este modelo experimental, que corresponden a ratones sensibilizados a los que se les inyectó intratraquealmente nitrocelulosa sin antígeno, muestran también abundantes células inflamatorias obtenidas por lavado bronquial. Los macrófagos son el tipo celular mas abundante durante todo el periodo de observación experimental, sobre todo en el día 3 con 1.4×10^6 células, solo en el primer día los leucocitos polimorfonucleares son el tipo

celular mas numeroso. Los linfocitos incrementan su número de 1×10^4 a 2.5×10^4 en el dia 3 y en esta cantidad se mantienen con pocas fluctuaciones durante todo el experimento(Fig 21).

Con el antígeno de 31-32 kD, los leucocitos polimorfonucleares son el tipo celular predominante en el primer dia, los linfocitos son las celulas mas abundantes en el dia 3 con 1.1×10^6 células, en el dia 7 se observaron cantidades iguales de linfocitos y macrófagos(6.4×10^5) y en los 3 ultimos intervalos de tiempo los macrófagos fueron el tipo celular mas abundante(Fig 21). Una cinética similar se observó con el antígeno de 38 kD, pero con predominio de linfocitos tanto en el dia 3 (1.4×10^6) como en el 7 (1.2×10^6), posteriormente cantidades equivalentes de linfocitos y macrófagos fueron observadas(Fig 21).

La proteina micobacteriana de choque termico de 70 kD mostro predominio numerico de los linfocitos sobre los macrófagos, sobre todo en el momento de máxima respuesta inflamatoria que corresponde a los dias 3 (1.1×10^6) y 7 (6.7×10^6); solo en los dias 1 y 28 los macrófagos fueron mas abundantes que los linfocitos(Fig 21). Con la proteina de 65 kD se observó, a diferencia de los otros antígenos, una cantidad casi igual de linfocitos (8.4×10^5) y macrófagos (7.2×10^5) con predominio de los ultimos en el dia 7 y mas del doble de linfocitos en relación a macrófagos en el dia 28 (Fig 21).

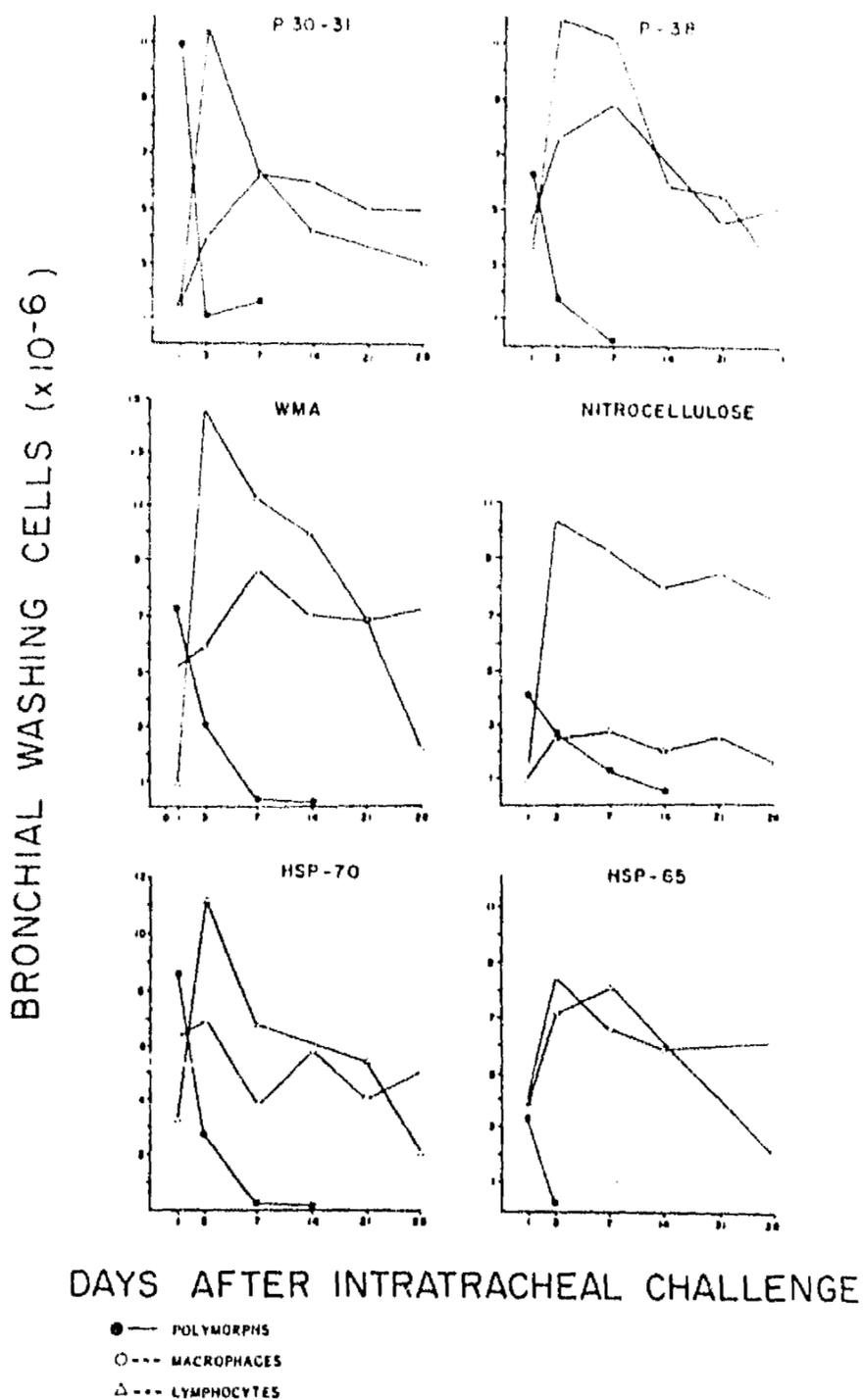


Fig 21. Cinética de células inflamatorias obtenidas por lavado bronquial de ratones sensibilizados con inflamación pulmonar producida por EPT, antígenos micobacterianos puros y nitrocelulosa sin antígeno. En general las proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* indujeron inflamación pulmonar con predominio de linfocitos, en comparación la nitrocelulosa sin antígeno provocó inflamación pulmonar constituida fundamentalmente por macrófagos.

12. INMUNOTIPIFICACION DE LAS CELULAS LINFOIDES EN LA INFLAMACION INDUCIDA POR EPT Y ANTIGENOS MICOBACTERIANOS PUROS.

El EPT incorporado en partículas de nitrocelulosa produjo extensa respuesta inflamatoria, las células linfoides obtenidas por lavado bronquial mostraron al igual que en el modelo de sefarosa-EPT, predominio de células T supresoras/citolíticas incluso desde el primer día posterior a la inyección intratraqueal del antígeno (50% contra 45% de las células T cooperadoras). También en el momento de máxima respuesta inflamatoria que corresponde a los días 3 y 7 se observó predominio de los linfocitos Lyt2 con 55% contra 25% de las células cooperadoras y 58% con 42% de linfocitos cooperadores respectivamente (Fig 22). La diferencia en comparación con el modelo de sefarosa, fue que en éste el porcentaje mayor de células Lyt-2 fue en el día 7, mientras que en el modelo de nitrocelulosa fue en el día 3.

Las células obtenidas por lavado bronquial de animales sensibilizados con lesión inflamatoria pulmonar producida por la inyección intratraqueal del antígeno de 31-32 kD incorporado a nitrocelulosa mostraron predominio de células T cooperadoras, el cual fue escaso en los días 1 y 3 y mas acentuado en los días 14, 21 y 28 (Fig 22).

El antígeno de 38kD mantuvo una proporción equivalente de células T con fenotipo cooperador y supresor/citolítico durante todo el periodo de observación experimental, excepto en el día 3 que corresponde al momento de máxima respuesta inflamatoria con predominio mayor del fenotipo cooperador, que correspondió al 60% de todas las células con morfología linfoide (Fig 22).

La proteína micobacteriana de choque térmico de 65 kD produjo infiltrado inflamatorio pulmonar cuyo componente linfocítico mostró predominio del fenotipo cooperador en el primer día después de la inyección traqueal del antígeno (67% por 35% del fenotipo supresor/citolítico). Posteriormente en todos los siguientes días de observación experimental y sobre todo en los días 3, 7 y 14 el predominio fue del fenotipo supresor/citolítico con 55%, 65% y 55% respectivamente (Fig 22). De forma muy semejante fue la respuesta linfocitaria en cuanto a porcentajes de fenotipos de células T, producido por la proteína micobacteriana de choque térmico de 70kD ya que también mostró solamente en el primer día predominio de las células cooperadoras (55%) y en todos los demás periodos de observación existió predominio del fenotipo supresor/citolítico, sobre todo en el día 7 (58%) (Fig 22). La proteína de 65kD indujo mayor porcentaje de células Lyt-2 en comparación con la proteína de 70 kD, con excepción del día 3 en el que la proporción producida de este fenotipo fue la misma (55%) y en el día uno en el que la proteína de 70 tuvo 50% del fenotipo supresor/citolítico y la de 65 kD fue de 35% (Figs 22).

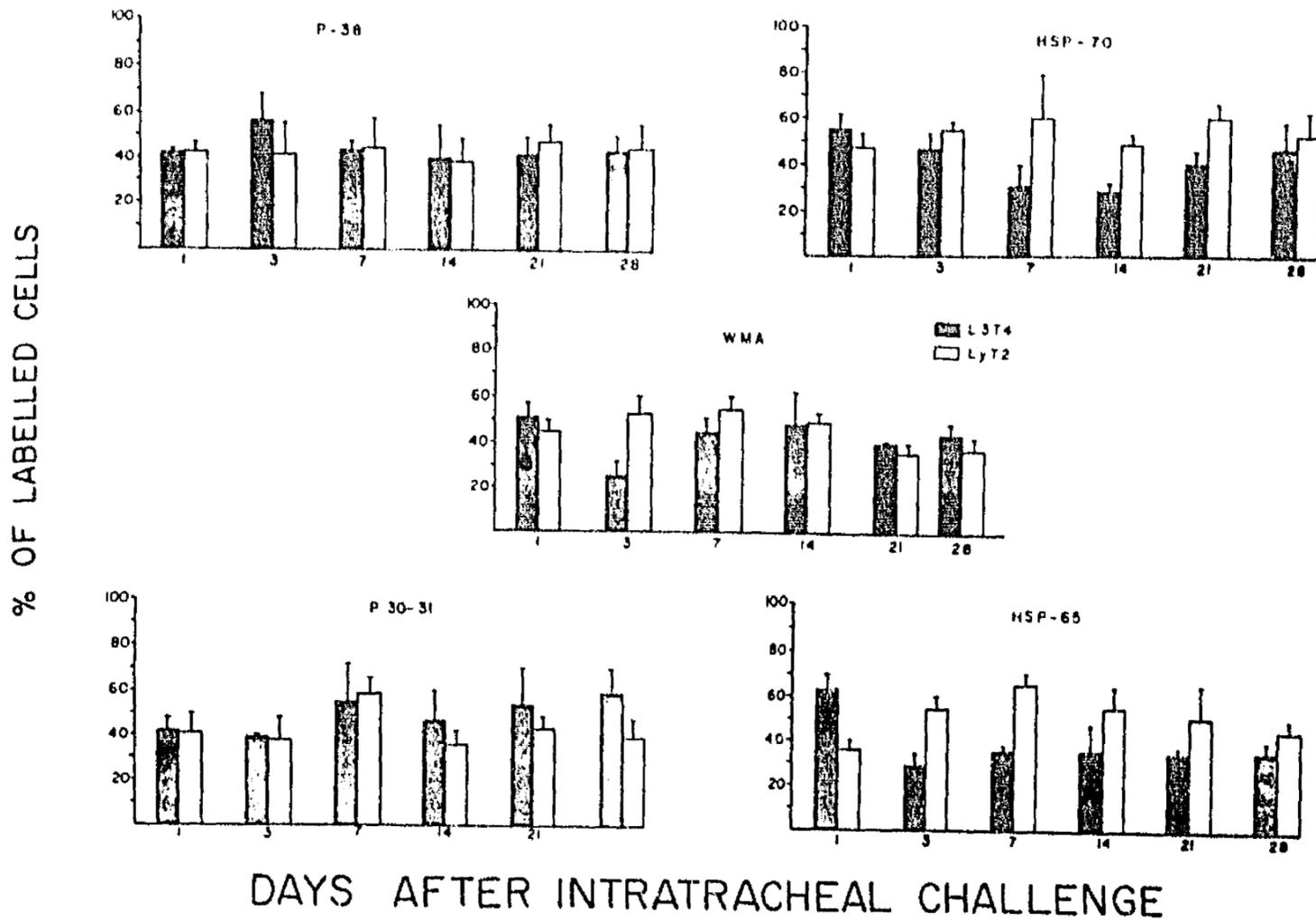


Fig 22. Gráficas comparativas que muestran las subpoblaciones de linfocitos T en lavados bronquiales obtenidos de ratones sensibilizados a los que se les inyectó EPT incorporado en fragmentos de nitrocelulosa (panel central), los antígenos micobacterianos puros de 38 y 30-31kD (panel de la izquierda) y las proteínas de choque térmico micobacterianas de 65 y 70 kD (panel de la derecha). Tanto el EPT como ambas proteínas de choque térmico producen reclutamiento selectivo de células T con fenotipo supresor-citolítico.

13. CUANTIFICACION POR ELISA DEL TITULO DE ANTICUERPOS SERICOS EN CONTRA DE EPT EN ANIMALES CON LESION PULMONAR PRODUCIDA POR ANTIGENOS DE M TUBERCULOSIS INCORPORADOS EN NITROCELULOSA.

Los animales sensibilizados con inyección intratraqueal de sefarosa, sin antígenos mantienen un título de anticuerpos de clase IgG anti EPT constante, de 1400 UDO durante todo el periodo de observación experimental(Fig 23). En comparación, ratones igualmente sensibilizados a los que se les inyectó EPT incorporado en fragmentos de nitrocelulosa, mostraron disminución del título de anticuerpos sericos anti EPT en el dia 3 y sobre todo 7 dias despues del reto traqueal, intervalo en el que se observó una disminución del 40% en comparación al grupo control(Fig 23), posteriormente el título se igualo al de los animales control. En el modelo de sefarosa la disminución en el título de anticuerpos se observó desde el primer dia postinoculación y se acentuó en el dia 3, en consecuencia en ambos modelos se observa el mismo efecto pero en momentos diferentes y siempre en concordancia con el predominio de linfocitos Lyt-2 en la inflamación pulmonar.

La inoculación traqueal de los diferentes antígenos micobacterianos puros, no produjo disminución del título de anticuerpos séricos anti EPT, tan solo con la proteina de 30-31kD se observó un ligero descenso en el dia 3 que rapidamente se recupero(Fig 23), mientras que las proteinas de 38 y 70 kD se mantuvieron con títulos muy parecidos al control(Fig 23) y con la proteina de stress de 65 kD se observó un ligero aumento(Fig 23).

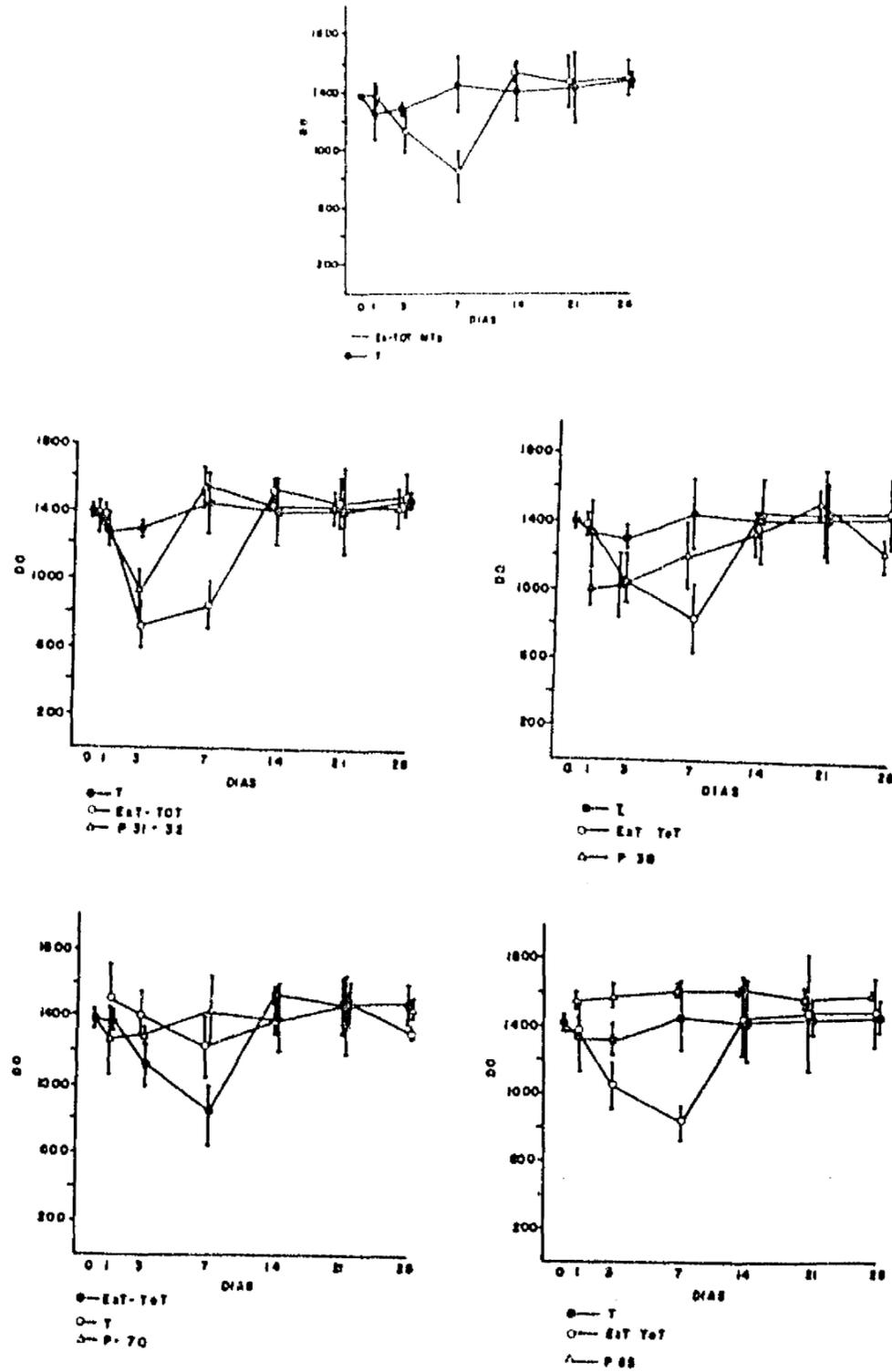


Fig 23. Gráficas comparativas del título de anticuerpos séricos de clase IgG anti-EPT, en animales sensibilizados con inyección intratraqueal de EPT y diversos antígenos puros micobacterianos. Solo la administración intratraqueal de EPT produjo disminución del título de anticuerpos séricos, los antígenos puros de *M. tuberculosis* inyectados intratraquealmente no modificaron el título de anticuerpos en suero.

14. DETERMINACION DE HRC EN CONTRA DE EPT EN RATONES CON LESION PULMONAR INDUCIDA POR EPT Y ANTIGENOS PUROS MICOBACTERIANOS.

Animales sensibilizados por via subcutanea y peritoneal pero sin lesión pulmonar, mostraron un nivel constante de respuesta inflamatoria en pruebas de hipersensibilidad retardada que fue de 280 U durante todo el tiempo de observación experimental (Fig 24). Los animales sensibilizados de la misma forma pero con inyeccion intratraqueal de EPT incorporado en fragmentos de nitrocelulosa, mostraron acentuada disminucion de la respuesta de hipersensibilidad retardada en todos los intervalos de tiempo estudiados, esta fue mas acentuada en el dia 1, 3 y 7 con 48, 100 y 97 U de inflamación respectivamente; en los dias 14, 21 y 28 la inflamación producida aumento, pero siempre estuvo por debajo de la observada en los animales sin lesión pulmonar, una vez mas en relación directa al grado de inflamación y el predominio de células Lyt-2 (Fig 23 y 24), este experimento fue considerado como el control positivo y reproduce lo observado en el modelo de granulomas inducidos por sefarosa.

El control negativo fue representado por la administración de nitrocelulosa sin antígeno en animales igualmente sensibilizados, es interesante que la nitrocelulosa sola también es capaz de disminuir la respuesta de hipersensibilidad retardada pero en mucha menor magnitud que el EPT y en comparación con los animales sin lesión pulmonar (Fig 24).

La proteina micobacteriana de choque térmico de 65 kD indujo importante disminucion de la respuesta de hipersensibilidad retardada cutanea, incluso en el dia 3 se observo menos

inflamación que la medida en animales con lesión pulmonar producida por el EPT, en los otros intervalos de tiempo la capacidad de supresión de EPT fue mayor que la observada en los animales con lesiones pulmonares inducidas por el antígeno de 65 kD (Fig 24). El mismo tipo de efecto supresor de la hipersensibilidad retardada cutánea fue observado con la proteína de choque térmico de 70kD, también con un efecto mayor en el día 3 que prácticamente igualo a lo observado con el EPT y con recuperación parcial en el día 7, pero a diferencia de la proteína de 65 kD el efecto supresor mostrado por el antígeno de 70 se mantuvo siempre por debajo del de la hipersensibilidad mostrada en los animales sensibilizados pero sin lesión pulmonar y de forma muy parecida a lo observado con el EPT(Fig 24).

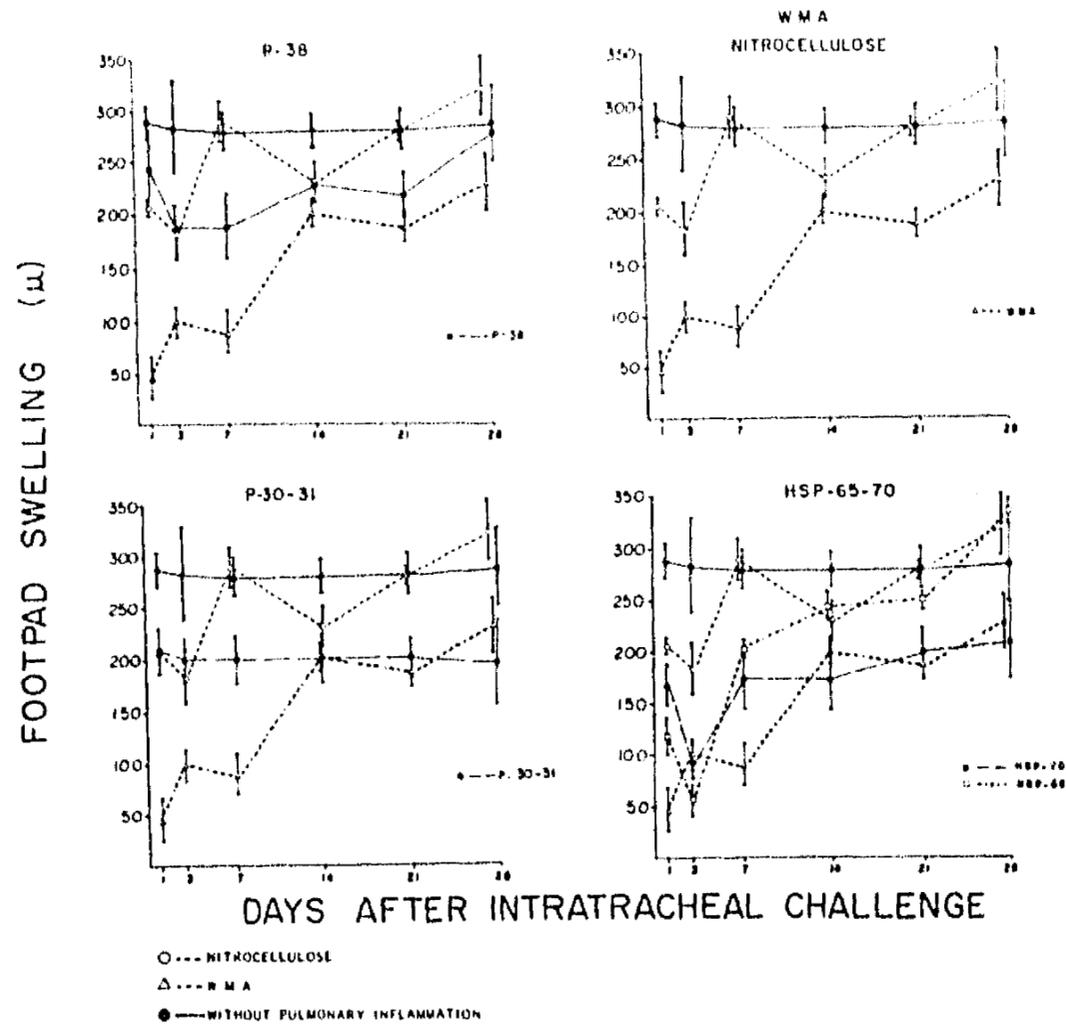


Fig 24. Prueba de hipersensibilidad retardada cutanea en animales sensibilizados con inflamación pulmonar producida por los antígenos micobacterianos puros de 38 y 30-31kD(panel de la derecha) y por EPT y las proteínas micobacterianas de choque térmico de 65 y 70kD(panel de la izquierda). Tanto EPT como las proteínas de stress térmico inducen acentuada disminución de la inmunidad celular sobre todo en los días 1, 3 ,7 y 14; en paralelo a el predominio de células T supresoras presentes en el pulmon.

15. DETERMINACION DE HRC EN CONTRA DE EPT EN RATONES CON INFLAMACION PULMONAR INDUCIDA POR ANTIGENOS MICOBACTERIANOS INCORPORADOS EN NITROCELULOSA Y TRATADOS CON CE E ID.

La supresión de la respuesta inflamatoria cutanea local inducida por la inyección subcutanea del EPT en animales con inflamación pulmonar producida por la misma mezcla antigénica incorporada en fragmentos de nitrocelulosa, fue totalmente revertida por la administración de ciclofosfamida en dosis adecuadas para destruir células T supresoras e indometacina. Al igual que en lo observado con el modelo de sefarosa la indometacina revirtió mejor el efecto de supresión (Fig 25). Estos resultados son muy similares al modelo previo tambien en lo referente a lo que consideramos como nuestro control negativo representado por los animales igualmente sensibilizados a los que se les inyectó fragmentos de nitrocelulosa sin antígenos y se les modulo farmacologicamente, ya que estos mostraron una respuesta inflamatoria cutanea muy pronunciada, asi por ejemplo con ambas drogas en el dia 7 en este grupo de animales se duplicó la intensidad de la inflamación cutanea a la observado en los animales con inflamación originada por EPT (Fig 25).

Debido a que solamente en los animales que recibieron proteínas de choque térmico de 65 y 70 kD se observo reclutamiento preferencial de células T lyt 2 y disminución de hipersensibilidad retardada en paralelo, solamente en estos casos se manipuló farmacologicamente. La supresión de la inmunidad celular estudiada a travez de pruebas de intradermoreaccion cutanea fue totalmente revertida por la administración de

ciclofosfamida e indometacina, pero a diferencia de lo observado en los animales con inflamación pulmonar inducida por EPT, la ciclofosfamida fue mas eficiente que la indometacina. (Fig 25).

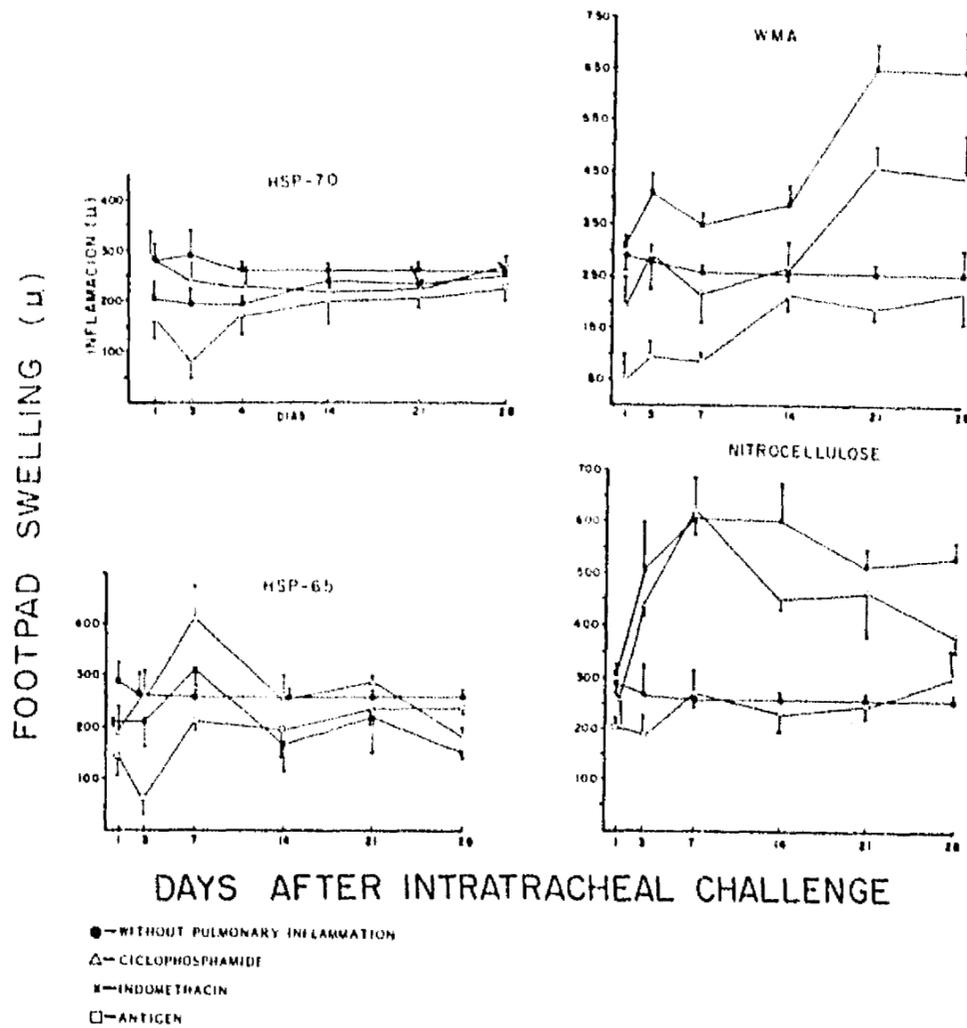


Fig 25. Pruebas de hipersensibilidad retardada cutanea en ratones sensibilizados con inflamación pulmonar inducida por las proteínas de stress térmico de 65 y 70 kD (panel de la derecha) y por EPT y nitrocelulosa sin antígeno (panel de la izquierda), tratados con ciclofosfamida e indometacina. Ambos farmacos revierten la supresión de la inmunidad celular en ratones con inflamación producida por EPT, siendo mas efectiva la indometacina; en comparación la ciclofosfamida fue mas eficiente en el caso de la supresión producida por las proteínas de stress, sugiriendo que en éstas, el efecto de anergia es fundamentalmente mediado por células T supresoras. En animales con inflamación pulmonar producida por nitrocelulosa sin antígeno, la respuesta de hipersensibilidad se incremento enormemente, sugiriendo que en los ratones sensibilizados existen células T supresoras que al ser destruidas por las dosis bajas de ciclofosfamida permiten que la inflamación sea muy intensa, y que aparentemente hay supresión tonal mediada por prostaglandinas, que al ser bloqueadas en su síntesis permiten se desarrolle acentuada inflamación.

DISCUSION.

Se considera a la inflamación granulomatosa como una colección compacta y altamente organizada de células mononucleares maduras cuya función fundamental es la de secuestrar y degradar ciertos agentes microbianos o partículas de otra naturaleza. No existe duda de que la tuberculosis es el prototipo de la inflamación granulomatosa, sin embargo el componente químico de el bacilo tuberculoso responsable de originar este tipo de respuesta inflamatoria ha sido objeto de multiples publicaciones con resultados conflictivos(141).

Se sabe por ejemplo que algunas preparaciones bacilares que contienen cera D y factor cuerda, las cuales ademas contienen antígenos micobacterianos asociados con peptido-glicolipidos de la pared celular son granulomatogénicos, pero caracteristicamente estos son incapaces de evocar respuestas de inmunidad celular que son la base de la inmunidad protectora y de la respuesta inmune en tuberculosis; por lo tanto este tipo de granulomas bien podrian ser considerados como de cuerpo extraño o de naturaleza no inmune. Sin embargo los componentes bacterianos de naturaleza esencialmente lipídica y polisacárida amplifican la respuesta inflamatoria, en consecuencia pueden actuar como adyuvantes y en este sentido pueden también incrementar la respuesta inmunológica y granulomatosa mediada por células específica para antígenos proteicos del bacilo(142).

Inicialmente los estudios experimentales descritos en la presente tesis fueron encaminados a determinar la capacidad de los antígenos de naturaleza proteica de M tuberculosis de inducir

inflamación granulomatosa. Nuestros resultados muestran que las proteínas obtenidas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, acopladas covalentemente a esferas de nitrocelulosa y depositadas en el pulmón por inyección traqueal en ratones BALB/C sensibilizados, son capaces de inducir un proceso inflamatorio bien organizado y circunscrito, histológicamente muy parecido a granulomas tuberculosos, ya que estuvieron constituidos esencialmente por linfocitos y macrófagos, aunque sin células gigantes y necrosis caseosa y a diferencia de los producidos por componentes de naturaleza lipopolisacárida de la pared bacteriana, los producidos por proteínas están constituidos esencialmente por linfocitos T, sin células B como lo demuestran nuestros resultados inmunohistoquímicos.

Bajo las mismas condiciones de administración, dosis de proteína y tipo de animales, EPT fue más granulomatogénico que BSA-m. Es posible que los antígenos anclados a la esfera de sefarosa actúen como si fueran células presentadoras de antígeno en la inducción de una respuesta inmunológica eficiente, esta idea es reforzada por la poca cantidad de macrófagos presentes en la lesión en este momento y su localización esencialmente en la periferia de la lesión; además de la escasa cantidad de lípidos y polisacáridos presentes en nuestro EPT, los cuales como se comentó son componentes con capacidad adyuvante y también son capaces de activar inespecíficamente a los macrófagos (143).

La formación del granuloma es la expresión de una serie de eventos inflamatorios complejos, en los cuales las citoquinas que produce el linfocito T pueden tener un papel fundamental

tanto en la iniciación como en el mantenimiento de los granulomas inmunes, es decir los relacionados con la generación de hipersensibilidad retardada(144). En relación con este hecho esta también el predominio de células T cooperadoras en el primer día post inyección intratraqueal, que representa el inicio de la formación de los granulomas. Posteriormente, cuando el proceso inflamatorio alcanza su máxima magnitud (días 3 y 7) así como en los días subsecuentes, el fenotipo predominante de células T fue el supresor/citolítico tanto en los cortes histológicos como en las células obtenidas de lavado bronquial en el caso de los granulomas producidos por EPT. En comparación los granulomas pulmonares producidos por BSA-m están constituidos por una proporción más o menos equivalente de células T con predominio de los linfocitos cooperadores. En concordancia con el concepto de que la respuesta inflamatoria granulomatosa parece ser iniciada por células T cooperadoras y las linfoquinas que éstas producen(145) y parcialmente dependiente de la naturaleza química del agente inductor. Ambos fenotipos de linfocitos T, cooperador y supresor/citolítico son generados durante la tuberculosis experimental(146) y su eliminación produce un significativo incremento del número de bacterias. Con la eliminación de las células T cooperadoras se produce un efecto más acentuado. Los linfocitos T supresores/citolíticos son particularmente eficientes en la protección en contra de la tuberculosis adquirida por vía respiratoria(147). Estas células han sido clonadas del bazo y ganglios linfáticos en ratones a los que se les inocularon micobacterias por vía intravenosa, y después de

reestimularlas in vitro, mostraron gran capacidad de lisar macrófagos infectados con micobacterias. Aparentemente, este es un mecanismo importante de protección, debido a que es posible que la lisis de macrófagos infectados incapaces por ellos mismos de destruir al bacilo, al ser sometidos a lisis por los linfocitos liberan a las bacterias y permiten que estas sean fagocitadas y destruidas por macrófagos activados que tienen mayor capacidad microbicida(52). Por lo tanto una eficiente protección inmunologica en contra de M. tuberculosis, debe de estar sustentada en la adecuada colaboración entre los linfocitos T cooperadores que son capaces de activar macrófagos y células T citolíticas que destruyen macrófagos infectados.

En varios modelos experimentales y en pacientes humanos que sufren de enfermedades granulomatosas como tuberculosis o lepra, hay frecuentemente diversas manifestaciones de supresión o anergia de las respuestas de inmunidad celular, como la hipersensibilidad retardada, disminución en la producción de interluquinas, abatimiento de la proliferación de linfocitos in vitro, aparición de células supresoras y factores de supresión circulantes(148, 149). Se han descrito varios tipos de células supresoras, que se sabe son inducidas por la infección micobacteriana. Células T supresoras antígeno específicas son las responsables de inhibir la inducción de la respuesta inmunológica en contra del bacilo y consecuentemente facilitan la proliferación bacteriana in vivo. Células T supresoras inespecíficas y macrófagos con capacidad supresora inhiben la proliferación de células T en general, factores de supresión han

sido parcialmente caracterizados y fueron identificados como los responsables de inducir inmunosupresión(120).

Ciertos componentes del bacilo tuberculoso tales como lipoarabino-manan activan mecanismos supresores in vitro(150). la inyección intraperitoneal de paredes celulares de BCG disueltas en aceite inducen células T supresoras que inhiben la reacción de injerto contra huesped. El muramil dipeptido, componente esencial de las paredes de BCG que tienen actividad adyuvante pero no de inmunogenicidad, es capaz de inducir supresión de hipersensibilidad retardada(151).

La dosis y ruta de administración experimental de micobacterias es muy importante, la inyección intravenosa y la intraperitoneal son capaces de inducir células supresoras, mientras que la via subcutanea, intramuscular o intradermica son adecuadas para inmunización pero no lo son para generar células supresoras. Nuestros resultados muestran que la via respiratoria, que es la puerta de entrada mas frecuente para adquirir tuberculosis, es eficiente para inducir linfocitos T con fenotipo supresor/citolitico.

Aunque existen pocos estudios inmunohistoquimicos acerca del fenotipo de células linfoides presentes en las lesiones de la tuberculosis humana, los resultados de la presenta tesis concuerdan con la observación clínica en pacientes con tuberculosis pulmonar miliar, en quienes los linfocitos CD-8 supresores/citoliticos son mas abundantes que los CD-4 cooperadores en lavados bronquiales y sangre periferica. En comparación los pacientes con tuberculosis pulmonar localizada

tienen una proporción de células CD4/CD8 normal en sangre periférica, con predominio de CD-4 en células obtenidas de lavado bronquial(152). Por lo tanto parecen existir diferencias proporcionales en los fenotipos de las células linfoides que están presentes en los sitios de la infección en relación con el estadio de la enfermedad; en este sentido los modelos presentados en la presente tesis, pudieran ser considerados de acuerdo a los fenotipos de linfocitos presentes en la inflamación, semejantes a la tuberculosis miliar.

Con el objetivo de estudiar las consecuencias en las respuestas de inmunidad humoral y celular de estos modelos experimentales, se determinó el título de anticuerpos y la hipersensibilidad retardada cutánea en contra de EPT y BSA-m. Solo en los animales con inflamación pulmonar producida por EPT, en la cual como ya se comentó predominaron linfocitos Lyt-2, mostraron una acentuada disminución tanto del título de anticuerpos séricos como de la hipersensibilidad tardía cutánea, sugiriendo que las células T con fenotipo supresor/citolítico participan en este efecto puesto que se observó concordancia entre la intensidad de la inflamación pulmonar, la cantidad de células Lyt-2 y la disminución en el título de anticuerpos y de la HRC. En efecto en los días 3 y 7, cuando la inflamación llegó a su máxima intensidad y los linfocitos T lyt-2 fueron más numerosos, fue cuando se observó la máxima disminución de anticuerpos séricos y HR en contra de EPT. Un hallazgo de interés en la respuesta granulomatosa a esferas de Sefarosa cubiertas con antígenos, fue su rápida resolución, lo cual contrasta con la observación de que las mismas esferas

inoculadas subcutáneamente producen granulomas que persisten por varias semanas, sugiriendo que la respuesta inmunológica pulmonar a los antígenos inoculados esta suprimida.

En comparación, los animales con lesiones pulmonares inducidas por BSA-m mostraron acenso en el título de anticuerpos séricos anti-BSAm y al igual que los ratones con granulomas producidos por EPT disminución acentuada de HRC. Dado que en las lesiones producidas por BSAm hay una gran cantidad de macrófagos, se penso que estos tambien podrian participar en el efecto supresivo de la HRC.

Con el fin de investigar la participacion de linfocitos T supresores y de los macrófagos, se manipulo farmacologicamente el modelo, administrando ciclofosfamida en bajas dosis para eliminar la población de linfocitos supresores e indometacina para bloquear la síntesis de prostaglandinas, importantes agentes inmunosupresores de origen fundamentalmente macrofágico.

Existen multiples estudios que han establecido a la ciclofosfamida administrada en bajas dosis como un método adecuado para eliminar a las células T supresoras(139). Con esta estrategia farmacológica, en los animales con granulomas inducidos por EPT acoplado a sefarosa se observó un acentuada disminución en el número de linfocitos obtenidos por lavado bronquial y en el area de superficie de los granulomas, indicando la participación predominante de células Lyt 2 en su formación y sugiriendo que el tratamiento con ciclofosfamida es eficiente y que ciertamente la mayoría de los linfocitos obtenidos por lavado bronquial son de tipo supresor.

Interesantemente tambien la constitución celular se modifico, ya que se observaron numerosas células gigantes y macrófagos. Además se observo restitución total y una mayor respuesta que la observada en los animales control de el título de anticuerpos y de la HTC. En comparación en los animales con granulomas inducidos por BSAm y tratados con CY, no se observo efecto en la restitución de la HRC, sugiriendo que en el caso de los granulomas inducidos por EPT hay una importante participación de linfocitos T supresores en la anergia observada, mientras que en en los granulomas por BSAm la supresión de la HRC no esta mediada por linfocitos supresores.

Esta tambien bien demostrado que las prostaglandinas son mediadores químicos muy importantes en la inflamación granulomatosa, y que los macrófagos son la principal fuente de dichos agentes farmacológicos. En efecto, sobre todo la prostaglandina E, se ha observado que tiene un efecto supresor sobre la producción de linfoquinas(153), disminuyen la síntesis de anticuerpos(153), produce supresión directa de la actividad funcional linfocitaria(154), inhibe la expresión de proteínas de clase II del CMH(155) y estimula la actividad de los linfocitos T supresores(156). Por todas estas funciones fue de interes estudiar el efecto de un bloqueador de su síntesis, la indometacina, en estos modelos experimentales.

El tratamiento con indometacina produjo disminución de el area de superficie de los granulomas inducidos por EPT, pero a diferencia de la ciclofosfamida, sin modificar el número de linfocitos obtenidos por lavado bronquial, además restauro por completo el

título de anticuerpos y la HRC incluso de forma mas eficiente que la ciclofosfamida. En los animales con granulomas inducidos por BSAm tambien restauro totalmente la supresión de la HRC. Estos resultados nos permiten proponer que la inflamación granulomatosa no siempre es un proceso encaminado a la protección, en ocasiones el granuloma puede ser fuente de una gran cantidad de moléculas con capacidades inmunosupresoras como las prostaglandinas, cuya producción en el caso particular del pulmón, la secreción puede ser mayor, puesto que los macrófagos alveolares son fuente natural y constante de estos agentes farmacológicos, de manera que en el caso de los granulomas por BSAm es este probablemente, el mecanismo de supresión fundamental de la HRC, mientras que en la tuberculosis ademas de estos eventos, diversos componentes del bacilo son potencialmente capaces de reclutar selectivamente células supresoras, con lo cual se potencia el efecto de supresión inmunológica. Esto en conjunto podria facilitar la proliferación y diseminación del agente infeccioso.

En modelos experimentales en los que se ha usado BCG como agente infeccioso, se ha observado disminución de la producción de anticuerpos en contra de antigenos T dependientes e independientes. Nuestros resultados muestran que, en los ratones con granulomas inducidos por EPT, se presenta una rápida y pronunciada disminución del título de anticuerpos séricos en contra de EPT, dado que la vida media de las inmunoglobulinas es de 2 a 3 semanas, la explicación mas razonable e inmediata es que los antígenos anclados en las esferas de sefarosa actuen como

"esponjas" moleculares adsorbiendo anticuerpos. Sin embargo esta posibilidad fue descartada, primero porque no se observó disminución de anticuerpos séricos en el caso de los animales con granulomas por BSAm y además porque al incubar sueros de ratones con títulos altos de anticuerpos contra EPT con sefarosa acoplada a EPT, después de dos horas de incubación en agitación se centrifugó y se midió en el suero sobrenadante el título de anticuerpos anti EPT, la disminución del título de anticuerpos fue muy pequeña descartándose el efecto de "esponja." . Otras explicaciones posibles es el desprendimiento de antígenos y la formación de complejos inmunes, los cuales, se ha demostrado tienen actividad inmunosupresora(157) y la presencia de anticuerpos anti-idiotipo que han sido bien caracterizados en modelos experimentales de infección micobacteriana(158). Los anticuerpos anti-idiotipo inducen la actividad de las células T supresoras efectoras cuando son inyectados intravenosamente, mientras que los anticuerpos idiotipo inducen células supresoras aferentes(158), la rápida caída de anticuerpos puede ser entonces explicada por un efecto de adsorción pero de las membranas de las células T supresoras y por lo tanto los anticuerpos anti-idiotipo pueden ser uno más de los factores de supresión presentes en las infecciones micobacterianas. Aunque no estamos totalmente seguros de que no existan contaminantes con una demostrada actividad inmunosupresiva como D-arabino galactan en nuestro EPT, los resultados obtenidos en el modelo experimental de antígenos acoplados a sefarosa muestran que componentes químicos del EPT son capaces de reclutar

No Existe

Página

preferencialmente linfocitos T supresores/citoliticos. La siguiente pregunta que nos planteamos fue cual o cuales de las muchas proteínas que constituyen a nuestro EPT es o son responsables de dicho reclutamiento de células T supresoras. Para responder a esta pregunta diseñó otro modelo experimental, fundamentalmente porque resultaba prácticamente imposible purificar una suficiente cantidad de proteína para acoplarla a la sefarosa.

