



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

INDUCCIÓN IN VITRO DE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE DE  
CELULAS DE PACIENTES TUBERCULOSOS REACTIVOS POR  
SUERO DE PACIENTES TUBERCULOSOS NO REACTIVOS

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P r e s e n t o



OLIVIA VACA GARCIA

México, D. F.

Noviembre, 1965



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
HIPOTESIS	12
OBJETIVO	12
ESTRATEGIA	13
MATERIAL Y METODOS	14
Poblaciones estudiadas	14
Biológicos	14
Antígenos	20
Mitógeno	20
Reactivos y soluciones	21
Estudio humoral	23
Estudio celular	23
Tratamientos adicionales	26
Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
DISCUSION	49
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	63

## I N D I C E D E T A B L A S

Tabla 1	DATOS GENERALES DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS	15
Tabla 2	DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES REACTIVOS PPD <sup>+</sup>	16
Tabla 3	DATOS NO INMUNOLOGICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS	28
Tabla 4	DATOS INMUNOLOGICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS	29
Tabla 5	CUANTIFICACION DE ANTICUERPO ANTI- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Tabla 6a	INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (c.p.m.) POST TRATAMIENTO DE LAS CELULAS CON 200 ug PROTEINA DE SUERO	38
Tabla 6b	INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (c.p.m.) POST TRATAMIENTO DE LAS CELULAS CON 400 ug PROTEINA DE SUERO	39
Tabla 7	ANALISIS ESTADISTICO DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACION BLASTOIDE CON PACIENTES TUBERCULOSOS PPD <sup>+</sup> OBTENIDOS CON LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY	41
Tabla 8	ANALISIS ESTADISTICO DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACION BLASTOIDE EN INDIVIDUOS SANOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY	44

## I N D I C E D E F I G U R A S

Fig. 1	DETECCION DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS EN LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS	32
Fig. 2	CURVAS DE DOSIS RESPUESTA AL ANTIGENO PPD EN CELULAS DE INDIVIDUOS SANOS	33
Fig. 3	CURVAS DE DOSIS RESPUESTA AL MITOGENO FITOHEMAGLUTININA (FHA) EN CELULAS DE INDIVIDUOS SANOS	34
Fig. 4	CURVAS DE DOSIS RESPUESTA AL ANTIGENO EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR REACTIVOS AL PPD	35
Fig. 5	CURVAS DE DOSIS RESPUESTA AL MITOGENO EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR REACTIVOS AL PPD	36
Fig. 6	EFECTO DEL SUERO SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL ANTIGENO EN CELULAS DE PACIENTES PPD <sup>+</sup> CON TUBERCULOSIS PULMONAR	37
Fig. 7	EFECTO DEL SUERO SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE EN CELULAS DE INDIVIDUOS SANOS	42
Fig. 8	EFECTO DEL SUERO DE UNA ENFERMEDAD RELACIONADA (HISTOPLASMOSIS) SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL ANTIGENO EN CELULAS DE PACIENTES PPD <sup>+</sup> CON TUBERCULOSIS PULMONAR	45

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 9	COMPARACION DEL EFECTO DEL SUERO INMUNE SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL MITOGENO (FHA) Y POR EL ANTIGENO EN PACIENTES PPD <sup>+</sup> CON TUBERCULOSIS PULMONAR	46
Fig. 10	COMPARACION DEL EFECTO DEL SUERO INMUNE SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL MITOGENO (FHA) Y POR EL ANTIGENO EN INDIVIDUOS SANOS	48
Fig. 11	POSIBLES MODELOS DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI- <i>Mycobacterium</i> EN LA RESPUESTA CELULAR	58
Fig. 12	POSIBLES MODELOS DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI- <i>Mycobacterium</i> EN LA RESPUESTA CELULAR	59

## RESUMEN.

Células linfoides de 20 pacientes con tuberculosis clínicamente definida por baciloscopia, estudio radiológico y positividad cutánea al PPD (2 y 4 UI) fueron cultivadas por 12 hrs en presencia de suero proveniente de pacientes tuberculosos no reactivos, conteniendo título alto de anticuerpos anti-Mycobacterium. Post incubación, las células fueron sometidas a transformación blastoide, utilizando PPD como antígeno. Células de sujetos normales PPD<sup>+</sup> y PPD<sup>-</sup> fueron utilizadas como control, así como las células de cada paciente sin contacto previo con suero. Además del suero anti-Mycobacterium se utilizaron sueros normales y de pacientes con otras enfermedades pulmonares. Las células linfoides de pacientes tuberculosos PPD<sup>+</sup> desarrollaron marcada inhibición a la estimulación con el antígeno (PPD) cuando fueron pre-incubadas con sueros de pacientes no reactivos. Las cuentas de incorporación de timidina <sup>3</sup>H Tdr bajaron considerablemente en los 20 pacientes en presencia del suero inhibidor, no así con los sueros controles

Simultáneamente se efectuaron estudios rutinarios de laboratorio, además de la caracterización de reactividad cutánea a la histoplasmina siendo esta negativa en los pacientes tuberculosos estudiados. Finalmente la cuantificación de IgM, IgG e IgA y C<sub>4</sub> estuvo dentro de los valores considerados como normales, mientras que la cantidad de C<sub>3</sub> presente en el suero de los pacientes estaba aumentada.

## INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua conocida hace más de 4000 años (1); ataca cualquier parte del cuerpo humano, aunque sus lesiones son primariamente pulmonares.

La primera demostración de que la tuberculosis correspondía a un proceso infectocontagioso, fué evidente hasta 1865 cuando Villemin produjo esta enfermedad de conejos. En 1882 el investigador alemán, Roberto Koch, aisló e identificó al agente etiológico de esta enfermedad, Mycobacterium tuberculosis (2).

La distribución de esta enfermedad es mundial, reportándose mayor incidencia en ciudades donde existen grandes núcleos de población con situación socioeconómica deficiente. En la República Mexicana, la tuberculosis aún es un grave problema de salud pública; no se conoce cual es la incidencia real, pero se estima que aproximadamente el 42.7 % de la población total padece esta infección (3).

La puerta de entrada más frecuente de M. tuberculosis, es por vía respiratoria a través de la inhalación de partículas de polvo contaminado, de ahí que el órgano más afectado sea el pulmón, donde la micobacteria encuentra las condiciones de irrigación sanguínea y aereación necesarias para producir focos inflamatorios (nódulos caseosos) en el tejido. Estas lesiones pueden estar limitadas o bien diseminarse a otras partes del organismo.

Es importante al observar el avance de la infección tuberculosa, distinguir entre una persona sin antecedentes de tuberculosis de la que ya sufrió la enfermedad con anterioridad. En el primer caso la infección es primaria, conocida como complejo primario. Se cura a menudo sin producir síntomas



definidos, debido a que la tasa de multiplicación de la micobacteria en el huésped está siendo limitada y por tanto el incremento de bacilos es bajo (4). Cuando aumenta mucho la cantidad de bacilos tuberculosos, aparece un exudado inflamatorio celular característico convirtiéndose entonces la tuberculosis primaria en neumónica. Los gérmenes se diseminan a partir del foco primario por los canales linfáticos (linfangitis) hacia los ganglios (linfadenitis), donde el bacilo se reproduce en forma activa, dando lesiones caseosas. En raras ocasiones la diseminación de la micobacteria pasa de los vasos linfáticos a los sanguíneos, con la consecuente diseminación de éstos hacia todos los órganos y tejidos del cuerpo, originando las formas generalizadas de tuberculosis miliar, meningitis tuberculosa y tuberculosis renal.

La adquisición y establecimiento de la enfermedad se encuentra en estrecha relación con la disminución de los mecanismos de defensa generalmente provocada por varias condiciones patológicas tales como: desnutrición, sarampión, tosferina, varicela, etc. (5).

El paciente que supera el proceso infeccioso presenta dos fenómenos inmunológicos importantes: primero, el individuo se vuelve positivo a la tuberculina y segundo, sus macrófagos adquieren la capacidad de inhibir la multiplicación intracelular del bacilo tuberculoso. Este hecho es la base de lo que constituye la inmunidad contra la tuberculosis (Inmunidad celular).

En ocasiones la enfermedad puede reincidir denominándose entonces tuberculosis de reinfección. Como el paciente ya ha desarrollado hipersensibilidad al bacilo tuberculoso, tendrá menos propensión a reinfectarse por una fuente exógena. La reinfección generalmente se produce por la reactivación de bacilos tuberculosos de una primoinfección antigua que se han conservado latentes (3). La tuberculosis de reinfección coincide con el cuadro de tuberculosis crónica. Las lesiones características de la tuberculosis crónica son las cavernas, las cuales se forman por fusión de los tubérculos. Ataca

primordialmente a los pulmones produciendo una lesión limitada, o bien progresa y puede producir un cuadro de tuberculosis miliar, capaz de infectar todos los órganos del cuerpo. Las infecciones extrapulmonares por metástasis pueden alcanzar diferentes órganos: bazo, huesos, riñones, próstata, piel, músculos y meninges (6). El hecho de que en algunos sujetos M. tuberculosis despierte años más tarde produciendo la reincidencia de la enfermedad tuberculosa, se debe entre otros factores a que existe una disminución en la resistencia del huésped. Actualmente, se sabe que el desarrollo de la enfermedad se debe a un problema de control de la respuesta inmune celular por parte del huésped, lo que origina una reacción exagerada, autoperpetuada y en cadena, que se traduce en daño pulmonar (7). De ahí que en la patogenia de la infección tuberculosa, exista una estrecha relación con la capacidad de respuesta inmune por parte del paciente (8).

Las consecuencias de inhalar o ingerir el bacilo de la tuberculosis dependen de la resistencia del huésped, del inóculo y de la virulencia de la cepa, la cual se basa en su capacidad para sobrevivir y proliferar en los fagocitos mononucleares evadiendo la actividad bactericida de los macrófagos al evitar la fusión de los lisosomas con los fagosomas (9), fenómeno que no se presenta con bacterias muertas (9).

La respuesta inmune en la tuberculosis se inicia por el contacto con los antígenos de M. tuberculosis, que provocan una respuesta inmunológica en un huésped competente la cual se manifiesta por la producción de anticuerpos específicos y linfocitos sensibilizados, derivados de una población de linfocitos timodependientes conocidos como linfocitos T. El predominio de dichas células en esta enfermedad, define la importancia del mecanismo de defensa celular sobre la respuesta humoral.

Los linfocitos T sensibilizados producen un gran número de mediadores solubles o linfocinas, como el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF), factores quimiotácticos y blastogénicos, linfo-toxinas e Interferon (6, 10), las cuales inician y modifican la respuesta inmunitaria por el recluta-miento de otros linfocitos (células B y T) que promueven la acumulación de macrófagos en el área de reacción, activan la fagocitosis del microorganismo por un lado y la secreción y liberación de produc-tos líticos por otro. Los macrófagos una vez activados intensifican su actividad antimicrobiana, pero si dicha estimulación es muy intensa, contribuyen en forma importante a la lesión tisular y a la necro-sis caseosa (11, 12). El daño en el tejido refleja la descarga de enzimas hidrolíticas de los macró-fagos moribundos, los cuales no pueden dejar la lesión por la acción del MIF, además los efectos inflamatorios son producidos por los mediadores de los linfocitos como las linfo toxinas y el MIF (13, 14). Esta respuesta se ve amplificada y sostenida en los macrófagos de los pacientes con tuberculosis, y parece ser debida a una alteración en el sistema de regulación de la respuesta celular, lo que se traduce en una falta de eficiencia para la eliminación del parásito por parte del sistema inmune celu-lar. Dicha alteración se cree está relacionada con la calidad más que con la magnitud de la respuesta. Esto es, está determinada por la interacción armónica entre los diferentes procesos y fenómenos que constituyen la respuesta inmune adecuada, para lo cual el aparato inmune, cuenta con mecanismos de regu-lación, los cuales actúan a diversos niveles, permitiendo que la respuesta tenga la intensidad, exten-sión y duración necesarias.

Los mecanismos de regulación de la respuesta inmune son variados y complejos. Existen varios factores que intervienen en ellos, como los de tipo genético, los de interacción celular, factores propios del antígeno, otros de índole no inmunológico como hormonas, prostaglandinas, fármacos, además de tras-tornos sistémicos (fatiga, "stress", etc.), así como la condición nutricional del huésped, y algunos factores humorales, como los complejos inmunes y particularmente los anticuerpos específicos.

Se ha hablado de la participación de factores genéticos en la susceptibilidad o resistencia a la tuberculosis. En el pasado se planteaba que la población negra era comparativamente más susceptible al desarrollo de formas severas de tuberculosis que la población blanca. Esta diferencia aparentemente "genética", era difícil de caracterizar, dadas las diferentes condiciones socioeconómicas en que vivían ambas poblaciones de individuos. En la actualidad, ya no se habla de tales diferencias de susceptibilidad, sin embargo, la participación de factores genéticos en la tuberculosis, es un hecho que ha sido demostrado por el grupo de Max B. Lurie en un modelo de tuberculosis experimental en conejos. Lurie logró establecer colonias o familias de conejos resistentes, así como de conejos susceptibles al desarrollo de la tuberculosis, además de colonias con resistencia o susceptibilidad intermedias (15,16).

Existen datos sobre la relación entre predisposición a la tuberculosis y presencia de antígenos asociados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA). Seiman, L. M. evalúa el fenotipo HLA de los locus A, B, C y DR en 50 pacientes con tuberculosis crónica de reinfección, encontrando una disminución estadísticamente significativa de A-3, A-9, B-5, B-8, B-13, B-17 y B-27, la cual abarca a muchos fenotipos y por lo menos dos locos, como para pensar en la ausencia de un gen protector (17). Por otro lado, se ha visto que el fenotipo HLA-BW15 se encuentra con alta frecuencia entre pacientes con tuberculosis (18).

La regulación por células está determinada por un círculo interdependiente entre el antígeno ---macrófago --- linfocitos T ---macrófagos --- antígeno (19). Cuando el inmunógeno interactúa con el macrófago, éste puede ser presentado a los linfocitos T produciendo tolerancia, o bien el macrófago lo digiere y produce la interleucina I que estimula a las células T inmaduras, las cuales a su vez producen y liberan la interleucina II que induce la expansión clonal de células T activadas. Los linfocitos activados inicialmente son los T ayudadores, los cuales estimulan a su vez a linfocitos B y células T

supresoras. La proliferación de las células T conduce a la diferenciación de células citotóxicas, células efectoras y células de memoria (20).

Con el desarrollo de métodos que permiten identificar las subpoblaciones de linfocitos T en función de sus diferentes alo-antígenos Lyt, y con la subsecuente diferenciación de sus funciones, es posible determinar la relación existente entre las subpoblaciones de células T responsables de la expresión de la respuesta al bacilo tuberculoso (21).

El papel central que juegan las células T en la expresión de la inmunidad contra la tuberculosis, puede ser deducido de los siguientes trabajos: - Por la incapacidad de los ratones timectomizados para expresar hipersensibilidad a la tuberculina y adquirir resistencia contra la enfermedad, después de un primer contacto con el bacilo (22). - Por la observación experimental de que ratones adultos timectomizados y sometidos a irradiación letal, desarrollan severas micobacteriosis después de una infección con BCG. - Por la rápida recuperación de los órganos linforreticulares atacados por el bacilo tuberculoso en los animales depletados de células T, cuando estos linfocitos T son reconstituidos con células de médula ósea (23). Este efecto restaurador hace más patente la contribución de la respuesta celular a la defensa contra M. tuberculosis.

Simultáneamente a la respuesta celular, se desencadena la respuesta inmune humoral. La función protectora de esta respuesta se manifiesta cuando los anticuerpos reaccionan con las estructuras que estimularon su producción, desencadenándose diferentes mecanismos que tienen como resultado final la eliminación del inmunógeno. Algunos de estos mecanismos son por ejemplo, que ciertos anticuerpos pueden neutralizar el efecto de una toxina, o bien que en colaboración con el sistema del complemento pueden perforar las membranas celulares (lisis celular), o que pueden facilitar solos o junto con el complemento el proceso fagocítico opsonizando al antígeno, promoviendo así su mejor fagocitosis.

Sin embargo, parece ser que las inmunoglobulinas tienen un papel secundario en la defensa contra M. tuberculosis, por ser este un parásito intracelular (24). En efecto, el bacilo tuberculoso puede ser fagocitado en virtual ausencia del suero (25). La adición de anticuerpo específico contra Mycobacterium justo antes de su exposición a fagocitos normales, incrementa la ingestión y el grado de fusiones fagosoma-lisosoma, pero no tiene efecto discernible sobre la subsecuente actividad bactericida intracelular (26).

