

03062
29.5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
U.A.C.P. y P. del C.C.M.**

**COINTERNALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE
DE MACROFAGOS COMO MECANISMO DEFENSIVO DE
M. tuberculosis**

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica

p r e s e n t a

Q. F. B. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS QUE PARA SUSTENTAR EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTI-
GACION BIOMEDICA BASICA PRESENTA EL Q.F.B. EDUARDO AL-
BERTO GARCIA ZEPEDA

SEPTIEMBRE 1987

INDICE

I) INTRODUCCION

II) ANTECEDENTES

1) Tuberculosis

- a) Aspectos generales
- b) Respuesta Inmune
- c) Patología
- d) Perspectivas

2) Endocitosis

- a) Generalidades
- b) Pinocitosis
- c) Fagocitosis
- d) Endocitosis mediada por receptores

III) EXPERIMENTAL

a) Material y reactivos

b) Metodología

1) Cultivo Celular

2) Preparación del extracto proteico de un filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

3) Cultivo de *M. tuberculosis*

4) Producción de suero hiperinmune contra *M. tuberculosis*

5) Ensayo de fagocitosis de *M. tuberculosis*

- 4) Endocitosis de extracto proteico obtenido de cultivo de M. tuberculosis
- 7) Ensayo de fagocitosis de partículas latex
- 8) Ensayo de fagocitosis de Escherichia coli
- 9) Marcaje radiactivo de las proteínas de superficie con I¹²⁵
- 10) Solubilización de proteínas con NP-40
- 11) Detección de la radiactividad (cpm) de las proteínas marcadas con I¹²⁵
- 12) Determinación de la concentración de proteínas por el método de Peterson
- 13) Electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
- 14) Electrotransferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa
- 15) Purificación de IgG anti-M. tuberculosis mediante cromatografía de afinidad con Proteína-A sefarosa
- 16) Marcaje de anticuerpos con fluorocromos
- 17) Microscopía de Fluorescencia.

IV) RESULTADOS

V) DISCUSION DE RESULTADOS

VI) CONCLUSIONES

VII) APENDICE

VIII) BIBLIOGRAFIA

I) INTRODUCCION

La tarea que hemos estado desarrollando al cabo de unos años, surge del poco entendimiento que se tiene del efecto que producen las micobacterias durante su interacción a nivel de superficie externa con las células fagocíticas. Este tipo de interacción se ve regido por la naturaleza misma de las superficies. Esto es, el contacto entre una superficie muy hidrofóbica, la de la micobacteria, y otra que es la de las células fagocíticas mononucleares, cuya membrana externa se encuentra formada principalmente de proteínas y lípidos. Se reporta que el macrófago tendrá mayor afinidad hacia partículas cuya hidrofobicidad superficial, dada principalmente por la constitución de su membrana, sea mayor que la propia (1). Así, hay la sugerencia del porque de la afinidad tan grande entre el macrófago hacia las micobacterias, independientemente del proceso fagocítico natural que lleva a cabo el macrófago a través de receptores especializados.

Una de las rutas posibles para poder lograr obtener información sobre este tipo de interacción ha sido monitorear las proteínas que se encuentran en la superficie del macrófago durante el proceso de fagocitosis. Así, uno de los objetivos que nos marcamos en este trabajo fue el determinar como afecta la fagocitosis de una micobacteria a la dinámica de la membrana plasmática y al tráfico intracelular de las proteínas que forman a la misma. Esta dinámica la hemos seguido a través del monitoreo de las cinéticas de cointernalización y reciclaje de las proteínas que se hallan accesibles en la membrana plasmática y que pueden ser detectables a través del marcaje radiactivo con 125 I.

Se propuso determinar cual es el efecto que pudiera tener la virulencia de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* respecto de la cepa no virulenta, sobre la dinámica de la membrana externa de las células fagocíticas mononucleares. Esta dinámica se siguió a través de las cinéticas de cointernalización y reciclaje de las proteínas que la forman. Se comparó la actividad de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* clasificada como H37 Rv (2), con los efectos producidos por la cepa avirulenta de *M. tuberculosis*, que se clasifica como H37 Ra.

Este efecto podría ser visto a un nivel de interacción membranar, sin embargo también podría ser que la liberación de factores solubles afectaran estas cinéticas. Anteriormente, en nuestro laboratorio se observaron diferentes efectos de los antígenos solubles sobre la actividad de las células fagocíticas, entre ellos, la morfología de las células que han pinocitado estos antígenos. Se buscó entonces algún tipo de efecto a nivel de membranas celulares o en la dinámica de las proteínas que forman a las membranas de estas células fagocíticas. Los efectos resultantes en la modificación de

las cinéticas de cointernalización de proteínas de membrana probablemente sean parte de una estrategia bien establecida por la bacteria, para evadir la respuesta del sistema inmune ya sea eliminándola o regulándola.

Para comprobar estas hipótesis, se propuso determinar que efecto tienen los antígenos micobacterianos solubles, en la dinámica celular a través de la evaluación de las cinéticas de cointernalización de proteínas que participan en la endocitosis de estos antígenos.

La integridad de una pared celular es muy importante cuando se lleva a cabo una fagocitosis mediada por proteínas de superficie externa. El comportamiento de los microorganismos depende de la integridad de sus paredes. Si se daña su pared por medios físicos, como calor o se cubren los sitios de enlace en sus superficies con anticuerpos, policlonales o monoclonales, los microorganismos muestran una capacidad menor para prevenir la formación de fagolisosomas, sugiriendo que el fenómeno depende de la actividad metabólica y de las características superficiales del parásito intacto y vivo. Además pudieran ser cierto tipo de antígenos o proteínas las que regularan esta interacción y que solamente pudieran estar presentes en bacterias metabólicamente activas o con pared intacta. Entonces se trató de determinar el posible efecto de bacterias viables y metabólicamente activas, y compararlo con lo que podría ocurrir si ensayáramos con bacterias muertas.

Otro de los objetivos que nos interesaba llevar a cabo es el de determinar si las cinéticas de entrada estaban influenciadas por el tipo de vía que se usara para esto, o sea, si fuera a través de receptores específicos tales como los inmunológicos, receptor para la fracción Fc y C3b, o mediante receptores no especializados, tales como cierto tipo de glicoproteínas (3). Esto también podría tener un efecto directo sobre la ruta que han de seguir internamente las proteínas que se han co-internalizado (4).

Plantamos por lo tanto determinar el efecto de la opsonización de las bacterias en la entrada de éstas, y en las cinéticas de cointernalización y reciclaje de proteínas involucradas en este proceso.

Cuando se habla de procesamiento antigénico, sin duda tendremos que pensar en un proceso regulatorio inmunológico donde el macrófago juega el papel preponderante. El tipo de procesamiento intracelular que se desarrolle con las bacterias completas o sus antígenos, será importante en el proceso de regulación inmune, cuando tengan contacto célula-célula con linfocitos, tipo B o T. La particularidad que tengan estos antígenos al tener mayor o menor afinidad por la membrana del macrófago, además de la posibilidad de evitar la degradación intracelular es igual de importante en el tipo de interacción que se desarrolla en este sistema, por lo que se trató de caracterizar a aquellos antígenos que se encuentran asociados predominantemente a la membrana del macrófago y en diferentes etapas de la fagocitosis.

II) ANTECEDENTES

1.a) Aspectos generales de la Tuberculosis.

La Tuberculosis se ha reconocido como una de las enfermedades más antiguas en el hombre (5,6). El nombre de tuberculosis se le atribuye al médico F. de la Bœ Sylvius, que en 1762, en Leyden, B., describió por vez primera a las lesiones características de esta enfermedad conocidas como "tuberculos".

Laennec (1781-1826) inicia la investigación de la tuberculosis a un nivel más científico, y reconoce una correspondencia entre las lesiones histológicas y la enfermedad. Willein (1845) y Keloche (1943) lograron la transmisión experimental de la tuberculosis a conejos.

Roberto Koch (1862) aisló el bacilo causal de esta enfermedad y logró reproducir la enfermedad en conejos. Describió un fenómeno hasta hoy, no del todo conocido, denominado de hipersensibilidad retardada.

La TB continúa siendo un problema de salud grave en el mundo. Aunque no distingue razgos genotípicos o fenotípicos, se acrecenta más en los países en desarrollo, debido principalmente a problemas socio-económicos (7).

Actualmente se estima que existen 30 millones de casos activos de tuberculosis (8). Se muestra una incidencia anual de aproximadamente 10×10^6 casos, y por otra parte se reportan un poco más de 3 millones de muertes por año (9).

A pesar de ser una enfermedad tan antigua y dada su relevancia a nivel mundial, se conoce aun muy poco sobre la relación que guarda con su huésped natural, el macrófago. Solo recientemente se han buscado modelos que expliquen esta interacción y su relación con la patogenicidad.

1.b) Inmunología de la Tuberculosis.

La respuesta inmune en la TB se ve afectada por los mecanismos de patogenicidad, así como por los productos bacterianos inmunomoduladores, resultando en un espectro de reacciones inmunes mediadas por anticuerpos y células (linfocitos T y macrófagos).

Los parámetros inmunológicos en la TB humana son de importancia fundamental si se considera que los síntomas clínicos están determinados por el tipo predominante de la reacción inmune. Las reacciones inmunológicas son decisivas para la patología de las lesiones y en su distribución anatómica. El efecto protector de la inmunidad adquirida en muchas ocasiones no actúa por la estructura rígida de la pared celular y aún de la

residencia intracelular de las micobacterias.

i) Respuesta Inmune Humoral. La TB induce una respuesta inicial mediada por anticuerpos hacia los antígenos micobacterianos asociada a una respuesta mediada por células (10). Se cree que la respuesta humoral no juega un papel protector en la patogénesis. Se reporta que hay poca actividad protectora cuando se transfiere suero de animales tuberculosos a otros que se retan con las bacterias vivas (11).

La respuesta humoral en TB probablemente tiene un papel accesorio en la respuesta del huésped. Los anticuerpos no participan en la formación de los granulomas ni en el daño observado en la necrosis tisular caseosa (12). Tampoco se ha encontrado correlación entre enfermedad avanzada, altos títulos de anticuerpos e hipersensibilidad retardada (13).

ii) Respuesta Inmune Celular. Las infecciones con *M. tuberculosis* empiezan probablemente por la inhalación de los bacilos. Enseguida se provoca una pequeña lesión. Esta lesión si prosigue se difundirá hacia otros órganos, incluyendo pulmones.

Los macrófagos juegan un papel crucial en la generación de una respuesta inmune, en la tuberculosis. Al inicio hay una monocitopenia incrementada y una liberación prematura de monocitos de médula ósea (14). Estos monocitos son atraídos a los sitios de inflamación donde maduran en macrófagos (15,16).

Los macrófagos se pueden activar en el sitio de inflamación, mostrando una actividad bactericida incrementada (17, 18) además de una serie de cambios morfológicos que incluyen un tamaño aumentado, un incremento en el número de organelos. Muestran una alta actividad en transporte y metabolismo de la glucosa. En su sistema oxidativo, presentan un incremento en la producción de superóxido. Esta generación de peróxido y superóxido se usan principalmente en el daño a las bacterias (19). Esta activación puede estar mediada por la liberación de linfocinas (20).

Muchas especies virulentas de *M. tuberculosis* pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las células fagocíticas. En la tuberculosis crónica, la activación celular puede no ser adecuada para una eliminación exitosa de las bacterias.

Las micobacterias ingeridas son llevadas a nodulos linfáticos regionales, hígado, bazo y otros órganos. Una pequeña cantidad de antígeno bacteriano, después de ser procesado en un fagosoma o fagolisosoma, se encuentra en la membrana del macrófago donde puede ser transferido a linfocitos mediante receptores celulares específicos.

Los macrófagos presentan efectos tales que inducen por sí mismos o en otras células, respuestas de supresión celular y humoral (21).

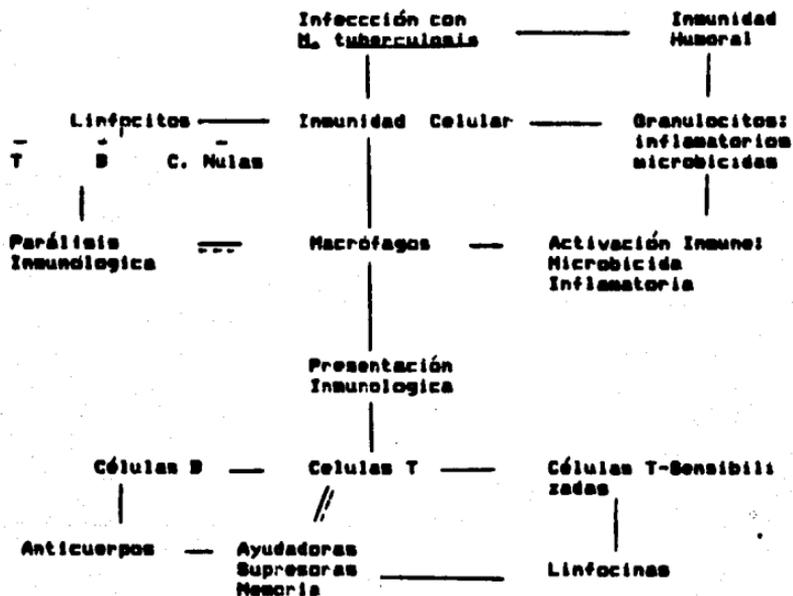
La interacción entre macrófagos y linfocitos T, es esencial para la respuesta inmune. La dirección neta de la respuesta dependerá de factores tales como, el tamaño de la infección, ruta de infección, naturaleza de los antígenos y la presencia de factores de reconocimiento celular ó humoral (22).

La interacción entre macrófagos y linfocitos B, puede ser directa o indirecta (23).

En la figura No. 1 se representan las posibles vías de una respuesta inmune celular hacia la infección con M. tuberculosis y sus efectos posteriores.

Figura No 1

VÍAS DE LA RESPUESTA INMUNE Y EFECTOS POSTERIORES A UNA INFECCIÓN CON M. tuberculosis.



Actividades:

Positiva _____

Supresora =====

iii) Fagocitosis de micobacterias .La fagocitosis implica una adherencia a la membrana a través de receptores inmunológicos o inespecíficos, para que posteriormente se induzca la internalización en forma de vesículas, denominadas fagosomas, los cuales a través de un sistema de microtúbulos los llevarán a su encuentro en la región perinuclear con los lisosomas (22,23). Los receptores superficiales y enzimas juegan un papel importante en la reacción de los macrófagos a los microorganismos y en su comportamiento posterior (24).

La ingestión de M. bovis BCG por macrófagos en cultivo, causa una disminución en el % de células que muestran receptores para globulinas (EAC) en poblaciones de células elicitadas y no elicitadas. Comparativamente, el receptor para EAC en pacientes con lepra limitrofe (BL) o lepromatosa (LL), está disminuido.

Otra consecuencia de la fagocitosis de M. bovis BCG es que aumenta la movilidad de macrófagos, y su pinocitosis (25).

Cuando se fagocitan especies de M. tuberculosis, estas provocan la liberación de factores solubles que activan a las células T, tal que aumenta el número de células T-supresoras (26).

Se menciona que el daño a especies virulentas y no virulentas de Mycobacterium tuberculosis por las células fagocíticas, puede ejercerse a través del sistema de peroxidación mediado por las catalasas. Estas catalasas se localizan principalmente en peroxisomas y citosol (27).

Los linfocitos son el principio del reconocimiento celular en la respuesta inmune. En base a sus propiedades de superficie y funciones, los linfocitos B, requieren de cooperación de las células T ayudadoras para responder a muchos antígenos T dependientes. Esta interacción entre antígenos específicos y linfocitos causa la liberación de un número de sustancias que amplifican o suprimen las respuestas inmunes.

Mackness (28) demostró que la hipersensibilidad celular retardada, era la causa acelerada de la formación del tubérculo, por medio del cual se produce la respuesta inmune mediada por células.

Los macrófagos no tienen memoria inmunológica, pero pueden adquirir indirectamente la especificidad inmunológica interactuando con linfocitos y sus productos. La respuesta de hipersensibilidad, asociada con la mediada por células, acelera la velocidad con que los macrófagos se acumulan en el sitio de infección y se activan.

Los linfocitos inician la respuesta celular y son responsables de su especificidad inmunológica. Bajo la influencia de los antígenos, los linfocitos proliferan localmente y producen linfocinas y quizás anticuerpos citotóxicos. Algunas adquieren especificidad antigénica por transferencia pasiva, algunas otras actúan inespecíficamente en el sitio (29).

Las reacciones de hipersensibilidad son lentas, alcanzan un pico de 48-72 horas, y persisten por días. Esta reacción permite la maduración de monocitos que llegan al sitio de infección por la vía linfática.

Cuando el huésped adquiere hipersensibilidad celular y tanto los bacilos como sus antígenos están prevalentes, el recambio de macrófagos a través de vías linfáticas es más rápido, y la activación es mayor en el macrófago.

En las lesiones locales, los bacilos y sus productos están en altas concentraciones. Mientras que a nivel sistémico tales productos estimuladores están en bajas concentraciones. Por esta razón, los macrófagos mantienen estados de activación muy altos y resistencia antimicrobiana sistémica.

Conforme la activación macrófágica sistémica y la resistencia desaparecen, la hipersensibilidad celular persiste. Tal acción es debida a los linfocitos T, que recirculan, la mayoría derivados de Timo, con receptores para antígenos.

Esta hipersensibilidad retardada acelera la formación de tuberculosis, y causa la destrucción de reinfecciones con bacilos tuberculosos que escapan de los macrófagos alveolares.

Esta reacción previene reinfecciones exógenas y puede abortar el progreso de muchas lesiones de origen hemático, de pulmón, bazo, hígado, riñón.

Por otra parte, la actividad de las células asesinas naturales, se ve aumentada en pacientes con TB pulmonar.

Mientras que la participación de los polimorfonucleares se encuentran en las etapas inflamatorias y exudativas de la TB. Su presencia se debe a la liberación de sustancias quimiotácticas por macrófagos alveolares. Su actividad microbicida se asocia a la generación de peróxido de hidrógeno y superóxido (30).

La adherencia de neutrófilos se ve aumentada en la TB (31). Los neutrófilos preceden a los monocitos en las áreas de inflamación granulomatosa y liberan factores quimiotácticos (32).

C) Patogénesis

El bacilo tuberculoso se transmite en forma de "gotitas" por vía aérea, y son inhaladas por un huésped susceptible.

Se implantan en el bronquiolis ó alveolo respiratorio, aquí pueden multiplicarse con poca resistencia del huésped. El bacilo se difunde a través de canales linfáticos, hacia nódulos linfáticos regionales y por vía hemática a todos los órganos.

Los organismos depositados en las zonas superiores del pulmón, parénquima renal, corteza cerebral, encuentran ambientes que favorecen su crecimiento, y numerosas reproducciones bacterianas ocurren antes de que la inmunidad adquirida se desarrolle y limite su multiplicación.

La inmunidad adquirida se cree adecuada para limitar una multiplicación posterior de los bacilos.

La masa de antígenos presentes en las bacterias, así como estructuras características del tejido involucrado, pueden determinar la respuesta patológica a la infección tuberculosa. En

la Tabla No I, se señalan algunas características de los antígenos micobacterianos predominantes y su relación con el sistema inmune.

Las respuestas tisulares de inflamación y necrosis junto con los síntomas sistémicos de la tuberculosis, son los resultados de la respuesta mediada por células.

En semanas o años después de la primera infección, los bacilos tuberculosos que han difundido a través del cuerpo a varios sitios que favorecen su persistencia pueden empezar a replicarse para producir un amplio espectro de la enfermedad.

En la primoinfección, cuando las micobacterias llegan al parénquima pulmonar causan un proceso inflamatorio discreto con afluencia de leucocitos polimorfonucleares primero y macrófagos después, que fagocitan a los bacilos y se acumulan en la luz alveolar produciendo un pequeño foco de infiltración, apenas visible macroscópicamente; al cabo de unas dos semanas algunos macrófagos se fusionan y constituyen células gigantes (tipo Langhans), la porción central de la lesión se necrosa y adquiere una consistencia característica que ha sido denominada caseosa; los macrófagos adoptan una morfología semejante a células epiteloides y el foco se rodea de linfocitos. Se conoce así a este proceso como folículo de Koster.

El foco de primoinfección se localiza en la zona subpleural del parénquima pulmonar y se disemina tempranamente por los vasos linfáticos a los ganglios hiliares regionales, que se caseifican, constituyéndose en el complejo primario de Ranke. Este puede evolucionar hacia la curación, o la generalización o tuberculosis progresiva de primoinfección.

Cuando el complejo de Ranke progresa, la lesión inicial aumenta de tamaño, así como el material caseoso disminuye de consistencia hasta hacerse casi líquido (licuefacción), lo que permite su fácil eliminación por los bronquios con dos consecuencias graves para el enfermo: por un lado se hace contagioso al eliminar grandes cantidades de bacilos con el esputo, y por otro lado, la diseminación bronquial siembra el proceso en otras partes del parénquima pulmonar, lo que puede dar lugar a una bronconeumonía caseosa, frecuentemente mortal.

La tuberculosis de reinfección implica un origen exógeno de los bacilos. Muestra una marcada preferencia a localizarse en las regiones subapicales de los lóbulos superiores. La evolución de estas lesiones lleva a la necrosis del exudado y las paredes alveolares incluidas en el centro del proceso, con extensión periférica de la inflamación. La licuefacción del material necrótico y su eliminación a través del árbol bronquial transforman por completo la naturaleza de la enfermedad al crear la lesión más importante y característica de la tuberculosis, la caverna (33.)

La tuberculosis pulmonar de reinfección puede mostrar otras lesiones cuya variedad morfológica es casi infinita, pero pueden resumirse en tres grupos distintos: los nodulos, las zonas de bronconeumonía caseosa y la neumonía caseosa.

Las complicaciones de la tuberculosis pulmonar pueden ser consideradas como intratorácicas o extratorácicas. Las intratorácicas son hemorragias, adherencias pleurales y empiema.

Las extratorácicas son diseminaciones del proceso infeccioso y amiloidosis secundaria.

B) Perspectivas

Aunque la vacunación con BCG se ha aplicado durante mucho tiempo para prevenir la tuberculosis, ésta ha tenido fracasos en algunos países (34), por lo que se ha cuestionado su eficacia en la prevención de esta enfermedad.

Se ha buscado por tanto el desarrollo de una nueva vacuna. Esta vacuna se relaciona con la posibilidad de estimular eficientemente la inmunidad mediada por células T, ya que la inmunidad adquirida se lleva a cabo por este mecanismo (35).

Recientemente el genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* ha sido clonado en *Escherichia coli* y varias proteínas recombinantes, antígenos micobacterianos, han sido expresados e identificados por medio del uso de anticuerpos monoclonales y policlonales (36).

La identificación de antígenos relevantes a la protección se ha desarrollado con células T. Clonas de células T-ayudadoras se han aislado de individuos enfermos de lepra y han reaccionado con los antígenos micobacterianos. Se han identificado clones de células T, que reconocen antígenos de un peso molecular de 65 y 19 kilodaltonos (37).

El antígeno de *M. tuberculosis* con un peso molecular de 64 kilodaltonos se ha clonado y ha producido cierta inmunidad en ratones previamente retados con *M. tuberculosis* (38).

Estas células T producen cierto tipo de infección por la interacción a nivel de membrana, entre los antígenos bacterianos y el antígeno de histocompatibilidad, Ia, provocando una activación del macrófago. También inducen la migración de monocitos al sitio de la formación de un granuloma.

Hay diferentes poblaciones de células T protectoras que pueden ser generadas a diferentes tiempos durante la infección conforme varios antígenos se vuelven disponibles para la presentación por macrófagos (39).

Así, el futuro de la investigación sobre la tuberculosis radicara en tres grandes áreas: primero, la búsqueda de mejores métodos para su prevención; segundo, búsqueda de métodos que logren detectar oportunamente y con gran especificidad a personas en alto riesgo; y por último, los métodos de diagnóstico basados en la tecnología moderna (40).

2) