

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

2
26

UACPyP/CCH.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DEL FENOTIPO,
RECEPTORES PARA ANTIGENO Y
PRODUCCION DE CITOCINAS DE LOS
LINFOCITOS T QUE RESPONDEN A LOS
ANTIGENOS DE 23 (SOD), 28, 30-31,
38 Y 50-55 kDa. DE M. tuberculosis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

CARMEN MARTHA ELINOS BAEZ

MEXICO, D.F. TESIS CON 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A DIOS CON TODA MI FÉ

A mi hija, Dra. Luz María Farías Elinos por su apoyo y valiosa ayuda interviniendo con el Instituto de Enfermedades Respiratorias en la obtención de pacientes con tuberculosis para realizar este proyecto.

A mi hijo, Ing. en Cibernética y Sistemas Computacionales Mario Farías Elinos por su apoyo y valiosa ayuda al dirigir la presentación de esta tesis y sus gráficos.

A mi hija, QFB Martha Farías y a su esposo, Dr Carlos Mauricio Laguna Izquierdo por el apoyo que me brindaron en todo momento para realizar este proyecto.

A mi esposo por su apoyo y confianza en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez, por su valiosa dirección para llevar a cabo esta tesis. Muchas gracias.

Al Dr. Lino Díaz de León, por su orientación académica como cotutor de este proyecto.

Al Dr. Librado Ortiz-Ortiz, por su valioso apoyo al permitirme realizar este proyecto.

Al Lic. de la Mora y a Lucy, por su apoyo que me mostraron en todo momento

A mis compañeros del laboratorio: Chayo Germán, Hugo y Ciro.

A mis amigos: Antonio y Nancy, Carlos y paty, Julio Cesar y mary, Ascensión y lolita, Alfredo y Miriam, Dayana, Laura, José, Karla Irma Gustavo, Alejandro, Mónica, nacho, Jorge, Claudia, Claudia G., Maricela, Angélica, Erika, Octavio, Miguel.

A las secretarias Violeta, Azucena, Pelita, Amada, Isabel, gracias por su ayuda.

A los fotógrafos y dibujantes: Sr. José, Sr. Jorge, Sr. Enrique y Sr. Rafael, por su valiosa colaboración.

INDICE

Resumen	1
1. Antecedentes	3
1.1. Introducción	3
1.2. Historia de la tuberculosis	3
1.3. Patogenia de la tuberculosis	4
1.4. Inmunología de la tuberculosis	6
a. Inmunidad humoral	6
b. Inmunidad celular	6
c. Inmunosupresión	7
1.5. Subpoblaciones de Linfocitos CD4+	9
a. CD4+ murinos	9
b. CD4+ humanos	11
1.6. Citocinas y subpoblaciones CD4+ en la tuberculosis	14
1.7. Citocinas: Glosario	15
2. Objetivo	19
3. Materiales y métodos	20
3.1. Medidas de seguridad	20
3.2. Cultivo de <u>Mycobacterium tuberculosis</u> y obtención del extracto proteínico total (EPT) de la micobacteria	21
3.3. Selección de proteínas a purificar	22
3.4. Fraccionamiento del EPT por el método de Seibert	23
3.5. Purificación de la proteína de 28 kDa (P 28)	24
3.6. Purificación de la proteína de 30-31 kDa que une fibronectina (Fn 30-31)	25
3.7. Purificación de la glicoproteína de 38 kDa (Gp 38)	25
3.8. Purificación de la glicoproteína de 50-55 kDa (Gp 50-55)	25
3.9. Purificación de la enzima superóxido dismutasa de 23 kDa (SOD)	29
3.10. Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNH)	30
3.11. Curvas dosis-tiempo-respuesta de CMNH	31
3.12. Obtención de líneas celulares humanas	32
3.13. Determinación del fenotipo y de los receptores para antígeno de las líneas celulares humanas	33

3	14. Determinación de citoquinas en las líneas celulares humanas por bioensayo.....	35
3	15. Determinación de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por ELISPOT en las líneas celulares humanas.....	36
3	16. Análisis de la respuesta de linfocitos T murinos a antígenos purificados de <u>M. tuberculosis</u>	38
3	17. Obtención de células esplénicas murinas (CEM).....	38
3	18. Curvas dosis-tiempo-respuesta de CEM.....	38
3	19. Obtención de líneas celulares murinas.....	39
3	20. Determinación del fenotipo y receptores para antígeno de las líneas celulares murinas.....	39
3	21. Determinación de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por ELISPOT en las líneas celulares murinas.....	40
4.	Resultados.....	43
	Purificación de antígenos de <u>M. tuberculosis</u>	43
4-	1. Fraccionamiento del EPT por el método de Seibert.....	43
4-	2. Purificación de P 28.....	43
4-	3. Purificación de Fn 30-31.....	44
4-	4. Purificación de Gp 38.....	44
4-	5. Purificación de Gp 50-55.....	44
4-	6. Purificación de SOD.....	44
4-	7. Respuesta blástica de CMNH.....	46
	a. Respuesta al EPT.....	46
	b. Respuesta de individuos sanos a antígenos purificados.....	47
	c. Respuesta de enfermos con tuberculosis pulmonar a la fitohemaglutinina.....	48
	d. Respuesta de enfermos con tuberculosis pulmonar a antígenos purificados de <u>M. tuberculosis</u>	48
4-	8. Respuesta blástica de CEM.....	49
4-	9. Líneas celulares humanas.....	50
4-	10. Fenotipo de las líneas celulares humanas.....	50
4-	11. Fenotipo de las líneas celulares murinas.....	51
4-	12. Producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por las líneas celulares humanas.....	51
4-	13. Producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por las líneas celulares murinas.....	54
5.	Discusión.....	55

6. Conclusiones.....	63
Apéndice A: Tablas y figuras.....	64
Apéndice B: Reactivos	96
Apéndice C: Abreviaturas.....	102
Referencias	103

RESUMEN

En la estrategia para combatir la tuberculosis tiene prioridad el desarrollo de nuevas vacunas. El hecho de que la vacunación con BCG presente variabilidad en su eficacia contra la infección por M. tuberculosis, como lo muestran las pruebas controles realizadas que van del 0 al 80% de protección (Fine, P. M. E., 1989), indica la necesidad de nuevas estrategias de vacunación, lo cual requiere entre otros estudios, de la identificación de antígenos micobacterianos inmunoprotectores.

En vista de que la respuesta inmune mediada por células es de gran importancia en la protección contra el bacilo de Koch, realizamos estudios para caracterizar la respuesta de 4 individuos sanos (2 PPD+, 2 PPD-) y de cuatro enfermos con tuberculosis, a los antígenos nativos purificados SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de M. tuberculosis cepa H37 Rv. Estas proteínas se purificaron por métodos desarrollados en nuestro laboratorio y con ellas se realizaron, curvas de dosis-tiempo-respuesta de linfocitos de sangre periférica. En general, la respuesta blástica fue más intensa con Gp 38, sobre todo en los individuos PPD+. En cuanto a la respuesta de los pacientes con tuberculosis, uno con enfermedad avanzada presentó anergia a todos los antígenos y otro con tuberculosis resistente al tratamiento presentó anergia a SOD y respuestas leves a los otros antígenos. Otros dos pacientes, uno con tuberculosis y diabetes y otro con tuberculosis temprana, presentaron respuestas leves a todos los antígenos. Se obtuvieron líneas celulares de los controles sanos y de los enfermos con cada uno de los antígenos para determinar, por FACS los fenotipos CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ y

por ELISPOT las citocinas secretadas, IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ . Los 5 antígenos indujeron predominantemente linfocitos CD4 con receptores para antígeno del tipo $\alpha\beta$. Las líneas celulares de los cuatro sujetos sanos produjeron exclusivamente IFN γ e IL-2, indicativo de un perfil Th1. Las líneas celulares de los enfermos presentaron heterogeneidad en la producción de citocinas: el enfermo con tuberculosis avanzada respondió con un patrón Th1 a Gp 38; con un patrón Th2 a P 28 y con un patrón Th0 a SOD, Fn 30-31 y Gp 50-55. El enfermo con tuberculosis y diabetes presentó un perfil Th1 con SOD, Gp 38 y Gp 50-55 y un perfil Th0 a P 28 y Fn 30-31. El paciente con tuberculosis resistente al tratamiento respondió con un patrón Th1 a Fn 30-31 y Gp 50-55 y con un patrón Th0 a SOD, P 28 y Gp 38. El paciente con tuberculosis temprana desarrolló un perfil Th1 a SOD, P 28, Fn 30-31 y un perfil Th0 a Gp 38 y Gp 50-55.

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción

La tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que el bacilo infecta al 33% de la población del mundo, presentándose alrededor de 8 millones de nuevos casos al año y de 2 a 3 millones de muertes anuales (Murray, C. J. L. y col. 1990). La enfermedad es multifactorial en lo que respecta a las causas que la provocan, debiendo mencionarse: factores genéticos, deficiencias nutricionales, hacinamiento y la inmunosupresión.

1.2 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas y era ya un problema endémico en animales, mucho tiempo antes que afectara al hombre (Steele, J. H. y col. 1958). En fósiles de animales del periodo paleolítico se ha demostrado la enfermedad, y en momias egipcias se han identificado restos de lesiones tuberculosas (Willet, H., 1992). Posiblemente en aquel tiempo el agente causal era Mycobacterium bovis o una variante. Al formarse las aldeas hubo un contacto más cercano entre los humanos y también con los animales que domesticaban, facilitándose el contagio de las enfermedades infecciosas. Posteriormente, el hacinamiento en las ciudades europeas facilitó que la tuberculosis se tomara epidémica como sucedió en la Europa feudal, donde se desató la llamada “gran peste blanca” (Dubos, R. y col. 1952). En épocas posteriores, la tuberculosis se diseminó a otras regiones del planeta debido a la colonización.

Aristóteles, célebre filósofo griego (384-322 A.JC), describió la enfermedad y desde entonces hay referencias sobre su origen y tratamiento. En 1679, el médico francés F. Silvius describió las lesiones pulmonares características, los tubérculos. Villemin, en 1865, inoculando conejos con el esputo de pacientes tuberculosos, reprodujo la enfermedad (Bloom, B. R. y col. 1992). En 1882, Roberto Koch demostró que la tuberculosis era causada por una bacteria y reprodujo la infección en cobayos (Grange, J. M. y col. 1982). Calmette y Guérin obtuvieron una cepa atenuada del bacilo de la tuberculosis bovina a la que se denominó bacilo de Calmette-Guérin (BCG), la cual ha sido utilizada desde 1924 como vacuna en casi todo el planeta. Esta vacuna, sin embargo ha mostrado una protección que varía de 0% a 80% (Fine, P., 1989).

1.3 Patogenia de la tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo aerobio facultativo, inmóvil, que no forma esporas y es ácido-alcohol-resistente. Su crecimiento es lento, con un tiempo de generación de 15 a 20 h, por lo que tienen que transcurrir varias semanas para que las colonias sean visibles en cultivo. El único reservorio conocido es el ser humano. Al toser, el paciente con tuberculosis disemina gotitas de saliva con un diámetro de 1 a 5 μm (gotitas de Flüger) que portan al bacilo, y al ser inhaladas pueden transmitir la enfermedad (Edwards, D. y col. 1986). Para que el bacilo inhalado provoque la infección pulmonar deben tomarse en cuenta otros factores como la virulencia y la capacidad microbicida del macrófago alveolar que lo ingiere; si el bacilo supera las defensas iniciales del huésped podrá reproducirse dentro del

macrófago y se desarrollará la enfermedad (Armstrong, J. y col. 1971 ; Myrvik, Q. y col. 1984). Se ha demostrado que el bacilo de Koch puede eludir los mecanismos microbicidas del macrófago para lo cual se han propuesto diversos mecanismos (Britton, W. J. y col. 1994). Al no haber destrucción del bacilo, se desarrolla la respuesta inmune celular y la inflamación (Armstrong, J. y col., 1975) Linfocitos y macrófagos llegan al sitio de la infección, se forma el granuloma, el cual, pequeño al principio, aumenta su volumen por la llegada continua de linfocitos T y de macrófagos en diversas etapas de activación; los macrófagos pueden fusionarse y formar células gigantes multinucleadas (Canetti, G., 1955).

En el granuloma, los macrófagos activados producen enzimas proteolíticas, peróxido de hidrógeno, radicales libres de oxígeno y óxido nítrico, para matar al microorganismo ingerido (Nathan, C. F. y col. 1983). Las enzimas hidrolíticas como la fosfatasa ácida y la lisozima atacan la pared celular y se producen ácidos grasos libres que inhiben la proliferación del bacilo (Jones, G. S. y col. 1990). En individuos con respuesta inmune normal, la inmunidad celular detiene el progreso de la infección, pero pueden quedar algunos bacilos viables dentro del granuloma. La reacción positiva a la tuberculina posiblemente sería el único vestigio de esta primo-infección, la cual podría reactivarse, sobre todo en procesos de inmunosupresión (Dannenbergh, A. M. Jr. y col. 1989).

Cuando no se controla la proliferación del bacilos, la infección puede diseminarse a otros órganos, dando lugar a pequeñas lesiones granulomatosas de unos 2 mm, lo que se llama tuberculosis miliar, nombre utilizado por los patólogos debido a que las lesiones pequeñas semejan semillas de mijo

(Uberoi, S., 1975). El desarrollo de la enfermedad y la diseminación masiva se presentan en huéspedes con inadecuada inmunidad celular (Sifford, M., 1991), en lactantes y en niños menores de 5 años, en adultos con trastornos malignos, alcoholismo o sometidos a tratamiento con inmunosupresores, o en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (Fischl, M. A. y col. 1992).

1.4 Inmunología de la tuberculosis

a. Inmunidad humoral. Las infecciones micobacterianas estimulan la respuesta humoral, sin embargo las inmunoglobulinas tienen una acción modesta o ninguna en la protección en contra de la tuberculosis (Reggiardo, Z. y col. 1974). La presencia de anticuerpos circulantes puede ser útil para corroborar el diagnóstico de la enfermedad (Abou-Zeid, C. y col. 1988; Bothamley, G. y col. 1992), aunque posiblemente en el futuro la detección de la tuberculosis se realice por amplificación del DNA bacteriano (Pierre, C. y col. 1991). La fagocitosis de micobacterias por macrófagos no se ve afectada de manera importante por los anticuerpos (Mackaness, G., 1954). Se encuentran complejos inmunitarios circulantes en el suero de individuos con tuberculosis (Carr, R. y col. 1980; May, J. y col. 1983), los que están compuestos por IgG, IgM e IgA y antígenos micobacterianos. Concentraciones altas de complejos inmunitarios circulantes se correlacionan con mal pronóstico (Johnson, N. M. y col. 1981). Puede presentarse nefritis por complejos inmunitarios en individuos con tuberculosis (Shribman, J. H. y col. 1983; Wadee, A. A. y col. 1990).

b. Inmunidad celular. En infecciones por M. tuberculosis, las células T con receptores $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ tienen papeles importantes en la respuesta inmune.

Los linfocitos T con receptores $\gamma\delta$ se encuentran en los sitios de la infección durante la respuesta temprana y los $\alpha\beta$ predominan en la fase tardía de la respuesta inmune (Barnes, P. F. y col. 1992). Además se ha observado que si la infección se realiza con la bacteria viva se expanden preferencialmente células T $\gamma\delta$, las que son también inducidas por las proteínas micobacterianas de estrés calórico (O'Brien, R. y col. 1989).

En 1992, Orme y col. postularon dos vías por las cuales se adquiriría resistencia a la infección tuberculosa. Una vía se caracteriza por la activación mediada por citocinas liberadas por células T de ayuda ($CD4^+$) para inducir al macrófago a destruir al bacilo que lo parasita y la otra vía comprende la destrucción de células parasitadas con el bacilo por células T citolíticas ($CD8^+$). La primera vía se presenta en las fases tempranas de la infección y la segunda alcanza su máxima actividad de 10 a 20 días después de iniciada la infección (Kumararate, D. y col. 1990; Orme, I. y col. 1992). En la inmunidad protectora mediada por células $CD4^+$ de ratones infectados con el bacilo de Koch se observaron moléculas con el marcador CD44, lo que hace suponer que estas moléculas son marcadores de células T de memoria (Griffin, J. y col. 1994). Otros investigadores han identificado células T de memoria inducidas por antígenos micobacterianos de bajo peso molecular en ratones infectados (Andersen, P., 1994), por lo que estos antígenos podrían ser considerados candidatos para vacunas (Harris, D. y col. 1993).

c. Inmunosupresión. Un factor fundamental en la patogenia de la tuberculosis es la capacidad del bacilo y sus productos para suprimir la respuesta inmune en contra de él. Se han observado estados de anergia en algunos individuos como una respuesta inmune regulatoria debida

posiblemente a la inmunosupresión inducida por algunos componentes del bacilo (Barnes, P. y col. 1993). Existen individuos que presentan predisposición para el desarrollo de la infección tuberculosa progresiva con niveles muy bajos de IFN γ y por lo tanto una deficiente activación macrofágica. Posiblemente por alguna razón se induce una anormal producción de la linfocina como se observó en un grupo étnico de la India en los trabajos realizados por J. A. Robinson en 1985, presentando anergia en casos de tuberculosis progresiva no tratada. En cambio se observó respuesta proliferativa de sus células mononucleares de sangre periférica con baja producción de IFN γ (Onwubalili, J. y col. 1985), por lo que la anergia no se considera generalizada. Se podría pensar en muerte celular en el cultivo o pérdida de la respuesta celular inducida por el antígeno debido a la interacción de células supresoras que inhiban la actividad de las células sensibles al antígeno originando una secreción inadecuada de IFN γ y que al no haber activación de macrófagos la enfermedad progresa. Existen evidencias de que moléculas de la pared celular del bacilo tuberculoso son potentes inmunosupresores (Florentino, D. y col. 1989). Además hay abatimiento en la producción de IL-2 por células T de ayuda, demostrada por la anergia presentada por los linfocitos T de pacientes con tuberculosis y que no se corrige al adicionar IL-2 purificada, lo que indica un desorden en el metabolismo regulatorio de la IL-2 (Toosi, Z. y col. 1986).

Se ha demostrado en cultivos *in vitro*, que al ser ingerido el bacilo tuberculoso por células adherentes de sangre periférica se liberan factores de activación de células supresoras, induciendo a las células CD8⁺ a inhibir la proliferación de los linfocitos T (Sussman, G. y col. 1991)

1.5 Subpoblaciones de linfocitos CD4⁺

Los estudios realizados en las últimas tres décadas con respecto a los linfocitos T de ayuda (CD4⁺) han mostrado la existencia de subpoblaciones primero en ratones y últimamente en humanos.

a. CD4⁺ murinos. En 1978, Tada y col. descubrieron dos tipos de células T de ayuda murinas, las cuales podían actuar independientemente y también en forma sinérgica para aumentar o disminuir la respuesta inmune, y que fueron designadas Th1 y Th2 (Tada, T. y col. 1978). Las células Th1, que no eran adherentes al nylon, intervenían en la respuesta temprana a la infección y activaban a las células B solo si los determinantes antigénicos estaban en la misma molécula, un hapteno acoplado a un acarreador heterólogo. En cambio las células Th2 se adherían al nylon, intervenían en la respuesta tardíamente y podían activar a las células B aún cuando los determinantes antigénicos estuvieran en moléculas diferentes. Además las células Th1 no exhibían antígeno Ia y las Th2 eran destruidas por antiseros anti-Ia más complemento.

Los estudios anteriores fueron ampliados y profundizados por Mosmann obteniendo clonas de células T de ayuda de ratones, con las que llevaron a cabo ensayos que confirmaron la existencia de dos subpoblaciones de células CD4⁺ y las definieron usando los siguientes criterios:

- 1) Síntesis y secreción de linfocinas, correspondiendo a Th1 la secreción de IL-2 e IFN γ , y a Th2 la secreción de IL-4 e IL-5.
- 2) Reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío, interviniendo en esta reacción la subpoblación Th1 y no así la Th2

3) Activación de las células B estimuladas por clonas Th1 a liberar IgG-2a y las estimuladas por clonas Th2 a liberar IgE.

4) En geles, las células Th1 presentan dos bandas de 17 y 18 kD y las Th2 una banda de 16 kD.

(Mosmann, T. R. y col. 1986)

En estudios posteriores, al inyectar clonas Th1 en el cojinete plantar de ratones sanos se observó una induración característica de hipersensibilidad retardada pues la inflamación empezó a ser visible a las 16 horas y llegó a su pico a las 24 horas. Las clonas Th2 no mediaron esta respuesta, posiblemente porque a diferencia de las Th1 no secretan leucotrienos y prostaglandinas que producen permeabilidad vascular y extravasación de células inflamatorias (Cler, D. J. y col., 1987).

Utilizando métodos de hibridización de RNA se ha demostrado que en las clonas de células Th1 se encienden genes para expresar mRNA-IL-2, mRNA-IFN γ y en las Th2 para mRNA-IL-4 y mRNA-IL5. Además, ambas clonas expresan mRNAs para otras linfocinas comunes (Cherwinski, H. M. y col. 1987). En otros estudios se demostró que las células Th1 inducen la síntesis de IgG2a y que las Th2 inducían la producción de IgG1 e IgE, (Stevens, T. L. y col. 1988; Finkelman, F. y col. 1988; Kühn R. y col. 1991).

En estudios posteriores se ha demostrado una tercera subpoblación que no producía IL-2 o IL-4, denominada de células nulas y una cuarta subpoblación capaz de secretar IL-2 e IL-4, así como las demás linfocinas, a esta subpoblación se le denominó Th0, la cual podría ser precursora de Th1 y Th2 o también una subpoblación de transición de Th1 a Th2, esto derivado

de las observaciones en cultivos de largo plazo, en los cuales la estimulación con antígeno o mitógeno, inducía la pérdida de la capacidad de secretar IL-2 e IFN γ pero no IL-4, diferenciándose así hacia Th2 (Scott, P. y col. 1991; Haanen, J. y col. 1991).

En otro experimento se estudió la respuesta proliferativa de las subpoblaciones Th1 y Th2 utilizando diferentes células presentadoras de antígeno y se observó que las clonas Th1 alcanzaban máxima proliferación cuando el antígeno era presentado por macrófagos o células dendríticas y las Th2 cuando la célula presentadora de antígeno era la célula B. Esto podría deberse a la existencia de cofactores proporcionados por células especializadas (Grajewski, T. y col. 1991).

Street, N. y col. en 1990 propusieron un esquema (ver figura 1.1) para describir las relaciones entre las diferentes subpoblaciones de células CD4⁺:

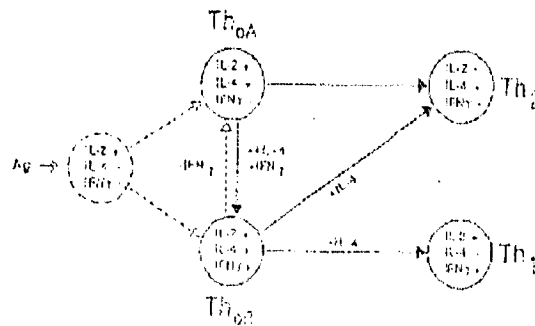


Fig 1.1. Esquema propuesto por Street, N. y col

b. CD4⁺ en humanos. Trabajos recientes han demostrado que las células T de ayuda humanas presentan subpoblaciones con perfil de producción de citocinas semejantes a lo observado en el ratón. En este

experimento se obtuvieron clones de células T específicas para PPD de M. tuberculosis y para Dermatophagoides pteronyssinus grupo I., y se observó que todas las clones específicas para PPD secretaron IL-2 e IFN γ pero no IL-4 ni IL-5 y las clones específicas de alérgenos secretaron IL-4 e IL-5. (Del Prete, G. y col. 1991).

Otros trabajos comprobaron que las células T de ayuda humanas se dividían en subpoblaciones Th1 y Th2 como las células T de ayuda murinas. En un primer estudio se observó que clones de células CD4⁺ humanas aisladas del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide fueron reactivas a diferentes proteínas micobacterianas, mostrando un perfil de producción de citocinas correspondientes a Th1 (Haanen, J. y col. 1991; Burford-Foggs, A. y col. 1992). En otro estudio se observó que las células humanas tratadas con PPD secretaron IFN γ y las tratadas con toxoide tetánico secretaban IL-4 (ElGhazali, G. y col. 1993). Estos resultados están basados en experimentos *in vitro*, sin embargo las citocinas secretadas por las células T en el sitio de la infección micobacteriana no se conocen bien pero se puede considerar a la primoinfección controlada como un modelo de respuesta inmune protectora realizada *in vivo*, resolviéndose la infección sin tener que recurrir a terapias, observándose un incremento de las células T CD4⁺ con el fenotipo de memoria CD_w29 y CD44, así como una fuerte producción de IFN γ (Orme, Y., 1988). Esto demuestra la presencia de subpoblaciones de células T de ayuda con funciones diferentes, que tal vez son adquiridas por las células T recién egresadas del timo al ser activadas por el antígeno en diferentes condiciones e interviniendo factores que inducen su diferenciación. Estos factores pueden ser: la estructura física y química del antígeno, la vía de

inmunización, la intensidad del estímulo de la célula T de ayuda, los diferentes tipos de células presentadoras de antígeno, el genotipo HLA, la activación por hormonas esteroides y posiblemente el efecto más importante es la activación inducida por las citocinas, así la IL-2 promueve la formación de células efectoras prescindiendo de las otras citocinas y el IFN γ puede influenciar sobre los precursores de las células T de ayuda para diferenciarlas en Th1 y la IL-4 para inducir las en Th2 en el mismo precursor dependiendo de los niveles endógenos de IFN γ e IL-4 (Maggi, E. y col 1992). En la tabla 1.1 se resumen las diferencias entre células Th1 y Th2.

CITOCINA	Th1	Th2
IL-2	+	-
IL-3	+	+
IL-5	-	+
IL-6	-	+
IL-10	+	+
IFN γ	+	-
TNF	+	+
GM-CSF	+	+
LT	+	-
DTH	+	-
IgG1	-	+
IgG2a	+	-
IgE	-	+

Tabla 1.1 Diferencias entre las subpoblaciones CD4.

1.6 Citocinas y subpoblaciones CD4⁺ en la tuberculosis.

Las citocinas son esenciales en la génesis de la respuesta inmune mediada por células contra las infecciones y en este caso contra la infección por M. tuberculosis, con efectos variados incrementando la atracción, agregación y activación de macrófagos, estimulando también a células B, linfocitos T tanto de humanos como de ratones (Sander, B. y col. 1995). Existe una variedad de estudios que han demostrado la inducción de la producción de IFN γ *in vitro* por antígenos micobacterianos; esta citocina capacita a macrófagos en la destrucción del bacilo (Onwubalili, J. K. y col. 1985; Del Prete, G. F. y col. 1991; Haanen, J. B. y col. 1991). El factor de necrosis tumoral beta (TNF β), estudiado por Peter F. Barnes y col. en 1992, induce agregación de macrófagos mediando la formación del granuloma y contribuyendo en la defensa antimicobacteriana (Rook, G. A. y col. 1989). La IL-2 interviene en la expansión clonal de células T específicas o no de antígeno y de células efectoras en la respuesta inmune mediada por células (Toosi, Z. y col. 1986; Barnes, P. y col. 1993; Boesen, H. y col. 1995). Se ha observado que en pacientes tuberculosos con anomalías en la producción de IL-2 o en la generación de receptores para IL-2, la enfermedad está más extendida. Por su parte la IL-2 es una interleucina producida por linfocitos T activados, que en presencia de IFN γ incrementa la resistencia de los ratones Balb/c contra la tuberculosis (Flynn, J. L. y col. 1995). La IL-4 interviene en formas progresivas no controladas de la enfermedad tuberculosa (Barnes, P. y col. 1993). La IL-5 se puede encontrar en algunas personas en el sitio de la aplicación de la prueba de la tuberculina sugiriendo que las células, quizá Th0, responden al antígeno micobacteriano liberando IL-5. Esta última

citocina, la IL-4 y la IL-10 activan a células B incrementando la síntesis de anticuerpos (Tsicopoulos, A. y col. 1992). También se ha visto que la IL-10 limita la respuesta inflamatoria y que puede disminuir la hipersensibilidad de tipo tardío y resultar en anergia en algunos pacientes. Entender el circuito inmunoregulatorio que controla la producción de citocinas en la infección por la micobacteria *in vivo*, parece ser fundamental en la patogénesis de la tuberculosis, pues ayudaría a desarrollar estrategias inmunoterapéuticas.

1.7 Citocinas: Glosario

Las citocinas son polipéptidos secretados principalmente por células T activadas (aunque también pueden hacerlo células B, monocitos, NK, macrófagos activados, basófilos, granulocitos, mastocitos, fibroblastos, keratinocitos, células endoteliales), que afectan el crecimiento y el metabolismo de otras células y de ellas mismas. El nombre citocinas se le dio originalmente para designar las moléculas producidas por las células del sistema inmune como una respuesta biológica que modifica al mismo sistema inmune interviniendo en el crecimiento y diferenciación de las células T. Diversos estímulos regulan la producción de las diferentes citocinas (Dinarello, C. y col 1987).

La mayoría de los receptores de las citocinas tienen características comunes y se encuentran presentes en la superficie celular y como receptores solubles. Las citocinas pueden formar una red compleja y exhibir interacciones sinérgicas aditivas y antagónicas ya que la respuesta celular es modulada por otras citocinas ya sea en forma positiva o negativa. Exactamente cómo una citocina modula el efecto de la otra se desconoce, así

como la modulación cruzada de la respuesta celular. Enseguida se describe el origen y propiedades de algunas citocinas.

IL-1.

Con un peso molecular (PM) de 17.5 kDa. Es secretada por macrófagos activados, keratinocitos y células endoteliales. Induce la proliferación de linfocitos T y B. Incrementa la síntesis de receptores para IL-2 y la síntesis de ICAM. Eleva la secreción de IL-6, TNF, GM-CSF.

IL-2.

Con un PM de 15 kDa. Es secretada por linfocitos T activados. Induce proliferación y diferenciación de linfocitos T y B e incrementando la síntesis de anticuerpos y cambio de clase a IgG2a. Activa a macrófagos, NK y LAK.

IL-3.

Con un PM de 28 kDa. Es secretada por linfocitos T, granulocitos y basófilos. Activa los precursores hematopoyéticos.

IL-4.

Con un PM de 16.5 kDa. Es secretada por linfocitos T activados. Induce proliferación de linfocitos T y B incrementando la síntesis de anticuerpos y cambio de clase a IgG1. Eleva la síntesis de IgE, la liberación de G-CSF y M-CSF. Induce Th2.

IL-5.

Con un PM de 15 kDa. Es secretada por linfocitos T y B activados, mastocitos. Induce proliferación de células B y de eosinófilos, incrementa la síntesis de IgA e IgM. Eleva la actividad de NK.

IL-6.

Con un PM de 23 kDa. Es secretada por células mononucleares y linfocitos T activados, fibroblastos, células endoteliales. Induce proliferación de linfocitos T y síntesis de IL-2, proliferación de células B y síntesis de anticuerpos. En macrófagos incrementa la síntesis de receptores para Fc. Activa a células NK.

TNF α .

Con un PM de 17 kDa Es secretado por linfocitos T, macrófagos, células NK activados, mastocitos. Induce proliferación de linfocitos T e incrementa la expresión de receptores para IL-2, Interviene en la destrucción tumoral.

TNF β .

Con un PM 20 kDa. Induce en los linfocitos T la síntesis de IFN γ . Activa la proliferación de linfocitos B y síntesis de anticuerpos. En los macrófagos incrementa la expresión de moléculas de clase II del MHC, de IL-1, de prostaglandinas. En células NK eleva su actividad citotóxica

IFN γ

Con un PM de 34 kDa. Es secretado por linfocitos T activados y por células NK. Inhibe la proliferación de la subpoblación Th2 y favorece la hipersensibilidad tardía. En los linfocitos B induce su proliferación y síntesis de anticuerpos. En los macrófagos aumenta la actividad microbicida, tumoricida y la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos, eleva la síntesis de receptores para Fc y de moléculas de

clase II del MHC. Incrementa el estallido oxidativo. Induce la subpoblación Th1, es antagonista de efectos de IL-4.

GM-CSF.

Con un PM de 22 kDa. Es secretado por linfocitos T y fagocitos activados. En los macrófagos incrementa la actividad tumoricida, eleva la síntesis del superóxido. Es factor quimiotáctico para macrófagos, basófilos y eosinófilos y favorece su degranulación.

IL-10.

Con un PM de 35 kDa. Es secretada por monocitos, macrófagos, linfocitos B activados y por las subpoblaciones Th1, Th2 y Th0. Su actividad en los linfocitos T disminuye la síntesis de IFN γ . En los macrófagos inhibe la actividad de célula presentadora. Interviene en hipersensibilidad tardía.

IL-12.

Es secretada por linfocitos B activados. Incrementa la síntesis de IFN γ por los linfocitos T activados.

IL-13.

Es secretada por las subpoblaciones Th1, Th2, Th0 y CD8⁺. Induce la expresión de CD23, regula la síntesis de clase II del MHC.

IL-15.

Con un PM de 14 kDa. Es un factor de crecimiento para las células T y utiliza las cadenas β y γ de los receptores de IL-2 para realizar su actividad.

2. OBJETIVO

- ◆ Identificar antígenos proteínicos de M. tuberculosis capaces de inducir la proliferación de linfocitos T con el fenotipo potencialmente inmunoprotector, es decir linfocitos CD4⁺, con cadenas de receptor para antígeno $\alpha\beta$, productores de IL-2 e INF γ .

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Medidas de seguridad del laboratorio.

Seguridad biológica de micobacterias. Nivel 3.

La cepa de M. tuberculosis H37/Rv pertenece a una especie estrictamente patógena y su reservorio está en el hombre, por lo que su manejo requiere de medidas de seguridad biológica correspondientes al nivel 3 (riesgo de transmisión por vía aérea; transmisión severa que puede ser mortal). El cultivo y la obtención de filtrados se llevará a cabo en áreas confinadas para este microorganismo y por personal que conozca el reglamento de seguridad para realizar este trabajo.

El reglamento de seguridad comprende principalmente:

- El trabajo debe ser organizado antes de comenzar a realizarlo.
- Se debe portar bata especial, guantes de látex, cubreboca.
- La campana donde se efectúa la resiembra y se obtiene el filtrado del cultivo del bacilo debe ser de seguridad biológica clase II.
- La asa de platino se descontaminará solo por autoclave.
- Se deberán usar propipetas y no pipetear con la boca.
- No comer ni fumar en el área de trabajo.
- El procesamiento debe minimizar los aerosoles.
- Las trampas de seguridad de las bombas deberán contener fenol.
- Al final del trabajo, todo el material usado así como la ropa y los utensilios para la limpieza de la campana con fenol al 2% se colocarán en bolsas para esterilización y se someterá al autoclave.

El laboratorio contará con una depresión barométrica con respecto a las áreas de circulación general y una zona de acceso controlado.

3.2 Cultivo de bacterias y obtención de extracto total.

La cepa de M. tuberculosis H37/Rv fue adquirida del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I P N. Las bacterias se sembraron en el medio de cultivo sintético de Proskawer y Beck modificado por Youmans, (PBY), (Youmans, G., 1949). La siembra se realizó por asada. Se incubó durante 6 semanas a 37°C. Después de este tiempo se separaron las bacterias del medio de cultivo por filtración al vacío en papel Whatman No.3, seguido de 3 filtraciones sucesivas con filtros de 1.20, 0.45 y 0.22 μm . (Millipore Corporation, Bedford, MA). Con el último filtro se obtuvo un filtrado estéril. Las proteínas del filtrado se obtuvieron por precipitación con 500g de sulfato de amonio por litro de cultivo filtrado, obteniéndose una concentración final de 72%; la agitación se prolongó 3 horas más y se centrifugó a 1×10^4 rpm, por 15 min. El sedimento obtenido en esta forma constituye el extracto proteínico total (EPT), el cual se disolvió en agua bidestilada y se dializó contra agua bidestilada hasta la eliminación total del sulfato, para lo cual se utilizó como indicador BaCl_2 al 10%. La concentración de la proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry, D., 1951), se dividió en alícuotas y se guardó a -20°C hasta su uso. El filtrado se analizó en geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, U., 1970) teñidos con azul de Coomassie y por inmunoblots incubados con suero hiperinmune (SHI) de conejo dirigido contra el extracto proteínico total de Mycobacterium tuberculosis. En el diagrama 3.1 se resumen las

metodologías empleadas en la purificación de los antígenos proteínicos estudiados.

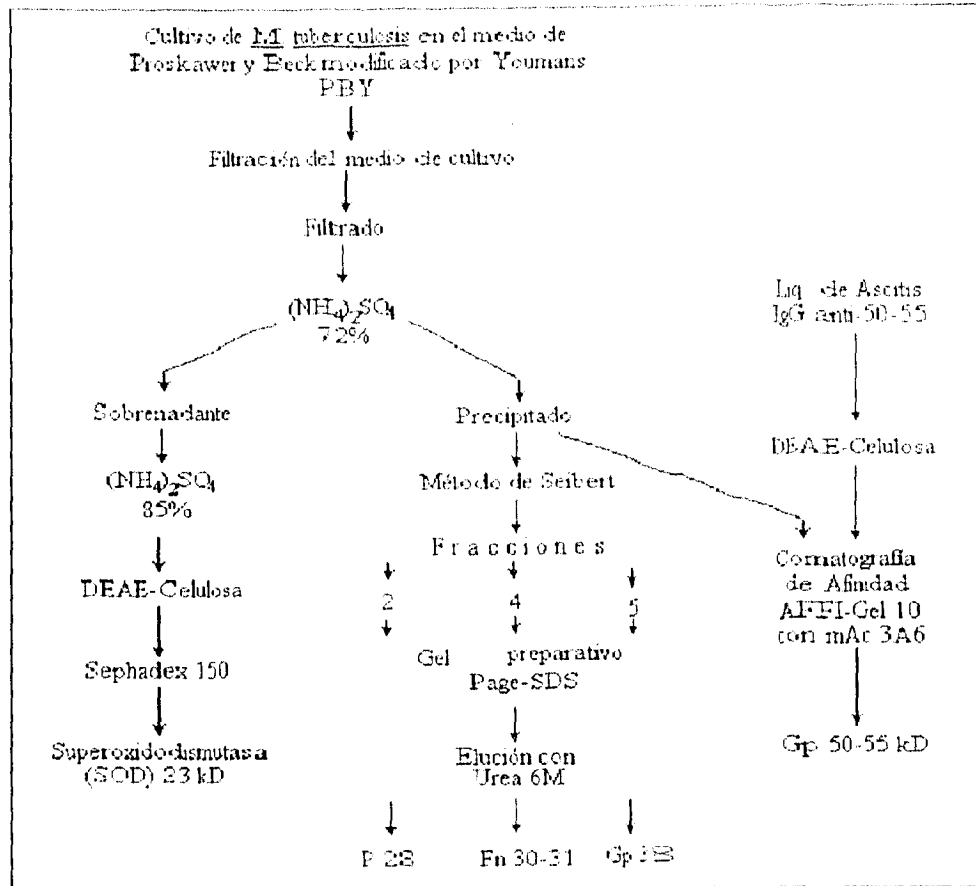


Diagrama 3.1. Se muestra los diferentes métodos de purificación de proteínas elaborados en nuestro laboratorio y utilizados en la obtención de antígenos micobacterianos, siendo el filtrado del cultivo la principal fuente de estos antígenos

3.3 Selección de proteínas a purificar.

Las proteínas seleccionadas para este trabajo son antígenos que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado ser biológicamente relevantes por su inmunogenicidad en ensayos de

hipersensibilidad retardada en animales y por estudios serológicos en humanos (Espitia, C., 1989). Estas proteínas son las siguientes:

Superóxido dismutasa (SOD). Enzima tetramérica que la micobacteria secreta para bloquear los radicales oxígeno (O_2^{\cdot}) que el macrófago envía al bacilo para destruirlo (Kusunose, E. 1976). En condiciones reductoras se rompe el tetrámero y cada monómero tiene una masa de 23 kDa. El anticuerpo monoclonal D2D, reconoce epítopes tanto en el tetrámero como en el monómero, sin embargo la actividad enzimática del tetrámero la pierde el monómero. Este trabajo se realizó utilizándola como enzima.

Proteína de 28 kDa (P 28). Proteína en estudio que ha demostrado, por biología celular inducir respuesta blástica. Se sabe que una proteína de 28 kDa de *M. leprae* es posible reguladora del Fe.

Proteína de 30-31 kDa (Fn 30-31). Se ha observado que esta proteína se une a fibronectina (Fn). Es una proteínas secretada por el bacilo que interviene en la fagocitosis de la micobacteria por el macrófago (Abou-Zeid y col. 1988).

Glicoproteína de 38 kDa (Gp 38). Por análisis realizados con peryodato se demostró que es una proteína asociada a carbohidratos. (Espitia, C. 1989). Interviene en el transporte de fosfatos.

Glicoproteína de 50-55 kDa (Gp 50-55). La reactividad con Con-A-peroxidasa sugiere la presencia de carbohidratos unidos covalentemente a esta proteína (Espitia, C. y col. 1989).

3.4 Fraccionamiento del EPT por el método de Seibert.

Para la purificación de P 28, Fn 30-31 y Gp 38 se utilizó el fraccionamiento ácido-alcohólico descrito por Seibert (Seibert, F. M., 1949),

el cual produce fracciones enriquecidas en dichas proteínas. El procedimiento se esquematiza en el Diagrama 3.2, que indica las condiciones y reactivos para cada fraccionamiento.

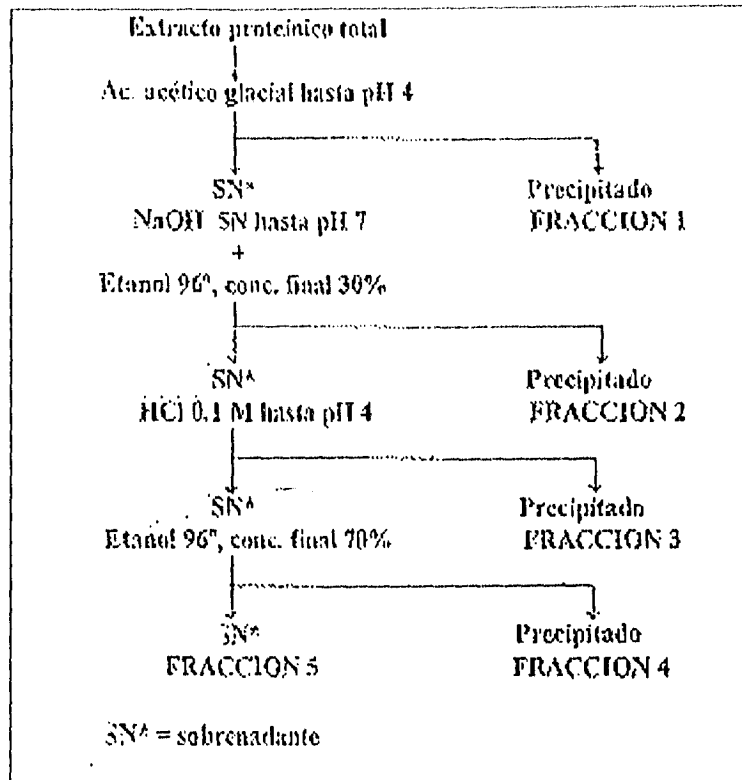


Diagrama 3.2. Fraccionamiento ácido-alcohólico descrito por Seibert

3.5 Purificación de P 28 kD.

En la fracción 2 de Seibert se observó enriquecimiento de la banda de 28 kD, la cual se extrajo de un gel preparativo por elución con urea 6 M. Para purificar esta proteína hemos utilizado también el material presente en el volumen de exclusión de cromatografías con DEAE-celulosa para purificar Gp 50-55.

3.6 Purificación de la Fn 30-31.

Esta proteína es abundante en la fracción 4 de Seibert, de la cual se purificó por electroforesis preparativa. La proteína se eluyó con urea 6M.

3.7 Purificación de Gp 38.

La fracción 5 obtenida por el fraccionamiento de Seibert es rica en esta proteína, la cual se extrajo de geles preparativo con urea 6M.

3.8 Purificación de Gp 50-55.

Se purificó por cromatografía de afinidad con un anticuerpo monoclonal, 6A3 obtenido en nuestro laboratorio por Rafael Saavedra y Rafaela Espinosa.

La purificación se llevó a cabo en 4 pasos:

- 1) Obtención de líquido de ascitis conteniendo el anticuerpo monoclonal 6A3 anti Gp 50-55. Las células del hibridoma 6A3 (obtenidas por fusión de las células del mieloma SP2/0-Ag14 y células de bazo de ratones hembras Balb/c inmunizados con Gp 50-55), se cultivaron en RPMI suplementado con aminoácidos esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1mM, penicilina-estreptomicina 50 U/ml y suero bovino fetal 10%. Se obtuvieron clonas por dilución limitante cultivadas en RPMIs. Los hibridomas así obtenidos, se centrifugaron, se lavaron, se diluyeron a 4×10^6 c/200 μ l RPMI/ratón y se aplicó por vía peritoneal a ratones Balb/c previamente estimulados con: Pristán (200 μ l/ratón). De 8 a 10 días después de la inyección se obtuvo el líquido de ascitis, en el cual se comprobó la presencia de anticuerpos específicos por inmunoblot revelando una banda correspondiente a 50-55 kD. Para purificar la IgG, el líquido de ascitis se diluyó 1:4 con

PBS, se centrifugó a 33000 rpm por 30 min, utilizando el rotor SW41 para la ultracentrífuga BECKMAN L8-60M. Al sobrenadante se agregó un volumen equivalente de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para obtener una concentración final de 50 %, que se adicionó lentamente y en agitación, manteniéndose así por 2 h a 4°C, se centrifugó a 12,000 rpm, 15 min, se decantó y el paquete conteniendo la IgG impura se disolvió en Tris-base 20 mM más NaCl 40 mM, pH 7.8. Se dializó contra una solución de Tris-base 20 mM más NaCl 20 mM pH 7.8. Se centrifugó a 14000 rpm y se decantó. Al sobrenadante obtenido se determinó la densidad óptica a 280 nm y se multiplicó por el coeficiente de extinción que para la IgG es de 0.7, o se dividió la D. O. entre 1.4, obteniéndose en ambos casos la concentración de la proteína dada en mg/ml. Normalmente se recuperan de 8 a 12 mg de proteína por ml de líquido de ascitis. Se agregó azida de sodio a una concentración final de 0.1 % y se guardó en congelación hasta su uso.

2) Purificación del anticuerpo monoclonal 6A3 por cromatografía de intercambio iónico. Se utilizó una columna de DEAE-Celulosa (SIGMA CHEMICAL COMPANY. San Louis, MO.), equilibrada con Tris-base 20 mM más NaCl 40 mM, pH 7.8 (el volumen de la columna se determinó utilizando la fórmula $\pi \times r^2 \times \text{altura}$) a la columna se agregó la IgG impura diluida al doble con una solución de Tris-base 20 mM pH 7.8 y con un flujo de salida de 0.5 ml/min. Se lavó la columna con 2 volúmenes de Tris-base 20 mM más NaCl 40 mM pH 7.8 y enseguida se eluyó con un gradiente lineal de Tris-base 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7.8 (4 volúmenes) y Tris-base 20 mM,

NaCl 400 mM, pH 7.8, (4 volúmenes). Se colectaron fracciones de 2 ml a un flujo de 0.5 ml/min y se determinó la DO_{280} de las fracciones. El pico obtenido contiene la IgG purificada que se concentró en Amicón (Amicon Inc, Beverly MA.) utilizando una membrana de ultrafiltración, PM 10. (Amicon, Inc. Beverly, MA.) hasta 10 mg/ml y se dializó durante 24 horas en una solución de acoplamiento de $NaHCO_3$ 0.1 M, pH 8.

- 3) Cromatografía de afinidad por acoplamiento del anticuerpo monoclonal 6A3 a un soporte de agarosa activada con N-hidroxisuccinimida. Se utilizó la resina de Affi-Gel 10 activa, Agarosa-Ester-N-dihidroxisuccinimida (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA.), para acoplar ligandos con grupos amino libres, la cual se lavó con 8 volúmenes de acetato de sodio 10 mM, pH 4.5, a través de un filtro de 0.22 μ m para eliminar el solvente orgánico en que se encuentra el gel. Se agregó el gel al anticuerpo monoclonal (AcMn) purificado, a razón de 10 mg/ml de gel. Se dejó en agitación suave por 4 horas a 4°C y enseguida se centrifugó a 500 rpm, 5 min. El sobrenadante se retiró y se determinó la concentración de IgG (previamente ajustado el pH a 3 para evitar la lectura de la succinimida) que se sustrae de la IgG inicial, teniendo como resultado el porcentaje de eficiencia en el acoplamiento. Al paquete de resina con el anticuerpo acoplado, se agregó etanolamina, 0.1 M, pH 8 para bloquear los sitios activos libres; se dejó en agitación suave toda la noche a 4°C. Enseguida se transfirió el Affi-Gel, acoplado y

bloqueado a la columna determinando su volumen ($\pi \times r^2 \times h$) y lavándola con 8 a 10 volúmenes de PBS, pH 7.4

4) Purificación de Gp 50-55 por cromatografía de afinidad. A la columna de afinidad obtenida en el paso 3 se le agregó el extracto total (previamente dializado durante 24 horas en PBS, pH 7.4) y se mantuvo en recirculación utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 0.5ml/min. durante 24 horas a 4°C. A continuación se dejó equilibrando una hora a temperatura ambiente y en seguida se colectaron fracciones de 2 ml que contienen las proteínas de M. tuberculosis que no se han pegado a la columna de afinidad. Se lavó la columna con 5 a 10 volúmenes de PBS pH 7.4 hasta D. O. de 0.02 a 280 nm, enseguida se lavó con 5 volúmenes de una solución que contenga Tritón-X100 2%, NaCl 0.5 M y Tris-Base 0.025 M, nuevamente se lavó con PBS hasta DO_{280} de 0.02. A continuación se eluyó con 4 volúmenes de NH_4OH 0.15 M, colectando fracciones de 2 ml en tubos a los que previamente se agregaron 135 μ l de HCl 1 M para neutralizar al NH_4OH y evitar que se deteriore la proteína, las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro. En los tubos con mayor D.O se encuentra la Gp 50-55 purificada. Enseguida se lavó la columna con 5 volúmenes de PBS pH 7.4 y un volumen de PBS con azida de sodio al 0.1 % y se guardó a 4°C. La proteína purificada se dializó contra agua destilada, se concentró y se dividió en alícuotas que se guardaron a -20°C. La eficiencia de la purificación se determinó por inmunoblots de acuerdo con el método de Towbin (Towbin 1979), revelados con SH1 anti-EPT y con el AcMn 6A3.

3.9 Purificación de la enzima superóxido dismutasa de (SOD).

Se utilizó el método de Kusunose (Kusunose, E., 1976). La purificación se llevó a cabo en tres pasos:

- 1) En observaciones previas hechas en nuestro laboratorio se comprobó que en el sobrenadante predominaba una banda de 23 kD la cual fue después identificada como SOD con un anticuerpo monoclonal. Por lo anterior, el sobrenadante obtenido después de la precipitación del extracto total con sulfato de amonio fue reprecipitado con sulfato de amonio a una concentración final de 85 %, agitando durante una noche a 4°C. Después de cetrifugar a 1.2×10^4 rpm por 15 min, el precipitado se disolvió en buffer de fosfatos 30 mM.
- 2) Cromatografía de intercambio iónico. El precipitado disuelto en buffer de fosfatos 30 mM se aplicó a una columna de DEAE-32-Celulosa, Dietilaminoetil celulosa, Intercambiador Aniónico microgranular, (SIGMA. Chemical Company. St Louis, MO.), equilibrada con buffer de fosfatos 30 mM. La proteína se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente lineal de buffer de fosfatos de 0.03 M-0.1 M, pH 7.9 y con un flujo de salida de 0.5 ml/min. Las fracciones se leyeron en un espectrofotómetro. El pico eluido se concentró en Amicón, utilizando una membrana de ultrafiltración PM 10.
- 3) Cromatografía de exclusión molecular. El material obtenido en el paso anterior se aplicó a una columna de Sephadex-150, de grano superfino, (Sigma Chemical Company. St. Louis MO.), equilibrada con buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.0 y 0.1 M de KCl y eluyendo con este mismo buffer, con un flujo de salida de 0.5 ml/min. Las

fracciones eluidas se leyeron en el espectrofotómetro para determinar la densidad óptima y conocer el pico con máxima concentración. Las fracciones que forman el pico contienen a la SOD, con las cuales se formó un pool que se concentró en Amicón, utilizando una membrana de ultrafiltración.

La pureza de la proteína se determinó por PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras, tiñendo con azul de Coomasie e incubando con SH1 dirigido contra el EPT de M. tuberculosis y con el anticuerpo monoclonal D2D (donado por J. Ivanyi, Hammersmith Hospital, Londres, Inglaterra). En condiciones no reductoras se determinó la actividad enzimática de la SOD utilizando un ensayo de foto-reducción (Beauchamp, CH., 1971) de la siguiente manera. Se hizo PAGE al 10 % en condiciones no reductoras y se incubó en azul de tetrazolio 2.45×10^{-3} M, 20 min, seguida de una inmersión por 10 min en riboflavina $2,8 \times 10^{-5}$ M y Temed 0.028 M en buffer de fosfatos 0.036 M, pH 7.8, incubando este último sobre una fuente luminosa (5-15 min). La SOD se distingue como una banda incolora, siendo el resto del gel de color azul.

3.10 Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNH).

Donadores. Se obtuvieron células de cuatro individuos sanos, dos PPD+, uno vacunado y otro sin vacunar y dos PPD-, uno vacunado y otro sin vacunar y cuatro pacientes con tuberculosis proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, con las siguientes características: Enfermo No.1, varón, 23 años de edad, con tuberculosis progresiva no tratada; la radiografía de torax mostró fibrosis en pulmón izquierdo y lesiones

cavidades en pulmón derecho. Enfermo No.2, mujer, 60 años de edad, diabética; radiografía de torax: afección localizada, unilateral y apical. Enfermo No.3, varón, 64 años de edad, resistente al tratamiento con 6 años de evolución. Enfermo No.4, varón, 25 años de edad, con infección temprana; un hermano, de 35 años de edad murió de tuberculosis.

Se obtuvo sangre periférica por punción venosa la cual se trató con heparina (SIGMA CHEMICAL COMPANY. St. Louis, MO) a una concentración de 10 U/ml de sangre, para evitar su coagulación. Se agregó un volumen igual de RPMI y la separación de las CMNH se realizó estratificando 8 ml de la sangre diluida en 4 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech. Uppsala, Sweden), centrifugando a 1500 rpm, 10 min, (Boyum, 1968).

3.11 Curvas dosis-tiempo-respuesta de CMNH.

Las CMNH, obtenidas por centrifugación con Ficoll-Hypaque, se lavaron tres veces con RPMI para eliminar el Ficoll, determinándose su viabilidad con azul tripán (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Se ajustaron las cuentas a 2×10^6 células/ml de RPMI suplementado.

Condiciones del cultivo:

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos (Costarcorporation. Cambridge, MA); a cada pozo se agregaron 2×10^5 CMNH/100 μ l de RPMI, suplementado con penicilina y estreptomicina (1 %), suero bovino fetal (10 %), aminoácidos esenciales (1 %) y piruvato (1 %), (ver reactivos).

Antígenos:

Se utilizó EPT y las proteínas purificadas SOD, P28, Fn30-31, Gp 38 y Gp 50-55 a concentraciones de 1 µg/pozo y 0.25 µg/pozo. Como control positivo se incubaron células con fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) diluida 0.1 µg/pozo. Como control negativo células incubadas con RPMI suplementado (100 µl /pozo). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. por el tiempo necesario para obtener las curvas de proliferación celular. Esto se repitió en 8 placas para los tiempos de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 días, marcando con 0.5 µCi /pozo de [³H]-Timidina (Dupont NEN Products, Boston MA), 20 horas antes de la cosecha de células, la cual se realizó con un cosechador de células (Skatron Instruments. Sterling, VA.), utilizando filtros de fibra de vidrio (Printed Filtermat A, Wallac Oy. Turku, Finland), que se leyeron en un contador de centelleo β, (Betaplate 1205 de Wallac Oy. Turku, Finland), para determinar la proliferación a través de la incorporación de timidina.

3.12 Obtención de líneas celulares humanas

Se obtuvieron CMNH de los donadores descritos en el párrafo 3.10. Las células separadas por centrifugación con Ficoll-Hypaque a 1500 rpm, se lavaron y se ajustaron las cuentas a 1x10⁶ células/ml, colocando 1 ml/pozo en placas de 24 pozos (Costar). Se utilizó una concentración de antígeno de 40 µg/ml, colocando 1 ml/pozo. Las células se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad hasta el día en que se obtuvo la máxima proliferación para cada antígeno, indicada por las curvas dosis-tiempo-respuesta. Las células se

resembraron después de separarse por centrifugación con Ficoll-Hypaque a 1500 rpm, se lavaron 3 veces con RPMI suplementado y se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm; las cuentas se ajustaron a 8×10^5 /ml, colocando 500 μ l/pozo, en placas de 24 pozos.

Como células presentadoras de antígeno (APC) se utilizaron células mononucleares autólogas, que se suspendieron en 3 ml de RPMI suplementado y se les agregó 100 μ l de mitomicina/ 10^7 células (la concentración de la mitomicina fue de 1 mg/ml) (SIGMA). Las células se incubaron por 50 min a 37°C y enseguida se lavaron 5 veces con RPMI suplementado, centrifugando a 1500 rpm; las cuentas se ajustaron a 2×10^6 /ml, colocando 500 μ l/pozo.

Los diferentes antígenos se diluyeron en RPMI a una concentración de 80 μ g/ml, usando 500 μ l/pozo y la IL-2 recombinante humana, IL-2rh, (Boehringer Mannheim, Gmbh, Germany) se utilizó a una dilución de 160 U/ml de RPMI suplementado, colocando 500 μ l/pozo.

Las placas se incubaron a 37°C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad por 5 días. Las placas se observaron diariamente y al día en el que hay gran proliferación, se resuspendieron las células, dividiendo el contenido de cada pozo en 2 pozos y agregando a cada pozo 1 ml de IL-2 diluida a 40 U/ml incubándose por 4 días. Al término de este tiempo se repitió el ciclo anterior con la finalidad de obtener líneas específicas de antígeno.

3.13 Determinación del fenotipo y de los receptores para antígeno de las líneas celulares humanas

Los linfocitos T se caracterizaron por citometría de flujo (FACScan Becton Dickinson San José, CA) utilizando anticuerpos monoclonales en

contra de las moléculas de superficie CD3, CD4 y CD8 y de los receptores T para antígeno $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

La metodología fue la siguiente: las células se separaron por centrifugación con Ficol-Hypaque a 1500 rpm, se lavaron con RPMI, se ajustaron las cuentas a 1×10^7 células/ml, colocando 100 μ l/tubo, en un total de 7 tubos, destinados a determinar CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, un tubo control para el anticuerpo conjugado a fluoresceína y un tubo conteniendo células solas. Las células se lavaron con 1 ml de PBS para FACS, (suero bovino fetal al 2% y azida de sodio al 0.1%), centrifugando a 3000 rpm por 10 min.

Incubación con el primer anticuerpo. Al tubo correspondiente se agregaron 200 μ l del sobrenadante de hibridomas OKT3, OKT4 y OKT8 y 50 μ l del anticuerpo monoclonal anti-TCR $\alpha\beta$ humano conjugado a FITC (Becton Dickinson, San José CA) diluido 1:1000 en PBS y del anticuerpo monoclonal de ratón anti-TCR $\gamma\delta$ humano diluido 1:400. Todos los tubos se incubaron a 4°C por 40 min. En dos tubos controles se colocaron solamente células. Después de incubar, se lavaron tres veces con 1 ml de PBS, más suero bovino fetal al 2%, y azida de sodio al 0.1%, centrifugando a 3000 rpm, 10 min.

Incubación con el segundo anticuerpo. Se agregaron 100 μ l del anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina (Fc) de ratón conjugado a FITC, diluido 1:150 (Sigma).

Todos los tubos se incubaron 40 min a 4°C en la oscuridad. Al término de la incubación se lavaron los tubos tres veces con 1 ml de PBS para FACS más azida de sodio al 0.1%, centrifugando a 3000 rpm, 10 min. El paquete de

células se resuspendió en 500 µl de paraformaldehído al 1%, recientemente preparado y se leyeron en un citómetro de flujo.

3.14 Determinación de citocinas en las líneas celulares humanas por bioensayo

Bioensayo para IL-2rh.

Se utilizaron los sobrenadante de las líneas celulares, IL-2 recombinante humana (IL-2rh), un anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-2 humana (Cell Biology Products) y una clona de linfocitos T dependiente de IL-2 (CTLL-2)

Se realizó una curva estándar de IL-2rh y una curva de neutralización de la IL-2rh con el anticuerpo monoclonal anti IL-2rh y como control positivo un sobrenadante rico en IL-2. Como control negativo se utilizó únicamente CTLL-2 cultivadas en RPMI suplementado. Para la curva estándar se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos. En cada uno de los pozos, menos en el primero, se colocaron 100 µl de RPMI suplementado. Al primer pozo se agregaron 200 µl de IL-2rh (200 U/ml) y en los siguientes pozos diluciones progresivas de IL-2rh (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512) El último pozo fue el control negativo. A cada uno de los pozos se agregaron 100 µl de la suspensión de CTLL-2 (2×10^4 c/pozo).

Se incubó la placa a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, durante 48 h. Se agregó [³H]Timidina 8 horas antes de la cosecha y se midió la radioactividad en un contador de centelleo beta.

La curva de neutralización se realizó siguiendo el mismo procedimiento inicial colocando en los pozos el AcMn antiIL-2rh a las mismas diluciones progresivas indicadas arriba. Enseguida se agregó a cada uno de los pozos

100µl de IL-2rh, diluida 1:32 y se incubó 1 h a 37°C para efectuar la neutralización. En el siguiente paso se agregaron 20 µl de la suspensión de CTLL-2 a una concentración de 2×10^4 /pozo. Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 48 h, marcando con timidina tritiada 8 horas antes del tiempo fijado para la cosecha

Determinación de IL-2 en los sobrenadantes de las líneas celulares humanas.

Se colocaron en 5 pozos menos en el primero 100 µl de RPMI suplementado. Al primer pozo se agregaron 200 µl del sobrenadante de la línea celular en estudio y se efectuaron diluciones seriadas como se ha señalado antes. Se agregaron a todos los pozos 100 µl de la suspensión de CTLL-2 a una concentración de 2×10^4 /pozo. Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 48 h, marcando con timidina tritiada 8 horas antes de la cosecha.

3.15 Determinación de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por ELISPOT en las líneas celulares humanas.

Se utilizó una cámara para ELISPOT, de 96 pozos (Bio-Rad Laboratories. CA), esterilizada por autoclave y el papel de nitrocelulosa esterilizado por luz UV. En condiciones de esterilidad se preparó la cámara con el papel de nitrocelulosa y se sensibilizó la placa con los anticuerpos monoclonales hechos en rata, en contra de las citocinas humanas IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ , a una concentración de 0.5 µg/pozo/100µl de PBS estéril, incubando a 37°C toda la noche (Anticuerpos monoclonales anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5 y anti-IFN γ , Genzyme. Cambridge. MA).

En seguida se lavó la placa 4 veces, con 300 μ l/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%, estéril, en agitación durante 3 min. Se bloqueó la placa agregando 300 μ l/pozo de PBS-BSA al 1%, estéril, incubando 1 h a 37°C. Después de esto se adicionaron las células de la línea celular correspondiente, a una concentración de 5×10^4 /pozo, más APC, colocandol 1×10^5 /pozo, más el antígeno correspondiente, usando 2 μ g/pozo. Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, durante 24 horas para IL-2, IL-4, e IL-5 y por 48 h para IFN γ . Enseguida y en condiciones no estériles se lavó la placa ocho veces con 300 μ l/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05% durante 3 min y en agitación.

Se agregó el anticuerpo policlonal anti-citocina hecho en cabra, a una concentración de 0.5 μ g/pozo/100 μ l de PBS-BSA al 1% (Anticuerpos policlonales anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5 y anti-IFN γ , R&D. Mineapolis, MN), incubando a 37 °C por 3 h. Se lavó la placa 8 veces con 300 μ l/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%, 3 min en agitación y se añadieron 100 μ l/pozo del anticuerpo anticabra marcado con peroxidasa, diluido 1:5000 en PBS-BSA al 1%, incubando a 37 °C por 2 h. La placa se lavó 4 veces con 300 μ l/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%, en agitación por 3 min y 3 veces con 300 μ l/pozo de PBS diluido 1:3, en agitación por 3 min. Se agregaron 50 μ l/pozo del sustrato filtrado: diaminobencidina 0.01%, NiCl₂ 0.03%, CoCl₂ 0.03%, H₂O₂ 0.005%, en PBS diluido 1/3. De 10 a 15 min después aparecen las manchas o "spots" y enseguida se retira el papel de nitrocelulosa de la cámara de ELISPOT. Finalmente, se cuentan las manchas (signo de positividad) en un microscopio de disección. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

3.16 Análisis de la respuesta de linfocitos T murinos a antígenos purificados de M. tuberculosis.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, machos, los cuales se inmunizaron dos veces en la siguiente forma:

1a. inmunización. A cada ratón se le inyectaron 30 µg de extracto total en 10 µl de PBS más 20 µl de adyuvante completo de Freund's en el cojinete plantar.

2a. inmunización. Diez días después de la primera inmunización, cada ratón se inyectó intraperitonealmente con 30 µg de extracto total en 100 µl de solución salina isotónica estéril.

3.17 Obtención de células esplénicas murinas (CEM).

Ocho días después de la segunda inmunización se sacrificaron los animales. Se extrajeron los bazos, se perfundieron con RPMI suplementado y se formó un pool que se dejó sedimentar a 4 °C por 20 min, se separó el sobrenadante para centrifugarse a 1500 rpm, 10 min, agregándose al paquete celular solución hemolizante, manteniéndose en agitación suave por 3 min. para destruir los glóbulos rojos, se centrifugó a 1500 rpm, 10 min y el paquete obtenido formado por las células esplénicas se lavó con RPMI 3 veces para eliminar la solución hemolizante y se determinó su viabilidad con azul trypan. Las células se ajustaron a 2×10^6 /ml

3.18 Curvas dosis-tiempo-respuesta de CEM.

Se siguió la misma metodología usada para CMNH, usando los antígenos EPT, SOD, P28, Fn 30-31, Gp38 y Gp 50-55 a una concentración de 1 µg/pozo y se agregaron las CEM colocando 2×10^5 /pozo.

Para el control positivo se cultivaron las CEM con Concanavalina A colocando 0.1 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ y en el control negativo, las CEM se cultivaron con RPMI suplementado. Los ensayos se hicieron por triplicado. Se ensayaron los tiempos de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 días marcando con 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{pozo}$ de (^3H)-Timidina 20 horas antes de la cosecha.

3.19 Obtención de líneas celulares murinas

Se siguió la misma metodología usada para la obtención de las líneas celulares humanas. Se utilizaron CEM ($2 \times 10^5/\text{pozo}$) y los mismos antígenos a una dilución de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, colocando 1 ml/pozo. Se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 y 95% de humedad hasta el día en que se obtuvo la máxima respuesta proliferativa para cada antígeno. A ese tiempo se separaron las células por centrifugación con Ficoll-Hypaque a 1500 rpm, 10 min. se lavaron 3 veces y se ajustaron las cuentas a 8×10^5 células /ml, colocando 500 $\mu\text{l}/\text{pozo}$, en placas de 24 pozos. Las APC se ajustaron a $2 \times 10^6/\text{ml}$, colocando 500 $\mu\text{l}/\text{pozo}$. Los antígenos se usaron a una concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RPMI, colocando 500 $\mu\text{l}/\text{pozo}$ y la IL-2 se usó a una concentración de 160 U/ml, colocando 500 $\mu\text{l}/\text{pozo}$.

3.20 Determinación del fenotipo de las líneas celulares murinas.

Se siguió la misma técnica utilizada para la determinación del fenotipo de las líneas celulares humanas con las siguientes condiciones:

Primer anticuerpo:

Sobrenadante de hibridomas 1452c11 obtenidos en hamster, anti CD3 de ratón colocando 100 $\mu\text{l}/\text{tubo}$.

Sobrenadante de hibridomas 4k1.5 obtenidos en rata anti CD4 de ratón, colocando 100 µl/tubo.

Sobrenadante de hibridomas 83.12.5 obtenidos en ratón anti CD8 de ratón, colocando 100 µl/tubo.

AcMn (IgG) de hamster anti TCR+ $\alpha\beta$ de ratón (Pharmingen. San Diego, CA). utilizando 1 µl/1x10⁶células.

AcMn (IgG) de hamster anti TCR+ $\gamma\delta$ de ratón (Pharmingen), utilizando 1 µl/1x10⁶células.

Todos los tubos se incubaron a 4°C por 40 min. Se lavaron.

Segundo anticuerpo:

Anti IgG de hamster hecho en conejo conjugado a FITC (Pierce)

Anti IgG de rata hecho en conejo conjugado a FITC (Sigma)

Anticuerpo polivalente anti IgM, IgG e IgA de ratón en conejo conjugado a FITC (Sigma). De cada uno de ellos se usaron 100 µl/tubo, diluidos 1:500 con PBS para FACS. Se incubaron 40 min a 4°C. Se lavaron.

Se utilizaron 2 controles, uno con células solas incubadas con los anticuerpos secundarios y otro control teniendo células solas.

El paquete celular se resuspendió en 500 µl de paraformaldehído al 1%, recientemente preparado y se leyeron en un citómetro de flujo.

3.21 Determinación de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por ELISPOT en las líneas celulares murinas.

Se siguió la misma metodología usada para la determinación de citocinas en las líneas celulares humanas, con las siguientes condiciones: los pozos de

la cámara para Elispot se sensibilizaron con los anticuerpos monoclonales anticitocinas de ratón:

Anticuerpo monoclonal anti IL-2 de ratón. Se utilizó el sobrenadante de los hibridomas ATCC HB -10968, hecho en rata (100 µl/pozo).

Anticuerpo monoclonal anti IL-4 de ratón. Se usó el sobrenadante de los hibridomas ATCC HB-188 (Ohara, J., Paul, W. E. 1985), hecho en rata (100 µl/pozo).

Anticuerpo monoclonal anti IL-5 de ratón (Pharmingen), hecho en rata. Se utilizaron 0.5 µg/100 µl de PBS-BSA al 1%/pozo.

Anticuerpo monoclonal anti IFN γ de ratón (Pharmingen), hecho en rata. Se colocaron 0.5 µg/100 µl de PBS-BSA al 1%/pozo.

La placa se lavó 4 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, estéril (300 µl/pozo), en agitación durante 3 min. Se bloqueó la placa con 300 µl/pozo de PBS-BSA al 1%, estéril, se incubó durante 1 hora a 37°C y se adicionaron las células de la línea celular correspondiente a una concentración de 5×10^5 /ml (100 µl/pozo), APC, 1×10^6 /ml (100 µl/pozo) y el antígeno correspondiente a una concentración de 20 µg/ml (100/pozo). La incubación se llevó a cabo igual que con las células humanas. Después se lavaron los pozos y se agregaron los siguientes segundos anticuerpos:

AcMn anti IL-2 de ratón, hecho en rata marcado con biotina, (Pharmingen), colocando 0.5 µg/100 µl de PBS-BSA al 1%/pozo.

Anticuerpo policlonal anti IL-4 de ratón, hecho en cabra (R&D Systems), . utilizando 0.5 µg/100 µl de PBS-BSA al 1%/pozo.

Anticuerpo policlonal anti IL-5, de ratón, hecho en cabra (R&D Systems). Se colocaron 0.5 µg/100 µl de PBS-BSA al 1%/pozo.

AcMn anti IFN γ de ratón, hecho en rata, marcado con biotina, (Pharmingen), colocándose 0.5 µg/100 µl de PBS-BSA al 1%/pozo.

Se incubó la placa durante 3 horas a 37°C y se lavó 8 veces con 300 µl/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05%, durante 3 min en agitación.

Para revelar los anticuerpos se usaron los siguientes reactivos:

Para los AnMc anti IL-2 y anti IFN γ marcados con biotina se utilizó estreptavidina-peroxidasa (Sigma) diluida 1:1000, usando 100 µl/pozo. Para los anticuerpos policlonales anti IL-4 y anti IL-5 hechos en cabra, se utilizó un anticuerpo anti cabra-peroxidasa diluido 1:1000, colocando 100 µl/pozo.

La placa se incubó una hora a 37°C. Se lavó 4 veces con 300 µl/pozo de PBS-Tween 20 al 1%, en agitación durante 3 min y se volvió a lavar 3 veces más con 300 µl/pozo de PBS diluido 1:3 en agitación durante 3 min.

Para desarrollar el color se utilizó una solución conteniendo:

Diaminobencidina	0.01%
Cloruro de níquel	0.03%
Cloruro de cobalto	0.03%
Peróxido de hidrógeno al 30%	0.005%

En PBS diluido 1:3

Se incubó a temperatura ambiente de 15 a 20 min, hasta la aparición de las manchas o "spots". El papel de nitrocelulosa se retiró de la cámara y las manchas se leyeron en un microscopio de disección. Los ensayos se hicieron por triplicado.

4. RESULTADO

Purificación de antígenos de M. tuberculosis.

La pureza e identidad de los antígenos obtenidos se determinó por inmunoblots, incubados con suero hiperimmune (SHI) dirigido contra EPT y con anticuerpos monoclonales o policlonales, así como por geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie.

4.1 Fraccionamiento del EPT por el Método de Seibert.

Para la purificación de P28, Fn 30-31 y Gp38, se obtuvieron fracciones enriquecidas por el método de Seibert. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 1, mostrando enriquecimiento de P28 en la fracción 2 (carril 4); de Fn 30-31 en la fracción 4 (carril 6); de Gp 38 en la fracción 5 (Carril 7). En el carril 2 se muestra el perfil proteínico del EPT, pudiéndose observar unas 34 bandas de proteína bien definidas. Además, la fracción 2 se enriquece en las bandas de 14 y 60 kD; la fracción 3 se enriquece en la banda de 60 kD y la 4 en las bandas de 16, 28, 30-31 y 50-55 kD.

4.2 Purificación de P 28.

Los resultados del procedimiento seguido se ilustran en la Figura 2. En un inmunoblot revelado por un suero hiperimmune de conejo anti-*M. tuberculosis* se puede observar que el procedimiento seguido fue exitoso. En el carril A se muestra el perfil proteínico del EPT, en el B se muestra la fracción 2 de Seibert enriquecida con esta proteína y el carril C presenta la proteína purificada. No se identifican bandas contaminantes. P28 se purificó

de geles preparativos de la fracción 2 de Seibert eluyendo con urea 6M, mismo procedimiento que se siguió para purificar Fn30-31 y Gp 38.

4.3 Purificación de Fn 30-31.

En la Figura 3 se observa un inmunoblot revelado con SHI que muestra la proteína purificada. El carril A corresponde al EPT de donde se partió, el B a la fracción 4 de Seibert de donde se extrajo, por geles preparativos la Fn 30-31 y el carril C muestra la proteína purificada.

4.4 Purificación de Gp 38

La Figura 4 ilustra los resultados del procedimiento de purificación de Gp 38 a partir de geles preparativos de la fracción 5 de Seibert, donde se encuentra muy enriquecida como se observa en el carril A. En el carril B se muestra la proteína purificada.

4.5 Purificación de Gp 50-55

En la Figura 5 se ilustran los resultados obtenidos en la purificación de Gp 50-55 por cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo monoclonal 6A3, acoplado al Affi-gel 10 al cual se unió la proteína específica, que se eluyó con NH_4OH 0.15 M. El SHI no reconoce ninguna otra banda (carril B) a diferencia del patrón que se observa en EPT (carril A).

4.6 Purificación de SOD.

Antes de iniciar la purificación de la SOD se comprobó su presencia en la muestra obtenida por reprecipitación con sulfato de amonio del sobrenadante del extracto total y también se determinó su actividad enzimática. Para esto se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% realizados en condiciones no reductoras, evitando así romper el tetrámero que constituye

la enzima cuyo peso es de 88 kDa. Los resultados obtenidos al someter los geles a diferentes procesos, se indican en la Figura 6. En el carril A se muestra, por azul de Coomassie la abundancia de la SOD y la presencia de proteínas contaminantes. El carril B corresponde al inmunoblot incubado con SHI dirigido contra el EPT de *M. tuberculosis*, que revela las proteínas contaminantes pero no a la SOD ya que este SHI no reacciona con SOD pues los conejos fueron inmunizados con EPT carente de SOD. El carril C muestra a la SOD reconocida por el anticuerpo monoclonal D2D (Donado amablemente por J. Ivanyu, Hammersmith Hospital, Londres, Inglaterra). En el carril D se muestra la actividad enzimática de la SOD utilizando el método de fotoreducción (Beauchamp y Fridovick, 1971). Los geles anteriores se realizaron en condiciones no reductoras lo que explica la migración a 88 kDa de la SOD.

Después de efectuar la purificación de la SOD se realizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones no reductoras y reductoras. En condiciones no reductoras, en el carril E se muestra la pureza de la proteína purificada al ser teñido el gel con azul de Coomassie, en el que ya no se observan las proteínas contaminantes. El carril F confirma la pureza al ser incubado el inmunoblot con SHI y no observarse bandas contaminantes. En el carril G se identifica a la SOD por inmunoblot con el anticuerpo monoclonal D2D. En el carril H se comprueba que la actividad enzimática no se ha alterado a través de los diferentes procesos de purificación. En cada corrimiento electroforético de la enzima purificada se obtuvo una sola banda de proteína la cual coincidió en su movilidad con la banda de actividad enzimática.

En condiciones reductoras en geles de poliacrilamida al 10% la movilidad de la proteína es diferente debido a que el tetramero que conforma la enzima se rompe en sus enlaces disulfuro y se pierde la actividad enzimática, convirtiéndose en un monómero de 23 kDa como se ve en el carril I en un gel teñido con azul de Coomassie. Esta banda es reconocida por el monoclonal anti D2D (carril K) pero no por el SHI (carril J). Analizando geles en condiciones reductoras se demostró que la SOD pierde su actividad enzimática (resultados no mostrados).

4.7 Respuesta blástica de CMNH.

Con los antígenos proteínicos purificados se procedió a realizar experimentos de proliferación celular.

a.- Respuesta al EPT

Con el EPT se realizaron ensayos piloto *in vitro*, para lo cual se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica humana (CMNH) separadas por centrifugación con Ficoll-Hypaque como se indica en Materiales y Métodos con la finalidad de conocer la respuesta a diferentes concentraciones y poder determinar los requerimientos para ensayos posteriores en los que se utilizarán los antígenos purificados. Se analizaron células de tres individuos sanos, uno PPD- no vacunado con BCG, uno PPD- vacunado con BCG y uno PPD+ no vacunado. Se utilizaron 2×10^5 células por pozo y concentraciones del EPT de 0.5, 1, 5 y 10 μg por pozo. En la Figura 7, los resultados muestran una mayor proliferación de las células del individuo PPD- no vacunado (A), siendo menor la proliferación en el

individuo PPD- vacunado (B). Cabe mencionar que a estos individuos se les aplicó el PPD (intradermoreacción) diez días antes de extraerles sangre venosa para realizar este experimento. Se observó que con dosis de 10, 5 y 1 μg de antígeno por pozo se obtuvo la máxima respuesta blástica al 8° día con una cinética similar. En experimentos subsecuentes se decidió utilizar 0.25 y 1 μg de antígeno por pozo.

b.- Respuesta blástica de individuos sanos a antígenos purificados.

Con los resultados anteriores se procedió a realizar curvas dosis-tiempo-respuesta *in vitro* de CMNH de 4 individuos sanos, 2 PPD+ (uno vacunado y otro sin vacunar) y 2 PPD- (uno vacunado y otro sin vacunar) con la finalidad de conocer los tiempos de máxima respuesta a los antígenos purificados para así determinar el tiempo óptimo de resiembra para obtener líneas celulares. Se usaron 2×10^5 células por pozo y de antígeno se utilizaron concentraciones de 0.25 y 1 μg por pozo. Como control positivo se utilizó la misma concentración de células incubadas con fitohemaglutinina, (PHA), diluida a 0.1 μg /pozo. Los resultados pueden verse en la Figura 8 que corresponde a dos controles sanos no vacunados (uno PPD+ y otro PPD-) y en la Figura 9 que corresponde a dos individuos controles vacunados (uno PPD+ y otro PPD-). En términos generales se puede decir que todos los antígenos analizados inducen respuesta blastogénica en controles sanos, la cual es heterogénea de individuo a individuo y de antígeno a antígeno en lo que concierne a la intensidad y al tiempo de máxima respuesta. En lo referente a la cinética de la respuesta a los diferentes antígenos se observa una gran heterogeneidad. También se observa que

la respuesta blástica máxima en los individuos PPD- se presenta al 8º día, es decir un día después de la respuesta máxima de los PPD+ que se presenta al 7º día en todos los experimentos.

c.- Respuesta de individuos con tuberculosis pulmonar a fitohemaglutinina.

La respuesta a esta lectina se analizó siguiendo las mismas condiciones usadas para los controles sanos, Figura 10. Los 4 pacientes con tuberculosis mostraron una respuesta a la PHA (0.1µg /pozo) muy abatida en comparación con la respuesta de un individuo sano PPD+ que presenta a máxima proliferación al 4º día mientras que en 3 enfermos se recorre hasta el 9º día. En el paciente 3 la respuesta fué prácticamente nula.

d.- Respuesta de individuos con tuberculosis pulmonar a antígenos purificados de M. tuberculosis

Los resultados se muestran en la Figura 11. Las CMNH del enfermo 1 con tuberculosis avanzada presentan anergia a todos los antígenos probados incluyendo el EPT. Llama la atención, sin embargo que las células de este individuo respondieron, aun cuando modestamente a la PHA. El enfermo 2 con tuberculosis y diabetes, sí presenta respuesta blástica a los antígenos micobacterianos aunque muy atenuada en comparación con los controles sanos. El enfermo 3, con tuberculosis resistente al tratamiento, presentó anergia casi total a SOD, en menor grado a P 28, Fn 30-31 y Gp 38. se observó una respuesta modesta al EPT y Gp 50-55, Figura 12; este paciente tuvo una respuesta nula a PHA, Figura 10. El enfermo 4, con tuberculosis temprana, fue el que

mejor respondió tanto a la PHA, Figura 10, como al EPT y a los antígenos purificados, Figura 12, aun cuando estuvo lejos de la respuesta observada en los controles sanos. Las CMNH de este paciente respondieron con mayor intensidad a Gp 38. En lo que concierne a la cinética, la respuesta máxima se presentó en general al 8o. día de cultivo, exceptuando con Gp 50-55 y P 28, antígenos que dieron respuestas máximas al 6o. día. En estas curvas destaca la heterogeneidad en la respuesta blástica tanto de un antígeno a otro como de un enfermo a otro.

4.8 Respuesta blástica de CEM.

En los ratones la respuesta blástica, *in vitro* de sus células esplénicas a SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55, presenta una cinética muy similar aunque la intensidad de la respuesta varía de un antígeno a otro como lo muestra la Figura 13: la máxima proliferación se obtuvo para SOD y P 28, que se presentó el día 3, siendo menos intensa la proliferación para Gp 50-55 la cual se obtuvo el día 4. Es de notar la respuesta blástica de estas células a la Con-A que es menor que la inducida por EPT, SOD y P 28, posiblemente se deba a que algunos mitógenos, en particular la Con-A activa a células T supresoras, las cuales pueden reducir la respuesta proliferativa en tales cultivos. Gp 38 induce menor respuesta blástica que la Con-A pero es de notar que esta glicoproteína incrementa la proliferación de los linfocitos supresor citotóxicos (CD8⁺).

4.9 Líneas celulares humanas.

Se obtuvieron las líneas celulares inducidas por SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de M. tuberculosis de individuos sanos PPD+ vacunados y sin vacunar y de PPD- vacunados y sin vacunar, de enfermos con tuberculosis y de ratones sensibilizados con el extracto total del bacilo tuberculoso para determinar las diferencias en la desviación fenotípica y el perfil de citocinas por las líneas celulares obtenidas. Se hizo un ensayo de especificidad al antígeno, Figura 14, con la finalidad de saber si se presentaba reacción cruzada entre Gp 38 y P 28 en la línea celular 38 de un individuo PPD+, Figura 14-A, y la línea celular 38 del enfermo 3 en 14-B. Los resultados indican que hay una mayor respuesta para Gp 38 que las indujo, siendo más intensa en el individuo PPD+ que en el enfermo 3; además existe respuesta aunque con menor intensidad para el medio de cultivo y también hay respuesta aunque muy atenuada para P 28, posiblemente sea por algo de influencia del medio de cultivo.

4.10 Fenotipo de las líneas celulares humanas.

Con la CMNH de los controles y los enfermos se obtuvieron líneas celulares inducidas por los antígenos SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de M. tuberculosis para determinar en ellas la desviación fenotípica y el perfil de citocinas. El fenotipo de las líneas celulares de los individuos sanos se pueden analizar en la tabla 1 y en la Figura 15 y el fenotipo de las líneas celulares de los enfermos se observa en la tabla 2 y en la Figura 16. En términos generales se puede decir que todos presentan el fenotipo protector CD4⁺ con el marcador TCRαβ. Las líneas celulares inducidas por Fn 30-31,

presentan un fenotipo similar en las siguientes personas PPD- no vacunado, enfermo 3 y enfermo 4.

4.11 Fenotipo de las líneas celulares murinas.

El fenotipo de las líneas celulares murinas se muestra en la tabla III, donde se observa que la mayoría de las líneas presenta el fenotipo protector $CD4^+$ con el receptor para células T $\alpha\beta$; sin embargo Gp 38 induce una línea celular que presenta bastante elevados el marcador $CD8^+$ y el TCR $\gamma\delta$ en comparación con los valores de estos mismos marcadores en condiciones basales.

4.12 Producción de IL-2, IL-4, IL-5 e $IFN\gamma$ por las líneas celulares humanas.

Se realizó un bioensayo para determinar la producción de interleucina-2 humana (IL-2h) por las líneas celulares inducidas por los antígenos SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55, para lo cual se utilizó una clona de células T dependiente de IL-2 (CTLL-2), un sobrenadante (SN) rico en IL-2 humana (IL-2h), IL-2 recombinante humana (IL-2rh) y un anticuerpo policlonal anti IL-2h, como se indica en Materiales y Métodos. Se realizó una curva estándar para IL-2rh y se determinó la dilución de la IL-2rh capaz de inducir el 50% de proliferación de la CTLL-2 (1 U) en las condiciones de nuestros ensayos, resultando ser la dilución 1:32 como se observa en la Figura 17, misma dilución que se utilizó para colocarla en todos los pozos de la placa de microtitulación al realizar una curva de neutralización, Figura 18, utilizando un anticuerpo anti IL-2rh, cuya literatura indicó que 10 μg contenidos en 10 μl neutralizan una U de IL-2rh, con estos datos se realizó la curva de

neutralización utilizando la clona CTLL-2, 5×10^4 /pozo. Los resultados obtenidos en la Figura 18 indican que la clona sí es dependiente de IL-2, ya que al disminuir la concentración del anticuerpo anti IL-2, hay IL-2 libre que utiliza la clona para activarse y proliferar, lo que comprueba que las curvas estándar, la curva de neutralización y los reactivos son correctos.

Se realizó un bioensayo, Figura 19 y Diagrama 3, con los SN de 48 horas de cultivo de nuestras líneas celulares para determinar en ellas la producción de IL-2 usando como control positivo un sobrenadante rico en IL-2h como se indica en Materiales y Métodos, pero los resultados fueron negativos, ninguno de los sobrenadantes de nuestras líneas celulares favoreció la proliferación de la clona CTLL-2, lo que parecía indicar que ninguna de las líneas celulares era productora de IL-2,

Se hizo otro bioensayo en las mismas condiciones con los sobrenadantes de 7 y 10 días de cultivo de nuestras líneas celulares como se indica en la Figura 20 y el Diagrama 3, pero los resultados fueron también negativos. Consideramos que posiblemente esto era debido a la presencia de receptores solubles en el medio de cultivo que interactuaban con las citocinas secretadas por las células. Existen varios reportes que demuestran la presencia de receptores solubles para IL-2 (Nelson, D. L., y col. 1986), IL-4 (Mosley, B., y col. 1989), IL-5 (Murata, Y., y col. 1992). La producción de los receptores solubles podría ser debido a que durante el empalme alternativo del RNAm-receptor de citocina quede truncado antes de la región que codifica para el dominio transmembrana o que esta región esté suprimida o también podría deberse al rompimiento proteolítico del dominio extracelular del receptor. Tomando en cuenta los resultados negativos obtenidos por el

bioensayo para la detección de citocinas recurrimos a otra prueba que fue el ensayo de ELISPOT.

El ensayo de ELISPOT fue originalmente descrito para determinar las células secretoras de anticuerpos específicos (Czerkinsky, C., 1983) posteriormente se ha utilizado para determinar las células secretoras de las diferentes citocinas en respuesta a su activación por antígenos específicos o mitógenos (Taguchi, T. 1990). La metodología es descrita en Materiales y Métodos y en el Diagrama 4 se muestra el fundamento del ensayo de ELISPOT.

Los resultados obtenidos en el papel de nitrocelulosa se observaron en un microscopio de disección. En la Figura 21, el círculo B muestra los spots o manchas que indican los sitios en donde el anticuerpo monoclonal específico pegado al papel de nitrocelulosa captura a la interleucina en el momento que es excitada por la célula, impidiendo que la citocina sea neutralizada por los receptores solubles que se habrán liberado al medio de cultivo. En el círculo A se muestra un resultado negativo indicando que no hubo producción de citocinas.

Los estudios realizados por ELISPOT en las líneas celulares humanas de individuos sanos se muestran en la Tabla IV y la Figura 22 y de los enfermos en la Tabla V y la Figura 23 indicándonos que sí hay diferencias en los resultados. Las líneas celulares de los individuos sanos inducidas por SOD, P 28, Fn 30-31 y Gp 38 secretan IL-2 e IFN γ , por lo que se considera que estas líneas celulares pertenecen a la subpoblación Th1. En cambio las líneas celulares de los enfermos inducidas por los antígenos SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de M. tuberculosis presentan subpoblaciones Th0 o Th1 o

Th2 al secretar IL-2 e IL4 o IL-2 e IFN γ o IL-4 e IL-5 respectivamente, predominando la subpoblación Th0. También se observa que en los análisis basales de los mismos enfermos presentan subpoblaciones Th2 o Th0, pero en ningún basal hay producción de IFN γ , en cambio esta citocina sí es secretada por las líneas celulares de los mismos pacientes inducidas por algunos de los antígenos micobacterianos analizados en este experimento como se observa en la Tabla VI, en la que se muestra el efecto de los niveles del IFN γ e IL-4 para desviar las líneas celulares a las subpoblaciones TH1, TH2 o TH0.

4.13 Producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por las líneas celulares murinas.

En la Tabla VII se observa la producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ por las líneas celulares murinas inducidas por los antígenos SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de M. tuberculosis indicándonos que las líneas celulares 23, 28, 30-31 y 50-55 pertenecen a la subpoblación Th0. Gp 38 parece no haber inducido ningún cambio en la producción de citocinas por esa línea celular con respecto al análisis basal, perteneciendo ambas a la subpoblación Th1. En los resultados correspondiente a la línea 30-31 se observa una gran producción de IFN γ (60 puntos) y de IL-4 solo unos cuantos spots, sin embargo debido a la presencia de IL-4 e IL-5 se considera que pertenece a la subpoblación Th0 en el momento que se realizó este experimento.

5. DISCUSION

En vista de la protección tan irregular conferida por la vacunación con BCG (Fine, P. E. M., 1989), una línea de investigación importante es en la actualidad la identificación de antígenos inmunoprotectores para ser utilizados en el diseño de nuevas vacunas. Recientemente, esta necesidad se ha acentuado por el incremento en las tasas de tuberculosis (American Thoracic Center for Disease Control, 1992) y por la aparición de cepas de bacilos resistentes a múltiples drogas antifímicas.

Existen observaciones que sugieren que la bacteria viva libera moléculas que pueden inducir inmunidad protectora y otras que son potentes inmunosupresores. Por lo tanto es necesario conocer la actividad de los antígenos micobacterianos antes de proponer su uso como vacunas.

En la actualidad existen evidencias que sugieren que la inmunidad protectora en tuberculosis se relaciona con las células CD4 (Zhang, M., 1995) en particular con la subpoblación Th1 productora de IL-2 e IFN γ . Esta última citocina capacita a macrófagos para destruir a la micobacteria y la IL-2 expande las poblaciones celulares, incluyendo células efectoras como las NK y células citotóxicas capaces de destruir a células infectadas por el bacilo (Barnes, P. F. y col. 1993).

Se han identificado fracciones antigénicas de peso molecular menor de 10 kDa con actividad inmunoprotectora que inducen *in vitro*, niveles elevados de IFN γ en controles sanos y en pacientes tuberculosos (Boesen, H. y col. 1995). Se han identificado múltiples antígenos que inducen eficientemente una respuesta blástica T *in vitro*, como son la proteína de

estrés calórico de 65, además Fn 30-31 y P 19 kDa (Mendez-Samperio, P. y col. 1995). Otras fracciones estudiadas son las de 45-64 y 61-80 kDa (Harris, D. P. y col. 1993). Más recientemente se ha observado que macrófagos transfectados con la proteína de estrés calórico de 65 kDa inducen inmunidad protectora (Cooper, A. y col. 1995)

En esta tesis hemos tratado de identificar antígenos que induzcan la proliferación de linfocitos T productores de IFN γ y de IL-2 con la hipótesis de que dichos linfocitos son inmunoprotectores. La estrategia seguida fue primero purificar antígenos que nosotros consideramos potencialmente relevantes de filtrados del medio de cultivo de una cepa virulenta de M. tuberculosis. SOD, fue seleccionada por representar una molécula de estrés cuya síntesis es modulada por factores tales como la exposición a radicales libres de oxígeno. (Kusunose, E., 1976). Fn 30-31 fue seleccionada por su reconocida capacidad para inducir una respuesta blástica *in vitro* y la síntesis de IFN γ . Gp 38 y Gp 50-55 se incluyeron en el estudio por representar, la primera un antígeno inmunodominante y la segunda por ser una proteína abundante en la pared de la micobacteria (Mancilla, R., datos no publicados). Así mismo se obtuvieron células de sangre periférica de individuos con diferente grado de exposición al bacilo de la tuberculosis, incluyendo sujetos PPD+, PPD- y pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada de diversos grados de extensión.

Para caracterizar el tipo de respuesta a los antígenos individuales se cultivaron las células con los antígenos micobacterianos, se determinó la cinética de la respuesta blástica, se obtuvieron líneas celulares y se identificó apropiadamente el fenotipo, el receptor para antígeno y el perfil de citocinas.

En lo que concierne a la respuesta blástica se puede decir que con la mayor parte de los antígenos de prueba, los controles PPD+, vacunados o no, presentan una respuesta más intensa que los individuos PPD- estudiados. El hallazgo anterior es de esperarse por la sensibilización inducida con BCG que generaría una memoria inmunológica. Es de interés la observación de que los individuos PPD- desarrollaron una buena respuesta blástica a todos los antígenos. La relación entre la activación, *in vitro* de los linfocitos y la hipersensibilidad retardada no siempre es absoluta aun cuando ambos fenómenos están mediados por linfocitos T. Se pueden encontrar individuos PPD- con respuesta blástica, probablemente debido a que los linfocitos T podrían activarse por mitógenos como PHA, Concanavalina A y por lipopolisacáridos. Podría ser también porque los fenómenos de extravasación linfocitaria estuvieran alterados o bien que, como se ha reportado en la literatura, podrían estar involucradas subpoblaciones diferentes de linfocitos que participan en la respuesta de hipersensibilidad retardada y en la respuesta blástica *in vitro*.

Los pacientes con tuberculosis presentaron respuesta blástica muy disminuida tanto a PHA como a todos los antígenos, siendo proporcional esta supresión a la extensión y gravedad de la enfermedad. Este fenómeno fue muy marcado con el paciente I el cual tenía tuberculosis muy avanzada, observándose anergia casi total a todos los antígenos pero no a la PHA, con la que se observó una respuesta blástica aunque atenuada; esto podría deberse a que la lectina es reconocida por los carbohidratos de membrana mientras que hay impedimento para que, receptores y antígenos del linfocito

interaccionen apropiadamente. Hay que señalar que fue con Gp 38 con la que se observaron las respuestas blásticas más intensas, esto en dos pacientes.

Nuestro hallazgos coinciden con lo reportado en la literatura. Existen múltiples reportes en los cuales se ha descrito anergia *in vitro* a PHA y a PPD (Toossi, Z. y col. 1986; Méndez-Zamperio, P. y col. 1995), existiendo reportes aislados en los cuales se ha detectado este fenómeno utilizando antígenos purificados, como en la presente tesis. Las causas de la inmunosupresión en tuberculosis podrían ser, entre otras, un impedimento estérico por la presencia de complejos inmunes unidos a los linfocitos T a través de los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, o a la presencia de células supresoras o moléculas supresoras liberadas por el bacilo que inhiben la actividad de las células. Existen varias observaciones que implican a lípidos de la pared bacteriana en los fenómenos de inmunosupresión de la tuberculosis (Sussman, G. y col. 1991; Barnes, P. F. y col. 1992) aun cuando también podrían participar las proteínas de estrés calórico (Hernández-Pando y Mancilla, observaciones no publicadas).

Una observación de interés fue la demostración de que la anergia de las células de los pacientes tuberculosos parece ser reversible, pues observamos que al estimular repetidamente a las células con PHA se logró la proliferación celular suficiente para obtener líneas celulares. Esto podría deberse a que las células cultivadas por tiempo prolongado logran liberarse de complejos inmunes y factores inmunosupresores.

En las líneas celulares humanas en contra de los antígenos purificados se determinó por FACS el fenotipo y los receptores para antígeno. Los resultados obtenidos han confirmado la observación previamente reportada de

que M. tuberculosis induce la proliferación preferencial de células T de ayuda ($CD4^+$). Esto fue notable con controles sanos en los que se observó que con todos los antígenos, las células $CD4^+$ constituían, en general, más del 90 % de los linfocitos T. En contraste, en las CMNH de los mismos individuos no estimuladas por antígeno, las células $CD4^+$ constituían aproximadamente la mitad de los linfocitos T.

A diferencia de los individuos sanos, en los pacientes con tuberculosis pulmonar, la proliferación de linfocitos $CD4^+$ fue menos aparente, observándose una contribución mayor de linfocitos T supresores-citotóxicos ($CD8^+$). Lo anterior fue notable en los pacientes 1 y 2, los que respondieron a SOD, Gp 38 y Gp 50-55 con una proliferación marcada de dichas células. La respuesta preferencial de células $CD4^+$ observadas con células humanas fue confirmada con las líneas celulares murinas, en las que se observó que 4 de los 5 antígenos probados expandían marcadamente la población $CD4^+$. Una excepción notable fue la Gp 38 la cual indujo proliferación marcada de linfocitos T con el fenotipo supresor-citotóxico ($CD8^+$); este fenómeno fue también observado con las células de 3 pacientes tuberculosos. Esta es una observación de interés por el papel que recientemente se ha asignado a las células $CD8^+$ en la respuesta antituberculosa. Hay evidencias de que estas células son capaces de lisar macrófagos que expresan en su superficie péptidos del bacilo (Flynn, J. L. y col. 1992). Por otra parte no hemos encontrado reportes en la literatura describiendo la expansión preferencial de estos linfocitos por algún antígeno particular. Lo anterior es además importante por el hecho de que se ha observado que una clona de células T $CD8^+$ aislada de ratones vacunados con células de mamífero que expresan el

antígeno micobacteriano de 65 kD fue capaz de lisar macrófagos infectados y de transferir protección (Silva, CL. y col. 1994). También es de interés en este contexto la observación de que ratones deficientes en células T CD8⁺ presentan mayor destrucción del pulmón al infectarlos con el bacilo tuberculoso (Flinn, J. L. y col. 1992). Por todo lo anterior sería de interés intentar expandir en condiciones clínicas o experimentales la población CD8⁺ con antígenos como Gp 38.

Durante los últimos años el tipo de receptor T para antígeno involucrado en la respuesta antituberculosa ha adquirido mucha relevancia. En este estudio hemos observado, tanto en ratones como en humanos sanos y tuberculosos, que hay proliferación casi exclusiva de linfocitos T con el receptor $\alpha\beta$; esto concuerda con lo reportado en la literatura. Más recientemente, han adquirido mucho interés en la inmunidad en tuberculosis la participación de linfocitos T con el receptor $\gamma\delta$ (Barnes, P. F. y col. 1992). Se ha observado que la estimulación, *in vitro* con PPD y con la proteína de estrés calórico de 65 kD induce proliferación marcada de estas células (O'Brien, R. L. y col. 1989; Born, W. y col. 1990). También se ha observado que en ratones infectados con el bacilo vivo hay proliferación de linfocitos T con el receptor $\gamma\delta$ (Griffin, J. P. y col. 1991) y que ratones deficientes en estas células son muy susceptibles a la infección tuberculosa (Silva, C. L. y col. 1994). Se sabe que los linfocitos $\gamma\delta$ participan en la respuesta temprana al bacilo de la tuberculosis (Janis, E. M. y col. 1989) En este estudio no observamos ni identificamos antígenos que indujeran de manera prominente linfocitos T $\gamma\delta$; la proporción más alta de estas células se observó en la línea murina inducida con Gp 38 (16.2 %).

En estos experimentos analizamos la producción de citocinas por el método de ELISPOT, por medio del cual se enumeran células que sintetizan dichas moléculas utilizando anticuerpos monoclonales (Czerkinsky, C. C. y col. 1983). Este método se seleccionó pues en ensayos piloto se observó que el ELISA daba resultados muy irregulares, probablemente debido a que en el cultivo puede haber desprendimiento de receptores para citocinas y que al unirse con estas dificultarían su detección. En este estudio el método de ELISPOT resultó ser de gran reproducibilidad.

Un hallazgo interesante realizado en este estudio fue la demostración de que las CMNH de controles sanos, de manera regular e independientemente del antígeno utilizado, presentan un patrón TH1 de producción de citocinas, ya que sólo se detectaron células productoras de IFN γ e IL-2. Las observaciones anteriores concuerdan con algunas observaciones publicadas en la literatura (Barnes, P. F. y col. 1993; Surcel, H. M. y col. 1994). Es de llamar la atención que los individuos PPD- fueron los que presentaron una mayor producción de IFN γ e IL-2. Hay que señalar que las células de los mismos donadores presentaron un perfil de tipo TH0 cuando fueron estimuladas por un periodo de 24 h por PHA.

El perfil de síntesis de citocinas observado en controles sanos difirió marcadamente del observado en las líneas celulares obtenidas con los mismos antígenos de pacientes con tuberculosis y con células esplénicas de ratones no infectados que habían sido hiperinmunizados con EPT en adyuvante completo de Freund. En comparación con los controles sanos, las líneas de los pacientes tuberculosos se caracterizaron por una marcada disminución de los niveles de producción de citocinas lo cual fue más

aparente en el paciente con tuberculosis muy avanzada. Estos resultados difieren de un estudio reciente en el cual se observó que el número de células productoras de citocinas era mayor en pacientes tuberculosos que en controles sanos (Surcel, H. M. y col. 1994). Otra diferencia entre controles y enfermos fue que en éstos se observó en su mayoría un patrón de tipo Th0. Sin embargo hay que señalar que hubo 9 ejemplos de un patrón de tipo Th1: dos inducidos por Fn 30-31, dos por Gp 38, dos por Gp 50-55, dos por SOD y uno por P28. Conviene decir que Fn 30-31 fue el antígeno que indujo el número mayor de células Th1, esto en los pacientes 3 y 4, que eran portadores de formas menos graves de tuberculosis. Es de interés, que en condiciones basales (es decir estimuladas las células solo con PHA), en ningún caso se observaron células productoras de IFN γ

A diferencia de lo observado en los controles sanos, en las líneas celulares murinas inducidas con SOD, P28, Fn 30-31 y Gp 50-55 se observó un patrón Th0. Sólo la línea inducida por Gp38 presentó un perfil Th1 con producción exclusiva de IL-2. Hay que mencionar, sin embargo, que fue con Fn30-31 que se observó una producción mayor de IFN γ .

De la discusión precedente podría concluirse que en los enfermos tuberculosos hay una alteración dramática en la respuesta inmune celular que resulta en cambios cualitativos y cuantitativos tanto en la proliferación de linfocitos T como en la red de citocinas lo cual favorecería la persistencia de la infección tuberculosa.

CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que M tuberculosis es un mosaico complejo de moléculas de antigenicidad muy heterogénea.

Todas las proteínas aquí probadas poseen epítopes capaces de inducir una respuesta T, la cual es más intensa en individuos sanos PPD⁺ que en individuos PPD⁻.

En pacientes con tuberculosis la respuesta blástica está disminuida .

Todas las líneas celulares obtenidas son CD3⁺ y CD4⁺ con receptores para antígeno $\alpha\beta$.

Las líneas celulares de individuos sanos presentan un patrón de citocinas del tipo Th1 (producción de IFN γ e IL-2).

Los pacientes con tuberculosis presentan un patrón de citocinas heterogéneo, siendo mayoritariamente de tipo Th0

Los antígenos: SOD, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 inducen en algunos enfermos proliferación de linfocitos T con el fenotipo supresor-citotóxico (CD8⁺).

Apéndice A: Tablas y Figuras

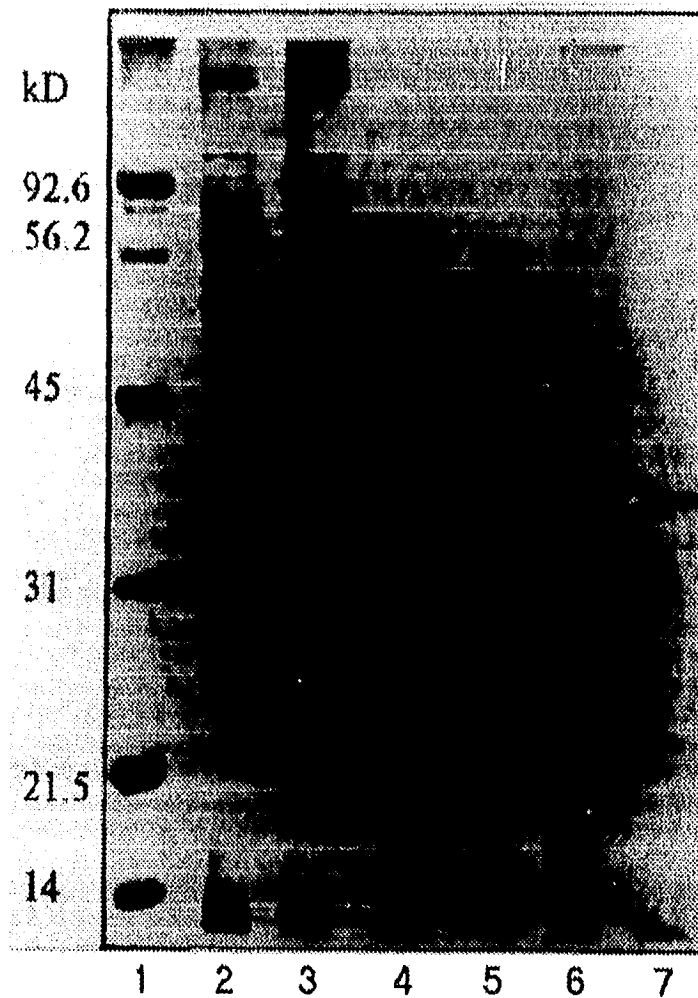


FIGURA 1. PAGE teñido con azul de Coomasie mostrando las fracciones obtenidas del EPT de *M. tuberculosis* por el método ácido-alcohólico de Seibert. Carril 1, pesos moleculares. Carril 2, con EPT observándose alrededor de 30 bandas bien definidas. Fracción 1 (carril 3). La fracción 2 muestra enriquecimiento de P 28 (carril 4). La fracción 3 está enriquecida con la proteína de 65 kDa (carril 5). La fracción 4, está enriquecida con P 28, Fn 30-31 y Gp 50-55 (Carril 6). La fracción 5 está enriquecida en Gp 38 (carril 7).

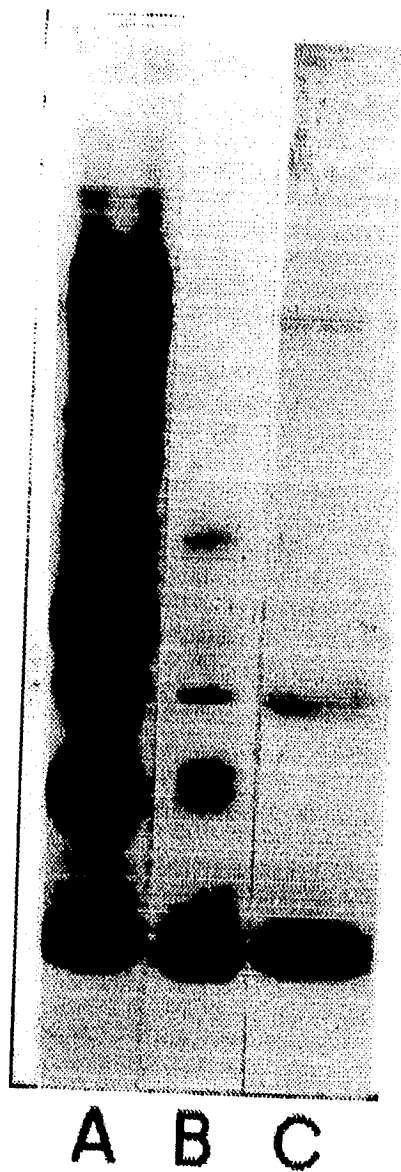


FIGURA 2. Immunoblot mostrando la purificación de P 28. Se reveló con suero hiperinmune dirigido contra el EPT. Se observa en A el EPT, en B la fracción 2 de Seibert y en C, P 28 purificada.

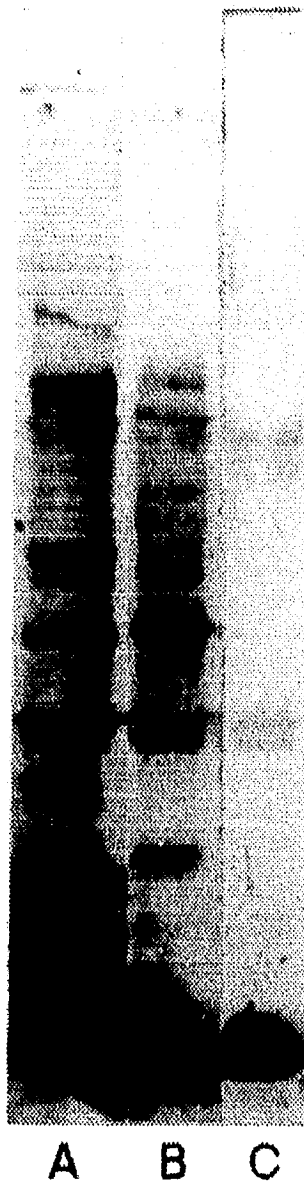


FIGURA 3. Inmunoblot mostrando la purificación de Fn 30-31. Se reveló con suero hiperimmune dirigido contra el EPT. En A se observa el EPT, en B la fracción 4 de Seibert y en C, Fn 30-31 purificada.

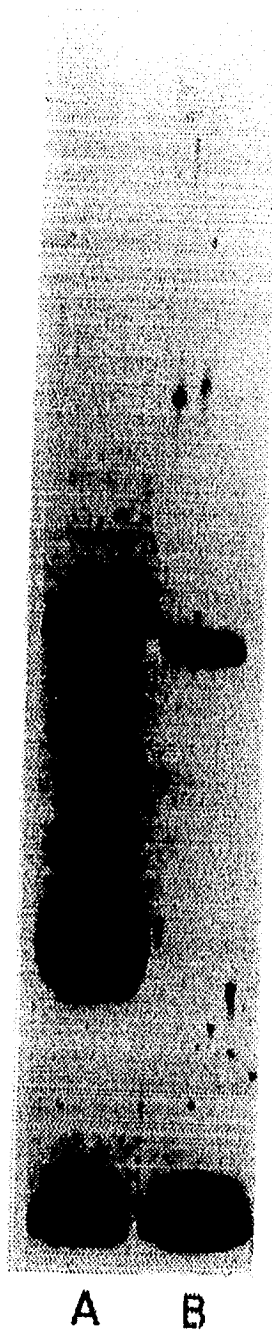


FIGURA 4. Immunoblot mostrando la purificación de Gp 38. Se reveló con el suero hiperimmune dirigido contra el EPT. Se observa en A la fracción 5 de Seibert y en B, la Gp 38 purificada.

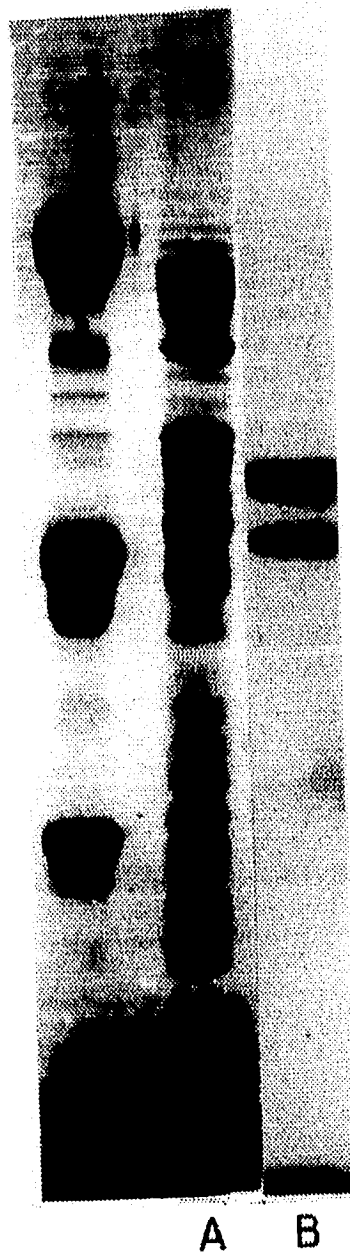


FIGURA 5. Immunoblot mostrando la purificación de Gp 50-55. Se reveló con el suero hiperimmune dirigido contra el EPT del bacilo. Se observa en A el EPT y en B, la Gp 50-55 purificada.

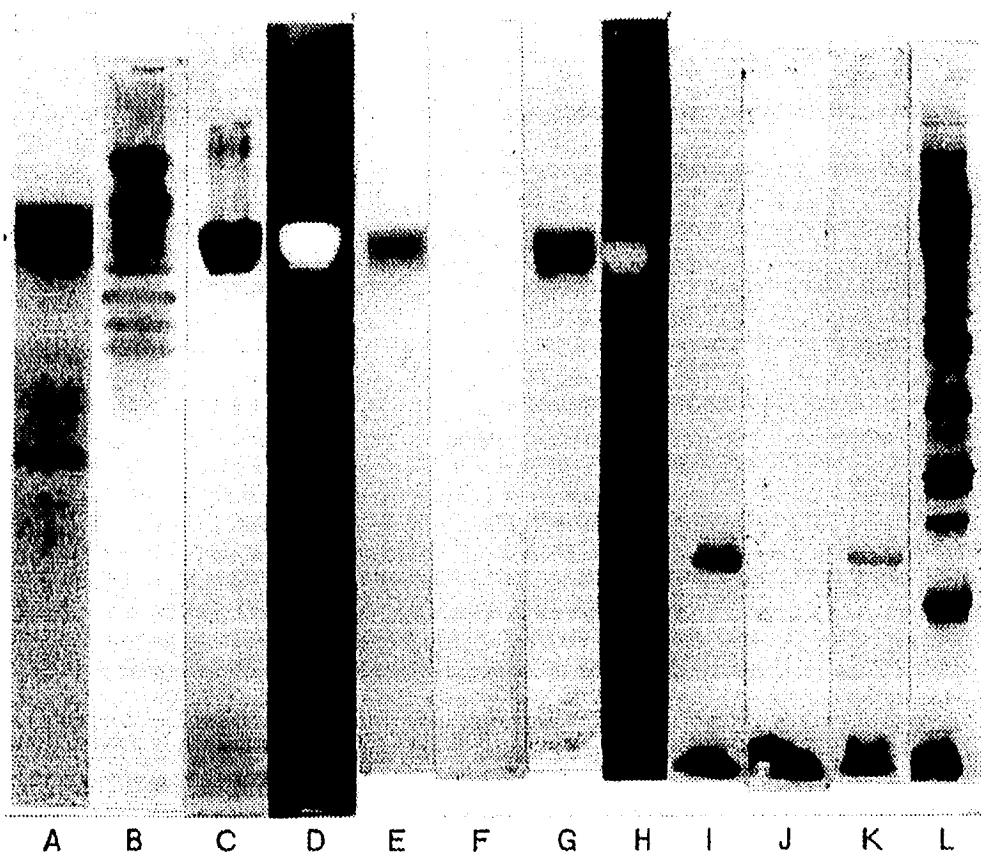


FIGURA 6. Purificación de la superóxido dismutasa, SOD. Geles en condiciones no reductoras, realizados antes de purificar la SOD: A, gel teñido con azul de Coomassie. B, inmunoblot revelado con SHI dirigido contra el extracto proteínico total. C, inmunoblot revelado con el anticuerpo monoclonal D2D anti-SOD. D, gel mostrando la actividad enzimática. Geles no reductoras realizados después de purificar la SOD: E, gel teñido con azul de Coomassie. F, inmunoblot revelado con suero hiperinmune anti EPT. G, inmunoblot revelado con el anticuerpo monoclonal D2D anti SOD. H, gel mostrando la actividad enzimática. Geles en condiciones reductoras y utilizando la SOD purificada y reducida a 23 kDa: I, gel teñido con azul de Coomassie. J, inmunoblot revelado con SHI. K, inmunoblot revelado con el anticuerpo monoclonal D2D anti SOD. L, inmunoblot de EPT revelado con el SHI.

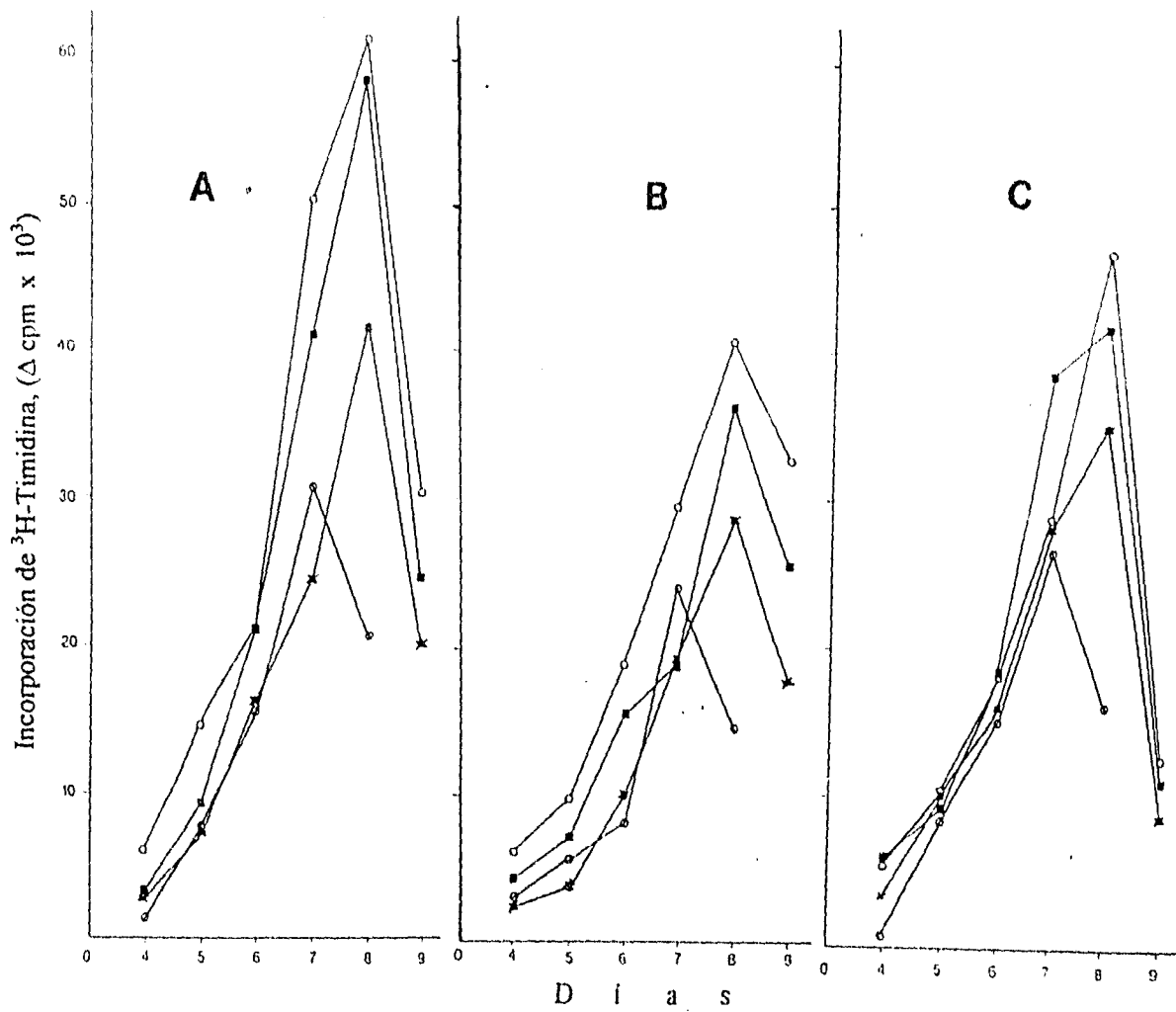


FIGURA 7. Respuesta blástica, *in vitro* de CMNH al EPT de 3 individuos: A un individuo PPD-, sano, no vacunado; B un individuo PPD-, sano, vacunado y C un individuo PPD+, sano, no vacunado. El EPT se usó a las siguientes concentraciones: 10 μg/pozo (○—○), 5 μg/pozo (■—■), 1 μg/pozo (×—×), 0.5 μg/pozo (△—△). En cada uno de los pozos se colocaron 2×10^5 CMNH.

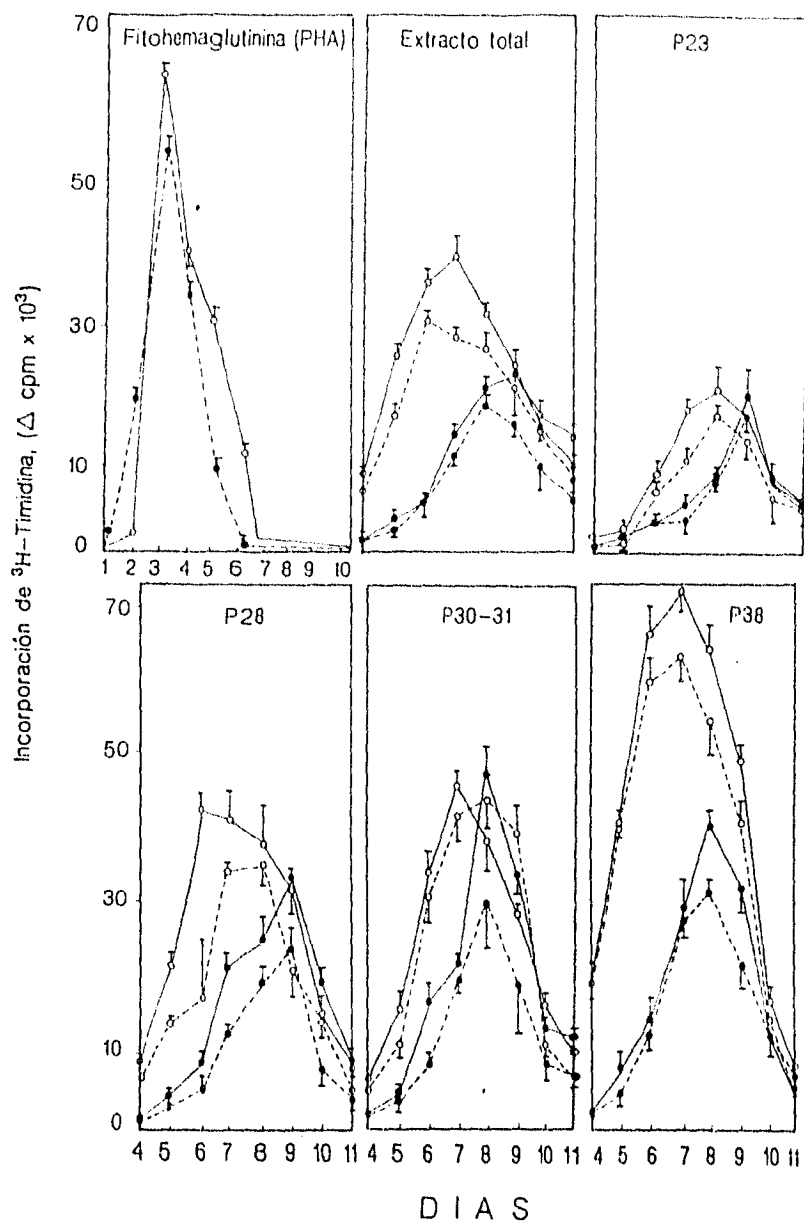


FIGURA 8. Respuesta blástica, *in vitro*, de CMNH (2×10^5 /pozo) de un individuo PPD+, sano, no vacunado, cultivadas con el antígeno indicado, 1 μ g/pozo (—○—) y 0.25 μ g/pozo (—□—). Otro individuo PPD-, sano, no vacunado, cultivadas con el antígeno indicado, 1 μ g/pozo (—●—), 0.25 μ g/pozo (—■—). Como controles positivos se usaron CMNH del individuo PPD+ (—○—) y PPD- (—●—), las cuales se cultivaron con PHA, 0.1 μ g/pozo.

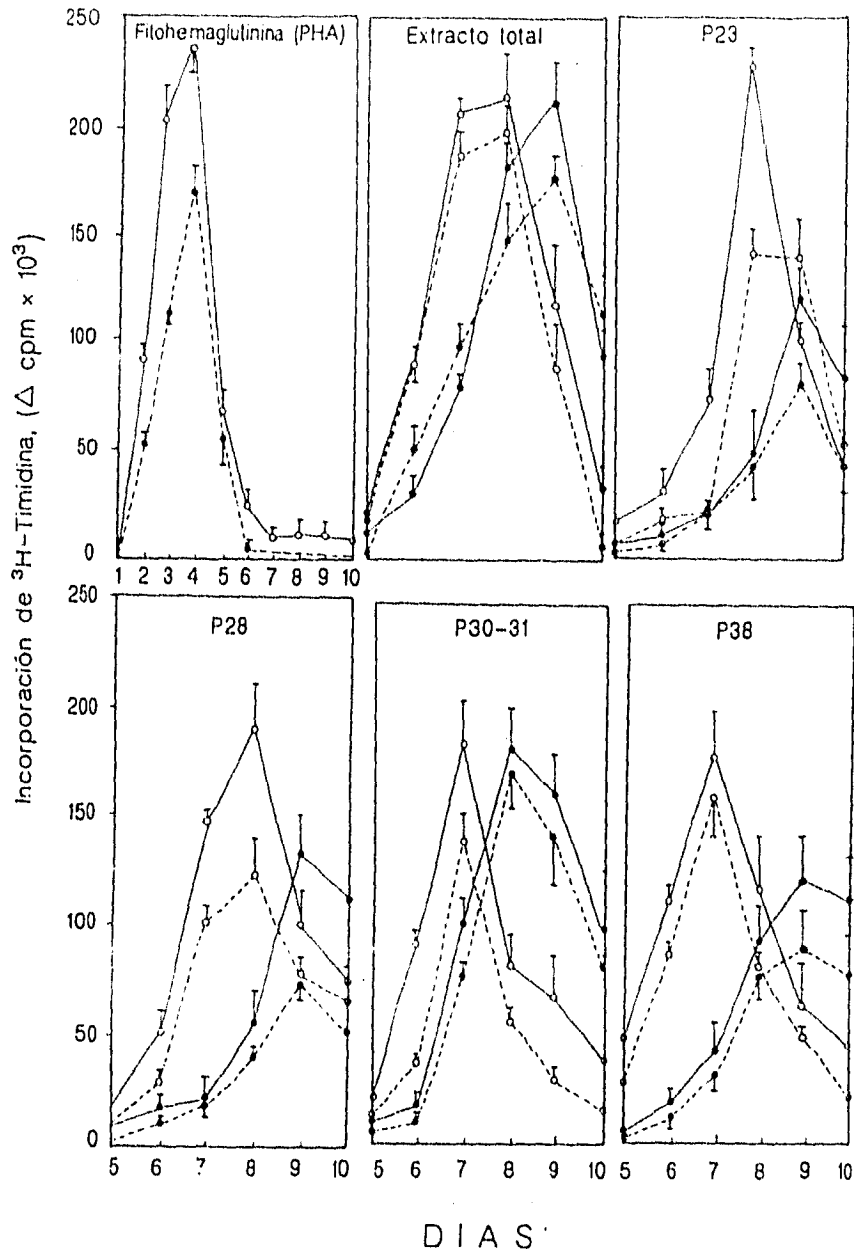


FIGURA 9. Respuesta blástica, *in vitro* de CMNH (2×10^5 /pozo) de un individuo PPD+, sano, vacunado, cultivadas con el antígeno indicado, 1 μ g/pozo (—○—) y 0.25 μ g/pozo (---○---) y de un individuo PPD-, sano, vacunado, cultivadas con el antígeno indicado 1 μ g/pozo (—●—) y 0.25 μ g/pozo (---●---). Como controles positivos se usaron CMNH del individuo PPD+ (—○—) y del PPD- (---●---), las cuales se cultivaron con fitohemaglutinina, 0.1 μ g/pozo.

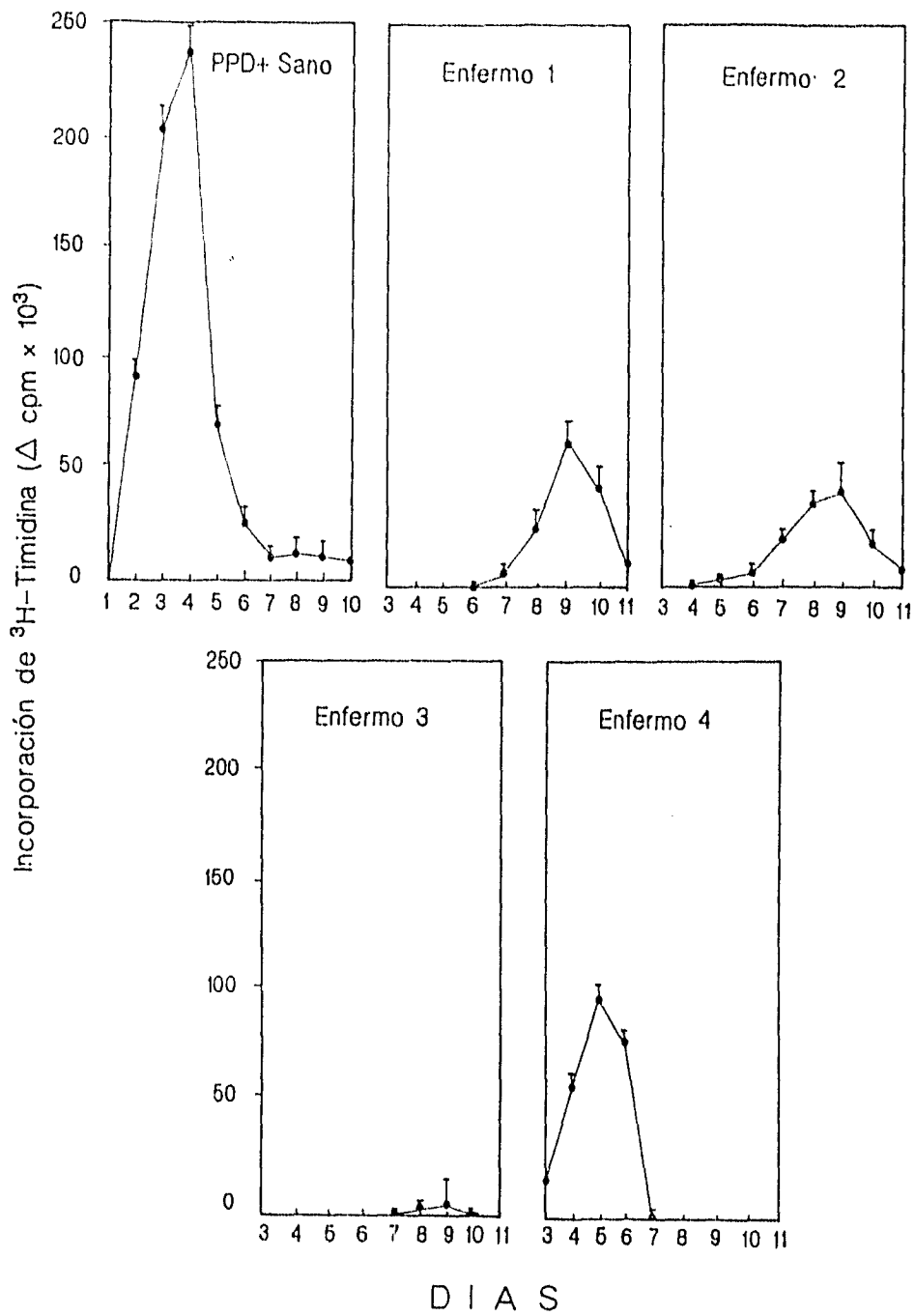


FIGURA 10. Respuesta blástica, *in vitro* de CMNH (2×10^5 /pozo), de un individuo PPD+, sano y de los enfermos con tuberculosis cultivadas con fitohemaglutinina, 0.1 μg/pozo.

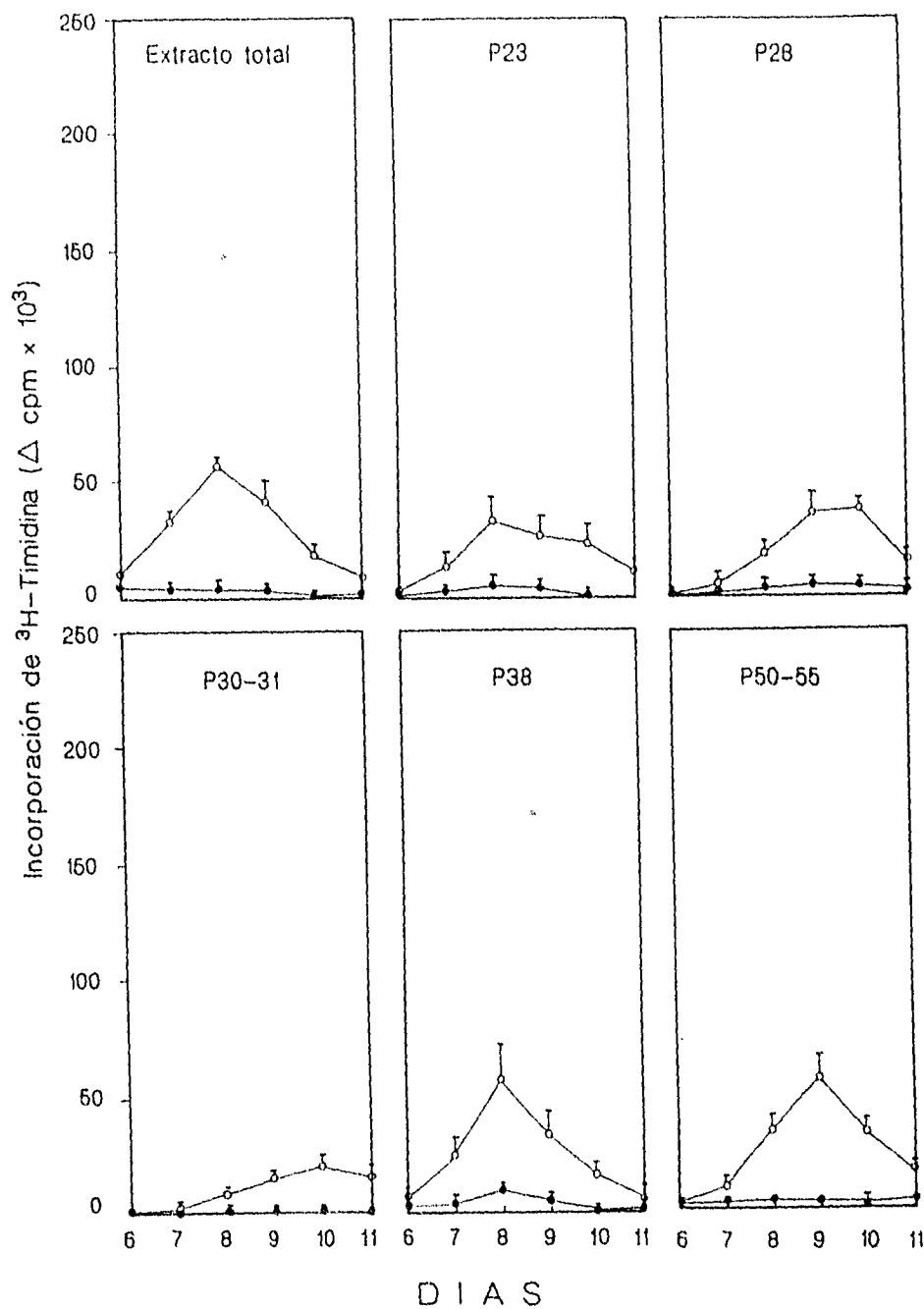


FIGURA 11. Respuesta blástica, *in vitro* de CMNH (2×10^5 /pozo), al antígeno indicado, 1 mg/pozo, de los pacientes con tuberculosis 1 (●) y 2 (○).

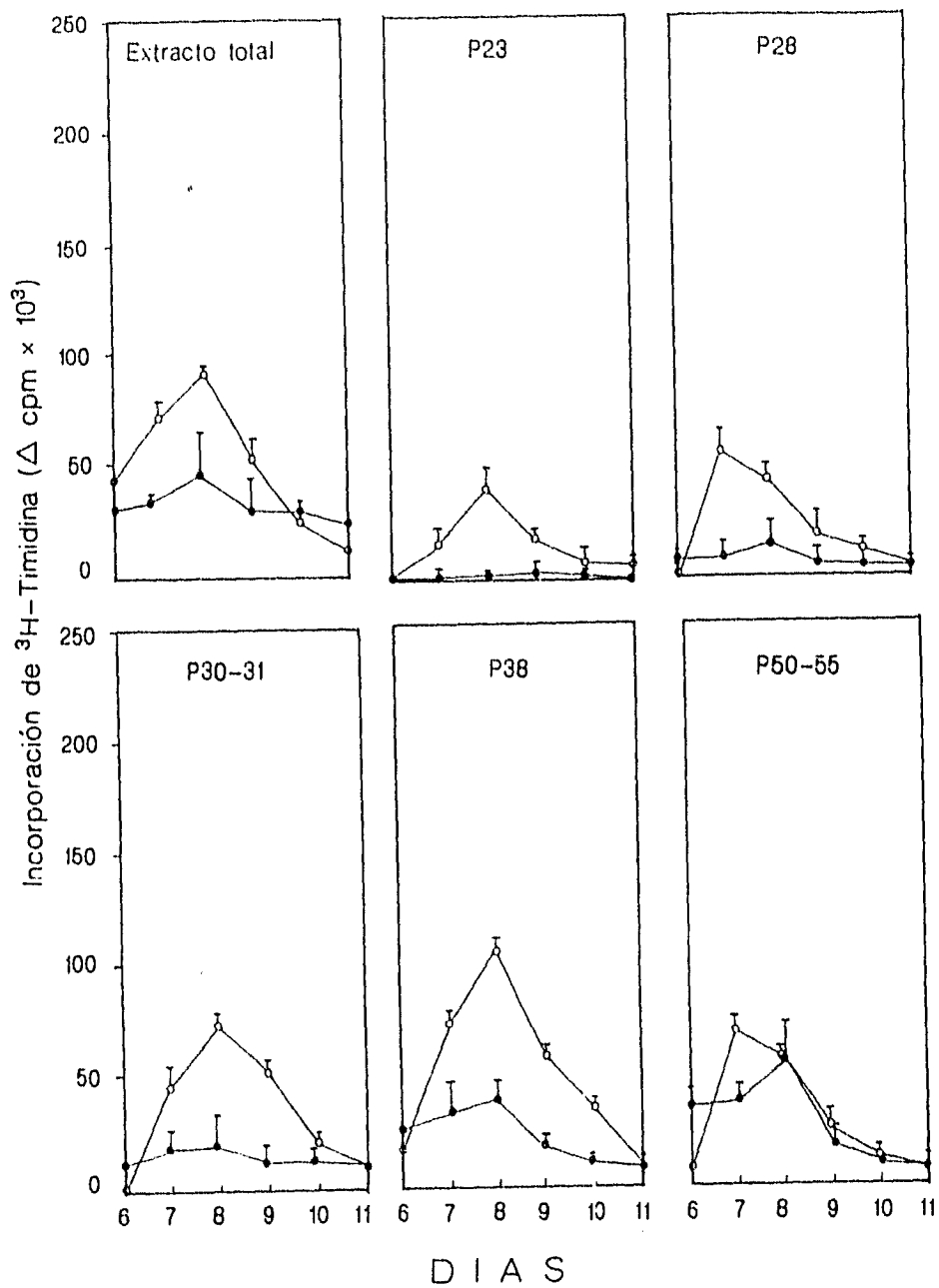


FIGURA 12. Respuesta blástica, *in vitro* de CMNH (2×10^5 /pozo), al antígeno indicado, 1 mg/pozo, de los pacientes con tuberculosis 3 (—●—) y 4 (—○—).

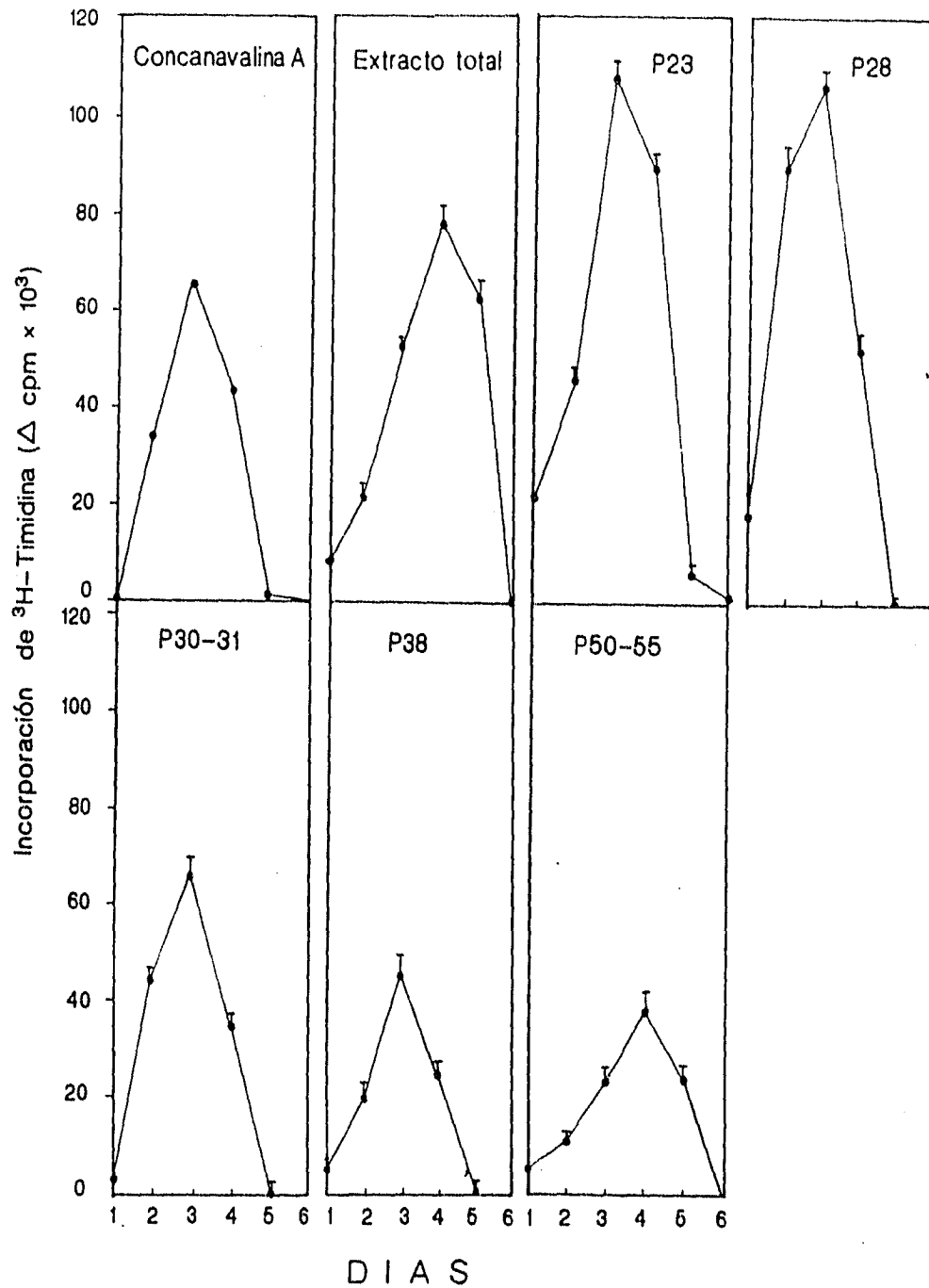


FIGURA 13. Respuesta blástica, *in vitro* CEM (2×10^5 /pozo), de ratones sensibilizados con EPT de *Mycobacterium tuberculosis* a los antígenos indicados, 1 μ g/pozo. Control positivo: CEM cultivadas con concanavalina A, 1 μ g/pozo. Control negativo: CEM cultivadas con RPMI suplementado.

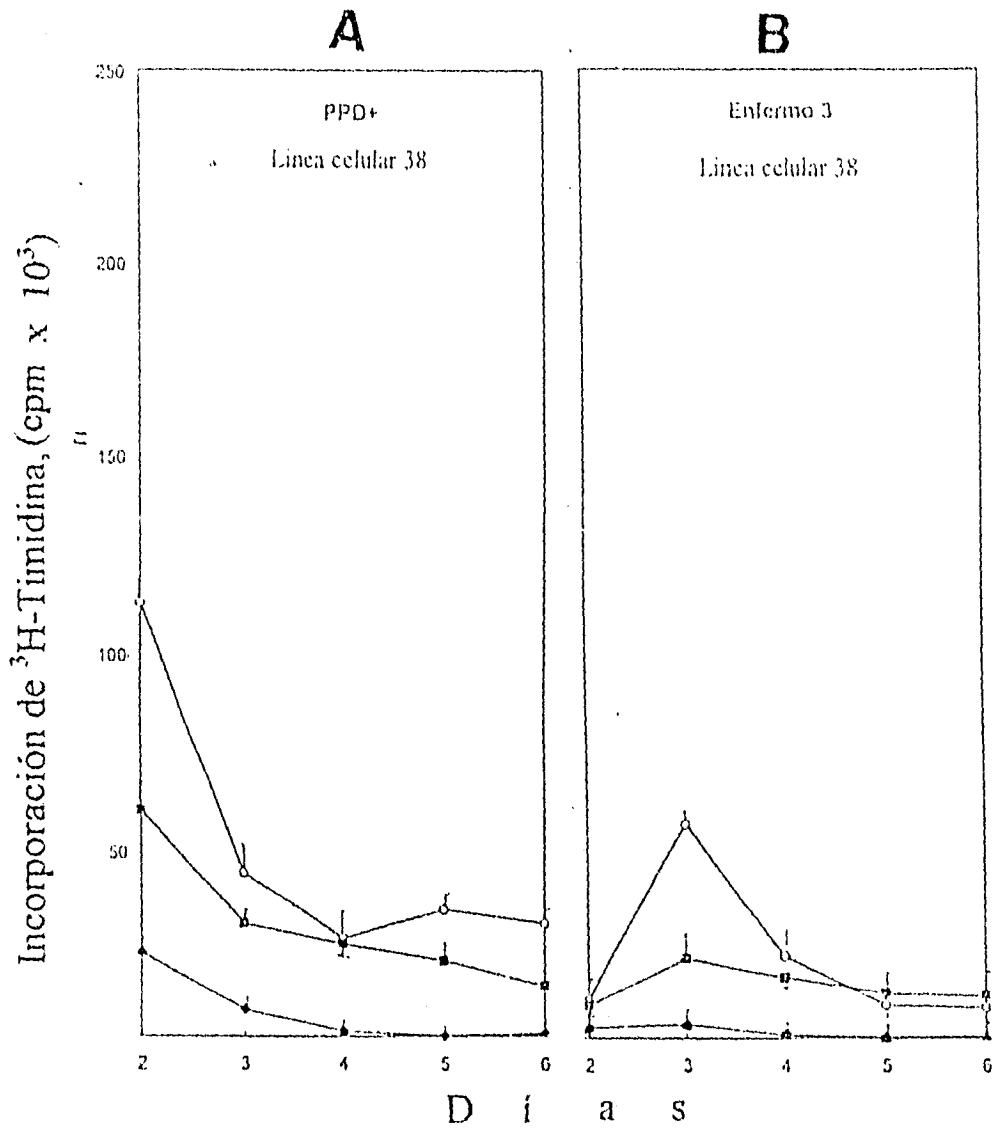


FIGURA 14. Respuesta blástica, *in vitro* de las líneas celulares inducidas con Gp 38 de un individuo PPD+, sano (A) y de un enfermo tuberculoso (B). Las líneas celulares, (5×10^5 /pozo), presentaron respuesta blástica a Gp 38, 0.25 μg /pozo (○—○), al medio de cultivo suplementado (■—■) y a P 28, 0.25 μg /pozo (●—●).

TABLA I

ANTIGENO	INDIVIDUO	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$
SOD	PPD+1	93.9	74.6	16.9	4.4	93.1	0.3
	PPD-2	94.1	91.3	8.9	10.2	94.3	1.1
	PPD+3	91.5	84.5	18.2	4.6	89.8	16.0
	PPD-4	95.9	85.3	17.8	4.7	94.3	9.7
P 28	PPD+1	97.5	93.1	4.7	19.8	94.3	0.9
	PPD-2	95.5	86.7	12.8	6.7	94.2	2.1
	PPD+3	96.7	85.7	16.1	5.3	87.6	10.2
	PPD-4	97.4	90.8	14.1	6.0	96.0	4.0
Fn30-31	PPD+1	84.5	67.4	14.0	4.8	78.9	3.0
	PPD-2	68.8	54.3	22.5	2.4	62.3	8.7
	PPD+3	93.8	90.9	14.1	6.4	97.2	0.8
	PPD-4	96.8	89.8	17.9	5.0	94.7	4.4
Gp38	PPD+1	96.5	68.2	34.5	1.9	81.8	3.0
	PPD-2	90.0	89.4	4.8	18.6	89.0	2.4
	PPD+3	96.0	95.8	10.0	9.5	92.0	7.6
	PPD-4	95.7	86.3	10.6	8.1	95.3	6.8
Basal	PPD+3	51.1	34.6	23.0	1.5	52.3	2.6
Basal	PPD-4	59.5	50.4	18.3	2.7	62.7	3.2
Normal		73.0	44.0	33.0	1.2	95.0	5.0
Rango		60-85	24-59	19-48	0.3 +		

Determinación por FACS de receptores de células T y de los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8 de las líneas celulares humanas inducidas por SOD, P28, Fn 30-31 y Gp 38 de *M. tuberculosis* de los individuos sanos PPD+1 y PPD-2 (no vacunados) y PPD+3 y PPD-4 (vacunados). También se muestran los valores basales del PPD+3 y PPD-4, así como los valores normales y sus rangos obtenidos de 100 individuos sanos. Immunology Today, Junio 1992.

Caracterización del Fenotipo y Citocinas de Linfocitos T

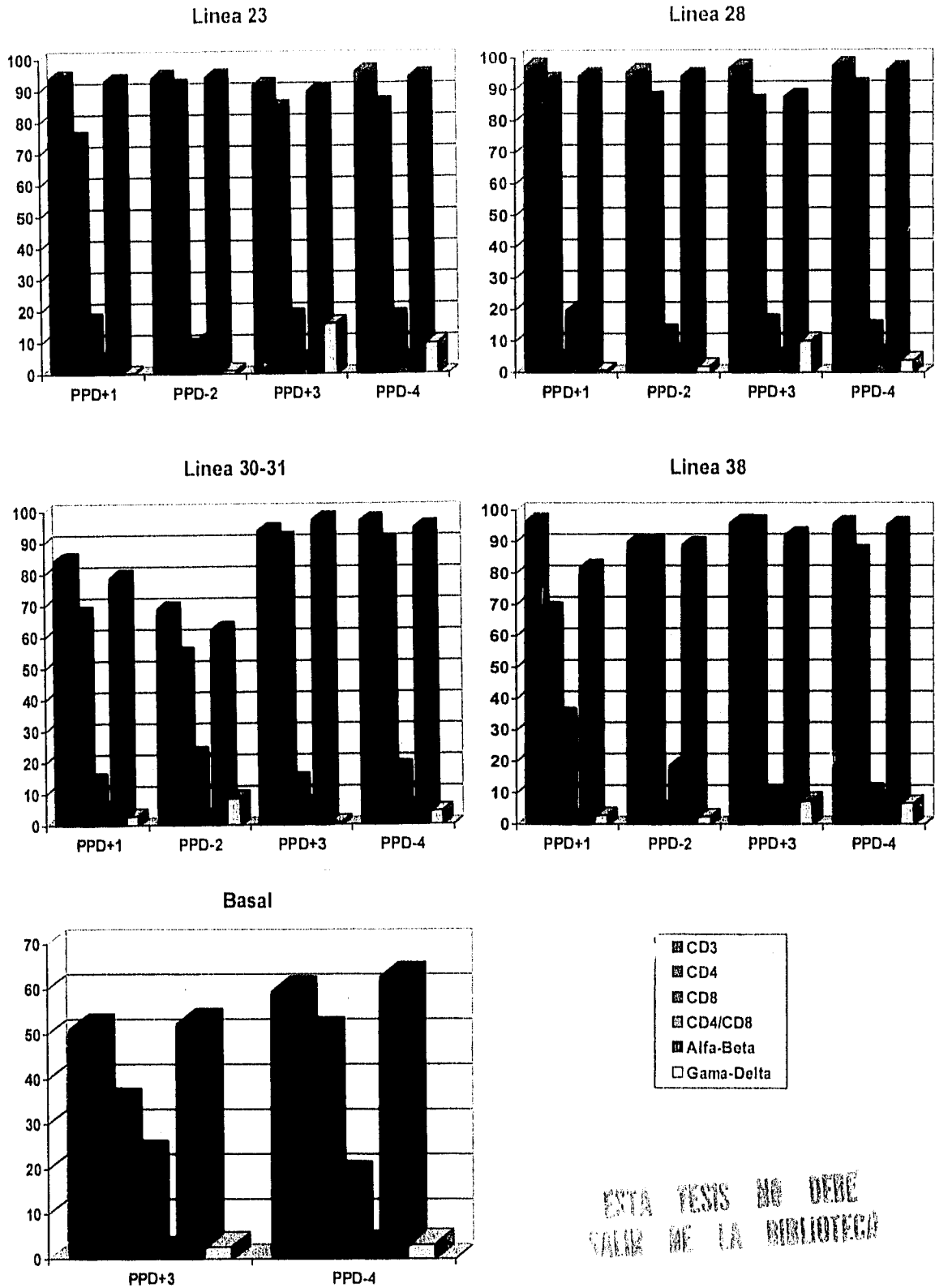


FIGURA 15. FACS de líneas celulares de individuos sanos con anti CD3, CD4, CD8 y antireceptores $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

ESTA TESIS NO DEBE
VALER DE LA BIBLIOTECA

TABLA II

ANTIGENO	ENFERMO	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$
SOD	No. 1	92.8	73.3	30.0	2.4	96.6	ND
	No. 2	95.2	73.9	30.1	2.5	94.8	ND
	No. 3	90.0	78.6	3.5	26.0	71.8	ND
	No. 4	95.1	95.5	9.0	10.6	90.0	ND
P 28	No. 1	96.3	94.9	5.1	18.0	92.0	ND
	No. 2	93.5	91.5	4.4	22.7	85.8	ND
	No. 3	85.7	77.8	6.7	11.6	91.1	ND
	No. 4	85.1	73.5	18.4	3.9	83.1	ND
Fn 30-31	No. 1	96.2	92.4	5.3	17.4	82.1	ND
	No. 2	92.8	73.3	24.0	3.0	96.6	ND
	No. 3	68.9	52.7	10.6	4.9	67.5	ND
	No. 4	62.1	43.2	29.1	1.4	54.0	ND
Gp 38	No. 1	99.6	61.2	50.1	1.2	95.6	ND
	No. 2	99.0	59.7	49.1	1.2	97.4	ND
	No. 3	89.7	84.6	3.4	24.8	87.2	ND
	No. 4	78.3	53.4	30.0	1.7	64.7	ND
Gp 50.55	No. 1	97.7	68.8	22.3	3.0	97.5	ND
	No. 2	97.3	72.0	38.5	1.8	95.3	ND
	No. 3	96.0	93.4	3.5	26.6	92.9	ND
	No. 4	86.1	79.9	14.1	5.6	89.0	ND

Determinación por FACS de los receptores de las células T y de los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8 de las líneas celulares inducidas por los antígenos de SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de los enfermos tuberculosos 1, 2, 3 y 4.

Caracterización del Fenotipo y Citocinas de Linfocitos T

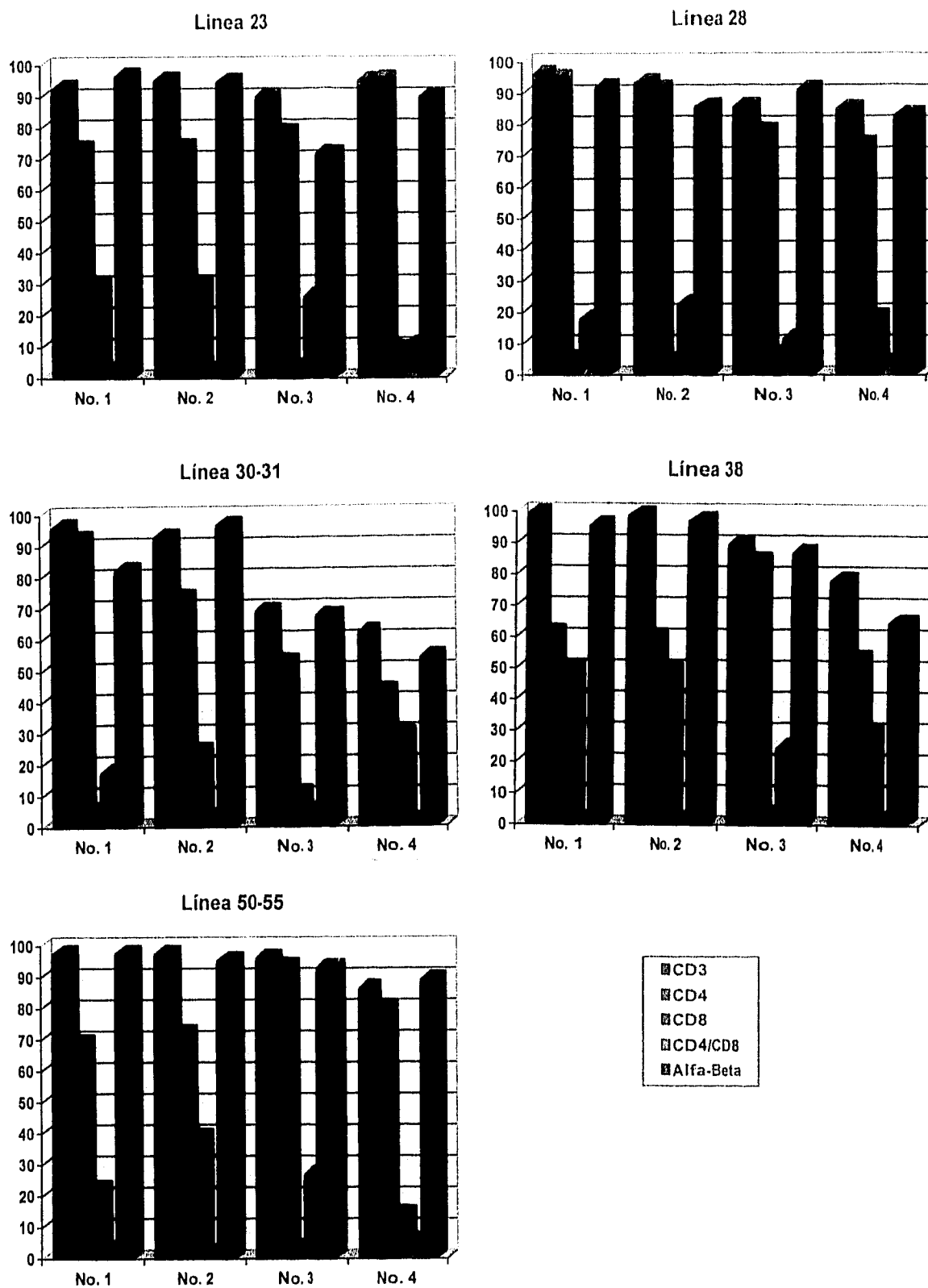


FIGURA 16. FACS de líneas celulares de pacientes tuberculosos con anti CD3, CD4, CD8 y antireceptores $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.
 Apéndice A: Tablas y Figuras

TABLA III

ANTIGENO	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$
SOD	97.5	96.0	1.2	80.0	84.4	3.0
P 28	97.8	96.0	1.4	68.5	92.3	7.3
Fn 30-31	95.5	86.7	12.8	6.7	94.2	2.1
Gp 38	90.6	47.0	34.9	1.3	78.3	16.2
Gp 50-55	94.9	83.7	14.1	5.9	90.5	1.0
Basal	58.0	43.0	14.0	3.0	53.2	2.7

Determinación por FACS de los receptores de células T y de los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8 de las líneas celulares murinas inducidas por SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de ratones inmunizados con EPT de M. tuberculosis, así como los valores basales.

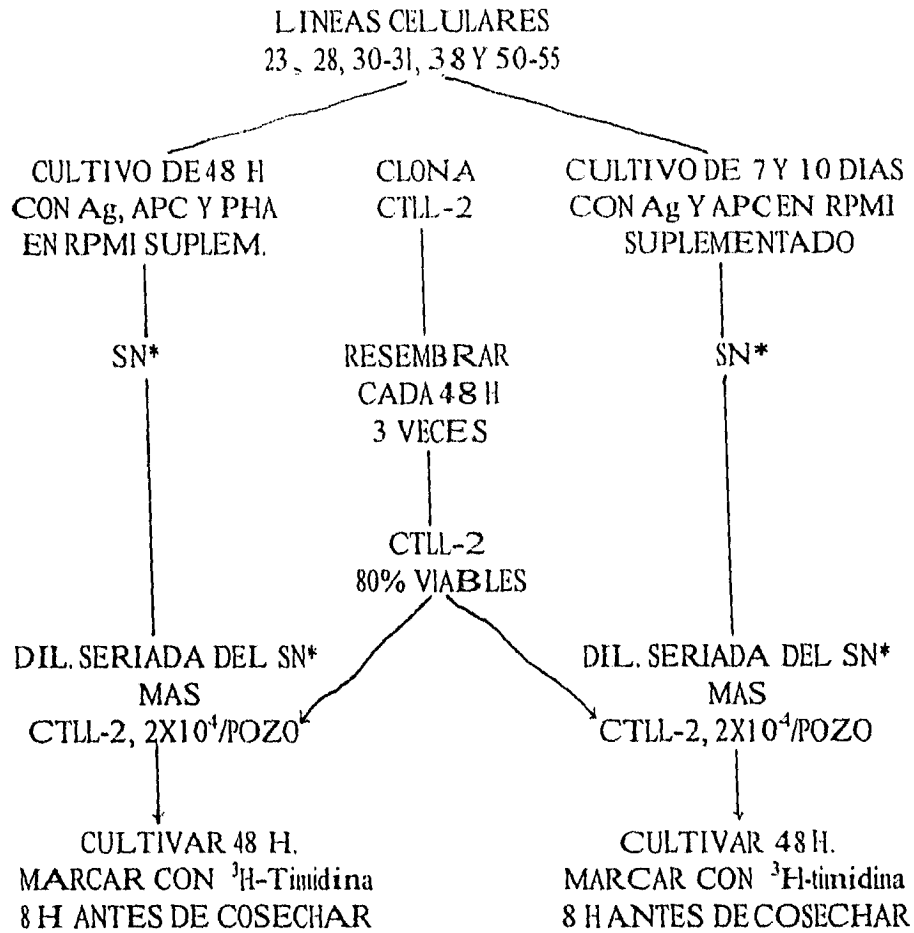


DIAGRAMA 3. Se muestran las vías que se siguieron en la determinación de IL-2 en los sobrenadantes (SN*) de las líneas celulares, utilizando una clona de células T dependientes de IL-2 (CTLL-2).

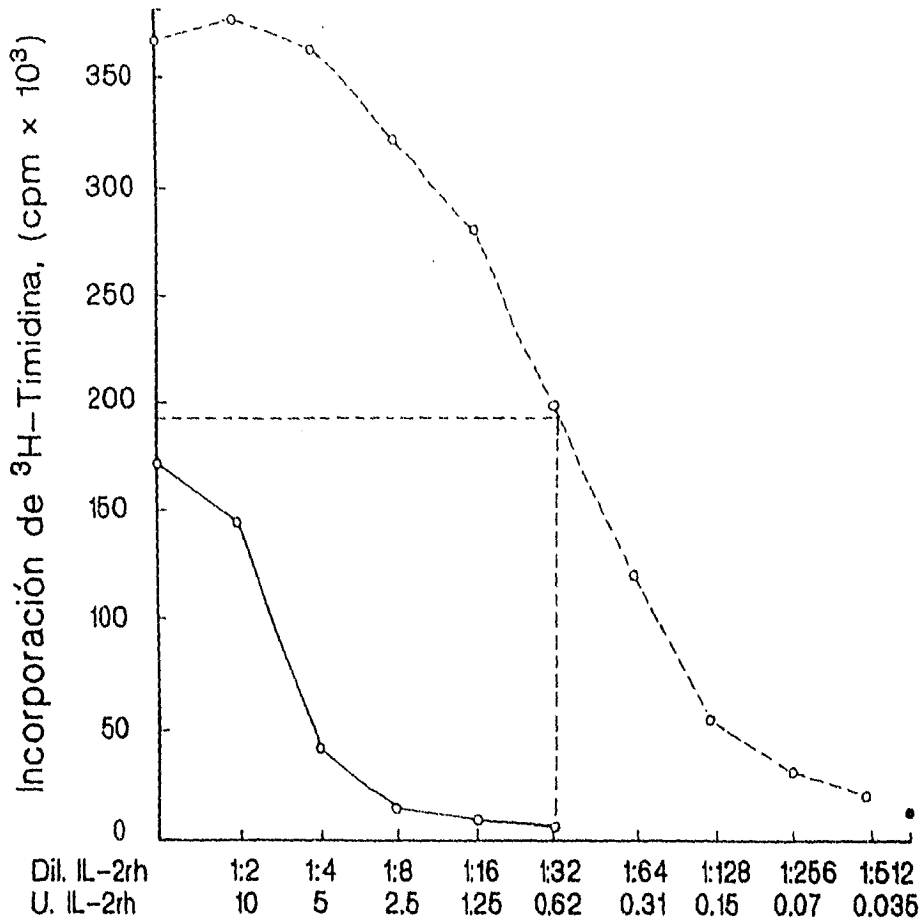


FIGURA 17. Curva estandar de IL-2 recombinante humana, IL-2rh(--○--), mostrando que la dilución 1:32 induce el 50% (1 U) de proliferación de la línea de células T dependiente de IL-2 (CTLL-2), 2×10^4 /pozo (-----). Se usó como control positivo un sobrenadante rico en IL-2h (—○—) a las mismas diluciones utilizadas para la IL-2rh. El control negativo es expresado por un pozo (·)

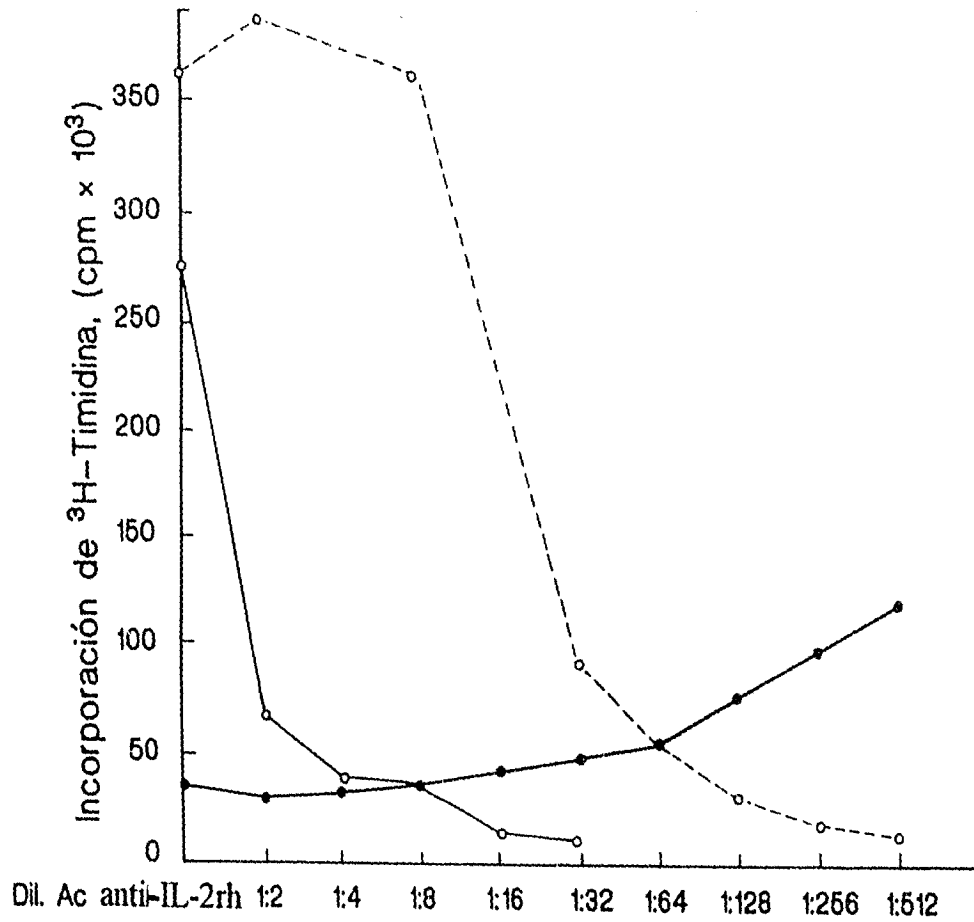


FIGURA 18. Curva de neutralización de la IL-2rh diluida 1:32/pozo con el anticuerpo monoclonal anti IL-2h (—●—), a las diluciones indicadas en el eje de las abscisas y utilizando la CTLL-2 (2×10^4 /pozo). Se muestra la curva estandar (---○---) y el control positivo que fue un sobrenadante rico en IL-2h (—○—). El control negativo es expresado por un pozo (·).

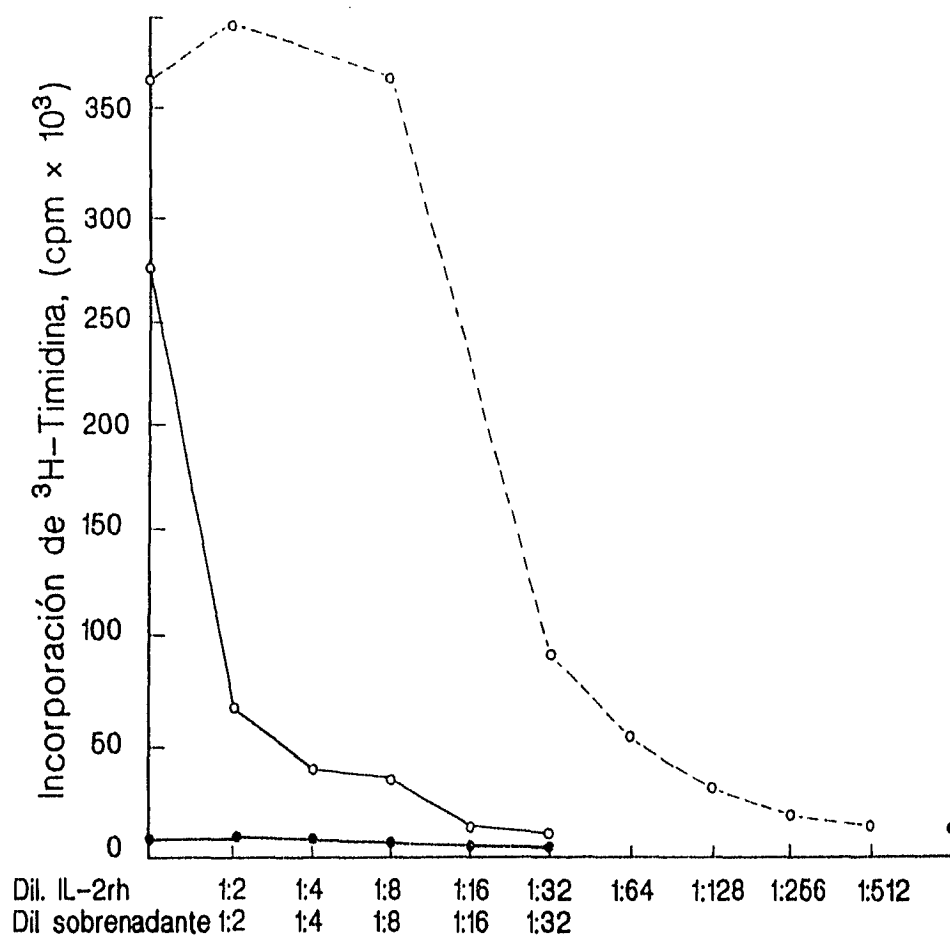


FIGURA 19. Respuesta blástica, *in vitro* de la CTLL-2 (2×10^4 /pozo) a los sobrenadantes de cultivos de 48 horas de las líneas celulares indicadas por SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 (—●—). Las diluciones de los sobrenadante fueron las mismas que se utilizaron para la curva estándar de la IL-2rh (---○---) Como control positivo se utilizó un sobrenadante rico en IL-2h (---○---) y el control negativo es expresado por un pozo (·).

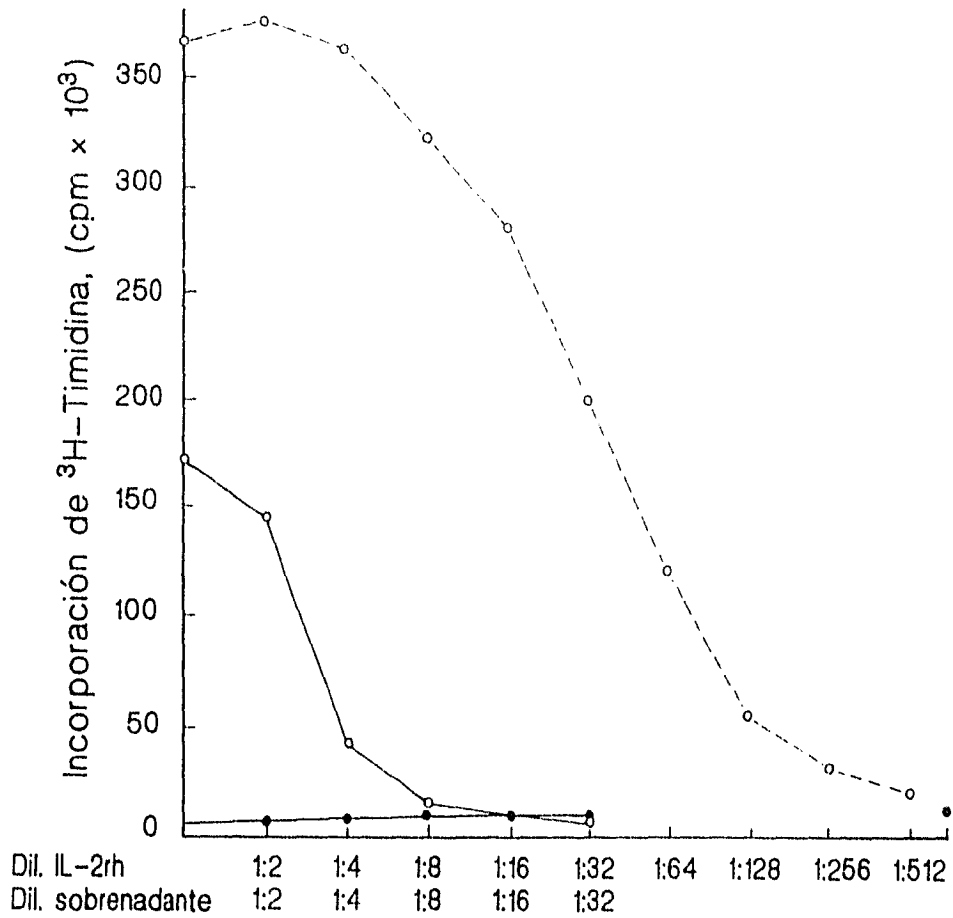


FIGURA 20. Respuesta blástica *in vitro* de la CTLL2 (2×10^4 /pozo) a los sobrenadantes de los cultivos de 7 y 10 días de las líneas celulares inducidas por SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 (—●—). Las diluciones de los sobrenadantes fueron las mismas que se utilizaron para la curva estándar de la IL-2rh (---○---). Se usó como control positivo un sobrenadante rico en IL-2h (---○---). El control negativo es expresado por un pozo (•).

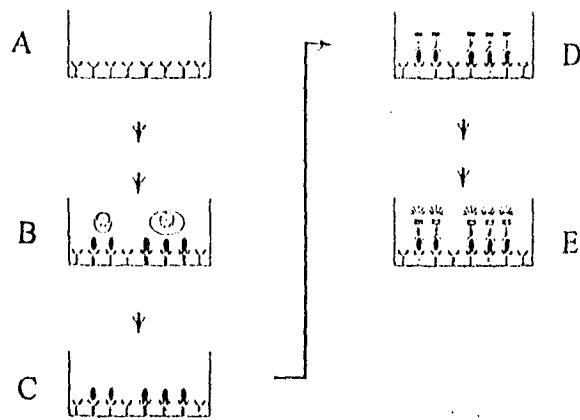


DIAGRAMA 4. Determinación de IL-2, IFN γ , IL-4 e IL-5 por ELISPOT. A, fondo del pozo de la placa sensibilizado con el anticuerpo monoclonal específico. B, cultivo de la línea celular y captura de la citocina por el anticuerpo monoclonal en el momento que es excitada por la célula. C, la línea celular es eliminada del pozo. D, la placa se incuba con el segundo anticuerpo específico. E, se adiciona el desarrollador de color.

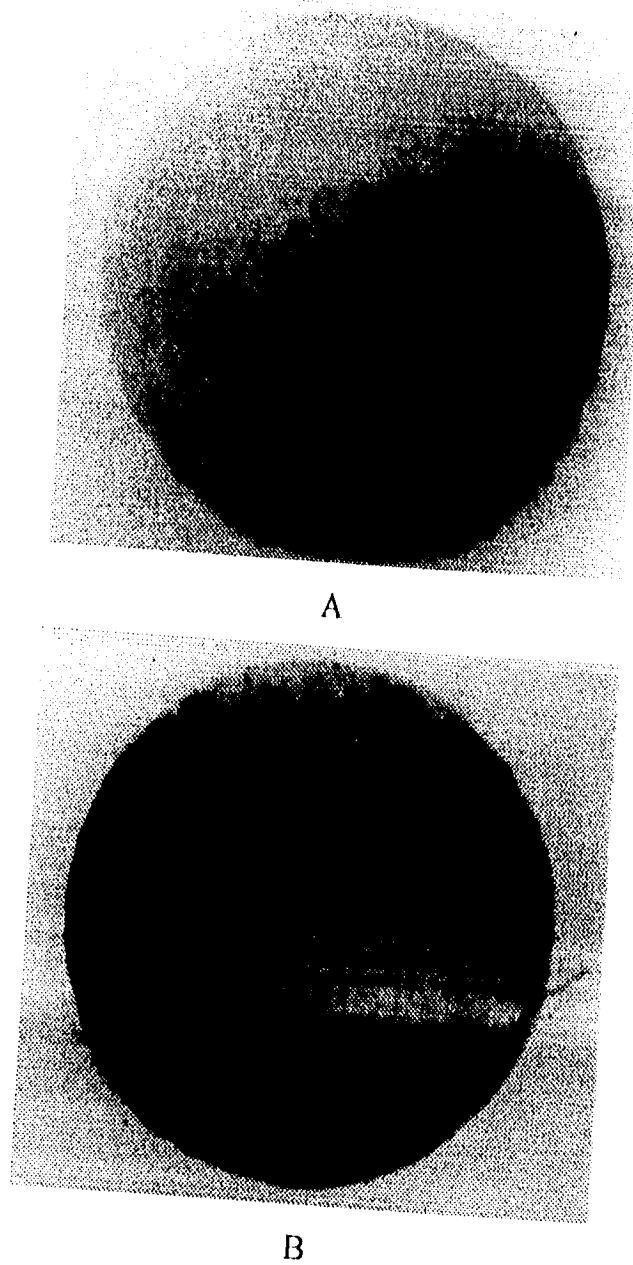


FIGURA 21. Se observan los puntos o "spots" obtenidos en el ensayo de ELISPOT, vistos con un microscopio de disección. A, negativo B, positivo.

TABLA IV

ANTIGENO	INDIVIDUO	IL-2	IL-4	IL-5	IFN γ
SOD	PPD+1	4	-	-	7
	PPD-2	11	-	-	13
	PPD+3	16	-	-	19
	PPD-4	23	-	-	25
P 28	PPD+1	5	-	-	8
	PPD-2	14	-	-	17
	PPD+3	17	-	-	23
	PPD-4	23	-	-	27
Fn 30-31	PPD+1	6	-	-	15
	PPD-2	20	-	-	25
	PPD+3	15	-	-	17
	PPD-4	28	-	-	32
Gp 38	PPD+1	11	-	-	16
	PPD-2	20	-	-	28
	PPD+3	12	-	-	15
	PPD-4	15	-	-	25
Basal	PPD+1	5	-	-	-
Basal	PPD-2	3	2	-	3
Basal	PPD+3	2	1	-	-
Basal	PPD-4	3	2	-	-

Número de células productoras de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ detectadas, *in vitro* por el ensayo de ELISPOT de las líneas celulares humanas (5×10^4 /pozo) inducidas por los antígenos SOD, P28, Fn 30-31 y Gp 38 de individuos sanos PPD+1 y PPD-2 (no vacunados) y PPD+3 y PPD-4 (vacunados). También se muestran los valores basales (CMNH no cultivadas).

Caracterización del Fenotipo y Citocinas de Linfocitos T

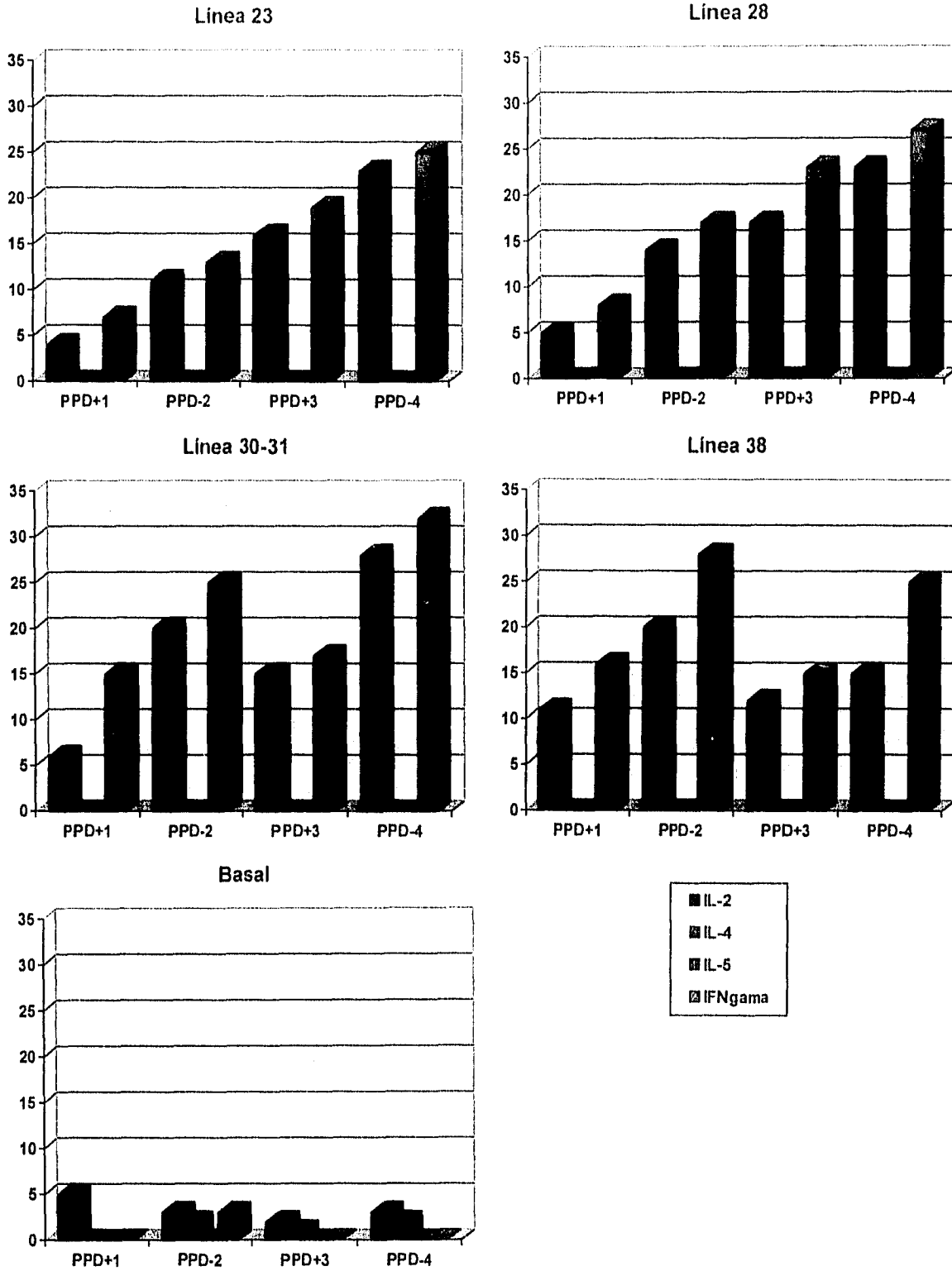


FIGURA 22. ELISPOT de líneas celulares de controles sanos para determinar IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ

TABLA V.

ANTIGENO	ENFERMO	IL-2	IL-4	IL-5	IFN γ
SOD	No. 1	3	3	-	5
	No. 2	3	-	-	7
	No. 3	4	3	-	4
	No. 4	5	-	-	5
P 28	No. 1	-	3	-	-
	No. 2	4	2	-	-
	No. 3	3	4	2	4
	No. 4	5	-	-	12
Fn 30-31	No. 1	3	-	2	-
	No. 2	-	4	3	2
	No. 3	11	-	-	14
	No. 4	14	-	-	14
Gp 38	No. 1	7	-	-	13
	No. 2	4	-	-	4
	No. 3	2	3	2	5
	No. 4	4	3	3	11
Gp 50-55	No. 1	5	4	-	14
	No. 2	5	-	-	5
	No. 3	7	-	-	9
	No. 4	3	4	3	5
Basal	No. 1	3	4	4	-
Basal	No. 2	-	4	4	-
Basal	No. 3	3	3	-	-
Basal	No. 4	2	4	3	-

Número de células productoras de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ detectadas, *in vitro* por el ensayo de ELISPOT de las líneas celulares humanas (5×10^4 /pozo), inducidas por los antígenos SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55, de los enfermos tuberculosos 1, 2, 3, y 4. También se muestran los valores basales (CMNH no cultivadas).

Caracterización del Fenotipo y Citocinas de Linfocitos T

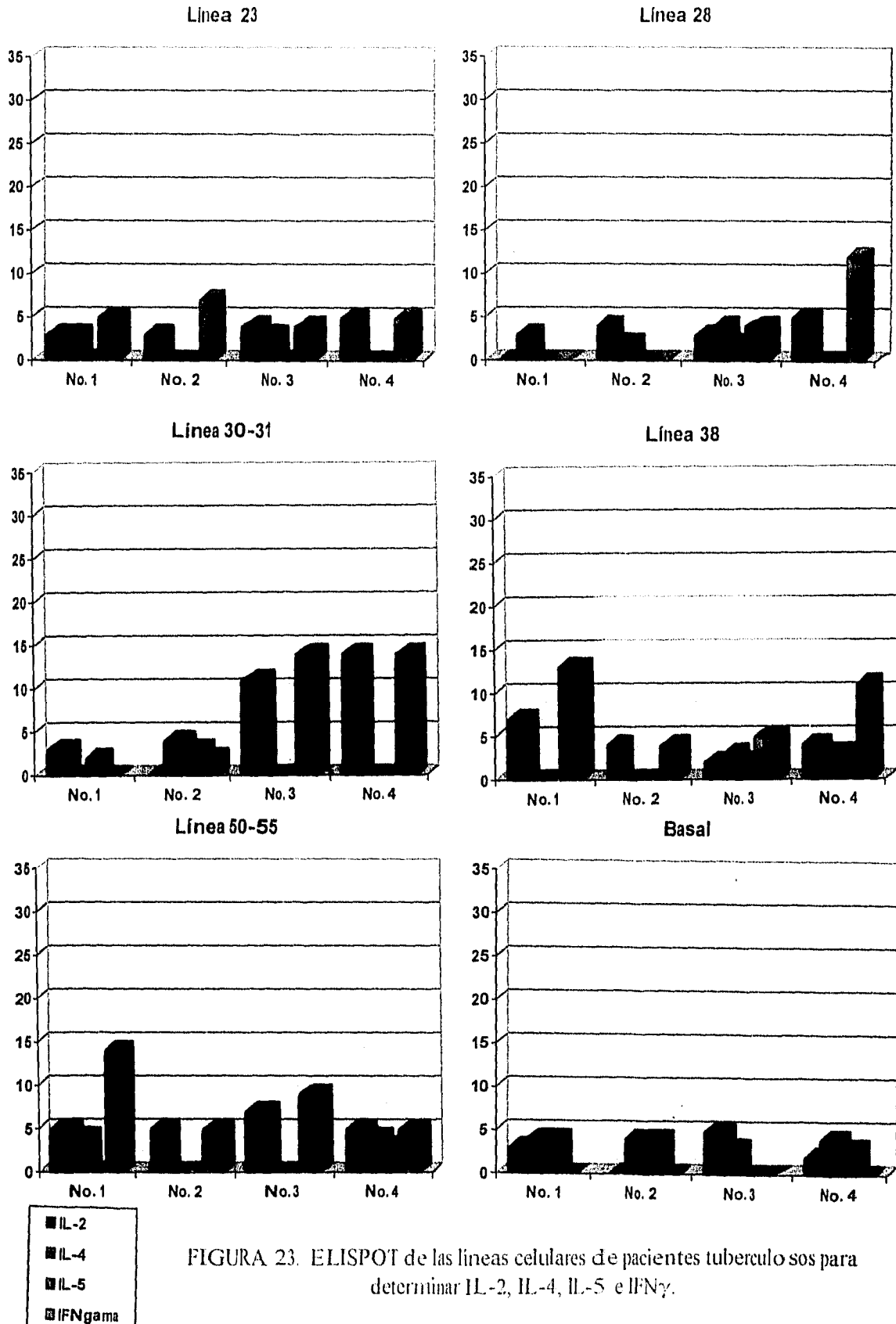


FIGURA 23. ELISPOT de las líneas celulares de pacientes tuberculosos para determinar IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ .

TABLA VI

ENFERMOS	Th1	Th2	Th0
No. 1	Gp 38	P 28	SOD, Fn 30-31, Gp 50-55
No. 2	SOD, P 28, Gp 50-55	-	P 28, Fn 30-31
No. 3	Fn 30-31, Gp 50-55	-	SOD, P 28, Gp 38
No. 4	SOD, P 28, Fn 30-31	-	Gp 38, Gp 50-55

Frecuencia de expresión de las subpoblaciones de células Th1, Th2 o Th0 inducidas por los antígenos SOD, P28, Fn 30-31, Gp38 y Gp 50-55 de pacientes tuberculosos.

TABLA VII

ANTIGENO	IL-2	IL-4	IL-5	IFN γ
SOD	16	3	-	4
P 28	4	5	2	3
Fn 30-31	7	6	4	60
Gp 38	5	-	-	-
Gp 50-55	-	4	2	2
Basal	4	-	-	-

Células productoras de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ detectadas, *in vitro* por ELISPOT de las líneas celulares murinas (5×10^4 /pozo), inducidas por SOD, P 28, Fn 30-31, Gp 38 y Gp 50-55 de ratones inmunizados con EPT de *M. tuberculosis*.

Apéndice B: Reactivos

REACTIVO 1.

Medio de cultivo PBY

ASPARAGINA	37.8 mM
KH ₂ PO ₄	36.0 mM
K ₂ SO ₄	2.8 mM
CITRATO DE SODIO	2.0 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.96 mM
GLICEROL	0.67 mM

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 5N. Aforar al volumen deseado y esterilizar en autoclave.

REACTIVO 2.

PBS (BUFFER DE FOSFATOS CON ALTA SAL), pH 7.4

Preparar las siguientes soluciones

- A) NaCl 0.15 M
- B) Na₂HPO₄ 0.15 M
- C) NaH₂PO₄ 0.15 M

Ajustar el pH de la solución B a 7.4 con la solución C.

A 900 ml de la solución A agregar 100 ml de la solución B ajustada.

Filtrar y esterilizar.

REACTIVO 3.

Método de lowry para determinar proteínas.

Preparar:

- A) TARTRATO DE SODIO 2%

B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2%

C) Na_2CO_3 en NaOH 0.1 N 2%

SOLUCION 1

Mezclar 0.5 ml de A + 0.5 ml de B y aforar a 50 ml con C.

SOLUCION 2

Mezclar 1 vol. de Folin-ciocalteu + 1 vol. de H_2O destilada.

SOLUCION 3

Albúmina sérica bovina (BSA), 1 mg/ml.

CURVA ESTANDAR DE PROTEINA (BSA 1 mg/ml).

Tubo	BSA μl	H_2O μl	Proteína $\mu\text{g/ml}$
1	-	1000	-Blanco
2	200	800	200
3	100	900	100
4	50	950	50
5	25	975	25
6	12.5	987.5	12.5

Agregar 4 ml de la solución 1, agitar, reposar 10 min.

Agregar 400 μl de la solución 2, agitar, reposar 30 min.

Leer en el espectrofotómetro la densidad óptica a 600 nm.

REACTIVO 4

Preparación de PAGE-SDS

GEL SEPARADOR al 10%

Acrilamida 30%-Bis-acrilamida 0.8% 10.00 ml

Tris-HCl, 1.5 M, pH 8.8 7.50 ml

H_2O destilada 11.65 ml

SDS al 10% 0.60 ml

Persulfato de amonio al 10 % 0.20 ml

Desgasificar durante 3 min.

Temed 0.02 ml

Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar unas gotas de isopropanol. Dejar polimerizar.

GEL CONCENTRADOR

Acilamida 30%-Bis-acilamida 0.8% 1.00 ml

Tris-HCl, 0.5 M, pH 6.8 2.50 ml

H₂O destilada 6.36 ml

SDS al 10% 0.10 ml

Persulfato de amonio al 10% 33.0 µl

Desgasificar por 3 min.

Temed 5.0 µl

Colocar el peine en la cámara y agregar el gel concentrados. Dejar polimerizar.

REACTIVO 5

TINCION CON AZUL DE COOMASIE PARA PAGE SDS.

Azul brillante de Coomasie 0.06%

Metanol 30.00%

Acido acético 10.00%

Se sumerge el gel en la solución teñidora por 4 horas.

Se destiñe sumerjiendo el gel en ácido acético al 10% y cambiándolo cuantas veces sea necesario para observar claramente las bandas de proteína.

REACTIVO 6

AMORTIGUADOR PARA CORRIDA DE PAGE-SDS.

Glicina	144.00 g
Tris-base	30.00 g
SDS	10.00 G

Aforar a un litro con agua destilada y filtrar.

REACTIVO 7

BUFFER DE TRANSFERENCIA, pH 8.35.

Tris-base	0.025 M
Glicina	0.193 M

En el momento de usarse prepara:

Buffer de transferencia	800 ml
Alcohol metílico	200 ml

Mezclar muy bien y usar.

REACTIVO 8

COCTEL PARA MUESTRAS

Tris-HCl, 0.5 M, pH 6.8	0.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Glicerol	1.0 ml
EDTA	7.4 mg
Agua destilada para aforar a	10.0 ml

pironina 1 granito

Preparar la muestra y dividirla en alícuotas de 1 ml

Antes de usar la alícuota agregarle 10 µl de 2-mercaptoetanol.

Mezclar volúmenes iguales de coctel y proteína problema. Hervir durante 5 min. en baño maría. Colocar las muestras en los pozos del gel y electroforetizar a 20 mA/gel para el gel concentrador y a 40 mA/gel para el gel separador.

REACTIVO 9.

DESARROLLADOR DE COLOR PARA INMUNOBLOT

PBS pH 7.4 50.00 ml

metanol 8.00 ml

H₂O₂ 30% 50 µl

4-cloro-1-naftol 30 mg disueltos en 2 ml de metanol.

La mezcla se prepara al momento de usarse y se agrega al inmunoblot, incubándolo hasta que el color de las bandas sea el deseado. Frenar la reacción lavando el blot con agua corriente.

REACTIVO 10

Acetato de sodio 4.0 M

REACTIVO 11

UREA 6 M

UREA 6 M

K₂HPO₄ 50 mM

KH₂PO₄ 50 mM

EDTA 20 mM

REACTIVO 12.

RPMI-HEPES, suplementado con:

Aminoácidos no esenciales	0.1mM
Piruvato de sodio	1.0 mM
2-mercaptoetano	0.5 mM
Penicilina-estreptomicina	50 U/ml
Suero fetal bovino	10%

Apéndice C: Abreviaturas

APC	Células presentadoras de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
CEM	Células esplénicas murinas
CMNH	Células mononucleares humanas de sangre periférica
DTH	Hipersensibilidad retardada
ELISPOT	Ensayo de ELISA por "spots"
EPT	Extracto proteínico total
FACS	Clasificación de células marcadas con fluoresceína
Fn 30-31	Proteína de 30-31 que se une a fibronectina
Gp	Glicoproteína
H2	Complejo de Histocompatibilidad Mayor en ratón
MHC	Complejo de Histocompatibilidad Mayor en humano
Lt	Linfotoxina
LT	Linfocitos T
LB	Linfocitos B
MO	Macrófago
PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida
PHA	Fitohemaglutinina
PBS	Buffer de fosfatos con alta sal
PBY	Medio de cultivo de Proskauer y Beck modificado por Youmans
PPD	Derivado Proteínico Purificado de <u>M. tuberculosis</u>
SOD	Superóxido Dismutasa.

Referencias.

Abelsira-Amar, O., Jankovic, D. L. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 148 : 3820-3829. 1992.

Abou-Zeid, C., Smith, I., Rook, G. A. W. The secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis and their relationship to those recognized by the available antibodies. *J. of General Microbiology.* 134: 531-538. 1988.

American Thoracic Society Centers for Disease Control. Diagnostic standard and classification of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 725-735. 1990.

Andersen, P., Askagaard, D., Ljungqvist, L. Bentzon, M., Heron, I. T-cell proliferative response to antigens secreted by Mycobacterium tuberculosis Infection and Immunity. 59:1558-1563. 1991.

Andersen, P., Heron, I. Specificity of a protective memory immune response against Mycobacterium tuberculosis Infection and Immunity. 61: 844-851. 1993.

Andersen, P. Effective vaccination of mice against M. tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. and Immunity.* 62: 2536-2544. 1994.

Appelberg, R., Orme, I. M., De Sousa, M. I. P., Silva, M. T. *In vitro* effects of interleukin-4 on interferon-gamma-induced macrophage activation. *Immunology* 76: 553. 1992.

Armstrong, J. A., Hart, P. D., Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes and phagosomes. *J. Exp. Med.* 134: 713-740. 1971.

Armstrong, J. A., Hart, P. D. Phagosome-lysosome interaction in cultured macrophages infected with virulent tubercule bacilli: reversal of the usual nonfusion pattern and observation on bacterial survival. *J. Exp. Med.* 142: 1-16. 1975.

- Aslanzadeh, J., Brown, E. J., Ratliff, T. L. Characterization of soluble fibronectin binding to bacille Calmette-Guérin. *J. of General Microbiology*. 135: 2735-2741. 1989.
- Barnes, P. F., Grisso, C. L., Abrams, J. S., Band, J. Rea, T. H. Modlin, R.L. $\gamma\delta$ T lymphocytes in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 165:506-512. 1992.
- Barnes, P. F., Abrams, J. S., Modlin, R. L. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infection and Immunity*. 61: 197-203. 1993.
- Barnes, P. F., Mehra, V., Brennan, P. J., Modlin, R. L. Characterization of T-cell antigens associated with protein-peptidoglycan complex of M. tuberculosis *J. Immunol.* 143: 2656-2662. 1989.
- Beauchamp, Ch., Fridovich, I. Superoxide Dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287. 1971.
- Binz, H. and Wigzell. Shared idiotype determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. I. Demonstration of similar or identical idiotypes on IgG molecules and T cell receptors with specificity for the same alloantigens. *J. Exp. Med.* 142: 197. 1975.
- Bloom, B. R., Murray C. J. R. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science*. 257: 1055-1064. 1992.
- Boesen, H., Jensen, B., Wilcke, T., Andersen, P. Human T-cell response to secreted antigen fractions of Mycobacterium tuberculosis *Infection and Immunity* 63: 1491-1497. 1995.
- Boom, W. H., Wallis, R. S., Chervenak, K. A. Human M. tuberculosis - reactive CD4+ T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 59: 2737-2743. 1991.
- Born, W., Happ, M. P., Dallas, A. Recognition of heat shock proteins and gamma delta cell function. *Immunol Today*. 11: 40-43. 1990.

- Bothamley, G. H., Rudo, R., Festeinstein, F., Ivanyi, J. Clinical value of measurement of Mycobacterium tuberculosis specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Torax*. 47: 270. 1992.
- Boyum. Ficoll-Hypaque methods for separating mononuclear cells from human blood *Clin Lab. Invest* 21 (Suppl 97), 1.
- Britton, W. J., Roche, P. W., Winter, N. Mechanism of persistence of Mycobacteria. *Trends in Microbiology*. 2: 284-288. 1994.
- Burford-Foggs, A., Sambol, S., Pope, R. Mechanism of T-cell activation by mycobacterial antigen in inflammatory synovitis. *Scand. J. Immunol.* 33: 253-260. 1991.
- Canetti, G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. New York. Springer, 1955.
- Carr, R. I. Chakraborti, A. K. Brunda, J. J. et. al. Immune complexes and antibodies to BCG sera from patients with mycobacterial infections. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 562-569. 1980.
- Chandler, P., Frater, A., Douek, D., Viney, J., Kay, g., Owen, M., Hayday, a., Simpson, E., Altmann, D. Immune responsiveness in mutant mice lacking T-cell receptor $\alpha\beta$ + cells. *J. Immunol.* 85: 531-537. 1995.
- Cher, D. J., Mosmann, T. R. Two types of murine helper T cell clone. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones *J. Immunol.* 138: 3688-3694. 1987.
- Cherwinski, H. M., Schumacher, J. H., Mosmann, T. R. Two types of mouse helper T cell clone. *J. Exp. Med.* 166: 1229-1244. 1987.
- Clerici, M., Shearer, M. a Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunology Today*. 14: 107-111. 1993.
- Cooper, A. M., Flinn, J. L. The protective immune response to M. tuberculosis. *Immunology*, 7: 512-516. 1995.
- Czerkinsky, C.C. Tarkowski, A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunological Methods* 65: 109-121. 1983.

Dannenberg, A. M. Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 11: 5369-5378. 1989.

Dannenberg, A. M. J. Controlling tuberculosis. The pathologist's point of view. *Res. Microbiol.* 141: 192-263. 1990.

Dannenberg, A. M. J. Delayed-Type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today.* 12: 228-232. 1991.

Decker, T., Lew, D., Mirkovitch, J., Darnell, J. Jr. Cytoplasmic activation of GAF an IFN γ -regulated DNA-binding factor. Oxford University Press. 927-931. 1992.

Del Prete, G., De Carlo, M., Ricci, M., Romagnani, S. Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T-cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *J. Exp. Med.* 174: 809-813. 1991.

Del Prete, G. F., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Romagnani, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150: 353-360. 1993.

Del Prete, G.F., Romagnani, S. Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigens of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile cytokine production. *J. Clin. Invest.* 88: 346. 1991.

Dinarello, C. A., Mier, J. Current concepts. Lymphokines. *The New England Journal of Medicine.* Oct 8: 940-944. 1987.

Dubos, R., Dubos, E. *The White Plague.* Boston. Little, Brown. 1952.

Durum, S. K., Oppenheim, J. Macrophage-derived mediators: IL-1, Tumor Necrosis Factor, IL-6, Interferon and related cytokines. *Fundamental Immunology.* Second Edition Raven Press Ltd., New York. 1989.

Edwards, D., Kirkpatrick, C. H. The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 1062-1071. 1986.

- ElGhazali, G. E., Troye-Blomberg, M. Number of IL-4- and IFN γ -secreting human T cells reactive with tetanus toxoid and the mycobacterial antigen PPD or phytohemagglutinin: distinct response profiles depending on the type of antigen used for activation. *Eur. J. Immunol.* 23: 2740-2745. 1993.
- Espitia, C., Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *M. tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 37: 378. 1989.
- Fine, P. M. E. The BCG story: Lessons from the past and implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* 11(s-2): s353. 1989.
- Finkelman, F., Katona, I., Mosmann, T., Coffman, R. IFN γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunology* 140: 1022-1027. 1988.
- Firestein, G. S., Glasebrook, A. L. A new murine CD4⁺ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 143: 518-525. 1989.
- Fischl, M. A., Daikos, J. L., Uttamchandani, R. B. Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multiple-drug-resistant bacilli. *Ann. Intern Med.* 117: 184-190. 1992.
- Fleming, D. O., Richardson, J. H., Tulis, J. J., Vesley, D. (Eds). *Laboratory safety principles and practices*. 2nd edition. ASM Press. Washington, D. C., 1995.
- Flesch, I. E. A., Kaufmann, S. H. E. Attempts to characterize the mechanism involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect. Immunol.* 56: 1464-1469. 1988.
- Florentino, D. F., Bond, M. W., Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081-2095. 1989.
- Florentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 147: 3815-3822. 1991.

- Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Triebold, K. J., Koller, B., Bloom, B. R. Major compatibility complex class I-restricted T cell are required for resistance to M. tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci* 89: 12013-12017. 1992
- Flynn, J. A., Goldstein, M., Triebold, K., Sypek, J., Wolf, S., Bloom, B. R. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to M. tuberculosis infection. *J. Immunol.* 155: 2515-2524. 1995.
- Gajewski, T. F., Fitch, F. W.. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J. Immunol.* 146: 1750-1758. 1991.
- Goren, M. B., Immunoreactive substances of mycobacteria. *Am.Rev. Respir. Dis.* 125:50-69. 1982
- Grange, J. M., Bishop, P. J. A tribute to Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus. *Tubercle* 63:3. 1982.
- Griffin, J., Orme, I., Evolution of CD4 T-cell subsets following infection of naive and memory immune mice with Mycobacterium tuberculosis *Infection and Immunity.* 62: 1683-1690. 1994.
- Haanen, J. B., Malefijt, R. de W., Pieter, C. M. Kraakman, E. M., Ottenhoff, T. H., de Vries, R. R., Spits, H. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. *J. Exp. Med.* 174: 583-592. 1991.
- Harris, D. P., Vordermeier, H. M., Friscia, G., Roman, E., Surcel, H., Paslov, G., Moreno, C. Ivanyi, J. Genetically permissive recognition adjacent epitopes from the 19 kD antigen of M. tuberculosis by human and murine T cell. *J. Immunol.* 150: 5041-5050. 1993.
- Haslov, K., Benson, W. Comparison of the immunological activity of five defined antigena from M. tuberculosis in seven inbred guinea pig strains the 38 kDa antigen is immunodominant. *Scand J. Immunol.* 31: 503. 1990.
- Havlic, D. H., Wallis R. S., Boom, H., Daniel, T., Chervenak, K., Ellner, J. Human immune response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Infection and Immunity.* 59: 665-670. 1991.

- Howard, M., O'Garra, A. Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today* 13: 198-200. 1992.
- Ihle, J., Keller, J., Henderson, L., Klein, F., Plasziynski, E. Procedures for the Purification of interleukin 3 to homogeneity. *J. Immunol.* 129: 2431-2435. 1982.
- Jacket, P., Bothamley, G., Batra, H., Mistry, A., Young, D., Ivanyi, J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiology.* 26: 2313-2318.
- Janis, E. M., Kaufmann, S. H., Schwartz, R. H., Pardoll, D. M. Activation of $\gamma\delta$ T cell in the primary immune response to M. tuberculosis. *Science* 244: 2754-62. 1989.
- Johnson, N. M., McNichol, M. W. Burton-Kei, E. J. Circulating immune complexes in tuberculosis. *Torax.* 36: 610-617. 1981.
- Jones, G. S., Amirault, H. J., Andersen, B. R. Killing of M. tuberculosis by neutrophils: A nonoxidative process. *J. Infect. Dis.* 162: 700-704. 1990.
- Kabilan, L., Andersson, G., Lolli, F., Ekre, H-P., Olsson, T., Troye-Blomberg, M. Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 20: 1085. 1990.
- Kappler, J. W., Skidmore, B., White, J., Marrack, P. Antigen inducible H-2 restricted. Interleukin-2 producing T cell hibridomas. *J. Exp. Med.* 153: 1198- 1214. 1981.
- Kaufmann, S. H. E. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunology Today.* 16: 338-342. 1995.
- Kelso, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost. *Immunology Today* 16: 374-379. 1995.
- Kühn, R., Rajewisky, K., Müller, W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* 254: 707-710. 1991.
- Kumararatne, D., Pithie, A., Drysdale, P., Gaston, J., Kiessling, R., Iles, P., Wise, R. Specific lysis of mycobacterial antigen-bearing by class II MHC-

restricted polyclonal T cell lines in healthy donors or patients with tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 80: 314-323. 1990

Kusunose, E., Ichihara, K., Noda, Y., Kusunose, M. Superoxide Dismutase from Mycobacterium tuberculosis. *J. Biochem.* 80: 1343-1352. 1976.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 280-285. 1970.

Lowry, H., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193: 265-275. 1951.

Mackanness, G. B., The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits. *American Review of Tuberculosis.* 69: 495-504. 1954.

Maggi, E., Romagnani, S. Reciprocal regulatory effects of IFN γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* 148: 2142-2147. 1992.

May, J. J., Katilus, J., Henson, P. M. The purification and identification of circulating immune complexes in tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: 920-925. 1983.

Méndez-Samperio, P., González-García, L., Pineda-Fragoso, P., Ramos-Sanchez, E. Specificity of cells in human resistance to M. tuberculosis infection. *Celular Immunology.* 162: 194-201. 1995.

Mosley, B., et al. *Cell* 59:335. 1989

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W. Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The J. Immunol* 136: 2348-2357. 1986.

Muller, D., Pakpreo, P., Filla, J., Pederson, K., Cigel, F., Malfovska. Increased Gamma-Delta T-lymphocytes response to M. bovis BCG in major Histocompatibility Complex Class I-deficient mice. *Infection and Immunity.* 63: 2361-2366. 1995.

Murata, Y., et al. *J. Exp. Med.* 175: 825. 1992.

Murray, C. J. L., Styblo, K., Rouillon, A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull WHO*. 65, 6. 1990.

Myrvik, Q. N., Leake, E. S., Wright, M. J. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37 Rv strain of Mycobacterium tuberculosis: A correlate of virulence. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 322-328. 1984.

Nathan, C. F., Rubin, B. Y. Identification of IFN γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158: 670-689. 1983.

Nelson, D. L., et al. *J. Clin. Immunol.* 6: 114. 1986.

O'Garra, A., Umland, S., De France, T., Chistiansen, J. B-cell factors are pleiotropic. *Immunology Today.* 9: 45-54. 1988.

Ohara, J., Paul, W. E. Production of a monoclonal antibody to and molecular characterization of B-cell stimulatory factor-1. *Nature* 315: 333-336. 1985.

Onwubalili, J. K., Scott, G. M., Robinson, J. A. Deficient immune interferon production in tuberculosis. *Cli. Exp. Immunol.* 59. 405-413. 1985.

Orme, I. M. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 138: 293-298. 1987.

Orme, I. M. Characteristic and specificity of acquired immunologic memory to M. tuberculosis. *J. Immunol.* 140: 3589-3593. 1988

Orme, I. M., Miller, E. S., Roberts, A. D., Furney S. K., Griffin J.P., Dobos, R. M., Brennan, P. J. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of M. tuberculosis infection. *J. Immunol.* 148: 129. 1992.

Orme, I. M., Roberts, A. D. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of M. tuberculosis. *J. Immunol.* 148: 189-196. 1992

- Orme, I. M., Boom, W. H. T cell response to Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Dis* 167: 1481-1497. 1993.
- O'Brien, R., Born W. K. Stimulation of a major subset lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from M. tuberculosis. *Cell* 57: 667-674. 1989.
- Pierre, C., Lecossier, D., Boussougant, Y., Bocart, D. Joly, V., Yeni, P., Hance, A. J. Use of a protocol improves sensitivity of detection of M. tuberculosis in clinical samples by amplification of DNA. *J. Clin. Microbiology*. 29: 712-717. 1991.
- Reggiardo, Z., Middlerok, G. Failure of pasive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 145: 173-175. 1974.
- Romain, F., Laqueyrie, A., Marchal, G. Identification of a M. bovis BCG 45/47 kDa antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infection and Immunity*. 61: 742-750. 1993.
- Rook, G. A., Al Attiyah, R., Foley, N. The role of cytokines in the immunopathology of tuberculosis and the regulation agalactosyl IgG. *Lymphokine Res*, 8: 323. 1989.
- Salgame, P., Clayberger, C. Modlin, R. L., Bloom, B. R. Differing lymphokine profile of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254: 279-82. 1991.
- Sander, B., Skansen-Saphir U., Damm, O., Hakansson, L., Andersson, J., Andersson, U. Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus Camette-Guérin. *Immunology*, 86:512-518. 1995.
- Scott, P., Kaufmann, S. H. E. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunology Today*. 12: 346-348. 1991.
- Seibert, F. B. Isolation of three diferent proteins and two polysacharides from tuberculin by alcohol fractions their chemical and biological propieretes *Am. Rev. Tuberc.* 59: 86-101. 1949.

- Shribman, J. H., Eastwood, J. B., Uff, J. Immune complex nephritis complicating miliary tuberculosis. *Br med. J.* 287: 1593-1594. 1983.
- Sifford, M., Bates, H. Host determinants of susceptibility to Mycobacterium tuberculosis *Semin. Respir. Infect.* 6: 44-50. 1991.
- Snider, D. E. Jr., Introduction. *Rev. Infect. Dis.* 11(suppl): S336-8. 1989.
- Silva, C. L., Silva, M. F., Pietro, R. C., Lowrie, D. B. Protection against tuberculosis by passive transfer with T cell clones recognizing micobacterial heat-shock protein 65. *Immunology*, 83: 341-346. 1994.
- Steele, J. H., Ranney A. F., Animal tuberculosis. *American Review of tuberculosis.* 77: 908. 1958.
- Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M. Fernandez-Botran, R. Coffman, R. L., Mosmann, T. R., Vitteta, E. S.. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 334: 255-258. 1988.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L.A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J.F. Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snaper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs Jr. W. R. Bloom, B. R. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature.* 351: 456-460. 1991.
- Street, N., Schumacher, J. H., Fong, A. T., Bass, H., Florentino, D. F., Leverah, J. A., Mosmann, T. R. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J. Immunol.* 144: 1629-1639. 1990.
- Surcel, H. M., Troye-Blomberg, M., Paulie, S., Anderson, G., Moreno, C., Pasvol, G., Ivanyi, J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology.* 81: 171-176. 1994.
- Sussman, G., Wade, A. A. Production of a suppressor factor by CD8+ lymphocytes activated by mycobacterial components. *Infection and Immunity.* 59: 2828-2835. 1991.
- Tada, T., Toshitada T., Okumura, K., Nonaka, M. and Tokuhisa, T. Two distinct types of helper T cell involved in the secondary antibody response:

Independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *The J. Exp. Med.* 147: 446-458. 1978.

Taguchi, T., Coffman, R. L., Kiyono, H. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN γ and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J. Immunol. Methods* 128: 65. 1990

Theofilopoulos, A. N., The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology Today*. 2: 90-98. 1995.

Theofilopoulos, A. N., The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunology Today*. 16: 150-158.

Toossi, Z., Kleinhenz, M. E., Ellner, J. J. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J. Exp. Med.* 163: 1162-1172. 1986.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354. 1979.

Tsicopoulos, A., Hamid, Q., Varney, V., Ying, S., Moqhel, R., Durham, S. R., Kay, A. B. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN γ , IL-2) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J. Immunol.* 148:2058-2061. 1992.

Uberoi, S., Malaviya, A. N., Chattopadhyay, C. Secondary immunodeficiency in millitary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 22: 404-408. 1975.

Vordermeier, H. M., Ivanyi, J. Identification of T cell stimulatory peptides from the 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 147: 1023-1029. 1991.

Vordermeier, H. M., Harris, D.P., Friscia, G. Roman, E., Surcel, H-M., 1991. Moreno, C., Pasvol, G., Ivanyi, J. T cell repertoire in tuberculosis selective anergy to an immunodominant epitope of the 38 kDa antigen in patients with active disease. *Eur. J. Immunol.* 22: 2631. 1992.

Wadee, A. A., Boting, L., Reddy, G. Antigen capture assay for detection of a 43 kilodalton Mycobacterium tuberculosis antigen. *J. Clin. Microbiology*. 28: 2786-2791. 1990.

Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M., Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein R., Yssel, H., Vries. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression *J. Exp. Med.* 174: 915-924. 1991.

Willet, H. P., *Mycobacteria* in Zinsser Microbiology. Joecklik, W. R., et al. editors 20 th ed. Appleton & Lange. USA. 1992.

Youmans, G. P. *J. Bacteriol.* 51: 703. 1949.

Young, D. B., Kaufmann, S. H., Thole, J. E. Micro review. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol. Microbiol.* 6: 133-145. 1992.

Zhang, M., Lin, Y., Iyer, D., Gong, J., Abrams, J., Barnes P. F. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis *Infectium and Immunity.* 63: 3231-3234. 1995.