Aunque los anticuerpos no participan directamente en estos fenómenos de gran importancia para la eliminación del bacilo, no se descarta otra posible función en este proceso infeccioso. Quizá jueguen un papel como moléculas reguladoras de la respuesta inmune celular como se sugiere en los modelos de respuesta inmune a háptenos simples, y en modelos infecciosos (27 - 32).

La interacción entre la respuesta celular y la humoral, puede producirse ya sea en la fase de inducción y/o en el mecanismo efector de la respuesta inmune. Se plantea que los anticuerpos participan dentro de esta interacción como "moléculas reguladoras", esto ha sido aceptado desde hace mucho tiempo, particularmente si consideramos que su espectro de acción es sobre células B, y que desde 1960 se conoce el fenómeno de inhibición de la producción de anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación (33). El anticuerpo puede ejercer esta regulación sobre su propia producción de diferentes formas: 1.- Evitando que el antígeno estimule las células inmunocompetentes por enmascaramiento de sus determinantes antigénicos; cuando el anticuerpo es catabolizado, el antígeno puede nuevamente estimular al sistema inmune, resultando así la producción cíclica de anticuerpos (34); 2 - por interacciones idiotipo - anti-idiotipo (35); 3.- previniendo la diferenciación exhaustiva de linfocitos competentes que pudieran resultar de una estimulación constante por el antígeno (34); etc.

El conocimiento de la actividad de los anticuerpos sobre la respuesta inmune celular ha sido más deficiente. Existen trabajos que muestran que algunos factores séricos son capaces de suprimir pruebas de inmunidad celular in vitro (36, 37). De éstos, es importante resaltar que existe poca información sobre el efecto de los anticuerpos en la respuesta celular generada por procesos infecciosos, sin embargo los pocos datos existentes, sugieren que en muchas enfermedades infecciosas de etiología bacteriana o fúngica (38) y en estados patológicos tumorales los anticuerpos tienen un papel muy importante no comprometido con la protección del huésped, sino con una posible acción reguladora.

En otra nosología de índole intracelular como la histoplasmosis, Taylor y col. (29), obtuvieron resultados que sugieren que los anticuerpos juegan un papel modulador de la expresión de la hipersensibilidad de tipo tardía en ratones sensibilizados con Histoplasma capsulatum. En un estudio reciente realizado en animales con infección activa producida por Histoplasma, se demostró que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-Histoplasma, abate la defensa de animales infectados así como la respuesta de intradermoreacción (30).

Entre los posibles mecanismos por los cuales los anticuerpos actuarían sobre la respuesta celular, destacan las evidencias que indican que los anticuerpos podrían ejercer su efecto regulador a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo específicos, ya que su presencia ha sido identificada en procesos tumorales e infecciosos como histoplasmosis, coccidioidomicosis, leishmaniasis y tuberculosis (30-45). La función del complejo inmune sería entre otras la de activar poblaciones celulares con actividad supresora (45). Por otro lado hay que señalar la ya aceptada participación de los anticuerpos anti-idiotipo. Se conoce que el trabajo neto de las interacciones idiotípicas y anti-idiotípicas sobre linfocitos puede constituir una importante forma de regulación (46, 47). Se sabe que pueden actuar, tanto sobre la respuesta inmune humoral, como ejerciendo un efecto inhibitor in vivo sobre ciertos tipos

de respuesta de hipersensibilidad tardía (48,49) así como en el caso de la respuesta al Derivado Protéico Purificado (PPD) en ratones infectados con BCG (27). También se sabe que inhiben la reacción cutánea de animales capaces de responder previamente a un hapteno como el p-azofenilarsenato y la fosforilcolina (50, 51).

La existencia de un espectro de la respuesta inmune en la tuberculosis, similar al que existe en otras enfermedades infecciosas crónicas causadas por parásitos intracelulares como lepra, por ejemplo (52), ha sido establecido por Lenzini y col. (8). Según este autor existen dos formas polares, la tuberculosis reactiva (RR) y la no reactiva (UU), con dos formas intermedias, una reactiva (RI) y otra no reactiva (UI).

La forma reactiva (RR) se caracteriza por lesiones localizadas, buena respuesta al tratamiento con rápida reducción de los bacilos en esputo, inhibición de la migración de los leucocitos (LIF) que correlaciona bien con la clásica respuesta de hipersensibilidad retardada en la prueba cutánea, y presenta un título bajo o ausente de anticuerpos.

En la forma reactiva intermedia (RI) los pacientes presentan cavitaciones simples, responden a la quimioterapia, el LIF es positivo, y también presentan bajos títulos de anticuerpos. La diferencia con el grupo anterior consiste en que en los pacientes RI la prueba cutánea es bifásica con una fase temprana y una fase tardía (Jones - Mote).

El grupo intermedio no reactivo (UI), tiene una rápida diseminación de las lesiones de tórax a otros órganos, su respuesta al tratamiento es pobre, el LIF es negativo, los títulos de anticuerpos son altos, y la respuesta cutánea es bifásica, similar a la del grupo anterior.



La forma polar no reactiva (UU) se caracteriza por tener lesiones diseminadas, con leucocitos polimorfonucleares y macrófagos con muchos bacilos, desarrollan pobre o casi nula respuesta al tratamiento, el Mycobacterium siempre está presente en el esputo, el LIF es negativo, no existe respuesta cutánea y los títulos de anticuerpos son elevados.

Esta distribución del espectro clínico en pacientes con tuberculosis, con una nítida correlación inversa entre respuesta celular y respuesta humoral, constituye un apoyo importante de la íntima interacción entre ambas respuestas inmunes.

Aunque en la tuberculosis no se cuenta aparentemente con un gran número de evidencias experimentales que apunten hacia un posible mecanismo regulador entre el componente humoral y celular de la respuesta inmune, existen algunos trabajos que apoyan la presencia de un mecanismo regulador mediado por anticuerpos en esta enfermedad. Se ha descrito en el modelo tuberculoso el fenómeno de inhibición de la transformación blastoide en presencia de componentes séricos (53). Aunque en dicho modelo queda en duda el papel de los anticuerpos, éstos actuarían más bien reaccionando con el antígeno e impidiendo su accesibilidad a las células linfoides para promover su transformación,

May y cols. sugieren que los complejos inmunes encontrados en pacientes con tuberculosis podrían tener un papel inmunoregulador, análogo al encontrado en pacientes con tumores (45). Finalmente la posibilidad de que los anticuerpos anti-BCG con actividad anti-idiotípica, sean los responsables de la supresión de hipersensibilidad tardía al PPD en ratones infectados con BCG, compromete muy íntimamente a los anticuerpos con la expresión de la respuesta inmune celular en la tuberculosis (27).

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por lo tanto, en la tuberculosis las evidencias que apoyan el papel del anticuerpo como posible molécula reguladora están en estrecha relación con los siguientes hechos:

- 1) Relación de altos títulos de anticuerpo y niveles bajos de respuesta celular.
- 2) Anticuerpos sin utilidad en la protección y poco útiles en el diagnóstico.
- 3) Presencia de complejos inmunes circulantes.
- 4) Inhibición del fenómeno de transformación linfocítica por anticuerpos Anti-Mycobacterium.
- 5) Inhibición de la respuesta cutánea al PPD por anticuerpos anti-BCG con actividad de anti-idiotipo

Dados estos antecedentes planteamos la siguiente HIPOTESIS:

#### HIPOTESIS

La respuesta celular en pacientes tuberculosos puede ser inhibida por componentes del suero inmune Anti-Mycobacterium tuberculosis.

#### OBJETIVO

Demostrar in vitro, que los anticuerpos Anti-Mycobacterium tuberculosis presentes en altas concentraciones en suero de pacientes tuberculosos no reactivos PPD<sup>-</sup>, son capaces de inhibir la respuesta celular de pacientes tuberculosos reactivos PPD<sup>+</sup>.

### ESTRATEGIA

Para someter a la comprobación nuestra hipótesis, se planteo, la siguiente estrategia: células de pacientes con tuberculosis, reactivos al PPD, con alta respuesta celular y bajos títulos de anticuerpos, fueron incubadas 12 hrs con suero de enfermos tuberculosos, anérgicos (ausencia de respuesta celular) con altos títulos de anticuerpos anti-Mycobacterium, previo a la estimulación con el antígeno (PPD).

Las células fueron lavadas extensivamente para la eliminación del suero, admitiendo que los anticuerpos específicos se pegaban a las células y las demás moléculas libres se eliminarían con la lavada. Este tratamiento llevaría a la inhibición de la respuesta celular frente a la dosis de estimulación con el antígeno (PPD), provocando así la anergia celular in vitro.

## MATERIAL Y METODOS

### Poblaciones estudiadas.

El estudio se realizó con pacientes procedentes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) dependiente de la Secretaría de Salud (S. S.) ; estos enfermos fueron diagnosticados clínica, radiológica y bacteriológicamente como tuberculosos y clasificados como reactivos mediante la aplicación intradérmica de dos unidades de tuberculina (UT).

Individuos sanos adultos de ambos sexos, PPD positivos y negativos, fueron utilizados como controles normales y para la estandarización de la técnica empleada (transformación blastoide). Las características de los individuos estudiados se encuentran resumidas en la tabla 1.

El diagnóstico de tuberculosis se completó con aspectos clínicos y con un buen estudio epidemiológico abarcando el estado socioeconómico, hábitos higiénicos, antecedentes familiares y contacto con enfermos tuberculosos. En general la sucesión de las maniobras diagnósticas siguieron el camino habitual: historia clínica, exámenes físicos, radiográficos y de laboratorio, datos que fueron proporcionados por el INER (tabla 2).

### Biológicos:

Se obtuvo un total de 10 ml de sangre periférica de cada paciente tuberculoso reactivo en jeringa heparinizada bajo condiciones de estricta esterilidad para la prueba de transformación blastoide. Los sueros autólogos y heterólogos obtenidos de cada paciente así como controles normales fueron almacenados en frascos estériles y guardados a -20°C para procesarse en diferentes pruebas inmunológicas y de rutina.

TABLA 1

DATOS GENERALES DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

GRUPOS	NUMERO DE INDIVIDUOS	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO CLINICO	PROCEDENCIA	TIPO DE EXPERIMENTO	
Testigos	1, 2	M	30-35	Sano PPD(+)	Donadores voluntarios	Curva dosis-respuesta a la FHA y al Ag.	
	3,4	F	22-28	Sano PPD (+)	Donadores voluntarios	Curva dosis-respuesta a la FHA y al Ag. Efecto del suero	
	5	F	42	Sano PPD(-)	Donadores voluntarios	Curva dosis-respuesta a la FHA y al Ag. Efecto del suero	
	6	M	32	Sano PPD(-)	Donadores voluntarios	Curva dosis-respuesta a la FHA y al Ag. Efecto del suero.	
	7	M	30	Sano PPD(-)	Donadores voluntarios	Efecto del suero.	
	8	M	32	Sano PPD(+)	Donadores voluntarios	Efecto del suero.	
	9	F	29	Sano PPD(+)	Donadores voluntarios	Efecto del suero.	
	PACIENTES	1	M	21	TbP de R	INER	Curva dosis-respuesta a la FHA y al Ag.
		2	M	38	TbP de R	INER	Curva dosis-respuesta al Ag. Efecto del suero.
3,4,6,7		M	21-49	TbP de R	INER	Curva dosis-respuesta a la FHA y al Ag. Efecto del suero.	
5,8,9,10,11,12,13		M	21-47	Tbp de R	INER	Efecto del suero.	
14, 15, 16		M	21-41	TbP de R	INER	Efecto del suero de otra enfermedad pulmonar (Histo plasmosis).	
17, 18, 19, 20		M	22-46	TbP de R	INER	Efecto del suero y estimulación con FHA.	

Tb P de R = Tuberculosis pulmonar de reinfección

INER = Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

FHA = Fitoheماغlutinina

Ag = Antígeno PPD

DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES REACTIVOS PPD<sup>+</sup> CLASIFICADOS POR PRUEBA DERMICA

Paciente No.	Edad	Sexo	Rayos X	Diagnóstico	Tratamiento
1	38	M	Fibrotórax derecho.	TbP de R avanzada y hemoptisis.	Inmunoterapia y antifímicos.
2	21	M	Fibrotórax derecho, diseminación a lóbulo superior izquierdo. Fibrosis y ectasias residuales.	TbP de R nefrocascosa, excavada bilateral, activa, muy avanzada. Anemia normocítica hipocrómica.	Secundario
3	47	M	Destrucción del lóbulo superior derecho con retracción de tráquea. Abdomen con gran distensión de asas.	TbP de R avanzada de predominio derecho. Hepatitis alcohólica.	Primario
4	40	M	Partes blandas, hemidiafragma, mediastino aumentado, opacidades en campos pleuropulmonares, opacidades heterogéneas en forma de destrozos nodulares y de tipo exudativo.	TbP de R avanzada bilateral y activa.	Primario
5	21	M	Hemitórax derecho con formas de panal de abeja apicales. Excavación parahiliar de 4 cm de diámetro aproximadamente.	TbP de R avanzada bilateral. Desnutrición.	Secundario

DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES REACTIVOS PPD<sup>+</sup> CLASIFICADOS POR PRUEBA DERMICA (continuación)

Paciente No.	Edad	Sexo	Rayos X	Diagnóstico	Tratamiento
6	25	M	Opacidad heterogénea, infiltrado micro y macronodular en ambos vértices. Región subclavicular izquierda con bordes gruesos, lo que sugiere cavitación y retracción de la tráquea a la derecha.	TbP muy avanzada, excavada bilateral activa.	Primario
7	34	M	Imágenes micronodulares de predominio izquierdo y lóbulos superiores excavados. Bronquiectasias.	TbP de R activa, excavada, bilateral avanzada, Desnutrición de 2º grado.	Primario
8	22	M	Excavaciones ubicadas en los segmentos apicoposteriores.	TbP de R activa, con micosis pulmonar.	Primario
9	38	M	Imágenes algodonosas, difusas en ambos hemitórax.	TbP de R bilateral exudativa de predominio derecho muy avanzada, probablemente activa.	Primario
10	44	M	Opacidad homogénea	TbP activa, ganglionar, enteropertitoneal. Derrame pleural. Desnutrición de 3er grado.	Primario
11	47	M	Opacidad heterogénea bilateral. Calcificaciones bilaterales diseminadas.	TbP de R bilateral mixta, avanzada. Desnutrición de 3er grado.	Secundaria

TABLA 2

DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES REACTIVOS PPD\* CLASIFICADOS POR PRUEBA DERMICA (continuación)

Paciente No.	Edad	Sexo	Rayos X	Diagnóstico	Tratamiento
12	47	M	Imágenes heterogéneas que ocupan prácticamente todo el pulmón derecho, más acentuadas en la base. Tráquea desviada hacia la derecha. Hemidiafragma izquierdo aplanado.	TbP de R con discriminación bronconeumónica.	Primario
13	37	M	Hemitórax derecho con formas de panal de abeja apicales. Opacidad heterogénea.	TbP de R avanzada bilateral.	Primario
14	33	M	Imágenes sugestivas de cavitación en el lóbulo superior derecho. En la región hilar imagen de cavitación de paredes gruesas. Elevación de hemidiafragma izquierdo. En ambos hemitórax se encontraron imágenes heterogéneas mal definidas en sus bordes.	TbP activa, hemoptisis, anemia moderada.	Primario
15	21	M	Lesiones predominantes en hemitórax izquierdo. La tráquea y el mediastino están desviados hacia el lado derecho. El hemidiafragma izquierdo desviado hacia arriba y en el vértice izquierdo presenta una lesión parenquimatosa destructiva.	TbP inactiva, fibrosis y bronquiectasia	HAIN, Protionamida y Rifampicina



TABLA 2

DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES REACTIVOS PPD+ CLASIFICADOS POR PRUEBA DERMICA (continuación)

Paciente No.	Edad	Sexo	Rayos X	Diagnóstico	Tratamiento
16	41	M	Imágenes múltiples, con cavernas en ambos ápices. Tráquea hacia la derecha.	TbP de R avanzada bilateral excavada y activa.	Secundario
17	22	M	Opacidad heterogénea con posibles zonas de rarefacción en apical derecha e infraclavicular izquierda. Infiltrado micronodular con fluente.	TbP de R muy avanzada, activa. Desnutrición.	Secundario
18	46	M	Opacidad heterogénea en regiones parahiliares de predominio izquierdo, fibrosis y zonas radiolúcidas.	TbP de R mixta activa.	Primario
19	31	M	Fibrotórax derecho. Retracción de la tráquea y zonas radiolúcidas.	TbP de R mixta y activa	Primario
20	28	M	Opacidad heterogénea en regiones parahiliares. Calcificaciones unilaterales diseminadas.	TbP de R activa y avanzada. Desnutrición.	Primario

TbP de R= Tuberculosis pulmonar de reinfección.  
 Tratamiento primario: Hidrazida del ácido isonicotínico (HAIN), etambutol, estreptomina.  
 Tratamiento secundario: Cicloserina, rifampicina, prolonamida.  
 M= Masculino.

Antígenos:

Para la intradermorreacción se empleó el Derivado Proteico Purificado (PPD) del Instituto Nacional de Higiene S.S. e histoplasmina donada por el departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina UNAM, cortesía de las Dras. Taylor y Toriello. Se utilizaron 2 UT de PPD contenidas en un volumen de 0.1 ml. Se aplicó también histoplasmina a una concentración de 17 ug proteína/0.1 ml.

En la prueba de transformación blastoide el antígeno PPD fué ajustado a 1000 ug. proteína/ ml. determinada por el método de Biuret (54), constituyendo la solución madre de trabajo a partir de la cual se obtuvieron las diferentes dosis de estimulación empleadas.

Mitógeno:

Se utilizó fitohemaglutinina (FHA) del laboratorio Microlab de México. La cuantificación se hizo por el método de Biuret, ajustándose la concentración de trabajo a 500 ug proteína/ ml.

Reactivos y soluciones:

Todos los reactivos utilizados excepto los que se mencionen, provinieron de los laboratorios Merck de México, S. A.

Medio de cultivo suplementado para células

RPMI-1640 (Gibco) en agua destilada	87 ml
Suero fetal bovino (Microlab). Inactivar a 57°C, durante 30' antes de usarlo,	10 ml
Solución de L -glutamina 100x (Gibco)	1 ml
Amortiguador HEPES (N-2 hidróxido piperazina N-2-ácido etano sulfónico) (Sigma)	0.2 g
Esterilizar por filtración.	

Material de Incorporación:

1. Timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ) (New England Nuclear) 4uCi/ml
2. Timidina no radioactiva (Sigma)(Timidina frfa) 0.5g/1t PBS

Líquido de Contalleo:

POPOP (1,4 bis[2- (5-feniloxazolil)]-benceno;fenil-oxazolilfenil oxazolil-fenil)	
(Sigma).	1.2 g
PPO 2,5 difeniloxazolil (Sigma)	12.0 g
Tolueno	3 000 ml

SOLUCIONES:Amortiguador de fosfatos (PBS) adicionado con timidina no radioactiva:

Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
Fosfato ácido de potasio ( $K H_2PO_4$ )	0.2 g
Fosfato ácido de sodio dibásico ( $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ )	2.9 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.8 g
Timidina no radioactiva (Sigma)	0.5 g
Azida de sodio ( $NaN_3$ )	0.2 g
Agua destilada c.b.p.	1 000 ml

Amortiguador de fosfatos adicionado con Tween (ELISA) (PBS-Tween)

Tween 20	3.5 ml
Azida de sodio ( $NaN_3$ )	0.2 ml
PBS	1 000 ml

Amortiguador de fosfatos Tween-BSA (ELISA)

Albúmina sérica bovina (BSA)	2 g
PBS-Tween	100 ml

Solución de azul tripano

Azul tripano	0.4 g
Solución salina isotónica	100 ml

Solución de Acido Tricloroacético (TCA) al 5 ó 10%

TCA	5 g ó 10 g.
Agua Destilada	1 000 ml.

### Estudio Humoral:

La detección de las Inmunoglobulinas en general, específicas o no específicas de la clase IgG, IgM e IgA presentes en el suero de cada paciente, se hizo por el método de Inmunodifusión radial (55) y la determinación de la IgE por la técnica de micro-ELISA (56). La detección de la actividad específica de las clases de Inmunoglobulinas anti-Mycobacterium se realizó por el método de ELISA Indirecto (57), utilizando anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA humanas acopladas a fosfatasa alcalina (laboratorio Sigma), empleando BCG como antígeno fijado a la fase sólida (58).

Para fines de obtención de títulos totales de anticuerpos anti-Mycobacterium se practicó la prueba de ELISA en sueros de pacientes y controles, usando un conjugado con Anti- $\gamma$  humana total marcada con fosfatasa alcalina.

### Estudio Celular:

Se practicó la prueba de Intradermorreacción (IDR) con PPD e histoplasmina, y el estudio in vitro de transformación blastoide.

IDR: El PPD fué administrado en el antebrazo izquierdo y la histoplasmina en el antebrazo derecho, contenidos ambos antígenos en un volumen de 0.1 ml. Las reacciones fueron leídas a las 48 y 72 hs. Se consideraron como reactivos aquellos individuos con induración mayor de 10 mm.

PRUEBA DE TRANSFORMACION LINFOCITICA: Se separó el paquete celular a partir de 10 ml de sangre periférica colectada en tubo estéril al vacío (Vacutainer) conteniendo 0.2 ml de heparina (lab. Abbot 1000 UI/ml). Se mezcló bien la sangre con el anticoagulante y se transfirió a un tubo Falcon conteniendo 10 ml de gradiente de Ficoll-Hypaque (lab. Sigma). Se centrifugó por 40 minutos a 4°C a 1700 r.p.m. y finalmente se separó el paquete celular el cual fué lavado 3 veces con RPMI. Las células

obtenidas fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Se cuantificaron las células usando la técnica de exclusión con azul tripano y se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, gentamicina ( 50 ug/ml) y L-glutamina.
2. Se colocó 1 ml de la suspensión en tubos de cultivo (Falcon) con una concentración final de  $1 \times 10^6$  células.
3. Se incubaron los cultivos a 37° C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 5 días.
4. A una serie de tubos a las 24 hs de cultivo se les adicionó el antígeno PPD diluido a diferentes concentraciones (50, 100 y 150 ug/PPD y se les dejó incubar hasta completar 120 hrs (4 días de incubación con el antígeno) y por último se cosechó.
5. En otra serie de tubos a las 48 hrs de cultivo se adicionó el mitógeno FHA, variando la concentración de 25-200 ug de proteína según el caso, y se dejó incubando hasta completar 120 hrs antes de la cosecha (72 hrs de período de incubación).
6. A las 18 hrs antes de cosechar las células, se adicionaron 4 uCi de timidina tritiada (actividad específica 6.7 Ci/mmol. New England Nuclear) a cada tubo.
7. La cosecha de las células se efectuó por centrifugación y el paquete celular obtenido se transfirió a filtros de papel Watman No. 3.

obtenidas fueron procesadas de la siguiente manera:

1. Se cuantificaron las células usando la técnica de exclusión con azul tripano y se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, gentamicina ( 50 ug/ml) y L-glutamina.
2. Se colocó 1 ml de la suspensión en tubos de cultivo (Falcon) con una concentración final de  $1 \times 10^6$  células.
3. Se incubaron los cultivos a 37° C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 5 días.
4. A una serie de tubos a las 24 hs de cultivo se les adicionó el antígeno PPD diluido a diferentes concentraciones (50, 100 y 150 uq/PPD y se les dejó incubar hasta completar 120 hrs (4 días de incubación con el antígeno) y por último se cosechó.
5. En otra serie de tubos a las 48 hrs de cultivo se adicionó el mitógeno FHA, variando la concentración de 25-200 ug de proteína según el caso, y se dejó incubando hasta completar 120 hrs antes de la cosecha (72 hrs de período de incubación).
6. A las 18 hrs antes de cosechar las células, se adicionaron 4 uCi de timidina tritiada (actividad específica 6.7 Ci/m mol. New England Nuclear) a cada tubo.
7. La cosecha de las células se efectuó por centrifugación y el paquete celular obtenido se transfirió a filtros de papel Watman No. 3.

8. Se secaron los filtros con luz Infrarroja (IR).
9. Se lavaron las células con PBS adicionado de timidina fría (pH 7.2).
10. Posteriormente se adicionó ácido tricloroacético al 5% y al 10% por varios minutos cada uno.
11. Se fijaron las células con metanol al 70 % y se dejaron secar con luz IR.
12. Una vez secos los filtros fueron colocados en viales con líquido de centelleo.
13. Se leyó la radioactividad en aparato de centelleo gamma (marca Packard).
14. Para la lectura en el aparato se usó un control de timidina radioactiva. Se hicieron, además, controles de células sin antígeno y sin FHA, así como un control de corrección de lectura (blanco de centelleo) conteniendo 10 ml de líquido de centelleo.
15. Los resultados se expresaron en  $\text{cpm} \times 10^3$  corregidos con el blanco de centelleo. Se graficaron para su correlación en tablas, así como para la expresión del índice blastogénico.
16. El índice blastogénico se determina por la relación de cuentas por minuto (cpm) de los cultivos estimulados, entre los cultivos no estimulados.
17. Cada cultivo fue hecho por triplicado y el resultado final expresa el promedio de 3 lecturas.



### TRATAMIENTOS ADICIONALES:

Efecto del suero de pacientes tuberculosos no reactivos, sobre la transformación blastoide de células de pacientes tuberculosos reactivos. La actividad de Inhibición por anticuerpos se realizó con la administración de suero Inmune (paciente anérgico, suero autólogo y de otra enfermedad pulmonar) a diferentes concentraciones (200 y 400 ug de proteína) a cada tubo con células, 12 hrs antes de la adición del antígeno o del mitógeno. Como control de suero se trabajó con suero procedente de sujetos normales PPP-. Después de la incubación con suero y de sucesivas lavadas (3 a 5 veces), se siguió el mismo procedimiento de la transformación blastoide descrito anteriormente.

### Análisis Estadístico:

Debido a la heterogeneidad de las muestras procesadas se empleó una prueba estadística no paramétrica conocida como Mann-Whitney o prueba de U(59), la cual fue realizada en el sistema Interactivo de Análisis Bioestadístico implementado en la computadora PDP-1140 de la Unidad de Cómputo de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## RESULTADOS:

Los datos clínicos de los 20 pacientes estudiados con tuberculosis pulmonar de reinfección en su mayoría, están resumidos en la tabla 2. Algunas otras informaciones adicionales de laboratorio, de aspectos no inmunológicos, se encuentran reportados en la tabla 3. En los resultados de las pruebas generales inmunológicas (Tabla 4) se puede observar que todos los pacientes fueron reactivos a la prueba dérmica con PPD, mientras que a la histoplasmina solo el paciente número 1 fué positivo. La prueba de VDRL resultó negativa en todos los casos. Los valores totales de IgG, IgM, e IgA se encuentran dentro de los reportados como normales, con excepción del paciente número 2 cuyo valor de IgA se encuentra ligeramente aumentado. Los datos encontrados para  $C_3$  están elevados en la mayoría de los pacientes, mientras que los valores de  $C_4$  están dentro del rango normal, exceptuando a los pacientes 1, 5, 8, 17 y 18. La proteína C reactiva fué heterogénea en todos los pacientes, el factor alfa 1 antitripsina se encuentra disminuido en la mayoría de los enfermos y el factor reumatoide fue negativo en todos los casos.

La presencia de anticuerpos totales anti-Mycobacterium tuberculosis en los pacientes, fué detectada por el método de ELISA. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos. El lote formado con el suero de pacientes con tuberculosis no reactiva (anérgicos) usado para el tratamiento de inhibición con suero en la prueba celular de transformación blastoide, dió un título de anticuerpos de 1:320, muy superior a los alcanzados por los pacientes con tuberculosis reactiva, cuyos títulos variaron del negativo a 1:80. El lote de suero obtenido de individuos sanos donadores voluntarios nunca desarrollo respuesta frente al antígeno PPD.

La respuesta de anticuerpos específicos discriminando las diferentes clases de inmunoglobulinas fué detectada también por el método de ELISA utilizando un conjugado de fosfatasa alcalina con la anti-Ig específica para cada clase. Los resultados se pueden ver en la figura 1 donde se

TABLA 3

DATOS NO INMUNOLOGICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

Paciente No.	QS	BH	BK	GO	Cp	Pt <sup>mg/dl</sup>
1	Normal	Leucopenia	++	Normal	-	9.27
2	Normal	Normal	-	Normal	Normal	7.02
3	Hipoglucemia	Leucopenia	-	Normal	<u>G. lamblia</u> *	9.07
4	Normal	Leucocitosis	-	Normal	<u>E. coli</u> * <u>G. lamblia</u>	6.27
5	Normal	Leucopenia	++	Normal	-	10.0
6	Normal	Normal	+	Normal	-	8.1
7	Normal	Leucocitosis	++	Normal	<u>E. coli</u>	7.48
8	Normal	Leucocitosis	-	Normal	<u>G. lamblia</u>	7.07
9	Normal	Leucopenia	+	Normal	-	6.32
10	Normal	Normal	+	Normal	<u>E. coli</u>	6.86
11	Normal	Leucocitosis	-	Normal	-	10.36
12	Normal	Eosinofilia	+	Normal	-	6.50
13	Normal	Normal	+	Normal	-	8.37
14	Hiperglucemia	Leucocitosis	-	Normal	-	4.43
15	Normal	Leucocitosis	-	Normal	<u>G. lamblia</u>	7.3
16	Normal	Leucocitosis	+	Normal	<u>Trichuris sp</u>	6.97
17	Normal	Leucocitosis	+	Normal	<u>G. lamblia</u>	8.7
18	Normal	Normal	+	Normal	-	7.7
19	Hipoglucemia	Leucopenia	+	Normal	<u>E. coli</u>	7.12
20	Normal	Normal	-	Normal	-	8.31

QS = Química sanguínea

BH = Biometría hemática

BK = Baciloscopia

GO = General de orina

Cp = Coproparasitoscópico

Pt = Proteínas totales

+ = Escasos

++ = Abundantes

- = Negativo

\*G. lamblia = Giardia lamblia\*E. coli = Escherichia coli

## DATOS INMUNOLOGICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

PACIENTE No.	PPD	HISTO	VDRL	IgG	IgM	IgA	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	PCR	FR	α <sub>1</sub> AT
1	(+)	(+)	(-)	260	143	257	63	97	+++	(-)	89
2	(+)	(-)	(-)	235	221	281	19	56	++	(-)	79
3	(+)	(-)	(-)	180	249	219	27	42	(-)	(-)	25
4	(+)	(-)	(-)	137	150	150	32	90	+++	(-)	22
5	(+)	(-)	(-)	203	259	204	22	105	(-)	(-)	25
6	(+)	(-)	(-)	117	104	113	13	49	(-)	(-)	22
7	(+)	(-)	(-)	158	134	163	20	80	++	(-)	60
8	(+)	(-)	(-)	195	150	143	32	105	+++	(-)	105
9	(+)	(-)	(-)	124	150	137	24	65	++	(-)	109
10	(+)	(-)	(-)	135	197	213	35	55	++	(-)	70
11	(+)	(-)	(-)	165	240	131	33	45	+	(-)	53
12	(+)	(-)	(-)	203	221	190	8	49	+++	(-)	48
13	(+)	(-)	(-)	144	122	156	35	74	(-)	(-)	154
14	(+)	(-)	(-)	138	212	127	19	72	(-)	(-)	98
15	(+)	(-)	(-)	201	188	192	23	53	(+)	(-)	108
16	(+)	(-)	(-)	175	123	211	25	48	(-)	(-)	90
17	(+)	(-)	(-)	144	134	176	27	105	(-)	(-)	25
18	(+)	(-)	(-)	124	150	204	25	97	+++	(-)	25
19	(+)	(-)	(-)	203	201	135	31	75	(-)	(-)	87
20	(+)	(-)	(-)	166	212	178	18	38	(-)	(-)	22

Histo = Histoplasmina  
 PCR = Proteína C reactiva  
 FR = Factor Reumatoide  
 α<sub>1</sub>AT = Alfa 1 Antitripsina  
 (-) = negativo  
 (+) = positivo

Valores Normales  
 IgG = 92-207 UI/ml      C<sub>3</sub> = 6-15 UI/ml  
 IgM = 69-287 UI/ML      C<sub>4</sub> = 18-91 mg/dl  
 IgA = 54-268 UI/ml      AAT = 94-142 UI/ml  
 PCR: + ++ = positivo  
 +++, ++++ = altamente positivo

T A B L A 5

CUANTIFICACION DE ANTICUERPO ANTI - *Mycobacterium tuberculosis*.

TITULO DE ANTICUERPOS	PACIENTE No.
Negativo	5
1:20	3, 4, 6, 9,14,15,20
1:40	7,11,12, 16, 17, 19
1:80	1, 2, 8, 10, 13, 18

SUERO ANERGICO: TITULO DE ANTICUERPOS 1:320

TECNICA : ELISA 100 ug PPD.

LOS TITULOS REPRESENTAN EL INVERSO DE LA DILUCION

DEL SUERO.

detecta que las diferentes clases de Inmunoglobulinas específicas no se encuentran incrementadas en los pacientes PPD<sup>+</sup>, cuyas D. O. se asemejan a la de los individuos sanos PPD<sup>+</sup>. Además el control de suero de pacientes anérgicos resalta los niveles muy elevados de IgG cuando comparado con las lecturas obtenidas con los pacientes tuberculosos reactivos.

Se investigó la dosis óptima de estimulación para el antígeno y para el mitógeno en 6 individuos sanos; 4 PPD<sup>+</sup> y 2 PPD<sup>-</sup> utilizando curvas dosis-respuesta (Fig. 2). Se encontró que para los sujetos sanos PPD<sup>+</sup>, las dosis de 50 y 100 ug del antígeno PPD corresponden a los picos más sobresalientes de estimulación. La actividad del PPD sobre las células decrece a la dosis de 150 ug y vuelve a aumentar con 200 ug. Las células de los dos individuos PPD<sup>-</sup> no fueron capaces de responder a ninguna de las estimulaciones a que fueron sometidas. Cuando los cultivos celulares obtenidos de estos seis individuos sanos fueron estimulados con 25, 50, 100 y 150 ug de proteína del mi tógeno (FHA) (Fig. 3) se encontró que todos los sujetos presentaron su mejor respuesta a la dosis de 100 ug de proteína de FHA la cual constituyó la dosis de trabajo para el lote utilizado.

Enseguida se procedió a confirmar si estas dosis de estimulación óptimas encontradas en los sujetos sanos, tanto para el antígeno como para el mitógeno, lo eran para células de pacientes PPD<sup>+</sup> con tuberculosis reactiva. La figura 4 muestra la respuesta de estos pacientes a 25, 50, 100 y 150 ug de PPD y la figura 5 la respuesta a 50, 100 y 150 ug de proteína de FHA. Como se puede observar las dosis de estimulación fueron confirmadas en pacientes tuberculosos en ambos casos.

El efecto del suero sobre la transformación blastoide inducida por el antígeno en células de pacientes con tuberculosis pulmonar reactiva fué estudiado en una población de 15 pacientes (Tabla 6a y 6b). Sus células fueron preincubadas con 200 ug (Fig. 6A, Tabla 6a) y 400 ug (Fig. 6B, Tabla 6b) de proteína de tres diferentes sueros: anérgico, normal y autólogo. Post incubación, fueron extensivamente lavadas y estimuladas con 0, 50 y 100 ug de PPD.

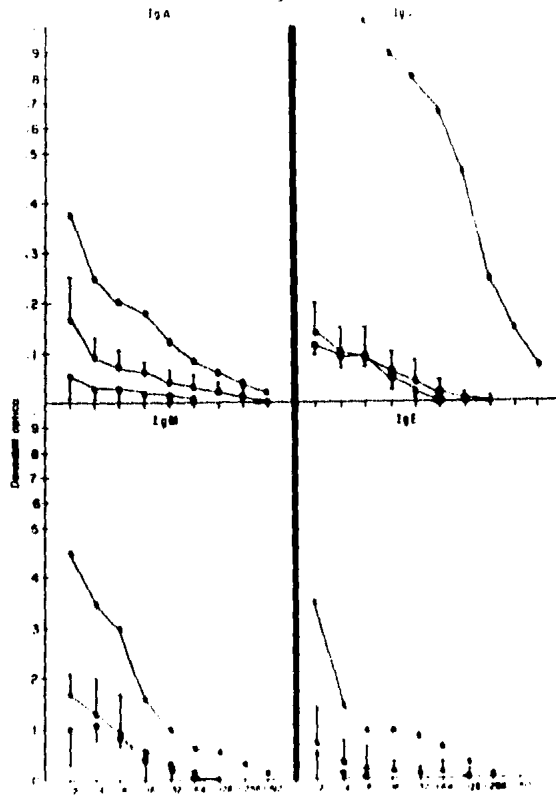


FIG. 1. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS EN LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS. Se trabajó la prueba de ELISA con BCG como antígeno y utilizando un conjugado de fosfatasa alcalina anti-Ig específica para cada clase de inmunoglobulina. Las lecturas obtenidas del lote de suero normal con el que se trabajó fueron utilizadas como valores correctivos de densidad óptica. En cada lectura, en todas las diluciones del suero de los pacientes PPD<sup>+</sup> (●), sus controles sanos PPD<sup>+</sup> (○) y el lote de suero anérgico (△) fueron deducidos los valores del lote de suero normal.

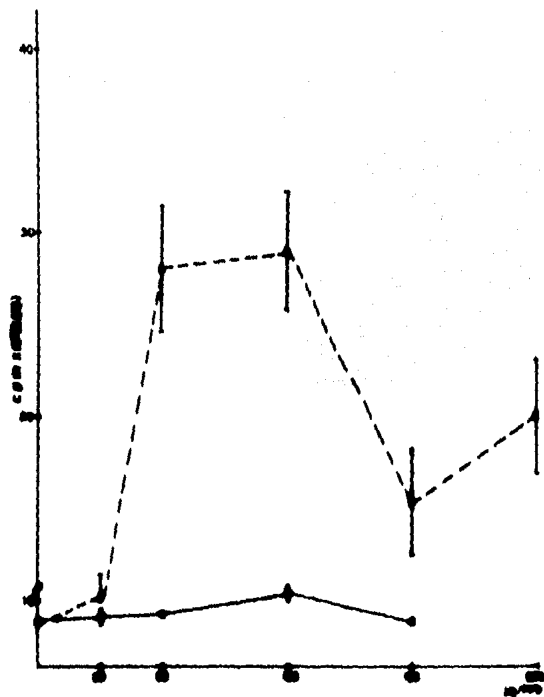


FIG. 2 .- CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA AL ANTIGENO PPD EN CELULAS DE INDIVIDUOS SANOS. Se trabajó la sangre estéril heparinizada de 6 sujetos normales; 4 PPD<sup>+</sup> (O-O) y 2 PPD<sup>-</sup> (●-●) (ver grupo testigo tabla 1). Las células fueron separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque. Se incubaron con PPD a las siguientes dosis 0, 25, 50, 100, 150 y 200 ug/proteína. Se siguió el procedimiento de transformación blastoide descrito en material y métodos.



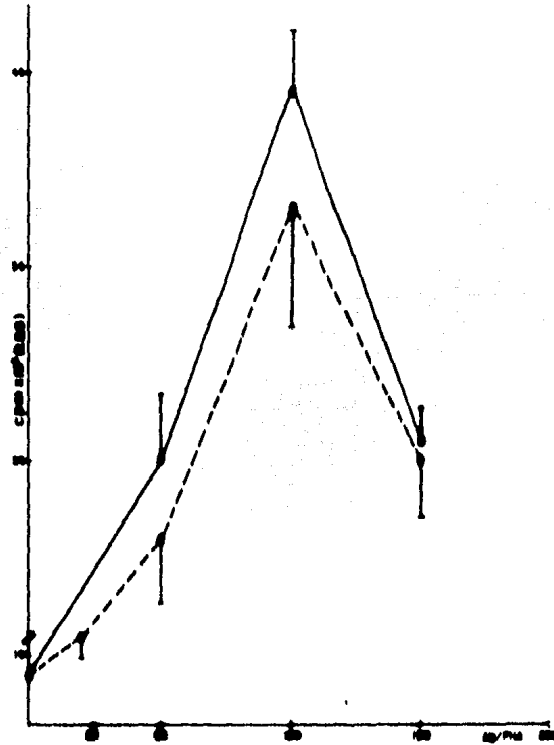


FIG. 3.- CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA AL MITOGENO FITOHEMAGLUTININA (FHA) EN CELULAS DE INDIVIDUOS SANOS. Se trabajó la sangre estéril heparinizada de 6 sujetos normales; 4 PPD<sup>+</sup> (0- -0) y 2 PPD<sup>-</sup> (●-●) (ver grupo testigo tabla 1). Las células fueron separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque. A las 72 hr de cultivo se añadió el mitógeno utilizando las dosis de 0, 25, 50, 100 y 150 ug de proteína de FHA. Se siguió el procedimiento de transformación blastoide descrito en material y métodos.

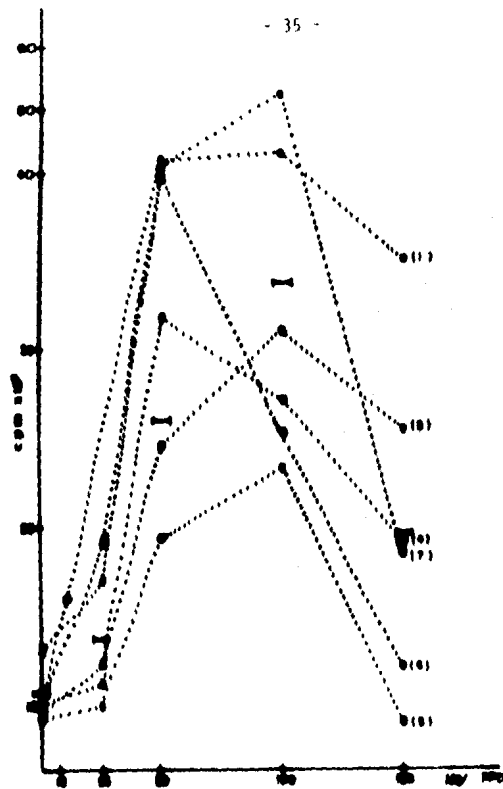


FIG. 4.- CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA AL ANTIGENO EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR REACTIVOS AL PPD. Las células de 6 pacientes (ver tabla 1) separadas por gradiente de Ficoll -- Hypaque, fueron incubadas con antígeno PPD a las dosis de 0, 10, 25, 50, 100 y 150 ug de proteína y procesadas para transformación blastoide como se indica en material y métodos. Las barras horizontales (1-4) indican la media ( $\bar{x}$ ) de cada dosis de estimulación del antígeno y los números en los paréntesis representan cada individuo trabajado.

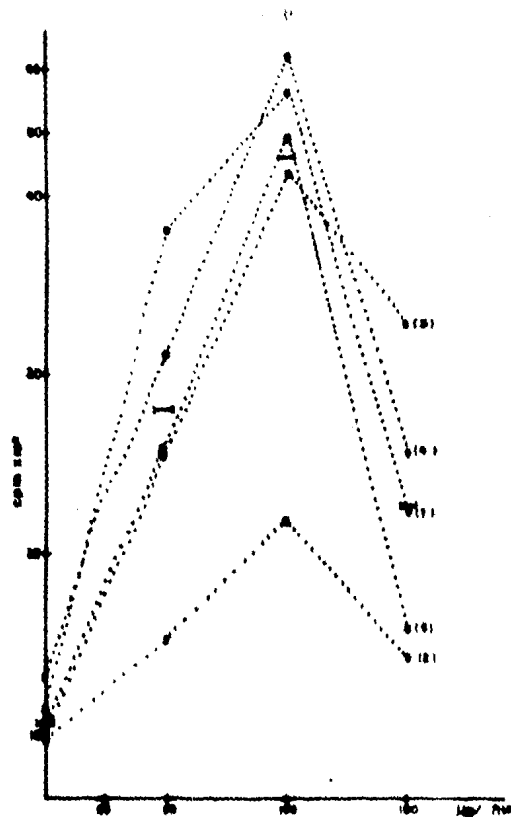


FIG. 5.- CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA AL MITÓGENO EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR REACTIVOS AL PPD. Las células de 6 pacientes (ver tabla 1) separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, fueron cultivadas con mitógeno (FHA) durante 72 hrs con dosis de 25, 50, 100 y 150 µg de proteína de FHA y procesadas para transformación blastoide como se indica en material y métodos. Las barras horizontales ( $\bar{x}$ ) indican la media ( $\bar{x}$ ) de cada dosis de estimulación del mitógeno y los números en los paréntesis representan cada individuo trabajado.

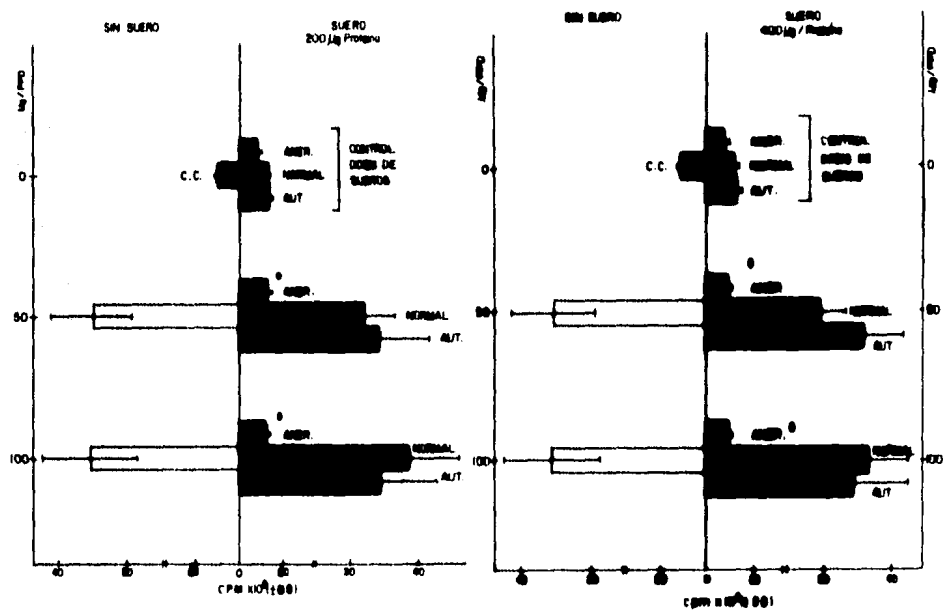


FIG. 4.- EFECTO DEL SUERO SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL ANTIGENO EN CELULAS DE PACIENTES PPD+ CON TUBERCULOSIS PULMONAR. La figura representa la media ( $\bar{x}$ ) de 15 pacientes. Las barras de la izquierda en ambas graficas representan controles de células (C.C.) y los controles de estimulación con el antígeno (50 y 100 ug) sin incubación con suero. Las barras de la derecha representan a los cultivos celulares que fueron incubados 12 hrs con 200 ug (A) y 400 ug (B) de proteina de los sueros anérgico (Aner.), normal y autólogo (Aut.) Post-incubación las células fueron lavadas varias veces y posteriormente estimuladas con 0, 50 y 100 ug de PPD. La prueba no paramétrica U de Mann-Whitney demostró que existe diferencia estadísticamente significativa (\*) para  $\alpha = 0.01$  entre las células incubadas con suero anérgico y el control de estimulación; mientras que las células tratadas con los sueros normal y autólogo no presentan diferencia cuando son comparadas con el control de estimulación.

TABLA 6a. INCORPORACION DE TIPOSA TRITADA (CPM) POST TRATAMIENTO DE LAS CELULAS CON 200 ug PROTEINA DE SUERO.

Paciente No.	Estimulacion ug/PPD	0	50	100	0	50	100	0	50	100	0	50	100	50	Control FNA 100 ug
	Tratamiento con suero	Anérgico			Normal			Autólogo			Histo.				
2		8 900	33 527	31 645	10 322	7 814	7 970	11 974	33 744	45 500	9 671	29 111	28 812	-	48 085
3		9 061	25 814	21 340	10 722	9 970	12 245	11 580	22 050	16 605	10 330	19 160	11 775	-	43 680
4		11 778	31 103	27 174	9 354	10 410	6 690	14 120	31 615	28 710	12 700	20 870	27 660	-	56 285
5		11 500	31 767	31 767	6 450	13 510	16 340	12 340	29 543	27 111	18 510	26 951	25 848	-	43 072
6		9 761	45 803	29 331	6 362	9 030	6 686	13 878	32 392	23 250	15 232	37 872	24 741	-	54 287
7		13 930	41 080	67 077	2 312	18 363	21 952	13 656	39 567	62 097	12 893	57 590	60 367	-	72 077
8		11 366	40 159	64 970	6 222	14 216	10 001	13 409	38 198	61 707	10 461	47 056	60 167	-	47 362
9		10 000	43 312	40 115	-	17 400	-	-	41 532	-	-	-	-	-	40 522
10		9 000	35 731	29 618	-	19 294	-	-	30 821	-	-	-	-	-	39 052
11		6 845	37 825	27 310	-	21 660	-	-	33 550	-	-	-	-	-	4 115
12		6 190	13 250	14 780	-	7 000	-	-	44 600	-	-	-	-	-	39 655
13		9 120	29 435	20 535	-	15 595	-	-	39 975	-	-	-	-	-	13 175
14		12 077	24 753	24 781	-	4 500	-	-	26 026	-	-	19 970	-	14 241	29 801
15		10 510	66 127	51 199	-	9 560	-	-	48 721	-	-	57 371	-	31 712	63 260
16		9 315	37 731	28 711	-	13 879	-	-	28 977	-	-	35 792	-	26 233	41 212
u		9 957	35 212	35 261	7 218	12 370	11 697	13 163	37 001	38 712	13 357	34 352	34 135	24 728	
s		1 074	11 877	13 226	2 676	5 765	5 264	803	10 820	16 623	2 832	14 955	17 317	5 019	

NOTA: Con las células del paciente número 1, sólo se hicieron curvas de dosis-respuesta al antígeno y al mitógeno.

HISTO = suero de paciente con histopatosis.

(-) = no se procesó.

FNA = fitohemaglutinina.

u = media poblacional.

s = desviación estándar.

TABLA 6 b. INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (TPM) POST TRATAMIENTO CON 400U<sub>g</sub> PROTEINA DE SUERO

Paciente No.	Estimulación ug/PPD	0	50	100	0	50	100	0	50	100	0	50	100	100	Control FNA
	Tratamiento con suero	Anémico			Normal			Autólisis			Histo.	100 ug			
2		8 900	33 527	31 645	11 713	7 271	7 211	10 586	35 519	26 755	11 031	27 876	20 320	-	48 085
3		9 063	25 840	21 310	9 650	10 510	6 450	9 000	17 995	21 345	9 950	23 270	21 116	-	41 680
4		11 778	31 103	27 174	8 815	8 860	9 130	12 950	21 560	23 305	11 010	22 240	22 770	-	55 285
5		11 500	31 767	31 767	11 520	7 893	10 986	13 971	23 666	28 054	15 665	23 644	26 310	-	45 872
6		9 761	45 803	29 331	5 041	5 438	6 874	15 138	31 925	36 816	17 852	42 579	29 641	-	54 287
7		13 930	41 080	67 077	6 213	13 315	15 008	11 621	40 407	58 301	11 727	45 452	65 208	-	72 077
8		11 366	40 159	64 870	4 936	10 896	7 888	10 970	15 891	58 817	11 116	58 320	59 828	-	67 362
9		10 000	43 312	40 115	-	-	6 277	-	-	43 332	-	-	-	-	40 522
10		9 000	35 241	29 612	-	-	9 412	-	-	10 821	-	-	-	-	39 052
11		6 845	37 825	27 310	-	-	9 190	-	-	33 550	-	-	-	-	68 115
12		6 190	13 790	34 780	-	-	11 005	-	-	44 600	-	-	-	-	39 650
13		9 120	20 435	20 535	-	-	11 711	-	-	39 975	-	-	-	-	73 175
14		12 077	24 758	24 781	-	-	3 203	-	-	26 078	-	-	24 956	15 782	29 801
15		10 510	66 127	51 189	-	-	9 743	-	-	48 721	-	-	50 012	35 394	63 360
16		9 315	37 241	28 711	-	-	9 002	-	-	28 277	-	-	26 115	18 975	41 212
17		9 957	35 217	35 211	7 695	8 863	8 349	12 275	29 564	36 494	12 816	35 925	34 629	22 717	
5		1 974	11 877	13 935	2 458	1 571	3 576	2 015	7 848	11 558	2 844	12 653	16 106	8 977	

NOTA: Con las células del paciente número 1 solo se hicieron curvas de respuesta al antígeno y al mitógeno.

Histo. = Suero de paciente con hiperfibrinólisis

( - ) = no se procesó.

FNA = Fibrinohemaglutinina

ug = microgramos (peso atómico).

ug = microgramos (peso estándar).

Se hicieron tres controles: 1.- control de células sin tratamiento con suero, ni estimulación con el antígeno; 2.- control de estimulación del antígeno, el cual representa las células estimuladas con 50 y 100 ug de PPD, sin incubación con suero; 3.- controles de sueros, en donde las células solo recibieron tratamiento con suero, sin ser sometidas a estimulación con el antígeno. Se observó que el suero anérgico tiene un efecto inhibitorio sobre la transformación blastoide tanto en las células incubadas con 200 ug así como con 400 ug de proteína del suero. Esto se pone de manifiesto al observar que las células incubadas con este suero (Fig. 6A y 6B) presentan cuentas por minuto tan bajas como las del control de células. La inhibición producida en las células estimuladas con 50 ug de PPD e incubadas con 400 ug de proteína del suero anérgico, así como en aquellas estimuladas con 100 ug e incubadas con 200 y 400 ug de proteína del mismo suero, cuando comparada con el control de estimulación es estadísticamente diferente (Tabla 7) según el análisis realizado por la prueba U de Mann Whitney para  $\alpha=0.01$ , e incluso hasta para  $\alpha = 0.001$ . Los cultivos celulares tratados con suero normal y autólogo no muestran ningún cambio en su transformación linfocítica. Estos resultados no son estadísticamente diferentes para ninguno de los dos casos (Tabla 7) ni siquiera para  $\alpha = 0.1$ , en comparación con el control de estimulación, según la prueba de U.

Por otro lado se encontró que la incorporación de timidina  $^3\text{H}$  Tdr del control de células en comparación con los controles de sueros son muy similares, por lo que no revelan diferencia por la prueba de U con  $\alpha=0.1$  a 0.01.

El efecto del suero sobre la transformación blastoide inducida por el antígeno en células de individuos sanos fue determinada (Fig. 7A y 7B). Se siguió el procedimiento descrito anteriormente y como se observa en ambas figuras el fenómeno de inhibición de la transformación blastoide se presenta nuevamente cuando las células de los individuos sanos  $\text{PPD}^+$  son puestas

TABLA 7

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACION BLASTOIDE CON PACIENTES TUBERCULOSOS PPD\* OBTENIDOS CON LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY.

Estimulación ug /PPD	Tratamiento ug/proteína suero	Comparaciones	Estadístico U	Tablas U	$\alpha$	Interpretación
0	200	n1 vs n2	71	75	0.01	-
		n1 vs n3	83	86	0.01	-
		n1 vs n4	83	86	0.01	-
	400	n1 vs n2	73	86	0.01	-
		n1 vs n3	79.5	86	0.01	-
		n1 vs n4	80	86	0.01	-
50	200	n1 vs n2	146	169	0.01	-
		n1 vs n3	83	169	0.01	-
		n1 vs n4	78	117	0.01	-
	400	n1 vs n5	7	9	0.05	+
		n1 vs n2	105	86	0.01	*
		n1 vs n3	68	86	0.01	-
100	200	n1 vs n4	53	86	0.01	-
		n1 vs n2	103	86	0.01	*
		n1 vs n3	53	86	0.01	-
	400	n1 vs n4	63	86	0.01	-
		n1 vs n2	225	169	0.01	*
		n1 vs n3	123	169	0.01	-
		n1 vs n4	91	117	0.01	-
		n1 vs n5	7	9	0.05	-

n1 = Control de estimulación  
 n2 = Tratamiento con suero anérgico  
 n3 = Tratamiento con suero normal  
 n4 = Tratamiento con suero autólogo

n5 = Tratamiento con suero histoplasmoso  
 \* = Diferencia estadísticamente significativa  
 - = Diferencia estadísticamente no significativa  
 $\alpha$  = Grado de confiabilidad.



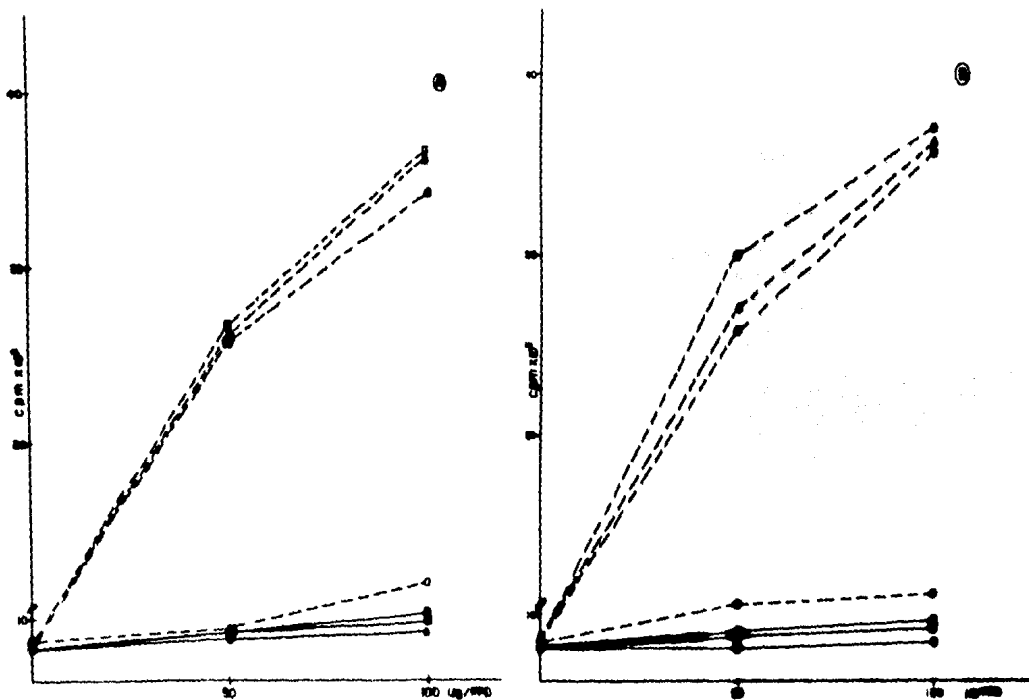


FIG. 7.- EFECTO DEL SUERO SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL ANTIGENO EN CELULAS DE INDIVIDUOS SANOS. Se trabajó con una población de 7 sujetos normales; la raya punteada (---) representa la media ( $\bar{x}$ ) de los cuatro individuos sanos PPD<sup>+</sup>, y la raya continua (—) la media ( $\bar{x}$ ) de los tres sujetos normales PPD<sup>-</sup>. Las células fueron incubadas 12 hr con 200 ug (A) y 400 ug (B) de proteínas de los diferentes sueros. Post-incubación fueron lavadas varias veces y posteriormente estimuladas con 50 y 100 ug de PPD. La prueba de U demostró diferencia estadísticamente significativa ( $\leq$ ) para  $\alpha=0.05$  entre las células de individuos PPD<sup>+</sup> incubadas con suero anérgico (○-○) y el control de estimulación con el antígeno sin tratamiento con suero (●-●); mientras que las células tratadas con suero normal (■-■), y con suero autólogo (Δ-Δ) no presentan diferencias comparadas con el control de estimulación.

en contacto con el suero anérgico. Para  $\alpha = 0.05$  la diferencia entre estas células y el control de estimulación es significativa (Tabla 8) por la prueba de U. Además las células de estos individuos, que fueron tratadas con suero normal y autólogo tampoco fueron afectadas. Por otro lado, las células de los pacientes sanos PPD<sup>-</sup> no respondieron a la estimulación con el antígeno, ni presentaron cambio en su transformación cuando fueron incubadas con los tres diferentes tipos de sueros utilizados (Fig. 7A y 7B).

Para caracterizar si el suero de sujetos con altos títulos para otra enfermedad pulmonar intracelular de nosología similar, como es la histoplasmosis, era capaz de inducir el mismo efecto mantenido por los sueros de pacientes con tuberculosis anérgica, se procedió al tratamiento de incubación con suero histoplasmoso durante la transformación linfocítica de las células de pacientes tuberculosos reactivos (Fig. 8A y 8B, Tabla 6a y 6b). Cuando estas fueron preincubadas con 200 y 400 ug de proteína de suero histoplasmoso y posteriormente estimuladas con 50 y 100 ug de PPD, se observó en las células incubadas con este suero una disminución en la incorporación de timidina tritiada, aunque no de la misma magnitud que la que presentan las células tratadas con el suero específico de pacientes anérgicos. El análisis estadístico refleja que la diferencia entre el efecto del suero histoplasmoso y el control de estimulación no es estadísticamente significativa para  $\alpha = 0.05$  (Tabla 7). Nuevamente los sueros normal y autólogo no presentan efecto inhibitorio.

Para verificar si el efecto de suero era específico y que además no alteraba la reactividad de las células a otras sustancias, como por ejemplo a la acción de mitógenos, se realizó una serie de experimentos en los cuales las células de pacientes reactivos al PPD, fueron incubadas con 0, 200 y 400 ug de proteína de los sueros anérgico, normal y autólogo y posteriormente estimuladas

TABLA 8

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACION BLASTOIDE CON INDIVIDUOS SANOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY.

Estimulación ug/PPD	Tratamiento ug/proteína suero	Comparaciones			Estadístico U	Tabla U	$\alpha$	Interpretaciones
50	200	n1	vs	n2	16	15	0.05	*
		n1	vs	n3	9	15	0.05	-
		n1	vs	n4	8	15	0.05	-
	400	n1	vs	n2	16	15	0.05	*
		n1	vs	n3	12	15	0.05	-
		n1	vs	n4	9	15	0.05	-
100	200	n1	vs	n2	16	15	0.05	*
		n1	vs	n3	10	15	0.05	-
		n1	vs	n4	9	15	0.05	-
	400	n1	vs	n2	16	15	0.05	*
		n1	vs	n3	9	15	0.05	-
		n1	vs	n4	8	15	0.05	-

n1 = Control de estimulación  
n2 = Tratamiento con suero anérgico  
n3 = Tratamiento con suero normal  
n4 = Tratamiento con suero autólogo  
\* = Diferencia estadísticamente significativa  
- = Diferencia estadísticamente no significativa  
 $\alpha$  = Grado de confiabilidad.

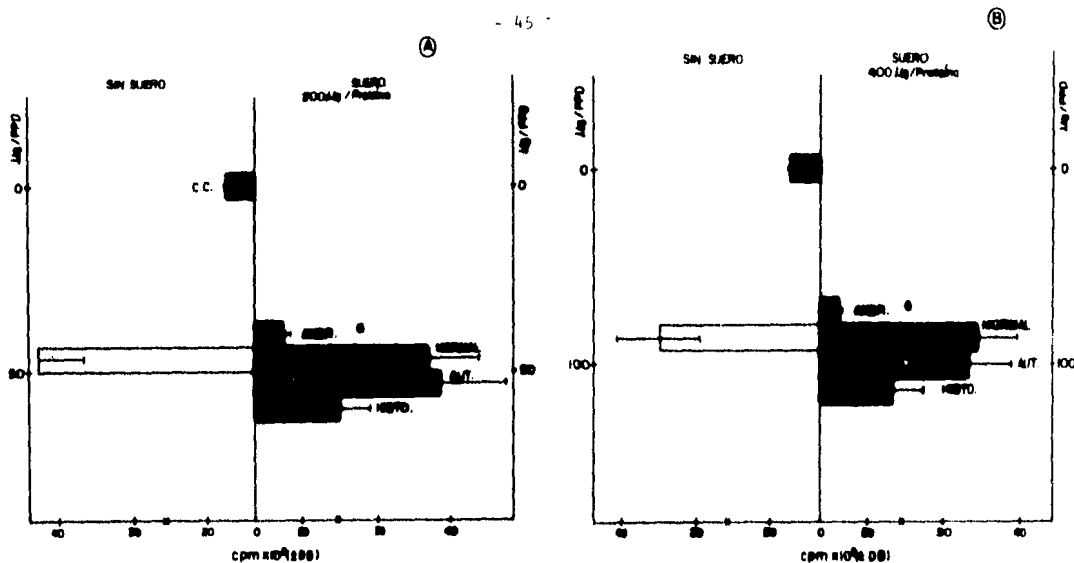


FIG. 8.- EFECTO DEL SUERO DE UNA ENFERMEDAD RELACIONADA (HISTOPLASMOSIS) SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL ANTIGENO EN CELULAS DE PACIENTES PPD+ CON TUBERCULOSIS PULMONAR. La figura representa la media ( $\bar{x}$ ) de 3 pacientes. Las barras de la izquierda en ambas gráficas representan controles de células (CC) y el control de estimulación con el antígeno (50 y 100 ug) sin incubación con suero. Las barras de la derecha representan los cultivos celulares incubados 12 hr con los sueros anérgico (Aner.), normal, autólogo (Aut.) y el proveniente de pacientes con histoplasmosis (Histo.). La figura (A) muestra las células incubadas con 200 ug de proteina de los sueros antes mencionados y estimuladas con 50 ug de PPD. La figura (B) representa las células incubadas con 400 ug de proteina de los diferentes sueros y estimuladas con 100 ug de PPD.

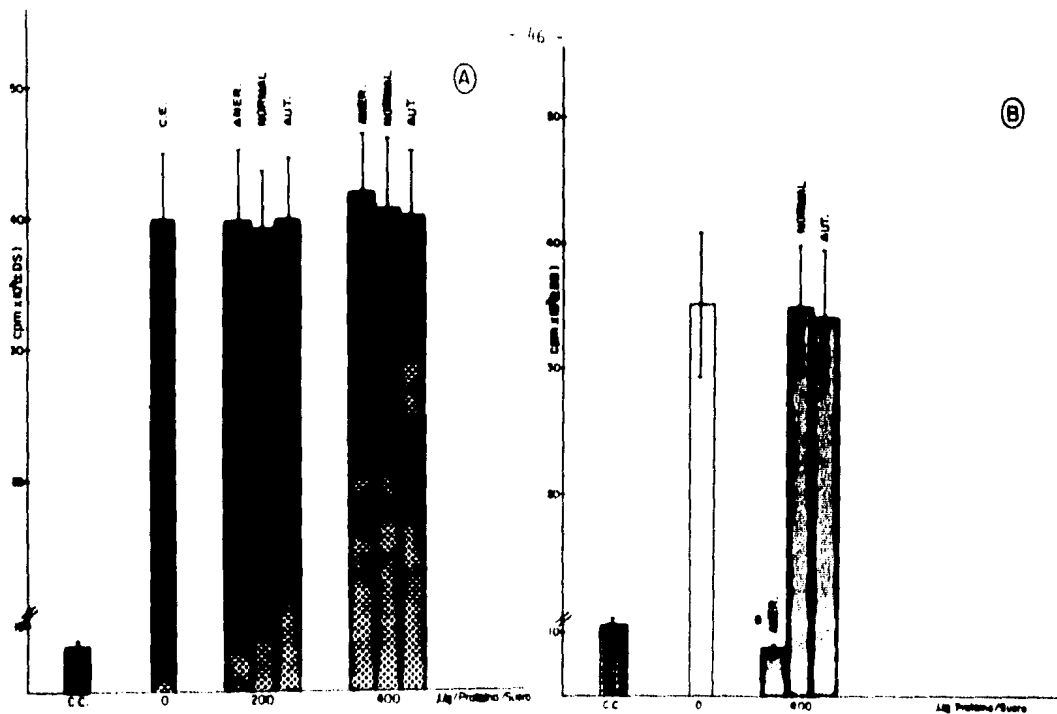


FIG. 9.- COMPARACION DEL EFECTO DEL SUERO INMUNE SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL MITOGENO (FHA) Y POR EL ANTIGENO EN PACIENTES PPD<sup>+</sup> CON TUBERCULOSIS PULMONAR. La Figura 9A representa la media ( $\bar{x}$ ) de 7 pacientes cuyas células fueron preincubadas con 200 y 400 µg de proteínas de los sueros anérgico (Aer.), normal y autólogo (Aut.) y estimuladas con 100 µg de proteína de FHA. La Figura 9B representa la media ( $\bar{x}$ ) de 3 pacientes cuyas células fueron preincubadas con 400 µg de proteínas de los sueros antes mencionados y estimuladas con 100 µg de proteína de FHA. La prueba de U demuestra que existe diferencia estadísticamente significativa (p para  $\alpha=0.05$ ) entre las células incubadas con suero anérgico y el control de estímulo de control; mientras que las células estimuladas con FHA no presentan diferencias cuando son comparadas con el control de estimulación.

con 100  $\mu$ g de proteína de fitohemaglutinina (FHA) (Fig. 9A). Estos cultivos celulares no fueron inhibidos por el suero anérgico como sucede cuando son incubadas con este suero y estimuladas con el antígeno PPD (Fig. 9B). La observación de la figura 9A pone de manifiesto que no existe diferencia en la incorporación de timidina tritiada entre las incubaciones con los diferentes sueros, incluso el anérgico, y el control de estimulación con FHA; mientras que en las células incubadas con estos sueros pero estimuladas con PPD, se repite el fenómeno de inhibición inducido por el suero anérgico y por tanto la diferencia es estadísticamente significativa para  $\alpha = 0.025$ .

Este último planteamiento se corroboró en individuos sanos PPD<sup>+</sup> donde también se observó el efecto específico que tiene el suero anérgico sobre la transformación blastoide de células reactivas al PPD. En la figura 10A se puede observar que las células incubadas con 200 y 400  $\mu$ g de proteína de suero anérgico y estimuladas con FHA no ven afectada su capacidad de transformarse, por lo tanto su incorporación de timidina tritiada es comparable con el control de estimulación con el mitógeno. Sin embargo, las células que estuvieron bajo tratamiento con suero anérgico y con posterior estimulación con el antígeno (Fig. 10B) presentaron inhibición con diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control de estimulación del antígeno para  $\alpha = 0.025$ . Los cultivos celulares incubados con los sueros normal y autólogo que fueron estimulados con PPD no presentaron cambio en su incorporación de timidina en comparación con el control de estimulación del antígeno y el mitógeno.

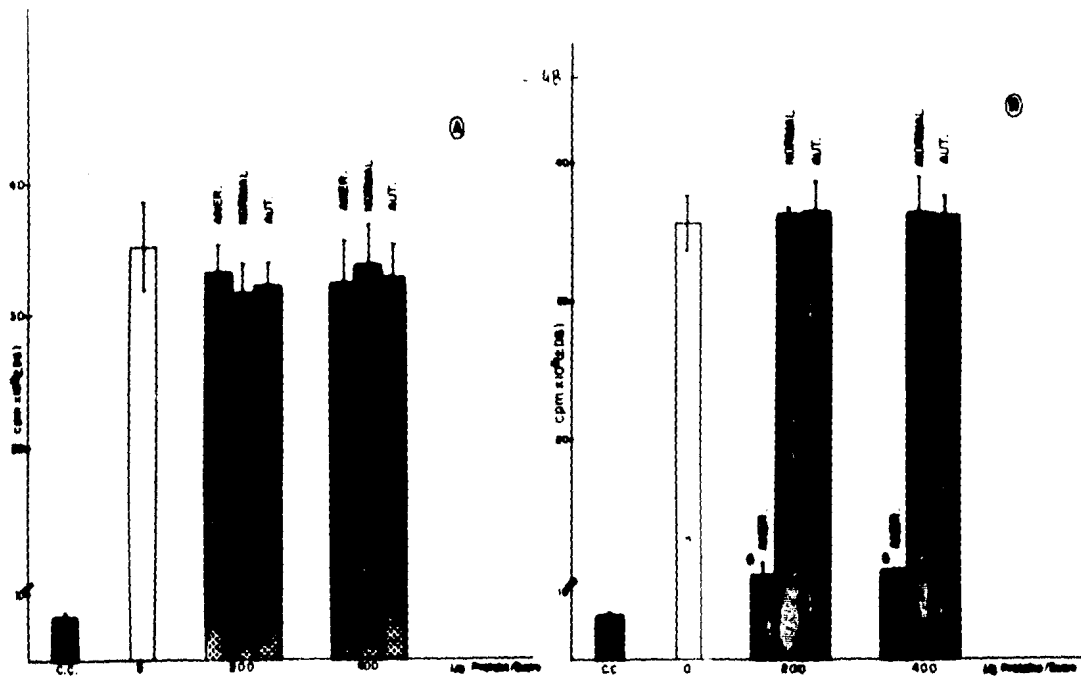


FIG. 10- COMPARACION DEL EFECTO DEL SUEPO IMMUNE SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE INDUCIDA POR EL MITOGENO (FHA) Y POR EL ANTIGENO (PPD) EN INDIVIDUOS SANOS. La figura 10A representa la media ( $\bar{u}$ ) de 5 individuos sanos cuyas células fueron preincubadas con 200 y 400 ug de proteína de los sueros anérgico (Aner.), normal y autólogo (Aut.) y estimuladas con 100 ug de proteína de FHA (■); la figura 10B representa la media ( $\bar{u}$ ) de los 5 individuos sanos cuyas células fueron incubadas con 200 y 400 ug de proteína de los sueros y estimuladas con 100 ug de PPD (■). La prueba de U demostró que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las células incubadas con suero anérgico y el control de estimulación con PPD; mientras que los cultivos celulares sometido al mismo tratamiento pero estimulados con FHA no presentan diferencias cuando se comparan con el control de estimulación.

## DISCUSION

La tuberculosis constituye uno de los modelos de infección intracelular donde la respuesta inmune mediada por células ha sido primeramente caracterizada y ha ocupado especial atención por parte de una amplia gama de especialistas. El estudio de la respuesta celular en este padecimiento ha generado muchas interrogantes, se observó por ejemplo que había pacientes con tuberculosis que no eran capaces de responder a la intradermorreacción con PPD, ni a pruebas celulares in vitro. Este hecho aunado a una respuesta humoral aumentada concurría con cierta frecuencia a un desenlace crítico de la enfermedad, lo que constituía una herramienta para la caracterización de mal pronóstico en la tuberculosis. Ya desde 1966, Heilman y Mc Farland (53) proponen una posible alteración en el suero de estos pacientes, la cual no permite la respuesta adecuada de las células comprometidas con la respuesta celular. Ellos reportan inhibición de la transformación blastoide por el suero de pacientes con tuberculosis moderadamente avanzada. Sin embargo el hecho de que este suero es puesto en contacto con las células durante todo el transcurso del experimento hace dudar del efecto inhibitorio de éste, y se podría pensar que más que inhibición, hubo una falta de estimulación de los linfocitos por ausencia del antígeno, ya que éste al ser administrado estaría siendo neutralizado por el suero. La baja casuística, la falta de controles adecuados, aunado a que este suero en algunos casos inhibe la transformación de células de donadores sanos PPD<sup>+</sup> y de pacientes con tuberculosis cuando son estimuladas con el mitógeno FHA, pone en duda la especificidad de la inhibición encontrada, y justifica la búsqueda de evidencias más contundentes que identifiquen el papel real de los anticuerpos en la tuberculosis, ya que a ellos no se les reconoce ningún papel protector y hasta hoy son mal utilizados en el diagnóstico. Partiendo de estos antecedentes se planteó este trabajo, tomando los cuidados debidos para descartar las críticas hechas al trabajo de Heilman y cols.



Dentro del contexto de este estudio se caracterizaron los aspectos inmunes generales, así como las características clínicas de los pacientes estudiados. El estudio de los aspectos inmunes generales, aportó datos que ameritan discusión. Se detectó que los valores para  $C_3$  se encuentran muy elevados en los enfermos, con excepción de los pacientes número 6 y 12 (Tabla 4), lo que no sucede para  $C_4$ . Como se sabe el complemento es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo e interviene principalmente en las reacciones citotóxicas específicas (11). La unidad  $C_3$  es la proteína más versátil de las muchas que componen el sistema del complemento y participa en la activación de la vía clásica y de la vía alterna, además se sabe que es precursor de fragmentos activos que presentan amplia gama de actividades biológicas, como el  $C_3b$  que no solo participa en la opsonización, sino que tiene gran actividad dentro del sistema del complemento. Se ha reportado que su deficiencia incrementa la susceptibilidad del paciente a las infecciones (60,61), pero no se ha caracterizado el significado biológico de su aumento. En la infección tuberculosa, Mc Murray y Echeverri han reportado que los valores de  $C_3$  se encuentran dentro del rango considerado como normal en los pacientes tuberculosos reactivos, como en los no reactivos (anérgicos) (62). Sin embargo no podríamos descartar la posibilidad de que la elevación de  $C_3$  podría ocasionar daño inmune, producido por su fijación inespecífica en las células, lo que facilita la lisis celular provocándose así el daño.

Otros parámetros séricos estudiados fueron el nivel de proteína C reactiva y la presencia de  $\alpha_1$  antitripsina ( $\alpha_1$  AT). Se encontró que los pacientes presentan tanto valores negativos (9/20), positivos (5/20), como altamente positivos (5/20) para la proteína C reactiva, lo cual no es raro si tomamos en cuenta que esta proteína está presente en el suero como indicador de un proceso inflamatorio. Los valores de  $\alpha_1$  AT, en el 75% de los pacientes se encuentran disminuidos, se ha reportado que esta pro-

teína previene la respuesta de anticuerpos y la síntesis de DNA en los linfocitos (63,64). También se sabe que las antiproteasas, entre ellas la  $\alpha_1$  AT tienen un papel inmunorregulador en la síntesis de anticuerpos (65).

La respuesta humoral en pacientes con tuberculosis es bastante irregular. Anticuerpos anti-M. tuberculosis están presentes por lo general en bajas concentraciones contra diferentes antígenos de M. tuberculosis (66). Por otro lado se han estudiado los cambios que existen en las proteínas séricas y en particular las Inmunoglobulinas totales en la evolución de la infección. Los reportes al respecto tienen cierta discrepancia, se ha encontrado un aumento de IgA en pacientes con tuberculosis pulmonar activa (67) mientras que otros autores reportan valores considerados como normales para este tipo de pacientes (11,62). En el presente estudio se encontró que los valores totales de IgA, IgM e IgG no están alterados (Tabla 4), con respecto a la actividad de las Inmunoglobulinas específicas detectadas por la técnica de ELISA, tampoco se identificó alguna alteración marcada.

Sin embargo en pacientes con tuberculosis miliar, o sin respuesta a la prueba intradérmica con PPD, se ha visto que los valores de IgA (67) e IgG (62) se encuentran aumentados significativamente con respecto a los controles sanos y a los pacientes con tuberculosis pulmonar. Por otro lado el título promedio de anticuerpos anti-PPD por la técnica de hemaglutinación para pacientes con tuberculosis pulmonar activa es de 1:8 y de 1:256 en pacientes con tuberculosis miliar (67)

Entre los muchos indicadores de infección tuberculosa quizá uno de los más utilizados tanto en diagnóstico, pronóstico y en estudio epidemiológico de prevalencia de tuberculosis, es la evidencia de reacción cutánea al PPD, que sugiere en los casos de respuesta positiva un contacto con M. tuberculosis, sea por una infección natural o por una inmunización artificial, siendo crítico en el diagnóstico, la conversión de un sujeto negativo (PPD<sup>-</sup>) a rector positivo (PPD<sup>+</sup>). Aunque la respuesta al PPD es una

herramienta muy útil, es sabido que existen tanto individuos sanos como enfermos tuberculosos que sistemáticamente responden negativamente a la prueba cutánea. En los individuos PPD<sup>+</sup> los linfocitos T que dan específicamente sensibilizados. Cuando estas células son sometidas a la prueba de transformación blastoide, utilizando PPD como antígeno, son estimuladas y entran en división acelerada aumentando la síntesis de DNA, por lo que incorporan timidina que se encuentra en forma radiactiva marcada con tritio (<sup>3</sup>H-Tdr). Esta incorporación se manifiesta en el aumento de cuentas de marcas radiactivas por minuto detectada en un contador de centelleo. Esto no sucede cuando hablamos de individuos que nunca han estado en contacto con el microorganismo, de ahí que sus células no se encuentran comprometidas, lo que se refleja en poca o ninguna respuesta a la intradermorreacción y baja incorporación de <sup>3</sup>H-Tdr. Por lo general, las pruebas de transformación blastoide se realizan con un control positivo de reacción, utilizando un mitógeno, sustancia que estimula inespecíficamente la división celular, en particular de linfocitos, y que a diferencia del antígeno, no requieren de un huésped sensibilizado. De ahí que las células de los individuos sanos son estimuladas por el mitógeno fitohemaglutinina, sea que provengan de individuos clasificados como PPD<sup>+</sup> o PPD<sup>-</sup>.

En los pacientes con tuberculosis, la respuesta a la prueba cutánea corresponde a la forma polar reactiva de esta enfermedad, mientras que su ausencia es característica de la forma polar no reactiva (8). La reactividad cutánea que define el comportamiento polar de los pacientes con tuberculosis es reforzada por la prueba in vitro de transformación blastoide, donde es sabido que los pacientes anérgicos no responden a la estimulación in vitro con el antígeno y es muy variable su respuesta a diferentes mitógenos (67).

Para trabajar con el antígeno PPD tuvimos que estandarizar la dosis óptima de nuestro lote de PPD por medio de curvas dosis-respuesta, primero en individuos sanos (Fig. 2) y después en enfermos con tuber-

culosis (Fig. 4) En ambos casos se vió que el incremento en la incorporación de timidina tritlada correspondía a las dosis de 50 y 100 ug de PPD, cuya representación en las gráficas corresponde a los puntos más altos. Se conoce que el PPD es un antígeno con acción mitogénica, algunos autores reportan como - dosis mitogénicas las concentraciones de 50 ug (68), sin embargo en este estudio se encontró que la transformación blastoide en las células de individuos sanos PPD<sup>-</sup> no se presenta con ninguna de las dosis utilizadas (Fig. 2), por lo que se descartó la posibilidad de que la estimulación encontrada en los linfocitos de individuos sanos (Fig. 2) y pacientes con tuberculosis (Fig. 3), ambos PPD<sup>+</sup>, correspondieron a una acción mitogénica del lote de PPD trabajado.

La existencia de un espectro inmune en la tuberculosis, donde la relación entre la respuesta humoral - y celular es inversa, nos ha permitido pensar en los anticuerpos como parte importante en la regulación de esta enfermedad. Esto no quiere decir que sean los únicos factores séricos involucrados en la disminución de la respuesta celular, puesto que se conocen otros factores séricos como la  $\alpha_1$ AT, la proteína C reactiva,  $\alpha$  globulina,  $\alpha$  fetoproteína, que también producen este efecto (37,64,69,70). Sin embargo en este estudio se detectaron niveles bajos de inhibidores inespecíficos como la proteína C reactiva y la  $\alpha_1$ AT.

El que la transformación blastoide de las células de los pacientes reactivos con tuberculosis solo sea inhibida por el suero de pacientes tuberculosos no reactivos al PPD, nos ha permitido pensar en el componente específico, los anticuerpos, como responsables de esta inhibición. Como el efecto podría ser dependiente de la concentración de proteína en los sueros, se trabajaron dos dosis: 200 y 400 ug. El hecho de que la incorporación de <sup>3</sup>H Tdr de los controles de células y los controles con linfocitos más - sueros sea similar, indica que los sueros por sí mismos no tienen ningún efecto sobre la transformación blastoide de estas células (U estadísticamente no significativa, Tabla 7). Por otro lado, el control - de estimulación sin incubación con suero ha permitido comprobar la capacidad reactiva de las células -

frente a la estimulación con el antígeno. Las incubaciones con suero normal y el proveniente del mismo paciente trabajado (autólogo) no interfieren con la transformación blastoide de las células, hecho que se revela al observar que la incorporación de  $^3\text{H}$  Tdr de estos cultivos y el control de estimulación es similar. La única incubación que disminuye la incorporación de timidina tritiada y por tanto inhibe la transformación blastoide es la del suero inmune procedente de individuos anérgicos, el cual como ya se reportó, es el único que tiene un alto título de anticuerpos anti-Mycobacterium tuberculosis (1:320). Como se recordará los sueros autólogos nunca alcanzaron títulos mayores de 1:80, y el suero normal dió título negativo (Tabla 5).

Al analizar los datos encontrados por la prueba estadística de U se detectó que la combinación 200 ug de suero anérgico con 50 ug de PPD es menos eficaz en la inhibición blastoide de las células de los pacientes, ya que es sólo estadísticamente significativa para  $\alpha = 0.05$ , mientras que las combinaciones de 400 ug de suero anérgico con 50 y 100 ug de PPD, así como la de 200 ug de suero anérgico con 100 ug de PPD fueron estadísticamente significativas para  $\alpha = 0.01$  (Tabla 7).

También se realizó otro control donde las células fueron estimuladas con el mitógeno FHA, para comprobar la viabilidad de estas al finalizar el tiempo de cultivo, así como su reactividad a otros estimulantes (Tabla 6a y 6b).

Se ha pensado en los anticuerpos como parte clave de la inhibición encontrada, porque con nuestra estrategia se les compromete íntimamente como responsables de la inhibición, ya que una vez cumplido el período de incubación con los diferentes sueros, las células son lavadas extensivamente, partiendo del supuesto de que los anticuerpos presentes en alta concentración en el suero anérgico interaccionarían con las células provenientes de pacientes reactivos. Como se puede observar en la figura 1 estos - -

anticuerpos anti-M. tuberculosis no están presentes en el suero normal y lo están en muy baja concentración en el autólogo, lo descrito anteriormente no sucedería en las células incubadas con estos sueros, por lo que no habría nada que interfiriera en su transformación cuando fueran estimuladas con el antígeno. Además, las lavadas seriadas eliminarían los anticuerpos libres en exceso, así como, cualquier otro factor sérico que pudiera inhibir inespecíficamente la prueba celular. Newberry y col (71) también sugieren que los anticuerpos pueden ser los responsables de la inhibición de la transformación blastoide in vitro de células de pacientes con histoplasmosis crónica. Aunque basados en el mismo -- planteamiento, incurrían en el mismo error del trabajo de Hellman antes mencionado. En ambas investigaciones las células están en contacto con el suero durante todo el tiempo de incubación del experimento, por lo que nuevamente queda en duda si realmente hubo inhibición o el antígeno se vio neutralizado por los anticuerpos presentes en el suero, de tal forma, que no hubo acceso de antígeno a los receptores celulares disponibles, las células no pudieron ser adecuadamente estimuladas y por tanto no hubo transformación. Esto aunado a la ausencia de controles pertinentes, como el control de estimulación sin incubación con los sueros autólogos, no permite establecer un verdadero índice de inhibición. Por otro lado, la especificidad del suero queda en entredicho al recordar que existen otros factores séricos - que suprimen la inmunidad celular in vitro, los cuales podrían estar presentes en el suero de los pacientes con histoplasmosis crónica.

Otra evidencia que ha permitido apoyar nuestra hipótesis, es el hecho de que en las células incubadas con el suero anérgico pero estimuladas con el mitógeno FHA no se presenta el fenómeno de inhibición de la transformación blastoide, sugiriendo la especificidad en la inhibición inducida por el suero anérgico. Con esto además se descarta la posibilidad de muerte celular a causa del suero inmune (Fig. 9A y 9B).

Se estudió el efecto del suero de pacientes con histoplasmosis sobre las células de los sujetos con tuberculosis reactiva. No hay que olvidar que ambas enfermedades son causadas por parásitos intracelulares y que aunque sus etiologías son distintas comparten una nosología y resolución semejantes, además de que con frecuencia desarrollan cruce inmune entre ambos. Los resultados detectados demostraron una aparente disminución en la transformación de las células incubadas con el suero histoplasmoso, sin embargo el análisis estadístico reveló que no existe diferencia significativa ni para  $\alpha = 0.1$ , hecho que contribuye a apoyar el planteamiento de que el efecto inhibitorio del suero anérgico es específico,

La acción del suero anérgico sobre las células de individuos sanos PPD<sup>+</sup> reveló que el efecto inhibitorio se repite en este modelo, pero solo es estadísticamente significativo para  $\alpha = 0.05$  (Tabla 6), mientras que como se recordará la inhibición de las células de los pacientes con tuberculosis es estadísticamente significativa hasta para  $\alpha = 0.01$  (Tabla 7).

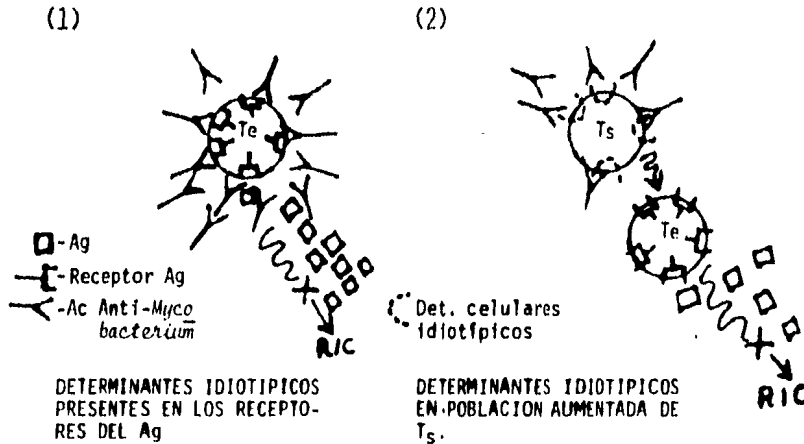
Los anticuerpos como moléculas reguladoras son los presuntos responsables de la inhibición encontrada, actuando posiblemente como modificadores de la función protectora dada por la respuesta celular, sin embargo, el mecanismo por el cual la modifican, no se conoce. Hellman (57), propone que el anticuerpo específico, reacciona con los determinantes antigénicos para la tuberculina u otros antígenos del Mycobacterium, incapacitándolos para promover el estímulo antigénico que desencadenaría la respuesta celular. Alternativamente propone, un factor circulante que actuaría bloqueando las células encargadas de la respuesta celular, no permitiendo así la expresión del fenómeno de transformación, cuando son estimuladas con el antígeno. Por otro lado, y no en desacuerdo con estos planteamientos, sino tan solo con más información recabada de investigaciones posteriores, se proponen en este trabajo otros mecanismos (Fig. 11,12)

por los cuales se estaría inhibiendo la transformación blastoide de las células de los pacientes con tuberculosis reactivos al PPD: A) Por efecto anti-idiotipo los anticuerpos anti-Mycobacterium podrían presentar reacción cruzada con idiotipos presentes en los linfocitos (Fig 11); en este mecanismo se proponen dos alternativas 1) El anticuerpo formado para proteger contra el antígeno, actúa como anticuerpo anti-idiotipo al reconocer los determinantes idiotípicos presentes en los receptores al antígeno, de los linfocitos T efectoras de la respuesta, bloqueándose así la capacidad para responder. Los resultados de Colizzi y cols. (27) al encontrar que anticuerpos auto-anti-idiotipo con actividad al BCG inhiben por transferencia pasiva la intradermorreacción al antígeno específico en ratones infectados con BCG apoyan este planteamiento. 2) Los anticuerpos anti-Mycobacterium reconocen los determinantes idiotípicos de las células T supresoras activándolas, estas a su vez actúan sobre los linfocitos T efectoras inhibiendo su actividad dando como consecuencia una deficiente respuesta celular. Existen varios trabajos que apoyan esta hipótesis: Yamamoto y cols. (50) encontraron que la intradermorreacción de ratones BALB/c a un hapteno, puede ser suprimida por la transferencia pasiva de anti-hapteno con función de anti-idiotipo. Observaron que el antisuero induce la actividad de las células T supresoras específicas para ese idiotipo, las cuales actúan suprimiendo tanto la fase inductiva como la efectora de la intradermorreacción. Sy y cols. (28, 31, 49, 72) han estudiado el funcionamiento del mecanismo por el cual los idiotipos regulan la función de las células T en la hipersensibilidad retardada al hapteno p-azofenilarsenato en ratones A/J. Sus datos muestran que la dosis de anticuerpos anti-idiotipo que fueron dadas después de la estimulación antigénica, induce la formación de células T supresoras que inhiben la respuesta de hipersensibilidad tardía. En este caso el sistema de supresión idiotípica está mediado por células T supresoras que pueden funcionar por la acción del complejo idiotipo-anti-idiotipo. Apoyando estas ideas Watson y Klimpel en modelos tuberculosos, reportan que ratones infectados con altas dosis de BCG desarrollaron células T supresoras capaces de inhibir la intradermorreacción al bacilo (73, 74).



FIG. 11.- POSIBLES MODELOS DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-*Mycobacterium* EN LA RESPUESTA CELULAR.

(A) POR EFECTO ANTI-IDIOTIPO-LOS ANTICUERPOS ANTI-*Mycobacterium* TIENEN REACCIÓN CRUZADA CON IDIOTIPOS PRESENTES EN LINFOCITOS.



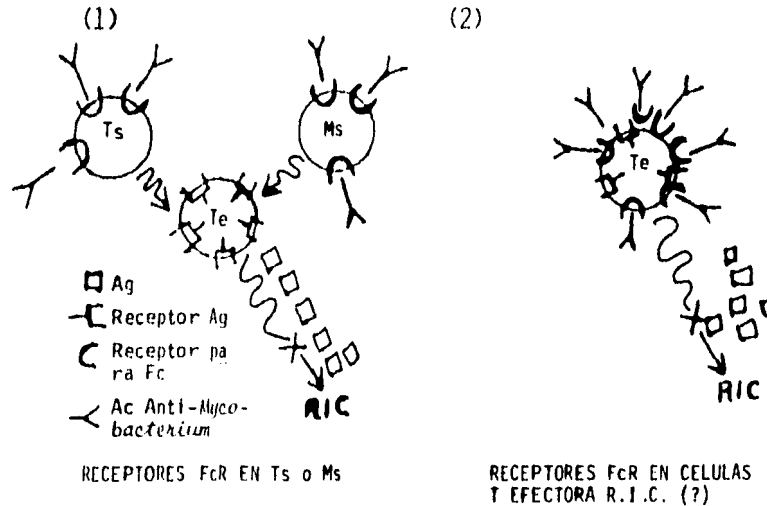
APOYOS (2) - Sy, M-S., Bach, B.A., Dohi, Y., Nisonoff, A., Benacerraf, B. and Greene, M.I. (1979). J. Exp. Med. 150, 1216.

(2) - Bottomly, K., Mathieson, B.J. and Mosier, D.E. (1978). J. Exp. Med. 148, 1216.

Abreviaturas: Te= Célula T efectora de la respuesta celular; Ts= Célula T supresora.  
RIC= Respuesta Inmune Celular.

FIG. 12.- POSIBLES MODELOS DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-*Mycobacterium* EN LA RESPUESTA CELULAR.

(B) A TRAVÉS DE LOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO PARA FcR DE LOS ANTICUERPOS ANTI-*Mycobacterium* EN SUPERFICIES CELULARES.



APOYO (1) - Moretta, L., Mingari, M.C.; Moretta, A., Haynes, B.F. and Fauci, A.S. (1980). In "Progress in Immunology IV" (M-Fougereaud and J. Dausset eds.) p. 223. Academic Press N. York.

Abreviaturas: Te= Célula T efectora de la respuesta celular; Ts= Célula T supresora; Ms= Macrófago con actividad supresora.

RIC= Respuesta Inmune Celular.

Otros investigadores (75,76) también han demostrado que la porción Fc de los anticuerpos anti-idiotipo es necesaria para suprimir la respuesta inmune, lo que sugiere que la supresión vía anti-idiotipo puede ser mediada por la interacción del anti-idiotipo con el receptor para el antígeno y con el receptor Fc, o bien por el cruce de ambos receptores sobre la superficie del linfocito.

Otros posibles modelos de interferencia de anticuerpos anti-Mycobacterium en la respuesta celular son:

B) A través de los sitios de reconocimiento para FcR de los anticuerpos anti-Mycobacterium en superficies celulares (Fig. 12). Se propone: 1) Que existen receptores en los linfocitos y macrófagos supresores para la porción Fc del anticuerpo, el cual se pegaría a la célula, activándola para suprimir la acción de los linfocitos T efectoras y por ende la respuesta inmune celular. Esta hipótesis encuentra apoyo en el trabajo de Moretta y cols (72). Otra posibilidad aunque un poco más difícil, pero no por eso descartable es: 2) Que los linfocitos T efectoras además del receptor para el antígeno tuvieran receptores para Fc, de ahí que una vez que se uniera el anticuerpo presente en altas concentraciones, podría enmascarar a los receptores para el antígeno, o provocar un cambio a nivel de membrana que evitaría que estas células llevaran a cabo la estimulación por el antígeno. Como los complejos antígeno anticuerpo son excelentes formas para la intrusión ilícita de los anticuerpos auto-anti-idiotipo, se ha propuesto que puede ser de esta forma que dichos anticuerpos interfieren con la acción de los linfocitos T; Hayward y cols. (78) proponen que la inmunosupresión encontrada in vitro, al poner en contacto linfocitos T y complejos inmunes, es provocada por la interacción de la porción Fc de los determinantes antigénicos de las inmunoglobulinas presentes en los complejos inmunes con los receptores de los linfocitos T, siendo estos inducidos a presentar actividad supresora. Además, tanto los complejos inmunes que contienen IgG como los que contienen IgM pueden provocar que las células T in vitro adquieran actividad supresora, siendo que los complejos inmunes han sido identificados en sistemas tumorales (79) y enfermedades infecciosas como histoplasmosis (39), coccidiofomicosis (43) y tuberculosis (45), etc.

La imaginación junto con las investigaciones hasta ahora realizadas con respecto al papel de los anticuerpos sobre la respuesta celular; en particular en la tuberculosis, han permitido plantear, los anteriores modelos de acción, donde se trata de comprometer a los anticuerpos como modificadores de la respuesta inmune celular. Reconocemos el hecho de que estos modelos, por ser hipotéticos, tienen muchas interrogantes por resolver, y aunque algunos de ellos ya cuentan con evidencias que los apoyan directamente, faltan datos para el modelo tuberculoso.

El presente trabajo muestra evidencias del papel del anticuerpo como inmunorregulador de la respuesta celular en la infección tuberculosa. Sin embargo, queda aún por aclarar el mecanismo por el cual actuaría. Hechos que constituyen el futuro de nuestras investigaciones,

CONCLUSIONES

- 1.- El efecto inhibitorio del suero inmune anti-Mycobacterium tuberculosis sobre la transformación blastoide de células de pacientes tuberculosos reactivos al PPD, sugiere una posible acción moduladora de los anticuerpos específicos sobre la respuesta celular de estos pacientes.
- 2.- Los componentes séricos presentes en sueros de individuos sanos PPD<sup>+</sup> y autólogo, con títulos bajos de anticuerpos, no tienen efecto inhibitorio en la respuesta celular.
- 3.- El hecho de que las células de pacientes con tuberculosis PPD<sup>+</sup>, estimuladas con el mitógeno FHA no fueran inhibidas por el suero anérgico, además de que el suero de otra enfermedad relacionada (histoplasmosis) no tuvo efecto marcado en la respuesta de dichas células, son evidencias que apoyan la hipótesis de que la inhibición encontrada con el suero anérgico es específica.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Zinsser, H. 1964. Bacteriología de Zinsser, Ed. Uthea. México. pp. 15
- 2.- Bernard, D.D., R. Dulbeco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg y B.W. Wood. 1969. Microbiology, Ed. A Harper International. Canada. pp. 978.
- 3.- Hinshaw, H.C. y J.F. Murray. 1983. Enfermedades del Torax, Ed. Interamericana, México. pp. 12-15
- 4.- Youmans, G.P., P.Y. Patterson y H.M. Sommers. 1982. Infectología clínica, Ed. Interamericana, México. pp. 418-439.
- 5.- Calderón, J.E. 1978. Conceptos clínicos de infectología. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. pp. 38-45.
- 6.- Jawetz, E., J.L. Melnik y E. A. Adelberg. 1973. Manual de Microbiología Médica, Ed. El Manual Moderno, S.A. México. pp. 222-223.
- 7.- Thoen, C.O. 1979. Factors associated with pathogenicity of Mycobacteria in Microbiology. Ed. D. Scheele Singer. Washington D.C. pp. 162-167.
- 8.- Lenzini, L., P. Rottoli y L. Rottoli. 1977. The spectrum of human tuberculosis. Clin. Exp. Immunol. 27: 230-237.
- 9.- Armstrong, J.A., P.D. Hart. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli: reversal of the unusual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J. Exp. Med. 142: 1-16.
- 10.- Bach, J. F. 1984. Inmunología. Ed. Limusa. México, pp. 347-352.
- 11.- Stites, P.D., J.D. Stobo, H.H. Fudenberg y J.V. Wells. 1983. Inmunología básica y clínica. Ed. El Manual Moderno, México. pp. 718.

- 12.- Myrvick, Q.N., N.N. Persal y R.S. Weisser, 1977, Bacteriología clínica. Ed. Interamericana. México. pp. 331-365.
- 13.- Hoeprich, P.D. 1972, Infectious Diseases. Ed. Hoper y Row. Hagerstown, Maryland. pp. 361
- 14.- Lefford, J.M. 1975, Delayed hipersensitivity and immunity in tuberculosis, Amer. Rev. Respir. Dis. 3:109-118.
- 15.- Lurie, M.B. 1941, Heredity, constitution and tuberculosis: an experimental study. Am. Rev. Tuberc. 44 (suplement) 1-125.
- 16.- Lurie, M.B., S. Abramson y A. G. Heppleston, 1952, On the response of genetically resistant and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human type tubercle bacilli and the nature of resistance to tuberculosis. J. Exp. Med. 95:119-134.
- 17.- Selman, L.M. 1982, Correlación clínica e inmunopatológica en la tuberculosis, Revista de la Facultad de Medicina, XXV:500-504.
- 18.- Al-Arifi, L., R.A. Goldstein, L.F. Affronti, J.W. Foellmer y B.W. Janacki, 1977, Immunogenetic aspects of tuberculosis. Proc. 12 th. Joint Conference on tuberculosis. United States-Japan Cooperative Medical Science Program 351.
- 19.- Unanue, E.R. 1980, Cooperation between mononuclear phagocytes and lymphocytes in immunity. N. Engl. J. Med. 303: 977-985.
- 20.- Gillis, S. 1983, Interleukins - 2: Biology and Biochemistry, J. Clin. Immunol. 3: 12-19
- 21.- Katz, P., R.A. Goldstein y A.S. Fauci. 1979, Immunoregulation in infection caused by Mycobacterium tuberculosis: the presence of suppressor monocytes and the alteration of subpopulations of T lymphocytes. J. Infect. Dis. 140: 12-21.
- 22.- Collins, F.M. 1979, Cellular anti microbial immunity. Rev. Microbiol. 7:27 -91.

- 23.- Collins, F.M., C.C. Congdon y N.E. Morrison. 1975. Growth of Mycobacterium bovis (BCG) In T, lymphocyte depleted mice, Infect. Immun. 11: 57-64.
- 24.- Reggiardo, Z y G. Middlebrook, 1974. Failure of passive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in guinea pigs, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 173-175
- 25.- Mackaness, G.B. 1954. The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits. Am. Rev. Tuberc. 69: 495-504.
- 26.- Armstrong, J.A. y P.D'A Hart. 1975. Phagosome lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. J. Exp. Med. 142: 1-16.
- 27.- Collzli, V., M.Giuntini, C. Garzelli, M. Campa y G. Falcone, 1983. Short Communication, Auto anti-Idiotypic antibodies inhibit T-cell mediated hypersensitivity in BCG - infected mice, Cell. Immunol. 80: 205-210.
- 28.- Sy, M.S., A.R. Brown, B. Benacerraf y M.I. Grecene. 1980. Antigen and receptor driven regulatory mechanism. III. Induction of delayed type hypersensitivity to azobenzearsonate with anti-cross reactive Idiotypic antibodies, J. Exp. Med. 151: 896-909.
- 29.- Taylor, M.L., C.C. Eslava, G.R. Garcia y A.R. Hernández. Relation between cellular and humoral - immune response in mice immunized with Histoplasma capsulatum. In. Kuttin C,S, Baum G,L, eds. - Human and animal mycology; proceedings of the 7th Congress of ISHAM, Jerusalem, Israel, March 11-16, 1979. New York: Elsevier/North Holland, 1980: 97-101.
- 30.- Taylor, M.L., S. Díaz, P.A. González, A.C. Sosa y C. Toriello, 1984. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: A hypothetical approach. Rev. Infect. Dis. 6: 775-780
- 31.- Sy, M.S. 1979. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. I. Induction of suppressor T cells with anti-Idiotypic - antibodies, J. Exp. Med. 150: 1216-1228.
- 32.- Neveu, P.J., V.V. Micusan, A. Fafard y A.G. Borduas. 1978. Modulation of the immune response by passive antibodies. IV Effects of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> anti-hapten antibodies. Immunology 35: 129-132.



- 33.- UHR, J.W. y J.B. Bauman. 1961. Antibody formation I. The suppression of antibody formation by - passively administered antibody. J. Exp. Med. 113: 935-957.
- 34.- Uhr, W. J. y G. Moller. 1968. Regulatory effect of antibody on immune response. Adv. Immunol. 8: 81 -127.
- 35.- Jerne, N.K. 1974. Towards a network theory of the immune systems. Ann. Immunol. (Paris) 125: 373-389.
- 36.- Nelson, D.S., J.M. Penrose, M.F.R. Waters, J.M.H. Pearson y M. Nelson. 1975. Depressive effect of serum from patients with leprosy on mixed lymphocyte reactions. Clin. Exp. Immunol. 22: 388-391.
- 37.- Mortensen, R.F. y A.P. Osmand. 1975. Effects of C reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-dependent lymphocytes and alteration of their functions. J. Exp. Med. 141: 821-839.
- 38.- Nahgoub, El Sheik . 1975. Proc. Third . Inter. Conf. Mycosis. Sao Paulo, Brasil. p. 154.
- 39.- Bullock, W.E., R.P. Artz y D. Bathena. 1979. Histoplasmosis. Association with circulating immune complexes, eosinophilia, and mesangiocapillary glomerulonephritis. Arch. Intern. Med. 139: 700-702.
- 40.- Theofilopoulos, A.N. y F.J. Dixon. 1979. The biology and detection of immune complexes. Adv. Immunol. 28: 89-220.
- 41.- Gupta, R.C. , F.D. Kueppers, R.A. De Rames, K.A. Houston y F.C. Mc. Duffic. 1977. Pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis in relation to circulating immune complexes. Am. Rev. Respir. Dis. 261-266.
- 42.- Carr, R.I., A.K. Chakraborty y M.J. Brunda. 1980. Immune complexes y antibodies to BCG in sera from patients with mycobacterial infections. Clin. Exp. Immunol. 39: 562-594.
- 43.- Yoshinoya, S., R.A. Cox y R.M. Rope. 1980. Circulating immune complexes in coccidioidomycosis. J. Clin. Invest. 60: 655-663.

- 44.- Casali, P. y R.H. Lambert. 1979. Purification of soluble immune complexes from serum using polymethacrylate beads coated with conglutinin or Clq. Clin. Exp. 37: 295-309.
- 45.- May, J.J. , J. Katilus, P.M. Henson y R.B. Dreislin. 1983. The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 128:920-925.
- 46.- Lema, N.K. 1974. Expression and function of idiotypes on lymphocytes. Am. Immunol. 1250: 373-379.
- 47.- Rodkey, L.S. 1980. Autoregulation of immune responses via idiotypic network interaction. Microbiol. Rev. 44: 631-659.
- 48.- Sy, M.S., J.W. Moorhead y H.N. Clamon. 1979. Regulation of cell mediated immunity by antibodies: possible role of anti-receptor antibodies in the regulation of contact sensitivity to DNFB in mice. J. Immunol. 123: 2593-2598.
- 49.- Sy, M.S., B.A. Bach, A. Brown, A. Nisonoff, B. Benecemal y M.I. Greene, 1979. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. II. Induction of suppressor T cells with idiotypic coupled syngenic spleen cells. J. Exp. Med. 150: 1229-1240.
- 50.- Yamamoto, H. 1979. Suppression of haptenspecific delayed type hypersensitivity responses in mice by idiotypic specific suppressor T cells after administration of anti-idiotypic antibodies. J. Exp. Med. 150: 818-829.
- 51.- Yamamoto, H. y D.H. Kats. 1979. Effective suppression of hapten specific delayed type hypersensitivity (DTH) responses in mice by anti-idiotypic antibodies. In : Bach F.H., Bonavida B., Vitetta, E.S., Fox, C.F. eds. T and B lymphocytes: recognition and function. New York: Academic Press . pp. 305-315.
- 52.- Ridley, D.S. y W.H. Jopling. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. Lepr. 34:255
- 53.- Hellman, H.D. y W. Mc. Farland. 1966. Inhibition of tuberculin -induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. Int. Arch. Allergy. 30:59-66.

- 54.- Kabat, A.E. 1968. Inmunología experimental, Ed. Fournier. México. pp, 529-531.
- 55.- Weir, D.M. 1978. Handbook of experimental immunology, Blakwell Scientific Publications Great Britain 3<sup>th</sup> edición pp. 19.2-19.10
- 56.- Voller, A., D.E. Bidwell y A. Bartlett, 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) - Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. The Zoological Society of London,
- 57.- Hernández, V.R., A.G. Acosta, Ibarra, C.M.A. 1981. Manual de técnicas de inmunología. México D.F.
- 58.- Corrales, I.M.A. 1981. Inmunoensayo enzimático diagnóstico ELISA, Cordis Laboratories, Inc, Miami, Fla.
- 59.- Siegel, S. 1977. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Ed. Trillas, México, pp. 240-244.
- 60.- Alper, C.A., K.J. Bloch y F.S. Rosen. 1973. Increased susceptibility to infection in a patient with type II essential hypercatabolism of C<sub>3</sub>. N. Engl. J. Med. 288: 601-607.
- 61.- Alper, C.A. y K.J. Bloch, 1970. Studies in vitro and in vivo on an abnormality in the metabolism of C<sub>3</sub> in a patient with increased susceptibility to infection. J. Clin. Invest. 49: 1975-1981.
- 62.- Mc Murray, N.D. y A. Echeverri. 1978. Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 118: 827-834.
- 63.- Dierich, M.P., B. Landen y M. Schmitt. 1979. Complement receptor analogous factors in human serum. I. Isolation of a molecule inhibitory for complement dependent rosette formation its identification as  $\alpha_1$  - antitrypsin and its functional characterization. Z. Immun- Forsch. 156: 153-157.
- 64.- Arora, P.K., H.C. Miller y L.D. Aronson. 1978.  $\alpha_1$  Antitrypsin is an effector of immunological - stasis. Nature (Lond.) 274: 589-590.

- 44.- Casali, P. y R.H. Lambert. 1979. Purification of soluble immune complexes from serum using polymethacrylate beads coated with conglutinin or C1q. Clin. Exp. 37: 295-309.
- 45.- May, J.J. , J. Katilus, P.M. Henson y R.B. Dreisin. 1983. The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 128:920-925.
- 46.- Leme, N.K. 1974. Expression and function of idiotypes on lymphocytes. Am. Immunol. 125C: 373-379.
- 47.- Rodkey, L.S. 1980. Autoregulation of immune responses via idiotypic network interaction. Microbiol. Rev. 44: 631-659.
- 48.- Sy, H.S., J.W. Moorhead y H.N. Clamon, 1979. Regulation of cell mediated immunity by antibodies: possible role of anti-receptor antibodies in the regulation of contact sensitivity to DNFB in mice. J. Immunol. 123: 2593-2598.
- 
- 49.- Sy, H.S., B.A. Bach, A. Brown, A. Nisonoff, B. Benacemal y M.I. Greene, 1979. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. II. Induction of suppressor T cells with idiotypic coupled syngenic spleen cells. J. Exp. Med, 150: 1229-1240.
- 50.- Yamamoto, H. 1979. Suppression of haptenspecific delayed type hypersensitivity responses in mice by idiotypic specific suppressor T cells after administration of anti-idiotypic antibodies. J. Exp. Med. 150: 818-829.
- 51.- Yamamoto, H. y D.H. Kats. 1979. Effective suppression of haptenspecific delayed type hypersensitivity (DTH) responses in mice by anti-idiotypic antibodies. In : Bach F.H., Bonavida B., Vitetta, E.S., Fox, C.F. eds. T and B lymphocytes: recognition and function. New York: Academic Press . pp. 305-315.
- 52.- Ridley, D.S. y W.H. Jopling. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. Lepr. 34:255
- 
- 53.- Hellman, H.D. y W. Mc. Farland. 1966. Inhibition of tuberculin-induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. Int. Arch. Allergy. 30:58-66.

- 74.- Klimpel, G.R. y C.S. Henry. 1978. BCG-Induced suppressor cells. *J. Immunol.* 120: 563-569.
- 75.- Pawlak, L.L., D.A. Hart y A. Nisonoff. 1973. Requirements for prolonged suppressive of an Idiotype specificity in adult mice. *J. Exp. Med.* 137: 1442-1458.
- 76.- Kohler, H., B.C. Richardson, D.A. Rowley y S. Smyk. 1977. Immune response to phosphorylcholine. III Requirement of the Fc portion and equal effectiveness of IgG subclasses in anti-receptor antibody - induced suppression. *J. Immunol.* 126: 233-238.
- 77.- Moretta, L., M.C. Mingari, A. Moretta, B.F. Haynes y A.S. Fauci. 1980. In "Progress in Immunology IV" (M- Fougereaud and J. Dausset eds) Academic Press N. York, pp. 223.
- 78.- Hayward, A.R., L.L. Layward, L. Moretta, L.M. Dagg y A. R. Lowton. 1978. Fc receptor heterogeneity of human suppressor T cells. *J. Immunol.* 121: 1-5
- 79.- Sjogren, H.O., I. Hellstrom, S.C. Bansal y K. E. Hellstrom. 1971. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor bearing individuals may antigen-antibody complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 1372-1375.