El modelo experimental en el cual se analizó la capacidad granulomatogénica de antígenos puros incorporados en nitrocelulosa, ha sido utilizado extensamente in vitro de manera que nosotros lo trasladamos a estudios in vivo. Nuestros resultados muestran que cuando se utiliza el EPT la respuesta inflamatoria en cuanto al tipo celular predominante y el efecto de disminución en el título de anticuerpos séricos y de la HRC fue casi idéntico al del modelo de antígenos acoplados a sefarosa, pero a diferencia del modelo de sefarosa. los animales control que recibieron fragmentos de nitrocelulosa sin antígenos presentaron una pronunciada respuesta inflamatoria con disminución aunque de mucho menor grado de la HRC. De cualquier forma el modelo fue útil para mostrar que entre los varios antígenos probados proteicos inmunodominantes de M. tuberculosis, solamente las proteínas de stress de 65 y 70 kD son capaces de reclutar preferencialmente linfocitos T con fenotipo supresor/citolitico en coexistencia con supresión acentuada de la HRC sin afectar el título de anticuerpos circulantes. Mas aun. los experimentos de manipulación farmacológica mostraron que a

diferencia de lo observado con EPT, la ciclofosfamida fue mas eficiente que la indometacina para restituir la supresión de la HRC y que esta última restituyo totalmente el efecto supresivo de la HTC observado en los animales sensibilizados con inflamación pulmonar producido por fragmentos de nitrocelulosa sin antígenos. Es interesante la observación de que animales igualmente sensibilizados pero sin inflamación pulmonar que son tratados con ciclofosfamida e indometacina bajo el mismo esquema, muestran una gran respuesta inflamatoria en las pruebas de HRC, mucho mayor que en los animales que recibieron por via intratraqueal antígenos micobacterianos. Esto podria significar que el proceso de sensibilización, generó células supresoras posiblemente residentes en diversos organos linfoides como ganglios linfaticos y bazo, que al ser destruidas por la administración de ciclofosfamida, permiten una respuesta inflamatoria muy energica cuando se inyectan subcutaneamente y que probablemente exista una actividad constitucional basal de secreción de prostaglandinas, que mantienen en el pulmón en un ambiente constante de inmunosupresión, el cual puede ser un aspecto funcionalmente de gran importancia para evitar respuestas inflamatorias excesivas en un organo constantemente expuesto a una gran carga antigénica. Diversas facetas de indole inmunológico de las proteínas de stress fueron presentadas en la introducción de la presente tesis. En relación con la tuberculosis, el aspecto inmunopatológico que probablemente mas se ha estudiado, es la actividad de reconocimiento cruzado entre la proteína de stress micobacteriana de 65 kD con la proteína central y de unión de

proteoglicanos sulfatados de la matriz cartilaginosa, en el modelo experimental de artritis reumatoide en ratas conocido como artritis por adyuvante. En este modelo se han clonado linfocitos con fenotipo cooperador que son capaces de reproducir la enfermedad cuando son transferidos a animales no sensibilizados; tambien se han clonado linfocitos que reconocen el mismo epitope antigénico en la proteina de stress de 65 kD pero que suprimen el proceso inflamatorio articular cuando son transferidas en animales con el esquema de sensibilización adecuado para desarrollar artritis por adyuvante(159). De manera que parece que ante la presencia de material antigenico micobacteriano, entre el cual esta presente la proteina de stress de 65 kD, se generan clonas de linfocitos T tanto cooperadores como supresores, probablemente el predominio de uno sobre el otro dependa, entre otras factores, de la constitución genética del animal ya que existe una clara relación del tipo de CMH con el desarrollo y el el subtipo de enfermedad micobacteriana establecida tanto en humanos como en animales de experimentación (160).

Las proteínas de stress son ciertamente elementos muy ubicuos en la naturaleza, que ademas tienen una gran homología estructural entre eucariontes y procariontes; en la flora bacteriana por ejemplo hay constantemente una importante producción de proteínas de stress, lo cual en un momento dado podria inducir al sistema inmunológico a reaccionar en contra de ellas y dado que existen regiones homologas con proteínas propias, la posibilidad de generar respuestas autoinmunes por reactividad cruzada es potencialmente probable. En este sentido seria razonable que se

generaran clones de linfocitos T supresores que funcionaran evitando el desarrollo de este tipo de alteración inmunopatológica y las micobacterias que tienen la capacidad de producir gran cantidad de las mismas, sobre todo ante el stress generado por la actividad de células inmunocompetentes como la actividad fagocítica de los macrófagos, promovieran reclutamiento preferencial de células supresores, con las consecuentes complicaciones de las cuales probablemente la mas importante seria la supresión de la hipersensibilidad retardada, que es la base de la inmunidad protectora en tuberculosis.

Pocas facetas de la inmunología se han visto con tantos problemas de falta de credibilidad como el de la existencia de las células T supresoras(161). Las causas han sido multiples, pero probablemente las mas importantes han sido: multiples células participantes tanto CD-4 como CD-8 y una gran cantidad de factores de supresión específicos e inespecíficos, la enigmática proteína I-J considerada como un elemento medular de la supresión inmunológica para la cual no se ha encontrado el gen que la codifica despues de clonar y secuenciar la totalidad del complejo mayor de histocompatibilidad, la falta de caracterización molecular de los factores de supresión y finalmente lo que ha tenido mas peso en contra de la supresión, que son los estudios moleculares realizados en hibridomas de linfocitos T supresores, los cuales han revelado que la mitad de estos tienen deletados los genes que codifican para las cadenas beta del receptor de antígeno de celulas T y el resto de las células no tienen rearreglo de los genes que codifican para la porcion variable

tanto de las cadenas alfa como beta del mismo receptor y por lo tanto no lo expresan en la membrana celular(162).

Sin embargo las evidencias experimentales de la existencia de células T supresoras inductoras de anergia especialmente en enfermedades infecciosas han sido multiples y bien argumentadas. Este análisis se ha extendido hasta la clonación y estudio directo de las capacidades de síntesis de interleucinas por linfocitos con fenotipo supresor. Estudios recientes realizados en lepra han mostrado que a semejanza de lo descrito para las células T cooperadoras, también las T supresoras pueden ser divididas cuando menos en dos familias. Las CD-8 clase I que esencialmente secretan interferon gamma e interleuquina 2, son las células predominantes en la lepra tuberculoide que cursa con adecuada respuesta de inmunidad celular y granulomas tisulares y las células CD-8 clase II, que predominan en las lesiones y en la sangre de pacientes con lepra lepromatosa, esta clase de células secreta fundamentalmente interleuquinas 4 y 10 y a través de estas induce bloqueo de la inmunidad celular con la consecuente anergia(163, 164, 165). En efecto estudios in vitro han mostrado que cuando clones de linfocitos T cooperadores CD 4 son expuestas a células CD 8 supresoras mas antígenos se vuelven anérgicas y se mantienen incapaces de responder en contra del antígeno hasta por 10 días, aunque son capaces de proliferar ante la presencia de IL 2 (163).

Es por lo tanto de gran interes en inmunología celular definir, en terminos moleculares , los factores y los antígenos que determinan la selección para activar especificamente a linfocitos

T de clase I o II para ambos subtipos de linfocitos CD-4 y CD-8, en este sentido nuestros resultados sugieren que las proteínas micobacterianas de stress de 65 y 70 kD son capaces de seleccionar a la población de linfocitos CD-8, posiblemente de clase II dada la pronunciada anergia de la HRC observada en los animales sensibilizados con inoculación intratraqueal de HSPs, mientras que otros antígenos de la micobacteria inducen la generación específica de otras clonas de linfocitos T con capacidades diferentes de secreción de interleuquinas y por lo tanto con actividades funcionalmente diferentes.

Aunque la reacción de hipersensibilidad retardada cutanea originada por la presencia del derivado proteico purificado de *M. tuberculosis* (PPD), ofrece un metodo simple para estudiar los eventos inmunológicos que siguen a la entrada de componentes micobacterianos en los tejidos, estos se ha comprobado, generan fundamentalmente linfocitos T CD-4 cooperadores de tipo I productores de interferón gamma e IL-2. Consideramos por lo tanto que, modelo experimentales como los utilizados en el presente trabajo, son mas adecuados para estudiar en forma directa las células participantes en el organo mas frecuentemente afectado por la tuberculosis. Otra importante consideración es el hecho de que la mayoría de los modelos murinos de tuberculosis experimental son invariablemente producidos por la administración de un gran número de bacterias inoculadas por vias que generalmente no son las rutas naturales de la infección tuberculosa en el ser humano.

CONCLUSIONES.

Proteínas obtenidas de un filtrado de cultivo de M. tuberculosis unidas covalentemente a Sefarosa e inoculadas intratraquealmente en ratones sensibilizados BALB/C, producen granulomas pulmonares.

Los granulomas inducidos por proteínas de M. tuberculosis que se organizan alrededor de las esferas de Sefarosa están constituidos fundamentalmente por linfocitos T y macrófagos. En el momento de la máxima intensidad de la inflamación granulomatosa, hay predominio de células T supresoras/citolíticas.

El título de anticuerpos y la respuesta de hipersensibilidad retardada, en contra del extracto proteico de M. tuberculosis disminuyen acentuadamente, cuando la inflamación granulomatosa pulmonar inducida por los antígenos proteicos micobacterianos alcanza su máxima intensidad y los linfocitos T supresores/citolíticos son más abundantes. Ambos fenómenos revierten cuando se eliminan las células T supresoras y se suprime la síntesis de prostaglandinas.

Los granulomas pulmonares inducidos por albúmina sérica bovina metilada, están constituidos por una proporción equivalente de linfocitos T cooperadores y supresores/citolíticos, con ligero predominio de los primeros.

El título de anticuerpos séricos en contra de albúmina sérica bovina metilada se incrementa en los animales con granulomas inducidos por el mismo antígeno, sin embargo la respuesta de hipersensibilidad retardada disminuye acentuadamente, este

fenómeno revierte totalmente con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y no se afecta con la eliminación de linfocitos T supresores.

Las proteínas micobacterianas de choque térmico de 65 y 70 kD inoculadas intra-traquealmente en ratones sensibilizados, inducen reclutamiento preferencial de linfocitos T supresores/citolíticos y disminución acentuada de la hipersensibilidad retardada, sin modificación en el título de anticuerpos séricos anti M. tuberculosis.

La disminución de la hipersensibilidad retardada por las proteínas de choque de 65 y 70 kD es revertida por la supresión de la síntesis de prostaglandinas y más eficientemente por la eliminación de linfocitos T supresores

La inflamación granulomatosa pulmonar puede producir inmunosupresión sistémica, debido a la secreción de factores químicos supresores como las prostaglandinas. En el caso de los granulomas tuberculosos, el efecto de inmunosupresión puede ser de mayor magnitud debido, a que además, componentes micobacterianos, como las proteínas de choque de 65 y 70 kD reclutan preferencialmente linfocitos T supresores/citolíticos.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-IVAT/WHO. Study group 1982. Tuberculosis control. Tuberc 53: 157-159, 1982.
- 2.-Nunn PP, Mc Adam KFWJ. Mycobacterial Infection and AIDS. Brit Med Bull 44: 801-813, 1988.
- 3.-Bloom BR, Murray Ch. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 257: 1055-1046.
- 4.-Long ER. A History of Pathology. Dover Publications Inc, New York. 1965.
- 5.-Franciscus S. (Franz De Le Boe). De Phtisis (Opera Medica, 1679).
- 6.-Brown L. Robert Koch. Ann Med Hist 7:292-385, 1935.
- 7.-Major RH. A History of Medicine. CC Thomas Publish. Springfield 1954.
- 8.-Schreiber W. The discovery of the tubercle bacillus, 1882. Medical Corps Int 4: 63-67, 1989.
- 9.-Koch R. De Aetiologie der Tuberkulose. Berliner Klinische Wschr 15: 221, 1882.
- 10.-Mackness GB. The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits. Am Rev Tuberc 69: 495-504, 1954.

- 11.- Bloom B, Bennett B. Mechanisms of a reaction in vitro associated with delayed type-hypersensitivity. Science 153: 80-82, 1966.
- 12.-Scordamaglia A, Bognasco M, Canonica G. Immune response to Mycobacteria. En Mycobacterium tuberculosis interaccions with the immune system, pp 81-98. Plenum Press, NY, 1988.
- 13.-Chase MW. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc Soc Exp Biol Med 59: 134-135, 1945.
- 14.-Edwards D, Kirkpatrick Ch. The immunology of mycobacterial diseases. Am Rev Resp Dis 134: 1062-1071, 1986.
- 15.-Daniel TM, Janick BW. Mycobacterial antigens: Review of their isolation, chemistry and immunological properties. Microbiol Rev 48: 84-113, 1978.
- 16.-Brennan P. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev Infect Dis 2(Suppl 2): 420-430, 1989.
- 17.-Fournie J, Adams E, Mullins R, Basten A; Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenolic glycolipids. Infect and Immun 57: 3653 - 59, 1989.
- 18.-Bloch H. Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituents of virulent organisms. J Exp Med 91: 197-218, 1950.
- 19.-Goren M, Brennan P. Mycobacterial lipids: chemistry and biological activities. En: Tuberculosis, editado por Youmans, pp 63-193. WB Sanders, Phil USA.

- 20.-Myrvick Q, Leake E. Goren M. Mechanisms of toxicity of tubercle bacilli for macrophages. En: Mycobacterium tuberculosis, interactions with the immune system. Plenum Press, N Y. 1988.
- 21.-Goren MB, Hart PD, Young MR, Armstrong. JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulphatides of M. tuberculosis. Proc Natl Acad Sci 73: 2510-2514, 1976.
- 22.- Ramanathan VD, Curtis J, Turk JL. Activation of the alternative pathway of complement by mycobacteria and cord factor. Infect and Immun 29: 30-35, 1980.
- 23.-Artman M, Bekiurkunst A, Goldberg I. Tissue metabolism in infection: biochemical changes in mice treated with cord factor. Arch Biochem Biophys 105: 80-85, 1964.
- 24.-Shankaran R, Venkitasubramanian T. Effect of cord factor on carbohydrate metabolism in mice. Am Rev Respir Dis 101: 401-407, 1970.
- 25.-Kato M, Studies of a biochemical lesions in experimental tuberculosis in mice. XI. Mitochondrial swelling induced by cord factor in vitro. Am Rev Respir Dis 110: 47-53, 1969.
- 26.-Retzinger G. An experimental model of miliary tuberculosis and diffuse intravascular coagulation. En !(USA-Japan Tuberculosis Research Conference. Tokyo Japan pp 295-313, 1984.

- 27.-Azuma I, Sugimura K, Taniyama T, et al: Adjuvant activity of mycobacterial fractions: adjuvant activity of synthetic N-acetylmuramyl-dipeptide and the related compounds. *Infect and Immunity* 14: 18-27, 1976.
- 28.-Emori K, Tanaka A. Granuloma formation by synthetic bacterial cell wall fragment: muramyl dipeptide. *Infect Immun* 19: 613-620, 1978.
- 29.- Nagao S, Tanaka A. Necrotic inflammatory reaction induced by muramyl-dipeptide in guinea pigs sensitized by tubercle bacilli. *J Exp Med* 162: 401-412, 1985.
- 30.-Wuest B, Wash mouth E. Stimulating effect of N-acetyl muramyl dipeptide in vivo. Proliferation of bone marrow progenitor cell in mice. *Infect and Immun* 37: 152-162, 1982.
- 31.-Galelli A, Chedid L. Modulation of myelopoiesis in vivo by synthetic adjuvant active muramyl dipeptides. Induction of CFS and stimulation of stem cell proliferation. *Infect Immun* 42: 1081-1085, 1983.
- 32.-Leclerc C, Bourgeois E, Chedid L. Demonstration of muramyl dipeptide induced T suppressor cells responsible for MDP immunosuppressive activity. *Eur J Immunol* 12: 249-252, 1982.
- 33.-Kishimoto T, Hirai Y, Nakamishi K. Regulation of antibodies response in different immunoglobulin classes. IV selective suppression of IgE response by administration of antigen-conjugated muramyl dipeptide. *J Immunol* 123: 2709-2715, 1979.

- 34.-Edge AS, Faltyneck CR, Hof L, Reichert LB, Weber P. Deglicosilation of glycoproteins by trifluoromethansulphonic acid. *Annal Biochem* 118: 131-7, 1981.
- 35.-Seibert F. Tthe isolation of three different proteins and two polysacharides from tuberculin by alcohol fractionation, their chemical and biological properties. *Am Rev Tuberc* 59: 6-101, 1949.
- 36.-Daniel T. The immunology of tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine* 1: 189-201, 1980.
- 37.-Daniel T, Good R, Janicki B. Immuno-electrophoresis of M. tuberculosis antigens. Comparative analysis of cell extract and culture filtrate antigens. *Am Rev Respir Dis* 112: 639-644, 1975.
- 38.-Affronti. Mycobacterial antigens. Reagents for tuberculin skin testing and serodiagnosis of tuberculosis. *En Mycobacterium tuberculosis: interactions with the immune system*. Plenum Press, pp 1-38, 1988.
- 39.-Britton W, Hellquist L, Bosten A, Ingkins A. Immunoreactivity of a 70 kD purified protein from M. Bovis, BCG, by monoclonal antibodies and affinity chromatography. *J Exp Med* 164: 695-708, 1986.
- 40.-Young DB, Mehlert A. Serology of mycobacterium. Characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. *Rev Infect Dis* 2(Suppl 2): 431-435, 1989.

- 41.-Ivanyi J, Bothamley GH, Jacket PS. Immunodiagnostic assays for tuberculosis and leprosy. Brit Med Bull 44: 635-644, 1982.
- 42.-Lamb J, Lathigra R, Young et al. Identification of mycobacterial antigens recognized by T lymphocytes. Infect Dis 212: 493-497, 1989.
- 43.-Young D, Ivanyi J, Cox J, Lamb J. The 65 kD antigen of mycobacterium-a common bacterial protein. Immunol Today 8: 215-219, 1987.
- 44.-Van Eden W, Hogervorst E, Hensen E, Van der Zee R, Van Embden, Cohen I. A model for human rheumatoid arthritis. Current Topics in Microbiology and Immunology No 145. En Molecular mimicry pp 27-43. Editado por MBA Oldstone, Springer-Verlag 1989.
- 45.-Lindquist S. The heat shock response. Annu Rev Biochem 55: 1151-1191, 1986.
- 46.-Young D, Meholert A. Serology of mycobacteria. Characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. Rev Infect Dis 2(Suppl 2): 431-435, 1989.
- 47.-Andersen A, Hansen E. Structure and mapping of antigen domains of protein antigen b, a 38,000 molecular weight protein of Mycobacterium tuberculosis. Infect and Immun 57: 2481-2488, 1989.

- 48.-Espitia C, Cervera I, Gonzales R, Mancilla R. A 38 kD M tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. Clin Experiment Immunol 77: 373-377, 1989.
- 49.-Abou Zeid C, Ratcliff T, Wiker H, Harboe M, Bennedsen J, Rook G. Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. Infect Immun 56: 3046-3051, 1988.
- 50.-Ashbridge K, Prestidge R, Booth R, Watson J. The mapping of an antibody-binding region on the Mycobacterium tuberculosis 19 Kilodalton antigen. J Immunol 144: 3137-3142, 1990.
- 51.-Dannenberg A M. Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local macrophage associated enzymes. Bacteriol Rev 32: 85-102, 1968.
- 52.-Dannenberg AM. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis 2(Suppl 2): 369-378, 1989.
- 53.-Crowle A. The tubercle bacillus-human macrophage relationship studied in vitro. In Mycobacterium Tuberculosis interactions with the immune system. pp 99-136, Plenum Press NY, 1989.
- 54.-Schurr E, Buschman E, Malo D, Gross P, Skamene E. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse and human homologous. J Infect Dis 161: 634-639, 1990.

- 55.-Collins FM, Campbell SG. Immunity to intracellular bacteria. Vet Immunol Immunopathol 3: 5-66, 1982.
- 56.-Mackness GB. The immunology of antituberculous immunity. Am Rev Respir Dis 97: 337-344, 1968.
- 57.-Fitch FW, T-cell clones and T-cell receptors. Microbiol Rev 50: 50-69, 1986.
- 58.-Scheynius A, Kloneskog L, Forsum U. In situ identification of T lymphocyte subsets and HLA-DR expressing cells in the human skin tuberculous reactions. Clin Experimental Immunol 49: 325-330, 1982.
- 59.-Konttinen YT, Bergroth V, Visa-Tolvanen K, Reitamo S, Forstrom L, Cellular infiltrate in situ and response kinetics of human intradermal and epicutaneous tuberculin reactions. Clin Immunol Immunopathol 28: 441-449, 1983.
- 60.-Kaufmann SH. In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. Rev Infect Dis 2(Suppl 2): 448-454, 1989.
- 61.-Lepay DA, Nathan CF, Steinman RM, Murray HW, Cohn Z. Murine Kupffer cells: mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates. J Exp Med 161: 1079-1096, 1985.
- 62.-Wolfe SA, Tracey DE, Henney CS. BCG induced murine effector cells. II characterization of natural killer cells in peritoneal exudates. J Immunol 119: 1152-1157, 1977.

- 63.-Yoneda T, Kasai M, Ishibashi J, Nishikawa K, Tokunaga T, Mikami R. NK cells activity in pulmonary tuberculosis. Br J Dis Chest 77: 185-188, 1983.
- 64.-Gangadharam P, Edwards C, Murthy P, Pratt P. An acute infection model for M. intracellulare disease using beige mice, preliminary results. Am Rev Respi Dis 127: 648-649, 1983.
- 65.-Murphy S, Florman A. Lung defenses against infection: a clinical correlation. Pediatrics 72: 1-15, 1983.
- 66.-Ofec I, Bekierkunst A. Chemotactic response of leukocytes to cord factor. J Natl Cancer Inst 57: 1379-1381, 1976.
- 67.-Anthony B, Sahn S, Harada R, Repine J. Lung repair and granuloma formation. Tubercle bacilli stimulated neutrophils release chemotactic factors for monocytes. Chest 83(Suppl): 95-96, 1983.
- 68.-Heifets L, Katsayuki I, Goren M. Expression of peroxidase dependent iodination by macrophages ingested neutrophils debris. J Reticuloendothelial Soc 28: 391-404, 1980.
- 69.-Grange JM. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological rate and diagnostic usefulness. Adv Tuberc Res 21: 1-78, 1984.
- 70.-Skvor J, Trnka L, Kugukovova Z. Immunoprofile studies in patients with pulmonary tuberculosis. II.- correlation of levels of different classes of immunoglobulins and specific

- antibodies with the extent of tuberculosis. Scand J Respir Dis 60: 168-171, 1979.
- 71.-Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. Clin Exp Immunol 27: 230-237, 1977.
- 72.-Kaplan MH, Chase MW. Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. II. Response to nine defined mycobacterial antigens with evidence for an antibody common to tuberculosis and lepromatous leprosy. J Infect Dis 142: 835-843, 1980.
- 73.-Sasano K. Further studies on the complement fixation test in tuberculosis. Am Rev Tuberc 9: 136-143, 1924.
- 74.-Campa M, Marelli P, Benedettini G. Role of B lymphocytes and antibodies in the regulation of cell-mediated immune reactions to BCG in mice. pp 263-275. En Mycobacterium tuberculosis, its interaction with the immune system. Plenum Press, NY, 1988.
- 75.-Orme I, Collins F. Passive transfer of tuberculin sensitivity from anergic mice. Infect Immun 46: 850-853, 1984.
- 76.-Rook G, Corswell J, Stanford J. Preliminary evidence for the trapping of antigen specific lymphocytes in the lymphoid tissue of anergic tuberculosis patient. Clin Exp Immunol 26: 129-132, 1976.
- 77.-Rieger M, Trnka L, Skovor J, Mison P. Immunoprofile studies in patients with pulmonary tuberculosis. III. Studies of hoemolytic complement in serum and phagocytic activity of

blood neutrophils. Scand J Respir Dis 60: 172-175, 1979.

78.-May JJ, Katilus J, Henson PM, Dreisin RB. The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis. Am Rev Respir Dis 128: 920-925, 1983.

79.-Burrel R, Cete CC. The effect of lung reactive antibodies on the pathogenesis of tuberculosis. Clin Exp Immunol 9: 809-819, 1971.

80.-Shibman A, Ashtekar M, Ganatra R. Immune complex nephritis complicating miliary tuberculosis. Br Med J 287: 1593-1594, 1983.

81.-Buschman E, Skamene E. Genetic background of the host and expression of natural resistance and acquired immunity to M. tuberculosis. pp 59-67. En: Mycobacterium tuberculosis, its interaction with the immune system. Plenum Press, NY. 1988.

82.-Lurie M, Dannenberg M. Macrophage functions in infection disease with inbred rabbits. Bacterial Rev 29: 466-476, 1930.

83.-Skamene E, Gres P, Forget A, et al. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. Nature 297: 506-510, 1982.

84.-Sminia T, Jeurissen S. Structure and function of bronchus associated lymphoid tissue. Crit Rev Immunol 9: 109-150, 1989.

- 85.-Lauwerinjs J, Baert J. Alveolar clearance and the role of pulmonary lymphatics. *Am Rev Respir Dis* 115: 625, 1977.
- 86.-Plesh B, Van Der Brugge G, Vand Ende M. Development of bronchus associated lymphoid tissue in the rat, with special reference of T and B cells. *Dev Comp Immunol* 7:79, 1983.
- 87.-Bienenstock J, Jhonston N, Perey D. Bronchial lymphoid tissue. I Morphologic characteristics. *Lab Invest* 28: 686, 1973.
- 88.-Racz P, Tenner-Racz K, Myrvick Q, Fainster L. Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell mediated reactions in the rabbit. *J Reticuloendothelial Soc* 22: 59, 1977.
- 89.-Dormans J. The ultrastructure of various cell types in the lower respiratory tract of the rat. *Exp Pathol* 24: 15, 1983.
- 90.-Bienenstock J, Johnston N. A morphologic study of rabbit bronchial lymphoid aggregates and lymphoid epithelium. *Lab Invest* 35: 343, 1976.
- 91.-Van Der Brugge G, Van de Ende M, Sminia T. Changes occurring in the epithelium covering the bronchus associated lymphoid tissue of rats after intra-tracheal challenge with horseradish peroxidase. *Cell Tissue Res* 245: 439, 1986.
- 92.-Mc Clugage S, Low F, Zimmy M. Porosity of the basement membrane overlaying Peyer patches in rats.

- 93.-Simecka J, Davis J, Cassell G. Distribution of Ia antigens and T-lymphocytes subpopulations in rat lung. *Immunology* 57: 93, 1986.
- 94.-Wilders M, Sminia Tt, Janse M. Ontogeny of non-lymphoid and lymphoid cells in the rat gut with special reference to large mononuclear Ia-positive dendritic cells. *Immunology* 50: 503, 1983.
- 95.-Plesh B. Histology and immunohistochemistry of bronchus associated lymphoid tissue in the rat. En: *In vivo immunology*. Plenum Press, NY. pp491, 1982.
- 96.-Van der Brugge G, Dijskstra C, Sminia T. Characterization of pulmonary macrophages and bronchus associated lymphoid tissue macrophages of the rat. An enzyme cytochemical and immunohistochemistry study. *Immunobiology* 169: 553, 1985.
- 97.-Breel M, Van de Ende M, Sminia T, Kraal G. Subpopulation of lymphoid and nono-lymphoid cells in bronchus associated lymphoid tissue of the mouse. *Immunology* 63: 657, 1988.
- 98.-Dijsktra C, Kamperdijk E, Doop E. The ontogenic development of the follicular dendritic cell. An ultrastructural study by means of intravenously injected horseradish peroxidase as marker. *Cell tissue Res* 236: 203, 1984.
- 99.-Harmson A, Muggenburg B, Snipes M, Bice D. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science* 230: 1277, 1985.

- 100.-Courtade E, Tsuda T, Dannenberg A. Capillary density in developing and healing tuberculous lesions produced by BCG in rabbits. A quantitative study. Am J Pathol 78: 243-260, 1975.
- 101.-Robbins S, Cotran, Kumar. Pathologic Bases of disease. Third Edition, 1989. Saunders.
- 102.-Schoenfeld Y, Isenberg D. Mycobacteria and autoimmunity. Immunol Today 9: 178-182, 1988.
- 103.-Dannenberg A, Tomashefsky J. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. En : Fishman A edit. Pulmonary diseases and disorders. 2nd Edition. Mc Graw Hill, NY, pp 1821-1842, 1988.
- 104.-Rook G. Progress in the immunology of the mycobacterioses. Clin Exp Immunol 69: 1-9, 1987.
- 105.-Rook G, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma interferon, vitamin D-3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. Immunology 62: 229-234, 1987.
- 106.-Fujiwara H, Kleinherz M, Wallis R, Ellner J. Increased interleukin I production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. Am Rev Respir Dis 133: 73, 1986.
- 107.-Sultzer B. Polyclonal Lymphocyte activation by M, tuberculosis and its products. pp 277-304, En: Mycobacterium tuberculosis, interactions with the immune system. Plenum Press, NY, 1988.

- 108.-Palmer D, Smith R. Augmentation of PPD and LPS-induced T independent DNA synthesis in normal mouse spleen cells by leukocyte lysates from tuberculous patients. *Cell Immunol* 13: 196-200, 1974.
- 109.-Rocklin R, Mac Dermott R, Chess L, Schlossman S, David J. Studies on mediator production by highly purified T and B lymphocytes. *J Exp Med* 140: 1303-1316, 1974.
- 110.-Primi D, Hammarstrom L, Smith E, Moller G. Characterization of self-reactive B cells by polyclonal B cell activators. *J Exp Med* 145: 21-30, 1977.
- 111.-Izvi S, Kobayakawa T, Lovis J, Lambert P. Mechanism for induction of anti-DNA antibodies by bacterial lipopolisacharides in mice. *J Immunol* 119: 2157-2162, 1977.
- 112.-Modolell M, Luckenbash G, Parant M, Murder P. The adjuvant activity of a mycobacterial water soluble adjuvant(WSA). *J Immunol* 113: 395-403, 1974.
- 113.-Rook G, Steward T. The dissociation of adjuvant properties of mycobacterial compounds from mitogenicity and from the ability to induce the release of mediators from macrophages. *J Immunol* 31: 389-396, 1976.
- 114.-Ellner J. Immunoregulatory function of mononuclear phagocytes in tuberculosis. pp 243-262. En: *Mycobacterium tuberculosis interactions with the immune system*. Plenum Press, NY, 1988.

- 115.-Nash D, Douglas J. Anergy in active tuberculosis: A comparison between positive and negative reactors and an evaluation of 5TU and 250 TU test doses. Chest 77: 32-37, 1980.
- 116.-Lagrange P, Hurtree B. Anergy and other immunologic perturbance in mycobacterial infections. pp 171-205. En: Mycobacterium tuberculosis its interaction with the immune system. Plenum Press, NY, 1988.
- 117.-Jensen J, Thesrup Pedersen K. In vitro changes in cell mediated immunity following tuberculin skin testing in humans. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 90: 109-116, 1982.
- 118.-Tsuguguchi I, Shiratsuchi H, Teraoka O, Hirano T. Increase in T cells bearing IgG Fc receptors in peripheral blood of patients with tuberculosis by in vitro stimulation with purified protein derivative. Am Rev Respir Dis 121: 951-957, 1980.
- 119.-Wadee A, Sher G, Rabson A. Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with mycobacteria. J Immunol 125: 1380-1386, 1980.
- 120.-Sassman G, Wadee A. Production of a suppressor factor by CD8 lymphocytes activated by mycobacterial components. Infect and Immunity 57: 2828-2835, 1991.
- 121.-Tweardy D, Sceder B, Ellner J. Association of altered

- dynamics of monocyte surface expression of human leukocyte antigens DR with immunosuppression in tuberculosis. *J Infect Dis* 149: 31-37, 1984.
- 122.-Davies D, Corbeil L, Ward W, Duncan J. A humoral suppression of in vitro lymphocyte transformation responses in cattle with Jones disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 145: 13721377, 1980.
- 123.-Campa M, Marelli P, Benedettini G. Role of B lymphocytes and antibodies in the regulation of cell-mediated immune reactions to BCG in mice. pp 263-275, En: *Mycobacterium tuberculosis its interaction with the immune system*. Plenum Press, NY, 1988.
- 124.-Schoenfeld Y, Vilner Y, Coates A, et al. Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA and monoclonal anti DNA autoantibodies react with *M. tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 66: 255-261, 1986.
- 125.-Parekh R, Dwek R, Sulton B, Fernandes D, Leung A et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316: 452-457, 1987.
- 126.-Holoshitz j, Mititian A, Cohen I. Arthritis induced in rats by clones of T lymphocytes responsive to mycobacteria but not to collagen type II. *J Clin Invest* 73: 211-215, 1984.
- 127.-Rook G, Stanford J. Slow bacterial infections or

- autoimmunity. Immunol Today 13: 160-164, 1992.
- 128.-Boros DL. Granulomatous Inflammation. Prog Allergy 24: 183, 1978.
- 129.-Adams DO. The granulomatous inflammatory response: a review. Am J Pathol 84: 164, 1976.
- 130.-Sheffield EA. The granulomatous inflammatory response. J Pathol 160: 1-2, 1990.
- 131.-Yoshida T, Cohen S. In vivo manifestations of lymphokine and lymphokine-like activity. Mechanism of cell mediated immunity, pp 43-60.
- 132.-Warren K, Domingo E, Cowan R. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. Am J Pathol 51: 735, 1967.
- 133.-Pertshuck L, Silverstein E, Friedland J. Immunohistologic diagnosis of sarcoidosis. Detection of angiotensin converting enzyme in sarcoid granulomas. Am J Clin Pathol 75: 350-354, 1981.
- 134.-Youmans GP. A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent human type tubercle bacilli. J Bact 51: 703-710, 1946.
- 135.-Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.

- 136.-Towbin H, Staehelin T, Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76: 4350-4354, 1979.
- 137.-Abou-Zeid C, Filley E, Steele J, Rook G. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from western blots into antigen-bearing particles. J Immunol Methods 98: 5, 1987.
- 138.-Young D, Ivanyi J, Cox J, Lamb J. The 65 KDA antigen of mycobacteria a common bacterial protein?. Immunol Today 8: 215-219, 1987.
- 139.-Ashkenase P, Hayden B, Gerson R. Augmentation of delayed type hypersensitivity of low doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. J Exp Med 141: 697-702, 1975.
- 140.-Kunkel S, Chensue S, Plewa M, Higashi G. Macrophage function in the E manssoni egg induced pulmonary granuloma. Am J Pathol 114: 240, 1984.
- 141.-Kato K, Yamamoto K. Role of adjuvant and immunogenic moieties of M. tuberculosis in pathogenicity. pp 39-50. En: Mycobacterium tuberculosis its interaction with the immune system. Plenum Press, NY, 1987.

- 142.-Meyer T, Ribic E, Azuma I. Biologically active components from mycobacterial cell walls. I granuloma formation in mouse lungs. *Cell Immunol* 16: 11-24, 1975.
- 143.-Oppenheim J, Togawa A, Chedid L, Mizel S. Components of mycobacteria and muramyl dipeptide induce lymphocyte activating factor. *Cell Immunol* 50: 71-81, 1980.
- 144.-Masih N, Majeska J, Yoshida T, Studies on experimental pulmonary granulomas. Detection of lymphokines. *Am J Pathol* 95: 391, 1979.
- 145.-Moore V. Regulation and pharmacology of granulomatous inflammation. En: *M. tuberculosis, its interaction with the immune system.* pp 137-150. Plenum Press, NY, 1988.
- 146.-Garret K, Richardson H, Aunnighake G. Mechanisms of granuloma formation. *Am Rev Respir Dis* 130: 477-483, 1984.
- 147.-Orme IM, Collins FM. Adoptive protection of the mycobacterium tuberculosis-infected lung. *Cell Immunol* 84: 113-120, 1984.
- 148.-Watson S, Collins F. Development of suppressor T cells in mice heavily infected with mycobacteria. *Immunology* 39: 367-373, 1980.
- 149.-Collin F, Watson S. Suppressor T cells in BCG infected mice. *Infect Immuni ty* 25: 491-496, 1979.

- 150.-Sibley L, Hunter S, Brennan P. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon mediated activation of macrophages. *Infect Immunity* 56: 1232-1236, 1988.
- 151.-Leclerc C, Bourgaous E, Chedid L. Demonstration of muramyl dipeptide induced T-suppressor cells responsible for MDP. Immunosuppressive activity. *Eur J Immunol* 12: 249-252, 1982.
- 152.-Ainske G, Bateman E, Solomon J. Variation of T lymphocytes numbers and subsets in different stages of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 133: A39, 1986.
- 153.-Gordon D, Bray MA, Morley J. Control of lymphokine production of prostaglandins. *Nature* 262: 401-402, 1976.
- 154.-Goodwin JS, Webb DR. Regulation of the immune response by prostaglandins in mediating immunosuppression. *Clin Immunol Immunopathol* 15: 106-122, 1980.
- 155.-Snyder DS, Lucy, Unuane ER. Control of macrophage Ia expression in neonatal mice. Role of a splenic suppressor cell. *J Immunol* 128: 1458-1465, 1982.
- 156.-Fulton AM, Levy JG. The possible role of prostaglandins in mediating immunosuppression of nonspecific suppressor cell. *Cell Immunol* 52: 29-37, 1980.
- 157.-Klaus G: Antigen-antibody complexes elicit anti-idiotypic antibodies to self-idiotopes. *Nature* 272: 265 - 66, 1978.

- 158.-Colizzi V, Giuntini M, Garzelli C, Campa M, Falcone G. Auto-anti-idiotypic antibodies inhibit T-cell-mediated hypersensitivity in BCG-infected mice. *Cell Immunol* 80: 205-210, 1983.
- 159.-Cohen IR, Holoshitz J, Van Eden W, Frenkel A. Lines of T lymphocytes illuminate pathogenesis and affect therapy in experimental arthritis. *Arthritis and Rheum* 28: 841-845, 1985.
- 160.-Van Eden W, Hogervorst E, Hensen E, Van Der Zee, Van Embden J, Cohen I. A model for human rheumatoid arthritis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. No 145, pp 27-43. In *Molecular mimicry*, editado por MBA Oldstone, Springer Verlag 1989.
- 161.-Bloom BR, Salgame P, Diamond D. Revisting and revising suppressor T cells. *Immunol Today* 13: 131-135, 1992.
- 162.-Hedrick SM, Germain RN, Bevan, et al. *Proc Natl Acad Sci* 82: 531-535, 1985.
- 163.-Salgame P, Abrams J, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin R, Bloom B. Differing lymphokine profiles of functional subset CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254: 279-282, 1991.
- 164.-Yamamura M, Uyemura K, Deans R, Weinberg K, Rea T, Bloom B, Modlin R. Defining protecting responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277-281.

165.-Salgame P, Convit J, Bloom B. Immunological suppression by human CD 8+ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. Proc Natl Acad Sci 88: 2598-2602, 1991.

APENDICE.

Hernández Pando R, Mancilla R: T-cell lung granulomas induced by sepharose-coupled Mycobacterium tuberculosis protein antigens. Manuscrito enviado a publicación.

Hernández Pando R, Reyes P, Espitia C, Yang Z, Rook G, Mancilla R: Raised agalactosyl IgG and antimycobacterial humoral immunity in Takayasu's arteritis. Manuscrito enviado a publicación.

Espitia C, Elinos M, Hernández Pando R, Mancilla R: Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-Kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis: demonstration by immunogold electron microscopy. Infection and Immunity 60: 2998-3001, 1992.

T-CELL LUNG GRANULOMAS INDUCED BY SEPHAROSE-COUPLED
Mycobacterium tuberculosis PROTEIN ANTIGENS. Predominant
recruitment of cytotoxic-supressor Lyt-2⁺ T cells.

Rogelio Hernández-Pando and Raúl Mancilla*

Departamento de Patología, Instituto Nacional de la Nutrición
"Salvador Zubirán" and *Departamento de Inmunología, Instituto de
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico City

Sixteen pages of text, eight Figures

Running Head: M. tuberculosis T-cell lung granulomas

Grant # CONACYT 0079-M9106

Correspondence:

Raúl Mancilla, M.D.
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Telephone # 5 50 39 82
Fax # 5 50 00 48
Apartado Postal # 70228
Ciudad Universitaria
04510 México, D.

ABSTRACT

The granuloma is the hallmark lesion of tuberculosis, its importance being that it seems to express the status of cell mediated immunity to M. tuberculosis at the tissue level. To investigate the granulomatogenic potential of mycobacterial proteins and the participating cells, we instilled sepharose beads coated with a crude culture filtrate protein extract into the lungs of Balb/c mice. Histologically, granulomatous reactions composed by lymphocytes and macrophages were observed surrounding the beads. In addition, mononuclear cell vasculitis, interstitial pneumonitis and hyperplasia of hilar lymph nodes and lymphoid tissue associated to bronchial mucosa were observed. The cells participating in these reactions were identified as T-cells by immunocytochemistry of tissue sections and bronchial washings. Twenty four hour granulomas were largely composed of L3T4⁺ T cells while at and after the peak intensity of the granulomatous reaction (3 days) most cells were of the Lyt-2⁺ phenotype. At difference, equivalent numbers of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ cells were found in lung granulomas induced with bead coated with methylated BSA. Our findings suggest the existence of mycobacterial constituents which promote a preferential rapid recruitment of supressor-cytotoxic cells in granuloma formation, which is in keeping with reported observations that adscribe an importante role to these cells in the immune response to mycobacteria.

INTRODUCTION

The failure of recent BCG vaccination trials (1) together with its reemergence in developed countries (2,3) shows that tuberculosis is not yet under control as formerly believed (3). It seems now that the control and eventual eradication of this scourge of mankind is going to require of much more basic knowledge about M. tuberculosis, the causal agent, and of the ways it interacts with its hosts. When M. tuberculosis lodges in hosts' tissues it evokes a peculiar type of inflammatory response, the granuloma, which is the hallmark lesion of tuberculosis. A number of observations suggest cell mediated immunity (CMI) as the central mechanism of this response. By immunohistochemistry most granuloma cells are T lymphocytes and thymectomy prevents granuloma development in experimental animals (4, 5). In tuberculous patients with poor in vivo and in vitro responses to PPD and in individuals with AIDS the granulomatous response to the tuberculosis bacillus is defective or absent (6,7). From these data, granulomas could be viewed as the protecting tissue expression of antimycobacterial CMI. It would be, therefore, of interest to know the granulomatogenic substances in the tuberculosis bacillus for they could be also involved in protective immunity. Cell wall glycolipids including cord factor, (8), muramyl dipeptide (9), and wax D (10) are reportedly granulomatogenic in laboratory animals. These substances, however, do not induce CMI (10), which is crucial in the development of the tuberculous granuloma. It would also be

worthwhile to learn about the events taking place locally within the granuloma for this would further our understanding of antimycobacterial immunity. This work was aimed to investigate the granulomatogenic potential of mycobacterial proteins and the cells involved in the response. For this purpose crude protein extracts obtained from M. tuberculosis culture filtrates were coupled to sepharose beads and instilled into the lungs of BALB/c mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were performed on BALB/c male mice bred in our own facilities. Mice were given routine animal chow and chlorinated water ad libitum until they were used, usually at 10-12 weeks of age.

Antigens and immunizations.

Mycobacterium tuberculosis strain H37/Rv was grown in the synthetic medium of Proskauer and Beck modified by Youmans (11). After 5-6 weeks of culture the medium was filtered to eliminate bacilli and precipitated with 45 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to obtain a crude protein extract. Phenylmethylsulphonyl fluoride (Sigma Chemical Co., St Louis MO) was added as an enzymatic inhibitor before dialysis in PBS. The antigenic protein profile of the extract was analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and by immunoblotting as described elsewhere (12). About 40 antigenic protein bands were observed by immunoblotting using serum of mice immunized with a H37/Rv protein extract (not shown).

Methylated bovine serum albumin (m-BSA) was purchased from Sigma. Animals were immunized (primed) with two subcutaneous and intraperitoneal injections one week apart of 50 and 25 μ g respectively of the crude mycobacterial protein extract emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Difco Laboratories, Detroit MICH). Other mice were primed in the same manner with m-BSA.

Coupling of antigens to sepharose beads and induction of pulmonary granulomas.

Pulmonary granulomas were induced as previously described (13). Briefly, thirty μ g of mycobacterial protein extract or of m-BSA were coupled to 15,000 cyanogen bromide activated Sepharose 4-B beads (Sigma) following manufacturers' instructions. Uncoated beads to be used as controls were inactivated with glycine (0.2 M, pH 8). Each animal received intratracheally 100 μ l of PBS containing 15,000 beads coated with the M. tuberculosis protein extract (Mtb-beads), with m-BSA (m-BSA-beads) or uncoated beads. For the intratracheal injection of beads mice were anesthetized with sodium penthotal. The trachea was exposed by a small incision on the neck region and beads were injected through a catheter placed into the trachea. The incision was closed with silk. Mice were maintained erect until the effects of anesthesia passed. Under these conditions animal mortality was kept very low.

Bronchial washings

At various time periods after intratracheal instillation of beads, mice were anesthetized and killed by exsanguination

cutting the axillary blood vessels. To collect inflammatory cells from the lungs, the thoracic cavity was opened, a catheter was placed into the trachea and the lungs were washed six times with 1 ml of PBS. The cell suspension obtained was centrifuged at 600 x g for 10 min and the cells were counted in a hemocytometer. Smears stained with Giemsa solution were used for differential counts. For lymphocyte phenotyping, smears were fixed in cold acetone for 5 minutes, rinsed and incubated for 30 min with monoclonal antibodies to L3T4 and Lyt-2 diluted 1/25 in PBS. These IgG monoclonal antibodies were obtained from ascites fluids by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and ion-exchange chromatography on DEAE. Purified IgG antibodies were coupled to biotin (Amersham, Berkshire, UK). Bound antibodies were detected with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Zymed Laboratories, San Jose CA) diluted 1/10 in PBS. Peroxidase was revealed with H_2O_2 and 4-chloro-1-naphthol. At least 100 cells per lung mouse were counted and the percent of labelled cells was obtained.

Preparation of tissue sections for histologic examination and immunohistochemistry.

For histologic studies the lungs were perfused and fixed with 10 % buffered formalin for 24 hr. Parasagittal sections through the hilus were taken, embedded in paraffin, sectioned at 5 μm thickness and stained with hematoxylin-eosin. For immunohistochemical studies, the lungs were perfused with OCT compound (Miles Laboratories, Elkhart, IN) and rapidly frozen in liquid nitrogen. Six μm parasagittal

sections through the lung hilus were taken with a cryostat. Slides were fixed for 1 min in cold acetone and stored at -70°C in sealed boxes until use. The biotin-labelled monoclonal antibodies used for phenotyping of bronchial washings cells were used for the immunohistochemical analysis of lung tissue sections following a similar procedure. In addition, immunohistochemistry with peroxidase-labelled antisera to mouse IgG and IgM (Cappel Laboratories, Durham NC) was performed. Slides were counterstained with methyl green. The cells of at least ten randomly chosen granulomas per mouse were examined and the percent of labelled cells was obtained. Staining of tissue sections for nonspecific esterases was also performed following a reported method (14).

RESULTS

Histologic changes

Slides with several sections of the lung from each mouse were examined by two experienced pathologists to establish the pattern and extent of histologic changes. Five changes were analyzed separately: 1) inflammation around the beads; 2) vascular changes; 3) interstitial inflammation; 4) bronchus-associated lymphoid tissue (BALT); and 5) changes in the hilar lymph nodes. The extent of inflammation around 10-20 beads per animal was estimated in μm^2 with an eyepiece micrometer (Zeiss Jena, Germany). Blood vessel and interstitial inflammation and BALT and hilar lymph node hyperplasia were semiquantitatively graded as intense (+), moderate (++) , mild (+) and absent (0).

Inflammation around the beads

Uncoated beads.- A single layer of cells with flattened cytoplasm was observed embracing the beads. This change was best seen at 24 and 72 h. The cells were identified as macrophages by their diffuse granular cytoplasmic nonspecific esterase pattern. Multinucleated giant cells were rarely seen. Lymphocytes or other inflammatory cells were not observed.

Mtb-beads.- Intense granulomatous type inflammation around beads covered with mycobacterial antigens was observed from the beginning (Fig. 1). It attained its peak (Fig. 2) three days after challenge ($22 \times 10^3 \mu^2 \pm 2.3 \text{ SD}$). At later times, inflammation declined to a minimum at the end of the study (28 days). At 24 hr, the earliest time point examined, most cells were nonspecific esterase positive macrophages in direct contact with the beads. At three days and at later times, lymphocytes were predominant and macrophages were displaced to the periphery of the granuloma. Multinucleated giant cells and polymorphonuclear leukocytes were not found. The inflammatory response was higher in primed animals but the cell types involved were the same.

mBSA-beads.-The inflammatory response to mBSA-beads was less intense but similar in cell composition and time course to that induced by Mtb-beads (Fig. 2).

Vascular changes.

There were intense inflammatory changes involving the pulmonary venules of animals challenged with Mtb-beads (Fig. 1). These changes were not induced by uncoated beads and they were

minimal in animals receiving mBSA-beads. Vasculitis followed the same time course of the granulomatous response around the beads. The cells observed were also lymphocytes and macrophages; these cells were seen plugging venules, attached to the endothelium and infiltrating the wall and the perivascular space. The blood vessel wall showed edema but no other changes were seen. The vasculitic process gradually subsided with no residual changes left.

Interstitial changes.

There were interstitial inflammatory changes (edema and inflammatory cells) which paralleled the time course of the inflammatory response around the beads; these changes were more intense in the vicinity of the beads. The cells involved were the same as seen around the beads. Interstitial inflammation was more intense (+++) in animals challenged with Mtb-beads. With m-BSA-beads the interstitial inflammatory changes were similar but less intense (+) than in animals challenged with Mtb-beads. Interstitial changes were minimal or absent from the lungs of control unchallenged mice and from animals challenged with uncoated beads.

Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and hilar lymph nodes.

BALT in unchallenged mice consisted of small clusters of mononuclear cells situated between bronchi and arteries and arterioles (not shown). BALT was unchanged in mice challenged with uncoated beads. In mice challenged with Mtb-beads there was intense hyperplasia of BALT (+++) at the time of

the maximal inflammatory response around the beads (3 days). The lymphoid cells were diffusely arranged forming no follicle-like structures. There was moderate to intense hyperplasia (+++) of parafollicular areas of lymph nodes from mice challenged with Mtb-beads. These changes were more intense at three days. There were no follicular structures seen in these lymph nodes. There was no lymph node hyperplasia in unchallenged mice and in mice challenged with uncoated-beads. With m-BSA-Beads changes were mild (+).

Differential cell counts in bronchial washing smears stained with Giemsa (Fig. 3).

In unchallenged control mice the total number of collected cells per animal was 600×10^3 . Of these 95 % were macrophages and 5% were lymphocytes. The highest cellularity was found in bronchial washings of animals challenged with beads covered with mycobacterial antigens (Mtb-beads). At the peak of the inflammatory response (3 days), a total of 4.35×10^6 cells per animal was counted, 87 % of them were lymphocytes, 11 % macrophages and 2% polymorphonuclear leukocytes. Thereafter cellularity declined to be within normal range at the third week. In animals challenged with mBSA beads cellularity was much lower than that induced with Mtb-beads (1.5×10^6 , at three days) and macrophages were predominant.

Phenotyping of T lymphocytes by immunohistochemistry of lung sections and bronchial washings.

Except for mice sacrificed at twenty four h, Lyt-2⁺ cells predominated over L3T4⁺ lymphocytes at all times, in both

tissue sections and bronchial washings (Fig. 4 and 5) of mice challenged with Mtb-beads. This difference was more striking in bronchial washings of mice sacrificed seven days after challenge. A similar L3T4/Lyt-2 balance was observed in the cells infiltrating interstitium (Fig. 6), blood vessels (Fig. 7) hyperplastic BALT (Fig. 8) and hilar lymph nodes. In mice challenged with mBSA-beads L3T4⁺ cells predominated always slightly over Lyt-2⁺ cells in both tissue sections and bronchial washings (Fig 4). Immunohistochemistry of lung sections with anti-IgG and anti-IgM antibodies showed no participation of antibody producing cells in granuloma formation. However, a few positive cells were observed in BALT and in hilar lymph nodes.

DISCUSSION

In this work we have demonstrated that proteins anchored to sepharose bead elicit a mononuclear inflammatory response in the lungs of mice reminiscent of the granulomatous response evoked by the living bacilli in experimental animals and in human tissues. Macrophages and lymphocytes formed well organized cuffs around the beads with virtually no participation of polymorphonuclear leukocytes and antibody forming cells. A number of findings indicate that in these reactions CMI mechanisms are operative. First, granulomas were bigger in primed than in unprimed mice. Moreover, granulomas were largely composed by mononuclear cells bearing T cell markers. In addition, the bronchus associated lymphoid tissue and the hilar lymph nodes exhibited T-cell hyperplasia.

These observations support previous findings implicating CMI in granuloma formation in tuberculosis (4,5,15,16). Our findings support also the view that mycobacterial proteins are involved in granuloma development in keeping with the fact that protein antigens induce antimycobacterial CMI which, as pointed out before, is crucial for granuloma formation.

Accompanying the granulomatous response to mycobacterial antigens, there were intense inflammatory changes involving veins and venules. Lymphocytes and macrophages were seen plugging blood vessels, attached to a hyperplastic endothelium and infiltrating vein walls and perivascular spaces. This inflammatory angiopathy, probably related to the influx of T-cells from the blood into the lungs, followed a course similar to that of the granulomatous reaction leaving no residual changes. Pulmonary vasculitis as a component of a local immune response has been noticed before (17).

Both helper-inducer ($L3T4^+$) and cytotoxic-suppressor ($Lyt-2^+$) T lymphocytes participate in the local in vivo lung response to sepharose-coupled mycobacterial proteins which is in agreement with in vitro observations made in human and experimental tuberculosis (18, 19). Interestingly, $Lyt-2^+$ cells were predominant even in early granulomas in contrast with early mBSA granulomas which were mostly composed by $L3T4^+$ cells. The lung response to Mtb-beads differs also from observations made in other models of granulomatous inflammation. For instance, in Schistosoma manzoni egg granulomas helper-inducer lymphocytes cells predominate until the 16th week when the modulating $Lyt-2^+$

dominated phase ensues (20). The preferential recruitment of cytotoxic-supressor T cells could be a feature of the local response to mycobacterial protein antigens. It is now established that M. tuberculosis may induce, in addition to a CD4⁺ response, proliferation of CD8⁺ T lymphocytes (21). The role of these cells seems to be complex. As CD4⁺ cells, transfered PPD induced CD8⁺ cells protect mice against an M. tuberculosis challenge (21, 22). More recently CD8⁺ cells have attracted much interest because of their capacity to lyse under MHC restriction macrophages primed with mycobacterial antigens (23). It has been speculated that this ability may help to eliminate the mycobacterial load. Finally, CD8⁺ T lymphocytes have been implicated in the immunosuppressive phenomena characteristic of human and experimental tuberculosis. Indeed, Wade et al. have demonstrated that M. tuberculosis may induce proliferation of CD8⁺ cells with supressive properties (24). The possibility that the cytotoxic supressor Lyt-2⁺ lymphocytes induced by sepharose coupled mycobacterial proteins are immunosupressive is currently under study in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank the excellent technical assistance of Rafaela Espinosa Organista.

REFERENCES

- 1.-Fine PEM. The BCG story: lessons from the past and implications for the future: Rev Infect Dis 1989, 2 (suppl 2): 353-359.
- 2.-Nunn PP, Mc Adam KPWJ: Mycobacterial infections and AIDS. Brit Med Bull 1988, 44:801-813.
- 3.-Bloom BR, Murray Ch: Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. Science 1992, 57:1055-1064.
- 4.-Yamamoto KI, Kato K, Kakinuma M, Brehmer W: Cellular regulation of lung granuloma formation and delayed type hypersensitivity induced with BCG walls. Further evidence of involvement in lung granuloma formation. Zbl Bakt I Abt Orig. A 1982, 251: 357-368.
- 5.-Van Der Oord J, De Wolf-Peeters Ch, Facchetti F., Desmet V: Cellular composition of hypersensitivity-type granulomas. Human Pathol 1984, 15: 559-565.
- 6.-Daniel T: The immunology of tuberculosis. Clinics in Chest Medicine 1980, 1: 189-200.
- 7.-Cohn CC, Schroff RW, Kliever KE: Disseminated M. avium-intracellulare infection in homosexual men with acquired cell-

mediated immunodeficiency: A histologic and immunologic study of two cases. Am J Clin Pathol 1982, 79: 247-252.

8.-Bekierhunst A, Levij IS, Yarkoni E, Vilkas E, Adam A, Lederer E: Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions. J Bacteriol 1969, 100: 95-102.

9.- Emori K, Tanaka A: Granuloma formation by synthetic bacterial cell wall fragments: muramyl dipeptide. Infect Immun 1978, 19: 613-620.

10.-Meyer T, Ribi E, Azuma I: Biologically active components from mycobacterial cell walls. Granuloma formation in mouse lungs and guinea pig skin. Cell Immunol 1975, 16: 11-24.

11.-Youmans GP: A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent human type tubercle bacilli. J Bact 1946, 51:703-710.

12.-Espitia C, Cervera I, Gonzales R, Mancilla R: A 38-kD Mycobacterium tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. Clin Exp Immunol 1989, 77: 373-377.

13.-Kobayashi K, Allred C, Cohen S, Yoshida T: Role of interleukin I in experimental pulmonary granulomas in mice. J Immunol 1985, 134: 353-364.

14.-Chayen J, Bitensky C: Practical Histochemistry. Chinchester, Wiley, 1991, pp 174-181

15.-Dannenberg AM: Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature and macrophage enzymes. Bacteriol Rev 1986, 32:85-102.

16.-Dannenberg AM: Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis 1989, 2(suppl 2): 369-378.

17.-Curtis JL, Warnock LM, Arraj SM, Kaltreider HB: Histologic analysis of an immune response in the lung parenchima of mice. Angiopathy accompanies inflammatory cell influx. Am J Pathol 1990, 137: 689-699.

18.-Kaufmann S: In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. Rev Infect Dis 1989, 2 (Suppl 2): 448-454.

19.-Scordamaglia A. Bognasco M, Canonica W: Immune response to Mycobacteria: characterization of immunocompetent cells in tuberculous lesions of humans. In Mycobacterim tuberculosis interactions with the immune system. Edited by Bendinelly M and Friedman H, New York, Plenum Press, 1988, pp 81-98.

20.-Chensue SW, Boros DL: Modulation of granulomatous hypersensitivity. I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in Schistosoma mansoni infected mice. J Immunol 1979, 123: 1409-1414.

21.-Hahn H, Kaufmann S: The role of cell mediated immunity in bacterial infections. Rev Infect Dis 1981, 3: 1221-1250.

22.-De Liberò G, Flesh I, Kaufmann S: Mycobacterium reactive Lyt 2⁺ cell. Eur J Immunol 1988, 18: 59-66.

23.-Kumaranatane DS, Pithie AS, Drysdale P, Gaston JS, Kiessling R, Iles PB, Ellis CJ, Innes J, Wise R: Specific lysis of mycobacterial antigen bearing macrophages by class II MHC-restricted T cell lines in healthy donors or patients with tuberculosis. Clin Exp Immunol 1990, 80: 314-323.

24.-Sussman G, Wade A: Production of a suppressor factor by CD8⁺ lymphocytes activated by mycobacterial components. Infect Immun 1991, 59: 2828-2835.

LEGENDS

Figure 1. Lung granuloma induced in sensitized BALB/c mice with sepharose beads coated with a whole protein extract of M. tuberculosis. There is a prominent inflammatory infiltrate organized around the bead (B) mostly composed of lymphocytes and macrophages. In the right there is a medium-size vein (V) with intramural and perivascular mononuclear inflammation. Endothelial cells are hyperplastic (arrows). Hematoxylin-eosin, x 200.

Figure 2. Surface area in μ^2 of pulmonary granulomas induced in BALB/c mice by the intratracheal injection of beads coated with mycobacterial proteins (MTb) or with methylated bovine serum albumin (mBSA). With both antigens the peak of the granulomatous reaction is attained 3 days after challenge. Mycobacterial proteins induced larger lesions.

Figure 3. Differential cell counts of inflammatory cells in bronchial washings were made in mice with pulmonary granulomas induced by mycobacterial antigens (upper) and methylated BSA (lower). Total cell counts were higher in mycobacterial granulomas and lymphocytes were the predominant cells. In contrast in mBSA induced granulomas equivalent numbers of macrophages and lymphocytes were seen.

Figure 4. T cell subsets in granulomas of mice challenged with Mtb or mBSA beads determined by immunohistochemistry with

monoclonal antibodies to Lyt-2 and to L3T4. In both, tissue sections and bronchial washings there was a predominance of Lyt 2⁺ suppressor/cytolytic T cells in lesions induced by mycobacterial proteins. At difference, in m-BSA induced granulomas similar numbers of Lyt-2⁺ and L3T4⁺ cells were observed.

Figure 5. Immunohistochemistry of a seven day lung granuloma induced by mycobacterial proteins. Frozen sections were incubated with a monoclonal antibody to Lyt-2. Most cells around the bead (B) show membrane labelling. x 400

Figure 6. Immunohistochemistry with an anti-Lyt-2 monoclonal showing numerous positive cells infiltrating the interstitial spaces. x 400

Figure 7. Immunohistochemistry of an inflamed vein similar to that shown in Figure 1. Numerous suppressor/cytolytic Lyt 2 + cells are seen infiltrating the wall of the venule and around it. x 200

Figure 8. Immunohistochemical reaction of lymphoid tissue associated to bronchial mucosa (arrows) using a monoclonal antibody against the Lyt-2 marker. Numerous suppressor/cytolytic T cells are seen in the hiperplastic lymphoid tissue. x 200

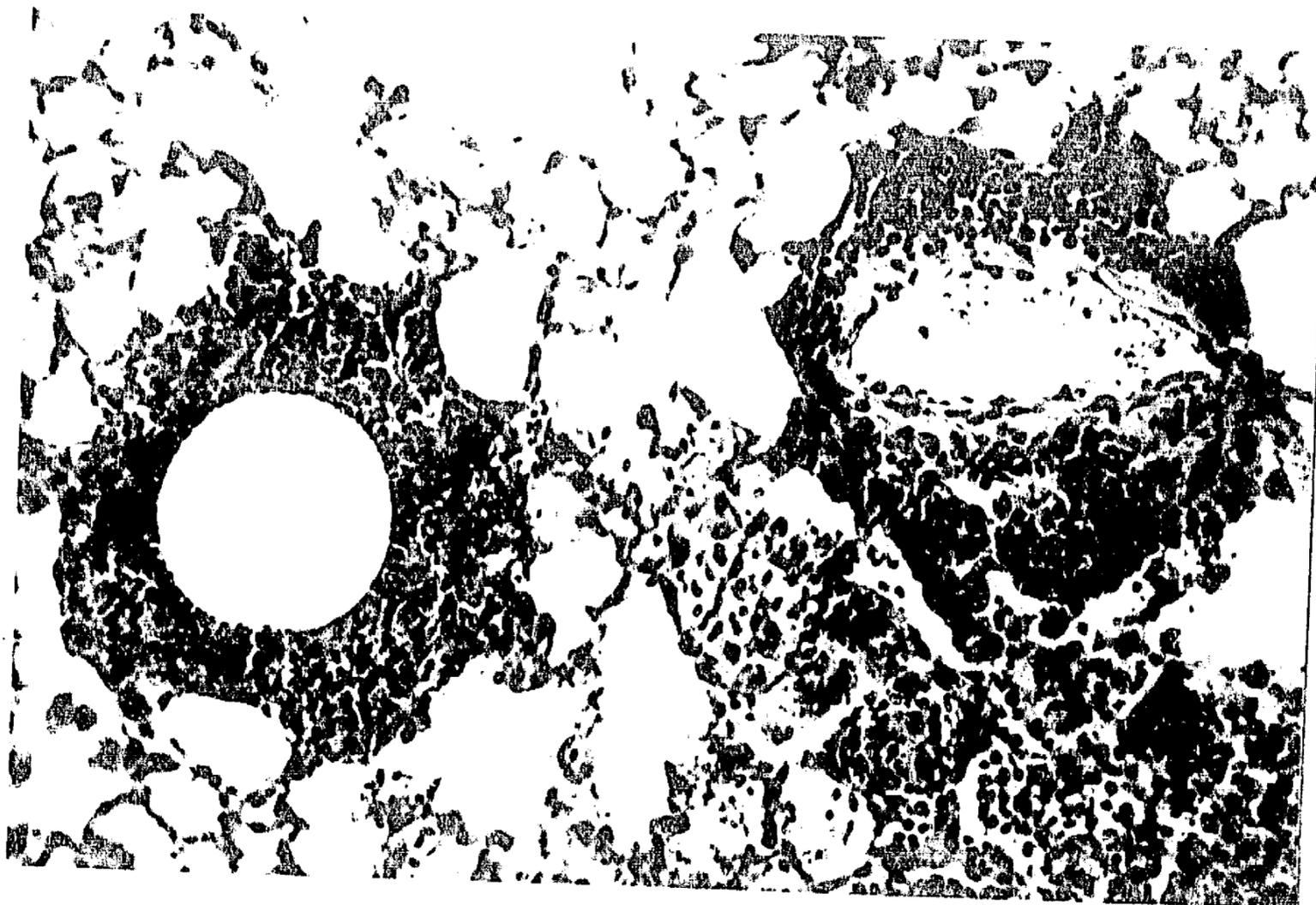


FIG. 1

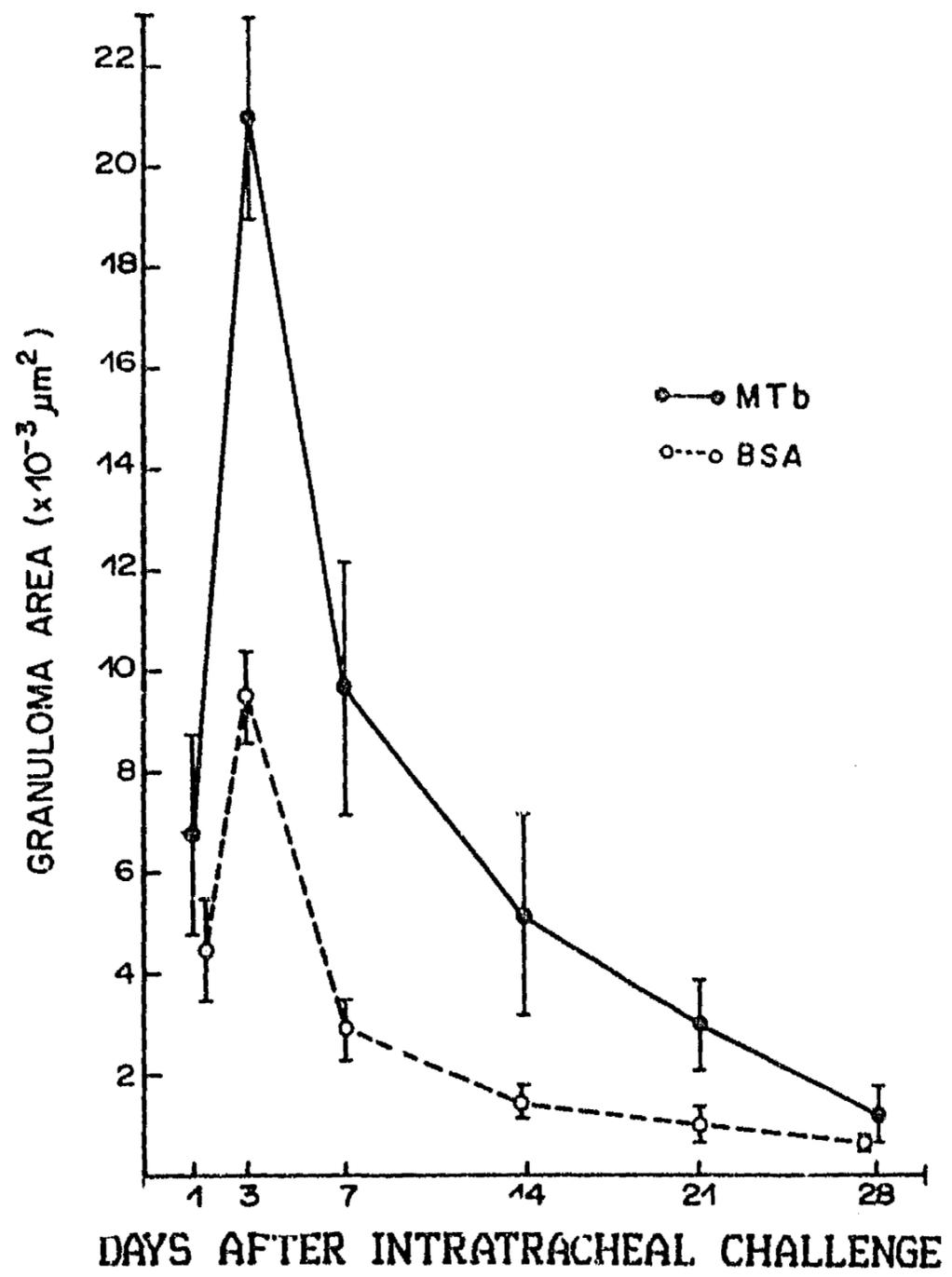


FIG. 2

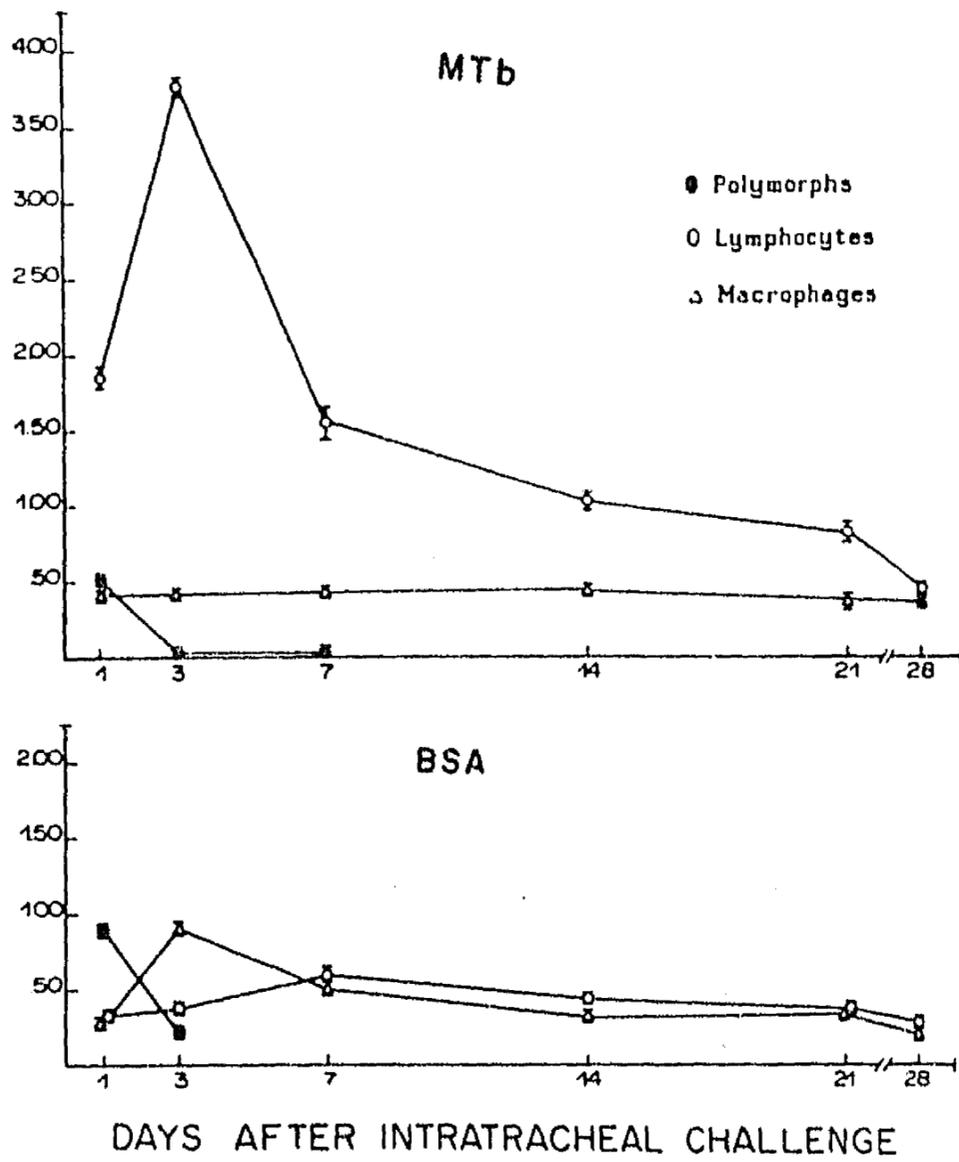


FIG. 3

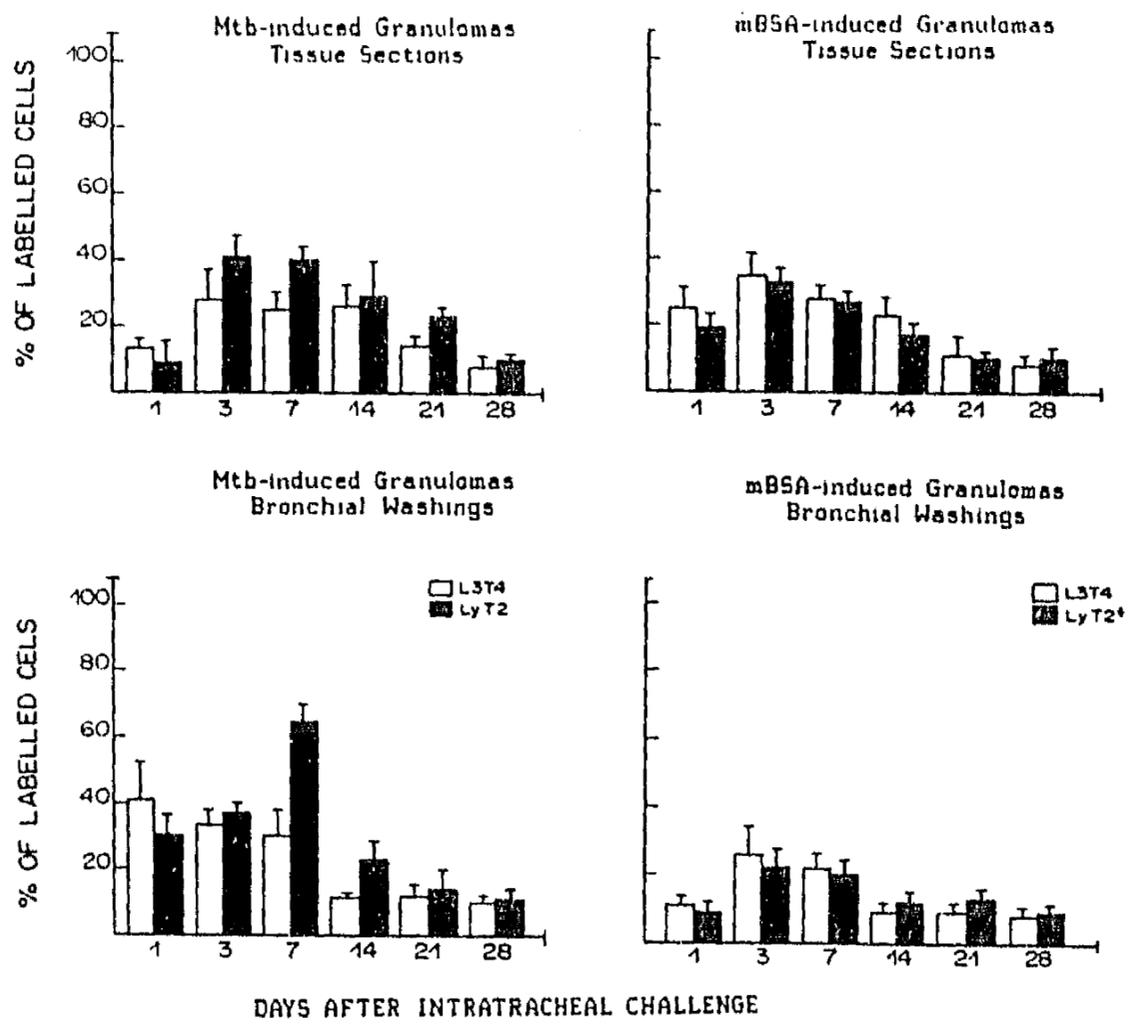


FIG. 4

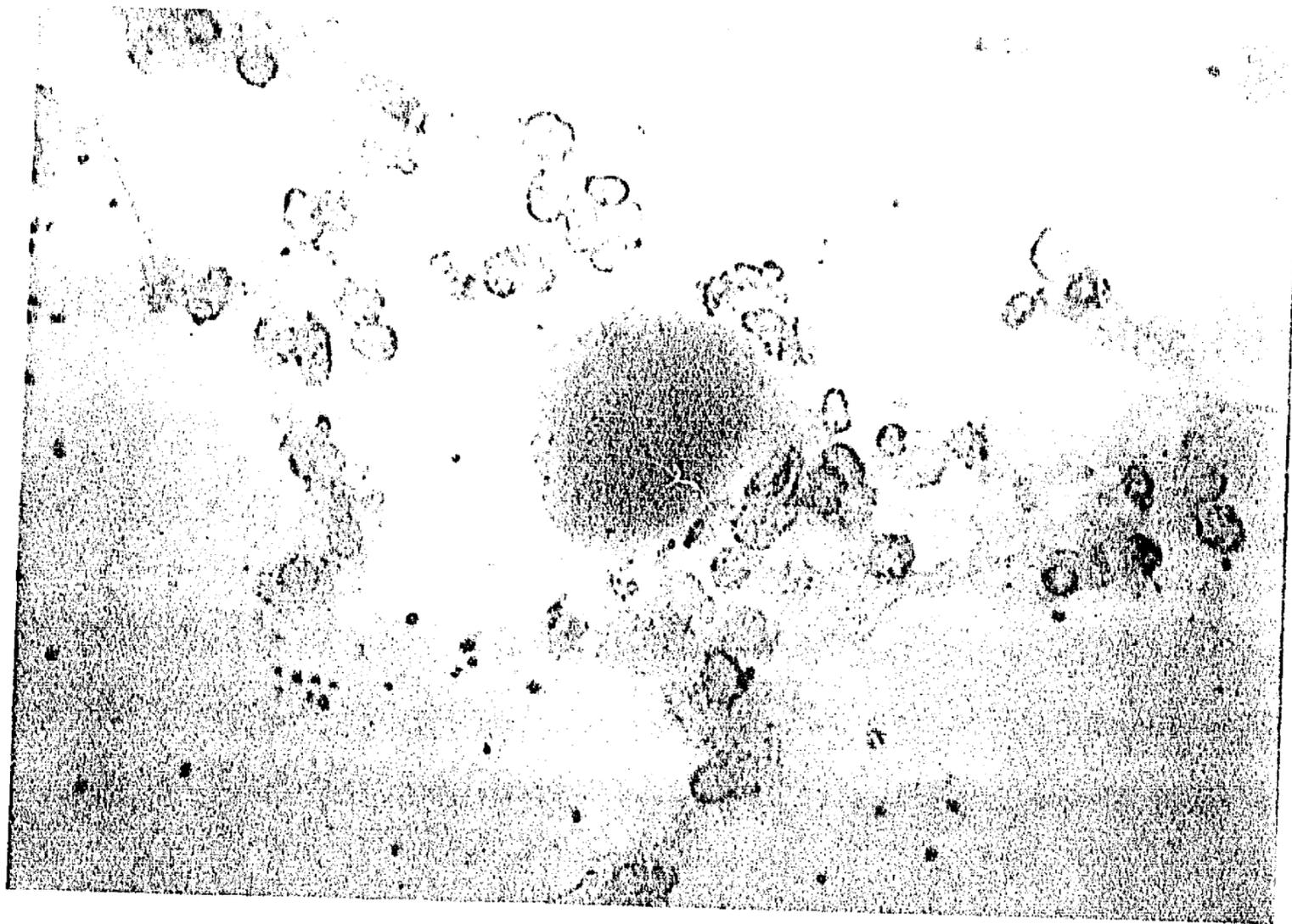


FIG. 5

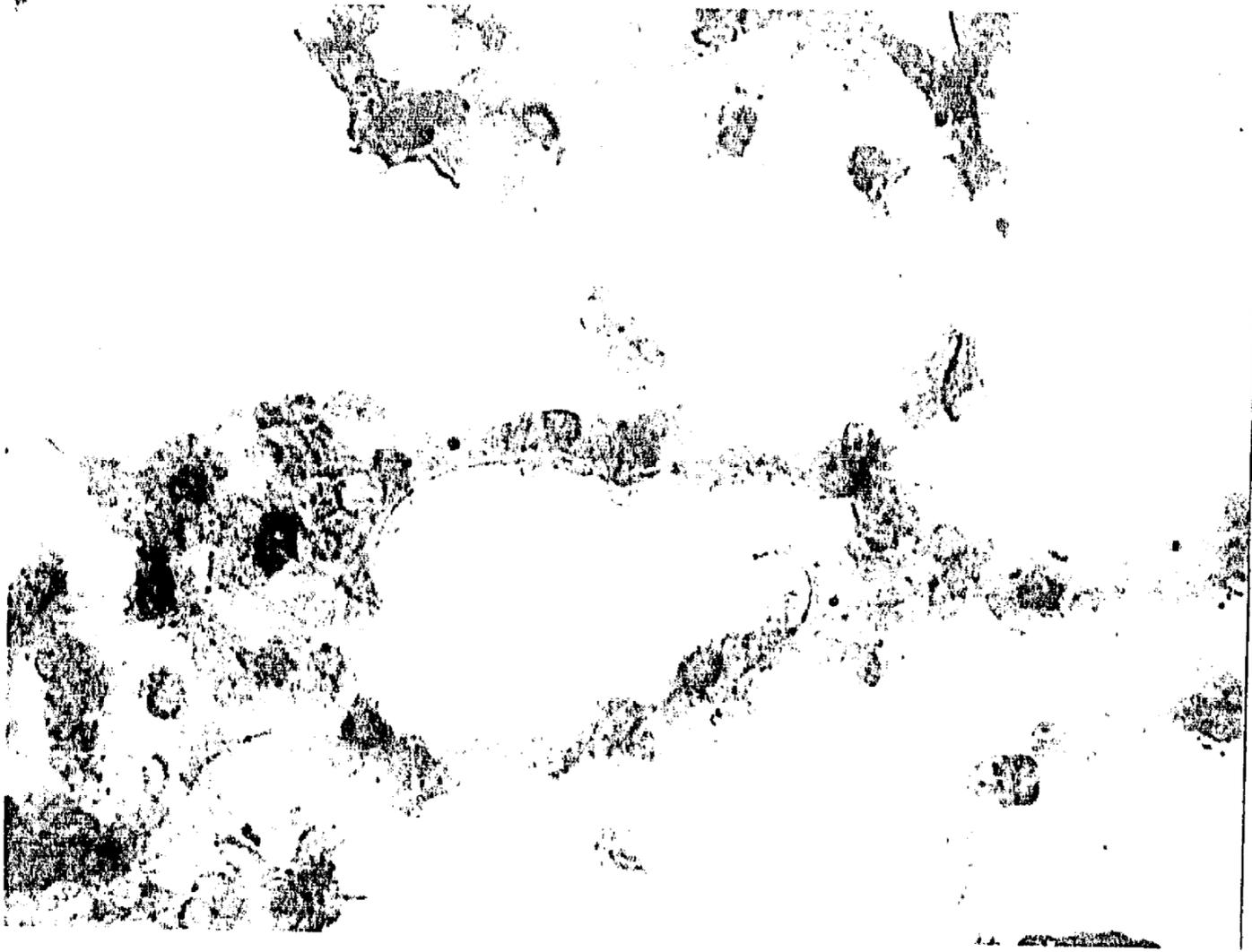


FIG. 6

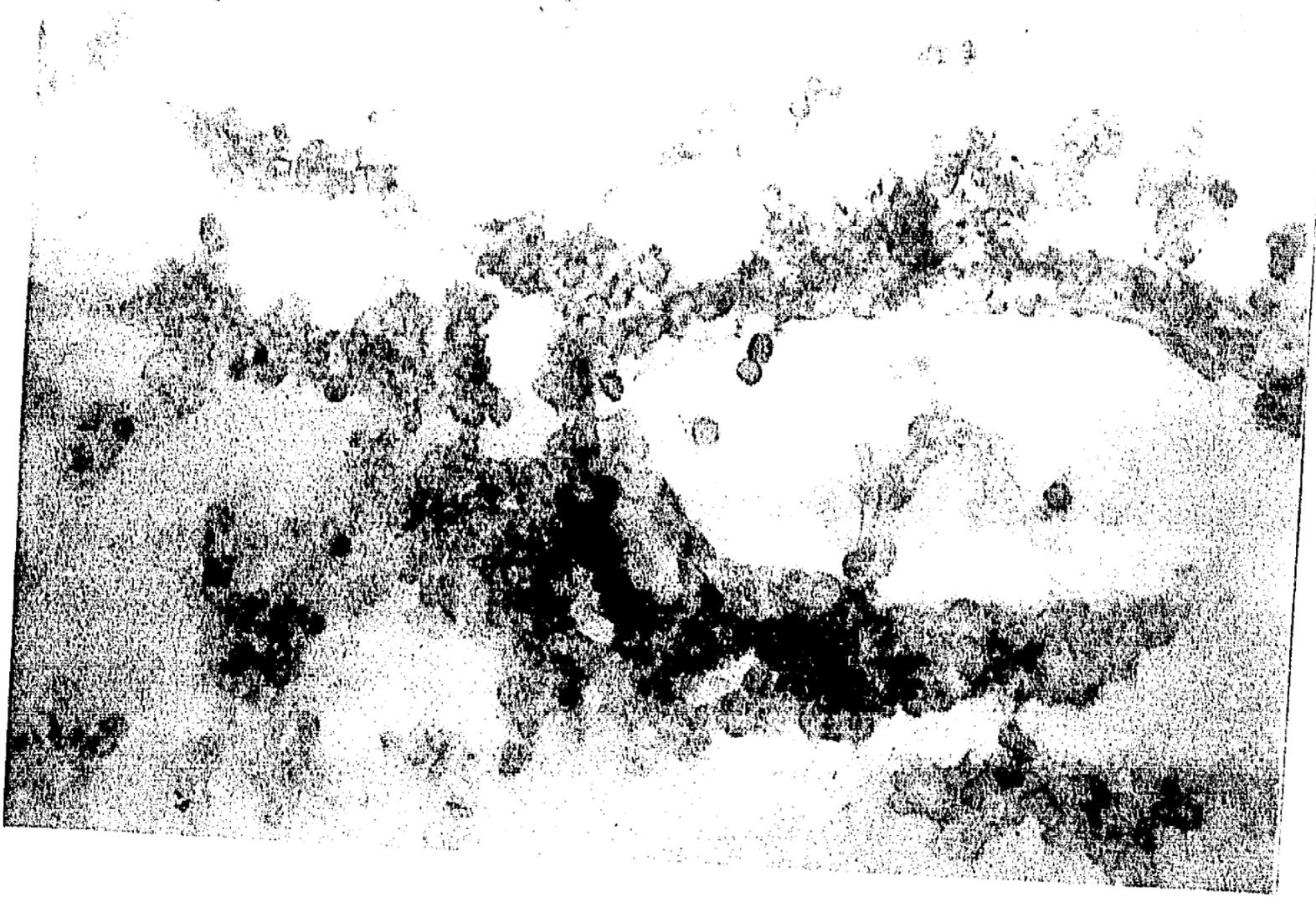


FIG. 7

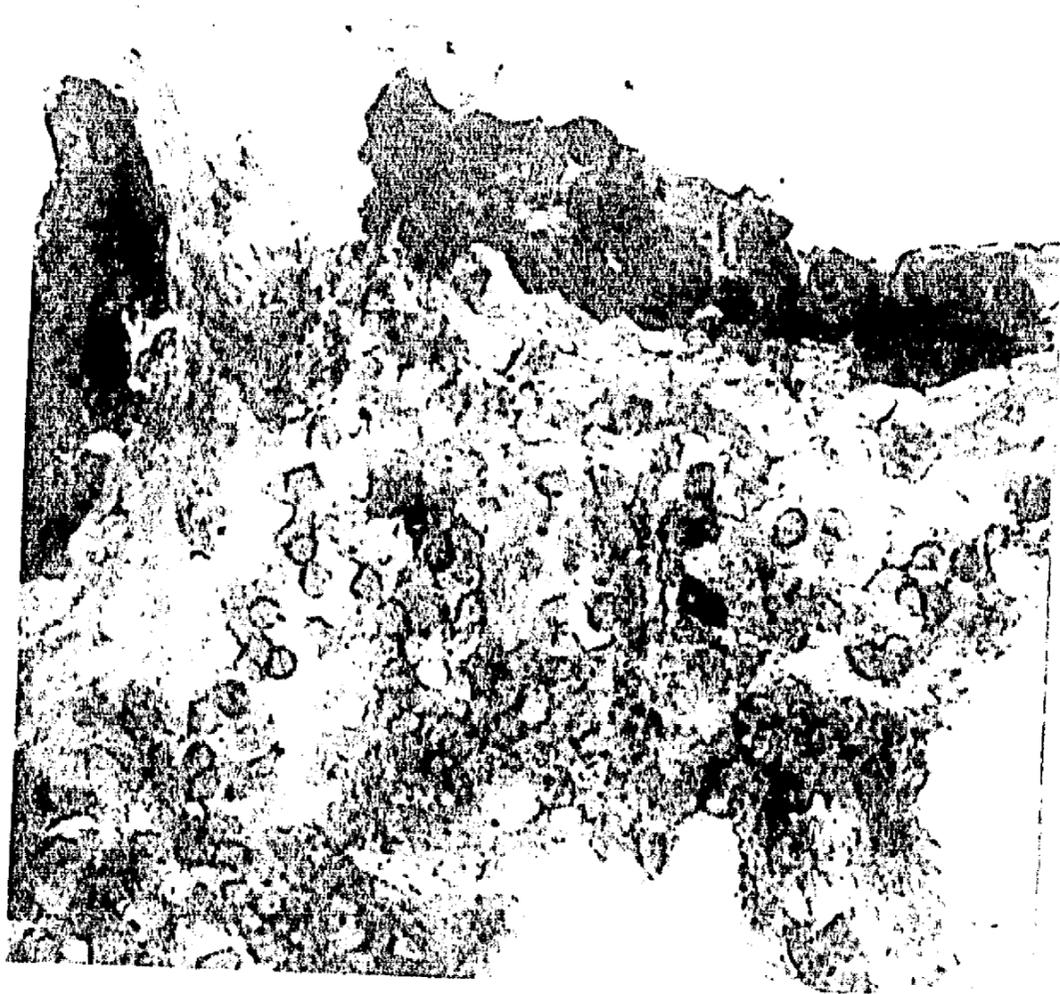


FIG. 8

RAISED AGALACTOSYL IgG AND ANTIMICOBACTERIAL HUMORAL IMMUNITY IN
TAKAYASU'S ARTERITIS

Rogelio Hernández-Pando MD¹, Pedro Reyes MD², Clara Espitia Ph.D³,
Yang Zhang⁴, Graham Rook MD⁴, and Raúl Mancilla MD³.

Departamento de Patología, Instituto Nacional de Enfermedades de la
Nutrición¹, Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de
Cardiología², Departamento de Inmunología, Instituto de
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional de México³, and
Department of Microbiology, University College & Middlesex School
of Medicine⁴.

Corresponding author.

Raúl Mancilla, MD
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional de México
Apartado Postal 70-228, C.P.04510
México, D.F., MEXICO

Running head: Mycobacterium tuberculosis and Takayasu's arteritis

ABSTRACT

Takayasu's arteritis is an inflammatory occlusive disease of the aorta and its main branches. The aetiology is unknown, but it is commonly associated with tuberculosis and with skin reactivity to tuberculin, so suggested causes include inapparent infection with Mycobacterium tuberculosis, or autoimmunity evoked by this organism. To evaluate these hypotheses we measured the % agalactosyl IgG, and the levels of antibody to mycobacterial antigens, in sera from patients with this disease. The % agalactosyl IgG in patients with active arteritis was in the range previously seen only in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, and the mycobacterioses. Similarly, taking 2 standard deviations above the mean antibody level in a control group as cutoff point, significantly raised antibody to the purified 38kDa protein of M. tuberculosis, and to the 65kDa heat shock protein of M. leprae, was found in 77 % and 83 % of patients with Takayasu's arteritis respectively, and the levels were highest in those with active disease.

These results suggest that Takayasu's arteritis particularly clearly illustrates the occasional relationship between mycobacteria and diseases of superficial autoimmune aetiology.

Keywords: Takayasu's arteritis, M. tuberculosis, heat-shock protein, ELISA, Immunoblot, agalactosyl IgG.

INTRODUCTION

Takayasu's arteritis or nonspecific aortitis is an inflammatory-fibrotic condition of the aorta and its main branches (1). In an early phase the basic lesion is an inflammatory granulomatous process involving primarily the adventitia, and in chronic phases fibrosis appears (1). These processes may result in narrowing of arterial lumina and diminished arterial blood supply. The most frequent clinical presentation is characterized by absence of pulses in upper limbs, neurological manifestations and characteristic ocular changes; these conditions are due to involvement of the aortic arch and its branches (2).

The etiopathogenesis of Takayasu's arteritis remains a mystery despite the more than one hundred years elapsed since its original description by Savory (3). It has been linked with infectious agents, specifically with Mycobacterium tuberculosis. Grounds for this belief are the granulomatous nature of the arterial lesion (1), the skin reactivity to PPD detected in most patients (3) and the frequent association with overt tuberculosis which ranges from 21.8 to 70 % (4,5). Failure to demonstrate acid-fast bacilli in lesions, however, has suggested a pathogenesis different from that of the classical tuberculosis lesion. A role for autoimmune phenomena has also been proposed in view of the reported association with autoimmune diseases such as rheumatic fever (6), rheumatoid arthritis (7), systemic lupus erythematosus (8), polymyositis (8) and scleroderma (9). These observations are of interest

given the evidence that mycobacteria can trigger autoimmune phenomena (10). Moreover, a further link between autoimmunity and the mycobacterioses has emerged from the discovery that a striking increase in the agalactosyl glycoform of IgG occurs only in the mycobacterioses (11,12), in rodent models of arthritis (13) and in certain supposedly autoimmune conditions such as rheumatoid arthritis (14) and inflammatory bowel disease (15), where involvement of mycobacteria remains an aetiological possibility (reviewed in Rook, Lydyard and Stanford, 1990). Therefore to investigate the possible association between tuberculosis and Takayasu's arteritis we have measured the % agalactosyl IgG in these patients, and also the antibody to whole culture filtrate antigens of M. tuberculosis, and to the purified 38kDa protein of M. tuberculosis (P38), and recombinant 65kDa heat shock protein (hsp65) of M. leprae. The results strongly suggest that in spite of the apparent absence of visible organisms from the lesions, Takayasu's arteritis is associated in some way with M. tuberculosis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and sera

Sera were obtained from 14 patients with Takayasu's arteritis attending the outpatient clinic of the Instituto Nacional de Cardiología in Mexico City. The diagnosis was established by clinical, laboratory and angiographic criteria. Sera from 25 patients with pulmonary tuberculosis were obtained from the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City. Diagnosis was established by smear examination and/or by culture. Control sera came from 25 healthy adults.

Antigens

Mycobacterium tuberculosis, strain H37/Rv, was grown in the synthetic medium of Proskauer and Beck, and culture filtrate protein antigens (whole antigens) were obtained by filtration and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation as previously described (16). P38 was purified to homogeneity as described elsewhere (16). Briefly, culture filtrates were alcohol fractionated and a fraction enriched in P38 was obtained. P38 was purified from this fraction by preparative elution from nitrocellulose membranes with acetonitrile after separation by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A gel purified recombinant M. leprae hsp65 was a kind gift from Dr. Alberto Palacios-Boix, (Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico City); hsp65 from M. leprae and M. tuberculosis share more than 95 %

sequence homology and are extensively cross-reactive (17).

Immunoblot

Culture filtrate proteins were separated by SDS-PAGE using a discontinuous buffer system with a 3 % stacking gel and a 10 % separating gel under reducing conditions with 2-mercaptoethanol. For immunoblot, gels were mounted in a protein transfer apparatus (Idea Scientific Co., Corvallis, OR) and transferred to nitrocellulose paper sheets (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The sheets were blocked with 3 % BSA in PBS-Tween 0.3 % and incubated for 3 h with test sera diluted 1/10. After washing, the strips were treated for 90 min with Protein A labelled with horseradish peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). H_2O_2 and 4-chloro-1-1-naphtol were used to reveal peroxidase.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Sera were processed in one session and included two replicates per serum. Immulon II microtitre plates (Dynatech Industries, McLean , VA) were used. Wells were sensitized overnight with 0.5 μ g of antigen in 100 μ l carbonates buffer, pH 9.6 at 37°C. Blocking of possible remaining active sites on the plastic was done with 1% BSA in PBS for 30 min at 37°C. Test sera diluted 1/1000 were applied to the wells for 1 h at 37°C. After rinsing, Protein A labelled with horseradish peroxidase was added to reveal bound antibodies. Peroxidase was developed by adding 100 μ l of 1 mg/ml orthophenyldiamine and 0.03 % H_2O_2 in citrate buffer 0.1 M, pH 4.5 for 4 min at 37°C. The reaction was

stopped with 50 μ l of 1N sulphuric acid. Optical density readings at 490 nm were done in a Behring automatic ELISA processor. Statistical differences among groups were assessed by Fisher's exact test.

Measurement of agalactosyl IgG in sera.

Sera from five patients with acute arteritis and from 9 with inactive disease were analyzed. The % agalactosyl IgG was measured using a monoclonal antibody (GN7) to terminal N-acetylglucosamine in a modification of the immunoassay described elsewhere (12) in which 96 well microelisa plates (Maxisorb, Nunc, Roskilde, Denmark) were substituted for the nitrocellulose combs. A series of standard sera, of which the % agalactosyl oligosaccharides had previously been determined biochemically (14), were a gift from Dr. T. Rademacher, Glycobiology Unit, Department of Biochemistry, Oxford. The % agalactosyl IgG in unknown sera was determined by interpolation into the standard curve generated from these standards. Since the normal values for % agalactosyl IgG show some variation with age (18) the data are normalised by subtraction of the mean value from normal donors of the same age, as described previously (15)

RESULTS

Clinical findings in 13 patients with Takayasu's arteritis.

In all patients the main symptoms were related to occlusive arterial disease. In Table 1, additional clinical data and pertinent laboratory findings are presented. Twelve patients were female and two were male. Age ranged from 6 to 50 years. Panaortography performed on first admission allowed classification of cases according to the vessels involved (19). Eight patients had type III arteritis with involvement of the thoracoabdominal aorta and the aortic arch branches. Type II arteritis was diagnosed in two patients with lesions in thoracic, descending, and abdominal aorta. Two patients had type I arteritis with involvement of the aortic arch and its branches. There was only one patient with lesions in the pulmonary arteries (Type IV arteritis). According to established criteria (20), five patients were considered to be in the early or active phase of the disease (cases 1, 2, 3, and 4) and 9 were in inactive or chronic phase. Patients with active disease had shorter evolution periods (1 to 8 years), increased WBC and platelet counts, increased erythrocyte sedimentation rates, positive protein C reactive, and increased gammaglobulin serum levels. Additional clinical data in patients with active phase disease were arthritis in three, fever in two and erythema nodosum in one. Rheumatoid factor was positive in only one case and the fluorescent antinuclear test was negative in all 13 cases. In patients with inactive disease, laboratory data was unrewarding except by an increase in gammaglobulin serum levels

seen in three cases. Positive skin-test responses to PPD were elicited in the eight patients in whom the test was performed. None of the patients had been BCG vaccinated. A history of chronic contact with tuberculous individuals was obtained in two patients. Tuberculosis was documented in only one patient by histopathological examination of an enlarged cervical node (case 11). In the remaining 13 patients there was no clinical or radiological evidence of tuberculosis.

Immunoblot demonstration of humoral immunity to Mycobacterium tuberculosis in patients with Takayasu's arteritis.

Due to shortage of serum only nine sera were subjected to this analysis. In all sera there were antibodies reacting with a variable number of bands present in the M. tuberculosis culture filtrate (Fig. 1, TA). All nine sera recognized, with high intensity, a band of 60kDa and a double protein band of 31-30 kDa. The 38kDa antigen was recognized by five sera and seven sera reacted with a 36kDa band. Several other bands were recognized less frequently. The immunoblot pattern of sera from five patients with active pulmonary tuberculosis was similar to that of patients with Takayasu's arteritis (Fig. 1, TB). Band reactivity was rare in sera from healthy controls (Fig. 1,C) even from PPD positive individuals (not shown).

Raised antibody levels to mycobacterial antigens in Takayasu's arteritis demonstrated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

These studies included 13 sera from patients with

Takayasu's arteritis, 25 tuberculosis sera and 25 control sera. Taking as cutoff point two standard deviations above the mean optical density of control sera, positive titers were demonstrated in the great majority of Takayasu's arteritis patients regardless of the antigen used for the ELISA (Fig.2). Positive titers to whole antigens, to P38 and to hsp65 were found in 69, 77 and 83 % of patients, respectively. In most sera titers were equally positive with the three assays (Table 2). Using Fisher's exact test, differences relative to control sera were found to be highly significant (whole antigens, $p < 0.004$; P38, 0.000006 ; hsp65 $p < 0.000003$). The optical density of the four sera with active arteritis was much higher than that of sera of patients with inactive disease (Table 2). In pulmonary tuberculosis positive titers to whole antigens, to P38 and to hsp65 were found in 92, 72 and 76 % of sera, respectively. As expected, highly significant differences between control and tuberculosis sera were found with the three assays (whole antigens, $p < 0.00000001$; P38, $p < 0.0000004$; hsp65, $p < 0.0000001$). No significant differences were found between Takayasu's arteritis and tuberculosis sera. It should be noted, however, that antibody levels to P38 and to hsp65 were higher in sera of patients with active arteritis than in all tuberculosis sera.

% agalactosyl IgG in serum from patients with Takayasu's arteritis

The values for 8 of the nine cases of inactive Takayasu's arteritis fell within 2 standard deviations of the mean value for normal donors of the same age (18). These eight patients had no

concurrent tuberculosis. A ninth patient with inactive Takayasu's disease had active lymph-node tuberculosis, and as expected, a raised value for % agalactosyl IgG. In contrast 4/5 cases of active Takayasu's arteritis, had markedly raised levels, and the 5th active patient's level was borderline, being 8.1 % ($>SD < 2xSD$) above the normal. Levels tended, as expected, to be raised in the patients with tuberculosis and Crohn's disease included as positive controls.

DISCUSSION

In this paper we document an enhanced anti-mycobacterial humoral immunity in patients with Takayasu's arteritis. By immunoblot, the banding pattern was comparable to that of patients with pulmonary tuberculosis. By ELISA using unfractionated culture filtrate antigens and two pure protein antigens, antibody levels were significantly higher in sera of patients with Takayasu's arteritis than in control sera and similar or even higher than those of patients with pulmonary tuberculosis.

The present data showing that patients with Takayasu's arteritis are sensitized to M. tuberculosis correspond to the reported PPD response (3), also observed in our cases, the frequent association with tuberculosis (4,5) and the isolated reports describing a response to antituberculous chemotherapy (21). Antimycobacterial immunity in our patients is not related to the coexistence of a classical tuberculosis infection or to BCG vaccination. Indeed, tuberculosis was ruled out in all but one patient, who, like all other patients studied, had not been BCG vaccinated. Raised antibody titers to mycobacterial antigens are not related to hypergammaglobulinemia since high titers were seen in a patient with normal serum gammaglobulin levels (case 4) and three patients with hypergammaglobulinemia had low antibody titers (cases 8,9, and 10).

P38 and hsp65, targets of the immune response of patients with Takayasu's arteritis, are biologically important

mycobacterial moieties. P38 is an immunodominant antigen with a high potential for the serodiagnosis of tuberculosis (16). By ELISA, positive titers are found in 83 % of patients with smear-positive pulmonary tuberculosis (22). Antibody titers in healthy individuals, whether PPD reactives, BCG vaccinated, or in contact with tuberculous patients are usually negative (16,22). The adequate performance of P38 as a serodiagnosis reagent is perhaps related to the fact that it is an antigen restricted to M. tuberculosis and M. bovis (23). The other antigen recognized by serum antibodies of patients with Takayasu's arteritis, hsp65, is the most intensely studied mycobacterial protein. It first focused attention for its high immunogenicity at humoral and cellular levels (24). Later, hsp65 was shown to be a member of the heat shock or stress protein family, homologous to Gro E1 of Escherichia coli (25) and to a mammalian protein (26). More recently, the role of this protein in autoimmunity has attracted much interest. Adjuvant arthritis, a model of rheumatoid arthritis, can be transferred into naive rats by T-cell clones specific for mycobacterial hsp65 (27). The arthritogenic epitope on hsp65 was identified and shown to be present in the glycosaminoglycan short core protein of cartilage (28). Thus, molecular mimicry seems to be the underlying mechanism in the autoimmune phenomena of adjuvant arthritis. A similar role for mycobacterial hsp65 in human rheumatoid arthritis is now suspected. High antibody titers have been reported (29) and synovial T cells from patients with early disease may respond to hsp65 (30).

Although the etiopathogenesis of Takayasu's arteritis could be

heterogeneous, a role for mycobacteria should be strongly suspected. Takayasu's arteritis and tuberculosis coexist in some patients (4,5), while others, as the majority of ours, are free of the infection. The strongest evidence these infection-free patients have of a previous contact with the tubercle bacillus is a strong antimycobacterial immunity demonstrable serologically and by tuberculin testing. However their strikingly raised percentage of circulating agalactosyl IgG may also point to a mycobacterial aetiology, and it emphasises the increasing numbers of links between the bacterial genus and diseases which seem superficially to be autoimmune. Parekh et al (14) demonstrated in 1985 that in rheumatoid arthritis there is a loss of terminal galactose from the oligosaccharides found on conserved glycosylation sites on the CH2 domain of the IgG heavy chain, resulting in an increased percentage of the agalactosyl glycoform of IgG (14). This change in glycosylation is due to decreased activity of galactosyltransferase in B cells (31). It has become apparent that the same glycosylation change occurs to a similarly striking degree only in a restricted and provocative group of conditions. First, it is seen in inflammatory bowel disease, particularly in Crohn's disease (15). Secondly, it is seen in tuberculosis (11) and in leprosy patients with erythema nodosum leprosum (12). Finally, it is seen in the rodent models of arthritis (13), which as discussed above, are characterized by responsiveness to the mycobacterial hsp65. Thus raised agalactosyl IgG links together a group of human and rodent diseases, all of which can be accompanied by arthritis (32,33), and all of which either are

mycobacterial, or have been linked tentatively with mycobacteria in the last few years (13). The addition of Takayasu's arteritis to the exclusive list of diseases with raised agalactosyl IgG is of particular interest because this condition has superficially autoimmune manifestations, and a lack of demonstrable organisms and yet the involvement of mycobacteria in one way or another, is quite clear.

What then is the pathogenesis? It is possible that, as in adjuvant arthritis, in patients with Takayasu's arteritis mycobacterial hsp65 might elicit cross-reactive autoimmunity having as target the arterial wall. A possible role of the response to hsp65 as a disease mechanism is suggested by the fact that antibody titers to this protein were much higher in active than in inactive arteritis. Additional observations related to the potential role of hsp65 in Takayasu's arteritis are the high frequency of arthritis in the active phase of the disease (6), the abundance of glycosaminoglycans in the adventitia of large arteries and the high similarity of joint and arterial wall glycosaminoglycan short core proteins (34), which at least in rodents are the apparent target of hsp65 induced cross-reactive immunity. However this is far less clear in relation to human disease (35), and further studies of rheumatoid arthritis and Takayasu's arteritis are needed.

REFERENCES

- 1.- Nasu T. Pathology of pulseless disease. A systematic study and critical review of twenty-one autopsy cases reported in Japan. *Angiology* 1962; 14: 225-42.
- 2.- Judge R, Currier R, Gracie W. Takayasu's arteritis and the aortic arch syndrome. *Am J Med* 1962; 32: 379-92.
- 3.- Lupi-Herrera E, Sanchez-Torres G, Castillo-Puga V. Reactividad cutánea al PPD y a los antígenos de mycobacterias atípicas (*kansasii*, *avium* y *fortuitum*) en pacientes con arteritis inespecífica. *Arch Invest Cardiol Mex* 1972; 42: 717-25.
- 4.- Lupi-Herrera E, Sánchez-Torres G, Marcusamer J. Takayasu's arteritis: Clinical study of 107 cases. *Am Heart J* 1977; 93: 94-103.
- 5.- Kinare SG. Aortitis in early life in India and its association with tuberculosis. *J Pathol* 1970; 100: 69-6.
- 6.- Ask-Upmark E. On the pulseless disease outside of Japan. *Acta Med Scand* 1954; 149: 161-78.
- 7.- Sanching H, Welin G. Aortic arch syndrome with special reference to rheumatoid arthritis. *Acta Med Scand* 1961; 170: 1-19.
- 8.- Miller G, Thomas M, Med W. Aortic arch syndrome and polymyositis with LE cells in peripheral blood. *Br Med J* 1962; 1: 771-72.
- 9.- Roth L, Kissane J. Panaortitis and aortic vasculitis in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Am J Clin Pathol* 1964; 41: 287-96.
- 10.- Schoenfeld Y, Isenberg D. Mycobacteria and autoimmunity.

- Immunol Today 1988; 9: 178-182.
- 11.-Rademacher T, Parekh RB, Dwek RA, et al. The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Springer Semin Immunopathol 1988; 10: 231-49.
 - 12.-Filley E, Andreoli A, Steele J, et al. A transient rise in agalactosyl IgG correlating with free IL-2 receptors during episodes of erythema nodosum leprosum. Clin Exp Immunol 1989; 76: 343-47.
 - 13.-Rook G, Lydyard P, Stanford J. Mycobacteria and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1990; 33: 431-35.
 - 14.-Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature 1985; 316: 452-57.
 - 15.-Dube R, Rook GA, Steele J, et al. Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. Gut 1990; 31: 431-44.
 - 16.-Espitia C, Cervera L, González R, Mancilla R. A 38-Kd Mycobacterium tuberculosis antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. Clin Exp Immunol 1989; 77: 373-77.
 - 17.-Young DB, Ivanyi J, Cox H, Lamb JR. The 65 kDa antigen of mycobacteria- a common bacterial protein?. Immunol Today 1987; 8: 215-19.
 - 18.-Parekh RB, Isenberg DA, Roitt IM, Dweek RA, Rademacher TW. Age-related galactosylation of N-linked oligosaccharides of human serum IgG. J Exp Med 1988; 167: 1731-36
 - 19.-Ishikawa K. Natural history and classification of occlusive

- thromboaropathy (Takayasu's Disease). *Circulation* 1978; 57: 27-34.
- 20.-Strachan R. The natural history of Takayasu's arteriopathy. *Q Med J* 1964; 33: 57-69.
- 21.-Pantell R, Goodman B. Takayasu's arteritis: the relationship with tuberculosis. *Pediatrics* 1981; 67: 84-8.
- 22.-Jackett PS, Bothlamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2313-18.
- 23.-Coates ARM, Hewitt J, Allen BW, Ivanyi J, Mitchison DA. Antigenic diversity of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* 1981; 11: 167-69.
- 24.-Thole JE, Van Schooten WC, Keulen WJ, et al. Use of recombinant antigens expressed in Escherichia coli K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65 kilodalton protein of Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun* 1988; 56: 1633-40.
- 25.-Shinnick TM, Vodkin MH, Williams JC. The Mycobacterium tuberculosis 65kD antigen is a heat-shock protein which corresponds to common antigen and to the Escherichia coli GroEL protein. *Infect Immun* 1988; 56: 446-51.
- 26.-Dudani AK, Gupta RS. Immunological characterization of a human homolog of the 65-kilodalton Mycobacterial antigen. *Infect Immun* 1989; 57: 2786-93.
- 27.-Van Eden W, Thole JE, Van der Zee R, et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T-Lymphocytes in

- adjuvant arthritis. Nature 1988; 331: 171-73.
- 28.-Van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 5117-20
- 29.-Bahr GM, Rook GAW, Al-Saffar M, Van Embden J, Stanford JL, Behbehani K. Antibody levels to mycobacteria in relation to HLA type: evidence for non-HLA-linked high levels of antibody to the 65 kD heat shock protein of M. bovis in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 1988; 74: 211-15.
- 30.-Res PC, Schaar C, Breedveld F, et al. Sinovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of Mycobacteria in early chronic arthritis. Lancet 1988; 11: 478-80.
- 31.-Axford JS, Mackenzie L, Lydyard PM, Hay FC, Isenberg DA, Roitt IM. Decreased B cell galactosyl transferase in rheumatoid arthritis. Lancet 1988; 11: 1486-88.
- 32.-Isaacs AJ, Sturrock RD. Poncet's disease -factor fiction?. A reappraisal of tuberculous rheumatism. Tubercle 1974; 55: 135-42.
- 33.-Atkin SL, Welbury RR, Stanfield E, Beavis D, Iwais B, Dick WC. Clinical and laboratory studies of inflammatory polyarthritis in patients with leprosy in Papua New Guinea. Ann Rheum Dis 1987; 46: 688-90.
- 34.-Heinegard D, Bjorne-Persson A, Coster L, Franzen A, Gardell S. The core proteins of the large and small interstitial proteoglycans from various connective tissues from distinct subgroups. Biochem J 1985; 230: 181-94.

35.-Res PC, Orsini DL, van Laar JM, Janson AA, Abou-Zeid C, deVires RR. Diversity in antigen recognition by Mycobacterium tuberculosis reactive T cells clones from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Eur J Immunol 1991; 21: 1297-302.

LEGENDS

Figure 1. Immunoblot with whole M. tuberculosis culture filtrates showing antigen band recognition by serum samples from patients with Takayasu's arteritis (TA), pulmonary tuberculosis (TB) and healthy controls (C). The molecular mass in kilodaltons (kDa) of the recognized bands is indicated on the left.

Figure 2. Serum antibody levels to mycobacterial antigens measured by ELISA in 13 patients with Takayasu's arteritis (TA), 25 with pulmonary tuberculosis (TB) and 25 healthy controls (C). Assays were performed with whole Mycobacterium tuberculosis culture filtrate antigens (whole antigens), a purified 38-kilodalton M. tuberculosis protein (P38) and a Mycobacterium leprae recombinant heat-shock protein of 65 kilodaltons (HSP65). In the TA columns, solid circles indicate patients with active arteritis and open circles patients with inactive arteritis. To define positive titers a cutoff point of two standard deviations above the mean optical density of control sera was chosen (horizontal lines).

Figure 3. The difference between the % agalactosyl IgG determined by immunoassay, and the mean value for normal donors of the same age. The variation in normals gives $\pm 2xSD$ of $\pm 10\%$. The patient with raised % agalactosyl IgG in the group with inactive arteritis (●), also had active lymph-node tuberculosis.

TABLE I. CLINICAL AND LABORATORY DATA IN 13 PATIENTS WITH TAKAYASU'S ARTERITIS.

Patient No.	Sex	Age	Classification by Angiography	Duration of Illness (yrs)	Reaction to PPD	Additional Clinical Data	Laboratory Findings
ACTIVE ARTERITIS							
1	F	29	III	8	+	erythema nodosum	↑ P, ↓Hb, ↑ESR PCR +, RhF+, ↑ gamma G
2	M	17	III	1	+	fever, arthritis	↑ WBC, ↑P, ↓ Hb PCR+, ↑gamma G
3	F	26	III	3	+	arthritis	↑ WBC, ↑ P, ↓ Hb ↑ ESR, ↑gamma G
4	F	35	I	2	+	fever, arthritis	↑ WBC, ↓ P, ↓ Hb PCR+
INACTIVE ARTERITIS							
5	F	40	III	20	ND		
6	F	50	III	25	ND		
7	F	32	I	10	+		
8	F	35	IV	11	ND	tuberculosis in a cervical node	↑ gamma G
9	F	30	III	15	+		↑ gamma G
10	F	43	III	29	+		↑ gamma G
11	M	18	II	?	ND		
12	F	35	II	13	ND		
13	F	31	III	14	+		

PPD denotes purified protein derivative, P platelets, Hb hemoglobin, ESR erythrocyte sedimentation rate, PCR protein C reactive, RhF rheumatoid factor, gamma G serum gamma globulins, WBC white blood cells, ND not done.

Table 2. Optical density readings at 490 nm by ELISA with whole antigens, P38 and hsp65 in 13 patients with Takayasu's arteritis, four of them with active disease.

Patient no.	Clinical status	Whole	Antigens		
			P38 antigens		hsp65
1	Active		1.600	1.390	1.768
2	Active		1.050	.214	.632
3	Active		1.600	1.413	1.770
4	Active		1.600	1.123	1.770
5	Inactive		.354	.181	.537
6	Inactive		.498	.159	.619
7	Inactive		.786	.186	.593
8	Inactive		.504	.218	.557
9	Inactive		.411	.053	.332
10	Inactive		.459	.116	.524
11	Inactive		.643	.256	.545
12	Inactive		ND	.272	ND
13	Inactive		.424	.083	.331

ND denotes not done. By Fisher's exact test relative to control sera: whole antigens $p < 0.004$, P38 $p < 0.000006$, hsp65 $p < 0.000003$.

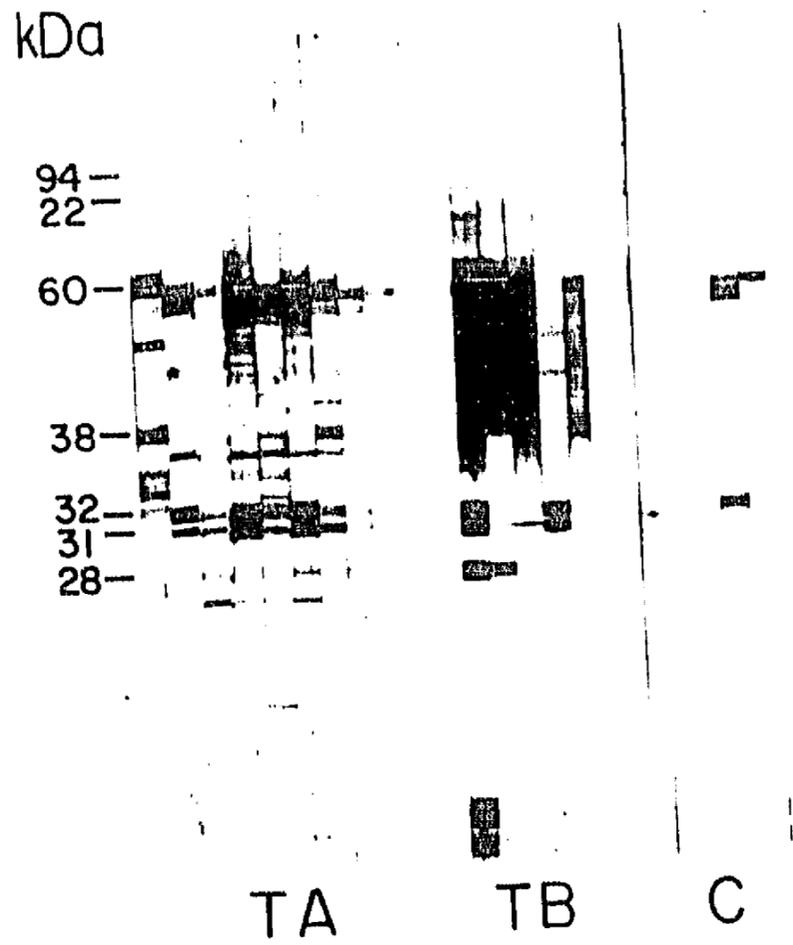


Fig 1.

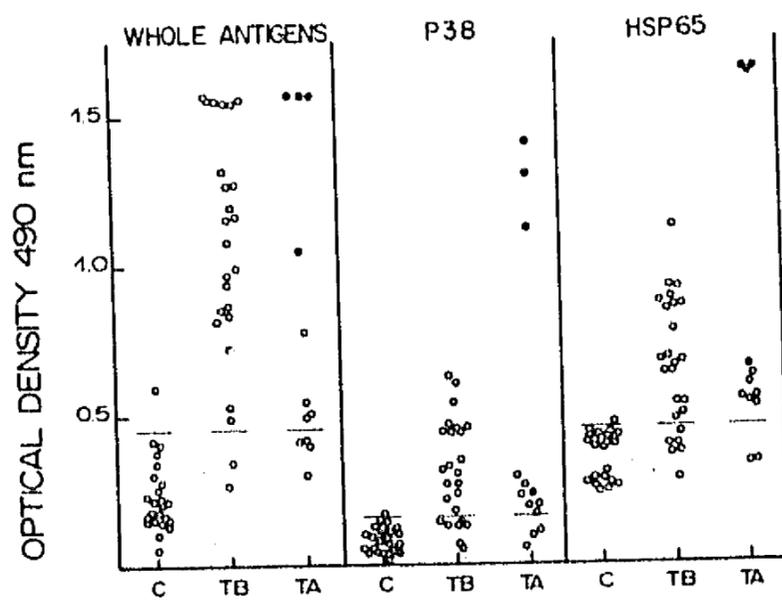


Fig 2.

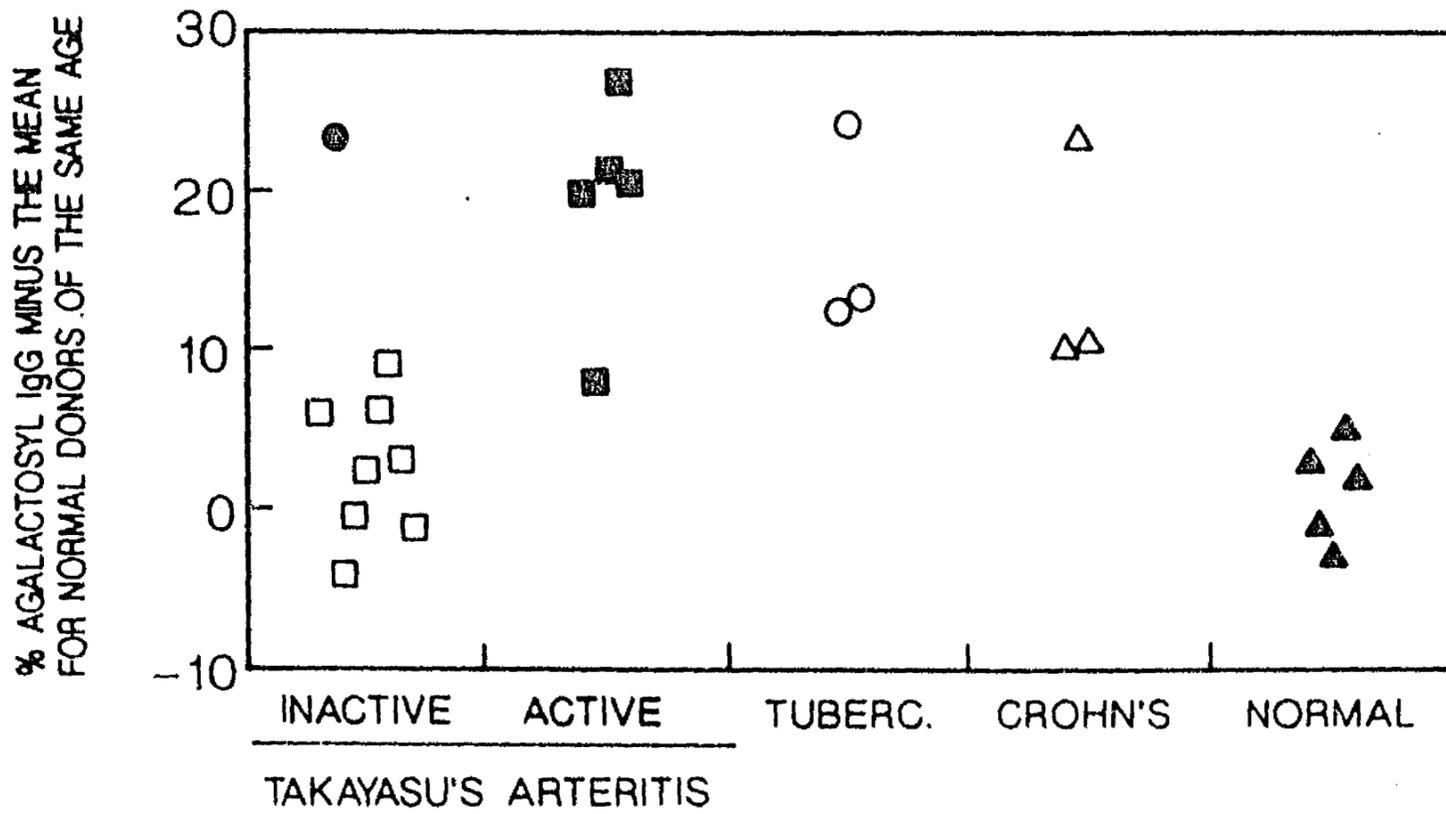


Fig 3.

Phosphate Starvation Enhances Expression of the Immunodominant 38-Kilodalton Protein Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: Demonstration by Immunogold Electron Microscopy

CLARA ESPITIA,¹ MARTHA ELINOS,¹ ROGELIO HERNÁNDEZ-PANDO,² AND RAÚL MANCILLA^{1*}

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228,¹ and Departamento de Patología, Instituto Nacional de Enfermedades de la Nutrición,² Mexico City, Distrito Federal, Mexico

Received 10 January 1992/Accepted 23 April 1992

In this work, we grew *Mycobacterium tuberculosis* in an enriched Proskauer-Beck-Youmans culture medium in the presence and in the absence of phosphate salts. Immunoblot analysis of sonic extracts showed overexpression of the 38-kDa protein antigen by bacilli grown in the medium without phosphate. These observations were confirmed by immunogold electron microscopy, which showed that the number of gold particles was significantly higher in bacilli grown in medium without phosphate than in bacilli grown in medium with phosphate. The 38-kDa protein was located mainly in the wall and on the cell surface.

The amount of information about the molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* has greatly increased in recent years because of the advent of sophisticated methods for the purification and analysis of proteins. Among the mycobacterial molecules, the 38-kDa protein antigen (P38) has attracted much interest, since it shows high immunogenicity at the B-cell (6) and T-cell (7) levels. At present, P38 is perhaps the antigen with the highest potential for the serological diagnosis of tuberculosis (6, 9, 15). Attention has been focused on P38 recently because of its possible role in phosphate metabolism. The gene coding for P38 was cloned and sequenced, and a 30% amino acid sequence homology with the phosphate-binding protein PhoS from *Escherichia coli* was found (2). Furthermore, as shown by immunoblotting, phosphate-starved bacilli overproduce P38 (3). In this study, we have documented by immunogold electron microscopy an enhanced level of expression of P38 by bacilli grown in medium without phosphate.

M. tuberculosis H37/Rv was first grown on the synthetic medium of Proskauer and Beck as modified by Youmans (PBY medium). At the end of 4 to 6 weeks of culture, bacilli were transferred to PBY medium enriched with 0.5% bovine serum albumin (BSA), 7.5% glucose, and 0.05% Tween 80. These supplements were added to obtain faster and more dispersed growth of bacilli. The cultures were incubated at 37°C in a New Brunswick R86 water bath reciprocal shaker at 75 rpm. After incubation, the optical density at 460 nm was read. In this medium, the logarithmic phase of growth usually starts at 5 days of culture, and the stationary phase is reached 5 days later.

To study the effects of phosphate deprivation, 40-ml samples of bacilli were taken at the mid-logarithmic phase of growth, washed by repeated centrifugation, and transferred to enriched PBY medium with or without phosphate. The pH of the medium without phosphate was adjusted to 6.8 with Tris-HCl (pH 7.6). At the end of the culture period, the bacilli were harvested, and, since the bacilli grew faster in medium with phosphate, the culture was diluted so that it had an optical density identical to that of the culture without

phosphate. For immunoblotting, the bacilli were rinsed by centrifugation at 2,500 × g, placed in electrophoresis cocktail (62 mM Tris [pH 6.8], 2% [wt/vol] sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.7% 2-mercaptoethanol), boiled for 15 min, and sonicated. After centrifugation, the proteins in the supernatants were separated in SDS-10% polyacrylamide gels by the method of Laemmli (10). The gels were transferred to nitrocellulose sheets (Bio-Rad, Richmond, Calif.) according to the method of Towbin et al. (14). Thereafter, the nitrocellulose sheets were treated overnight with 3% BSA in phosphate-buffered saline (PBS)-Tween 20. After being rinsed, the strips were incubated for 2 h at room

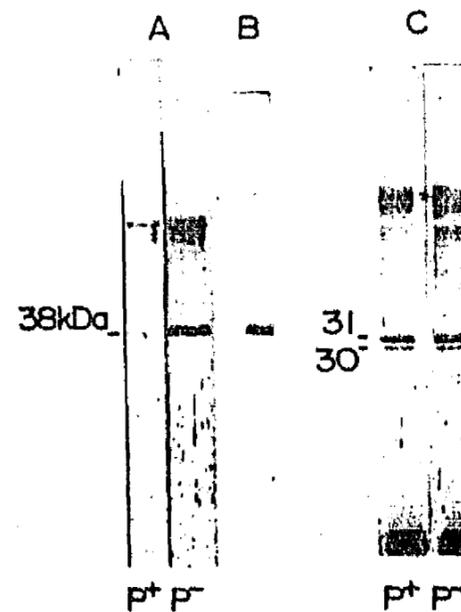


FIG. 1. Immunoblot of sonicated bacilli grown with (P⁺) or without (P⁻) phosphate and harvested at 12 h of culture. The bands were revealed with a monospecific mouse antiserum to P38. Overexpression of the 38-kDa band in bacilli grown without phosphate was clearly observed (A). The upper bands probably represent artifacts induced by 2-mercaptoethanol, since they appear regardless of the antiserum used (4). The overexpressed antigen was recognized by monoclonal antibody TB71 (B). There were no differences seen on immunoblots whose bands were revealed with an antiserum against Fn 30-31 (C).

* Corresponding author.

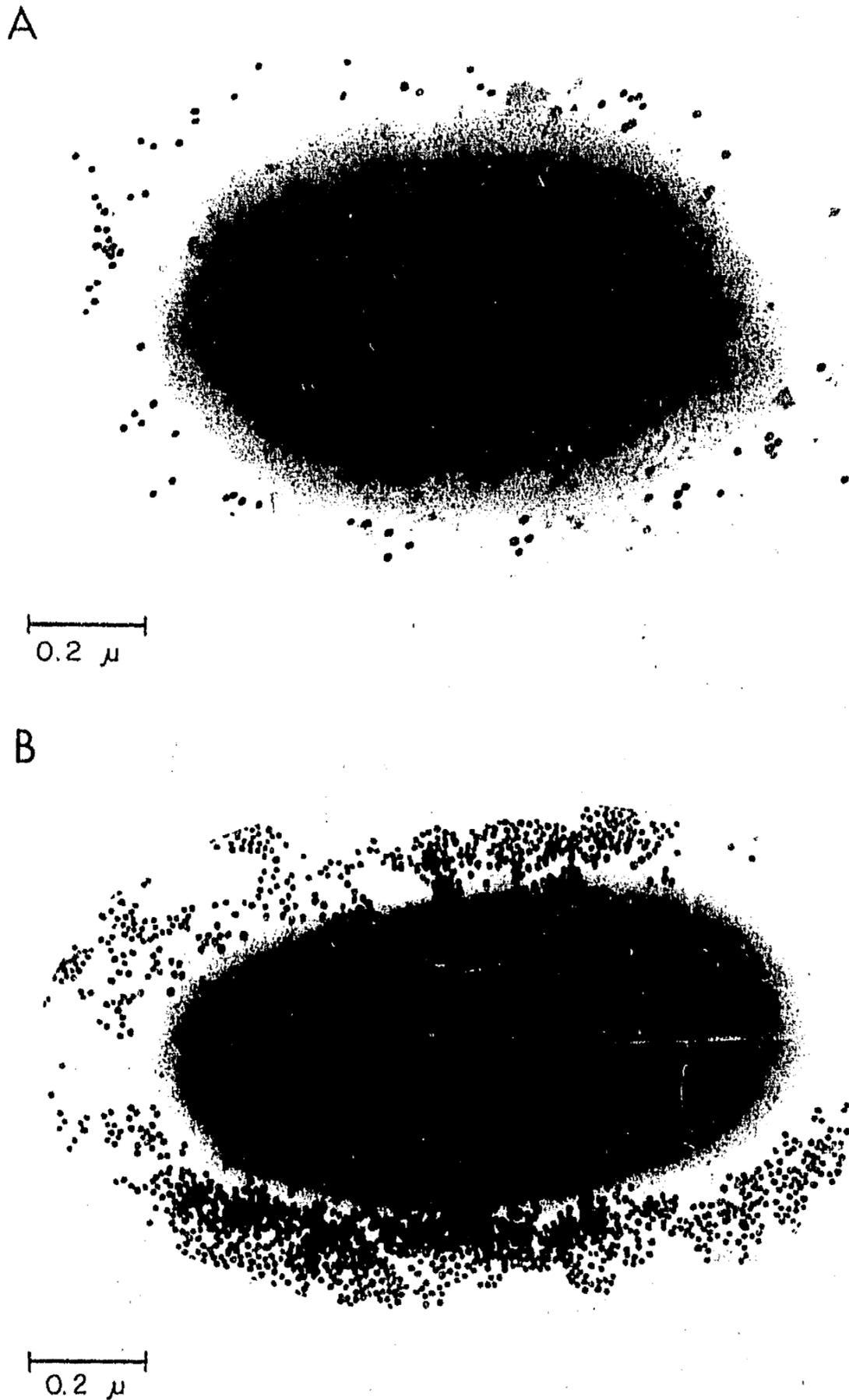


FIG. 2. Electron micrographs illustrating the expression of P38 in bacilli grown with (A) and without (B) phosphate. Bacilli harvested at 12 h of culture were fixed in glutaraldehyde and embedded in LR-White. After dewaxing, ultrathin sections were incubated first with a mouse antiserum to P38 and then with a goat antiserum to mouse IgG and IgM labelled with 15-nm gold particles. The number of gold particles in bacilli grown without phosphate (B) was higher than that in bacilli grown with phosphate (A).

temperature with various antibodies. These included the TB71 monoclonal antibody and polyclonal mouse antisera to P38 and to the fibronectin-binding antigen of 30 to 31 kDa (Fn 30-31). These antisera were obtained from mice immu-

nized with the purified proteins incorporated into nitrocellulose. These antisera were shown to be monospecific by immunoblotting of whole *M. tuberculosis* extracts (not shown). The bound antibodies were detected with a goat

anti-mouse immunoglobulin G (IgG) antibody labelled with horseradish peroxidase (Zymed Laboratories, South San Francisco, Calif.), and by treatment of the strips with H_2O_2 and 4-chloro-1-naphthol. With the mouse antiserum to P38, the intensity of the P38 band was much higher for bacilli grown in medium without phosphate than for those grown in medium with phosphate. This effect was clearly observed at 9 and 12 h of culture (Fig. 1A). In immunoblots of bacilli harvested at 3, 6, 15, 18, and 21 h, no obvious differences were observed. The identity of the induced antigen was confirmed with the TB71 monoclonal antibody (Fig. 1B), which recognizes the *M. tuberculosis* 38-kDa protein antigen (16); this antibody was kindly donated by J. Ivanyi, Hammersmith Hospital, London, England. On immunoblots whose bands were revealed with a monospecific polyclonal mouse antiserum against Fn 30-31, this antigen was expressed equally in bacilli grown with and without phosphate (Fig. 1C). Thus, it appears that phosphate starvation affects mainly P38 synthesis.

To further analyze the effects of phosphate starvation on P38 expression, we examined bacilli cultured for 12 h by immunogold electron microscopy. This technique has proven very useful in metabolic studies of other bacteria (1, 13). The bacilli were extensively washed and fixed in 1% glutaraldehyde in Sorensen buffer (pH 7.4) for 1 h at 4°C. Free aldehyde groups were blocked with 0.5 M NH_4Cl in PBS for 1 h. Postfixation with OsO_4 was omitted. The bacilli were embedded in LR-White (Polysciences, Inc., Warrington, Pa.), and ultrathin sections were cut out and placed on Formvar-coated 300-mesh nickel grids (Electron Microscopy Sciences, Washington, Pa.). The grids were incubated with monoclonal antibody TB71 or with the polyclonal antiserum to P38 or to Fn 30-31. A goat antibody to mouse IgM and IgG conjugated to 15-nm gold particles (Amersham, Braunschweig, Germany) and diluted 1/30 in PBS was used as a secondary antibody. Electron micrographs at a magnification of $\times 16,000$ were taken, and the number of gold particles in 20 consecutive randomly photographed bacilli was counted with a Hewlett-Packard 9874A digitizer and expressed as the number of gold particles per square micrometer of bacillary surface. In control grids, antibodies were omitted or replaced by normal mouse serum. A higher level of expression of P38 in phosphate-starved bacilli was detected with TB71 and with the antiserum to P38. With the latter, there were 573.4 ± 224.2 gold particles per μm^2 in bacilli grown in medium with phosphate (Fig. 2A), while there were $1,567.1 \pm 1,413.2$ particles per μm^2 in phosphate-deprived bacilli (Fig. 2B). These differences were significant according to the Mann-Whitney test ($P < 0.05$). In contrast, no significant differences in the number of gold particles were observed in experiments using the antibody against Fn 30-31 (with phosphate, 549.4 ± 185.4 gold particles per μm^2 ; without phosphate, 676.5 ± 187.9 gold particles per μm^2). The distribution of data is illustrated in Fig. 3. Our immunogold electron microscopy studies add support to previous observations implicating P38 in phosphate metabolism (3). In addition, these studies have shown for the first time the topographical distribution of this important mycobacterial moiety. The gold particles were located mainly in the wall and on the outer surface of the bacilli. This location is in accordance with the possible role of P38 in phosphate metabolism (3), with its high immunogenicity (6, 7), and with studies suggesting that P38 is a secretion antigen (2).

Despite the great resolving power of immunoelectron microscopy, this tool has seldom been used to investigate the subcellular distribution of mycobacterial moieties. Li-

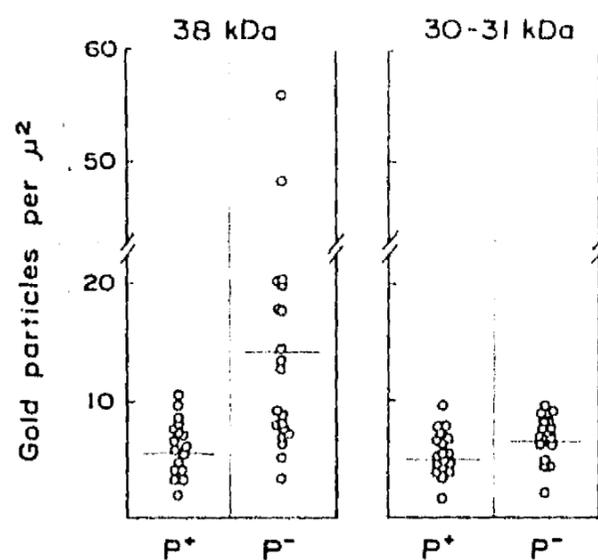


FIG. 3. Dot diagram illustrating the immunogold findings. Gold particles in 20 randomly chosen bacilli were counted, and the number of particles per square micrometer was estimated with a Hewlett-Packard 9874A digitizer. Although the distribution of gold particles in phosphate-deprived bacilli was very uneven, the difference was significant according to the Mann-Whitney test. The levels of expression of Fn 30-31 in bacilli grown with and without phosphate were similar. P⁺, bacilli grown with phosphate; P⁻, bacilli grown without phosphate.

poarabinomannan, an abundant cell wall component, was found to be distributed as a loose capsulelike material around *M. tuberculosis* bacilli (8). The phenolic glycolipid of *M. leprae* was shown to be localized mainly in the cell wall (5). The 65-kDa heat shock protein, which is believed to be a cell wall component on the basis of cell fractionation studies, was found to be mainly cytoplasmic by immunoelectron microscopy (12). As expected from previous studies, the 29- to 33-kDa fibronectin-binding antigen of *M. tuberculosis* was shown to be present in the cell wall and on the cell surface (11). The knowledge derived from these other studies and from ours could help to define better the biologic role of mycobacterial molecules in host-bacterium interactions.

We thank E. Lamoyi for his critical review of the manuscript and J. M. Perez for helping with the statistical analysis.

REFERENCES

1. Anba, J., J.-M. Pages, A. Bernadac, and C. Lazdunski. 1987. New insights into the export machinery through studies on the synthesis of phosphate-binding protein in *Escherichia coli*, p. 73-77. In A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and E. Yagil (ed.), *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Andersen, A. B., and E. B. Hansen. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 57:2481-2488.
3. Andersen, A. B., L. Ljungqvist, and M. Olsen. 1990. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 136:477-478.
4. Bjerrum, O. J., K. P. Larsen, and N. H. H. Heegaard. 1988. Specificity problems and troubleshooting with an atlas of immunoblotting artifacts, p. 227-254. In O. J. Bjerrum and N. H. H. Heegaard (ed.), *Handbook of immunoblotting of proteins*, vol. 1. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
5. Boddington, J., and H. Dijkman. 1990. Subcellular localization of *Mycobacterium leprae*-specific phenolic glycolipid (PGL-I)

- antigen in human leprosy lesions and in *M. leprae* isolated from armadillo liver. *J. Gen. Microbiol.* 136:2001-2012.
6. Espitia, C., I. Cervera, R. González, and R. Mancilla. 1989. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin. Exp. Immunol.* 77:373-377.
 7. Haslov, K., A. B. Andersen, L. Ljungqvist, and M. Weis Bentzon. 1990. Comparison of the immunological activity of five defined antigens from *M. tuberculosis* in seven inbred guinea pig strains: the 38 kDa antigen is immunodominant. *Scand. J. Immunol.* 31:503-507.
 8. Hunter, S. W., and P. J. Brennan. 1990. Evidence for the presence of phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 265:9272-9278.
 9. Jackett, P. S., G. H. Bothamley, H. V. Batra, A. Mistry, D. B. Young, and J. Ivanyi. 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 26:2313-2318.
 10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
 11. Rambukkana, A., P. K. Das, A. Chand, J. G. Baas, D. G. Groothuis, and A. H. J. Kolk. 1991. Subcellular distribution of monoclonal antibody defined epitopes on immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* proteins in the 30-kDa region: identification and localization of 29/33-kDa doublet proteins on mycobacterial cell wall. *Scand. J. Immunol.* 33:763-775.
 12. Thole, J. E. R., P. Hindersson, J. de Bruyn, F. Cremiers, J. van der Zee, H. de Cock, J. Tommassen, W. van Eden, and J. D. van Embden. Antigenic relatedness of a strongly immunogenic 65 kDa mycobacterial protein antigen with a similarly sized ubiquitous bacterial common antigen. *Microb. Pathog.* 4:71-83.
 13. Tingli, G., A. Ghosh, and B. K. Ghosh. 1984. Subcellular localization of alkaline phosphatase in *Bacillus licheniformis* 749/C by immunoelectron microscopy with colloidal gold. *J. Bacteriol.* 159:668-677.
 14. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
 15. Wilkins, E. G. L., and J. Ivanyi. 1990. Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet* 336:641-644.
 16. Young, D., L. Kent, A. Rees, J. Lamb, and J. Ivanyi. 1986. Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 54:177-183.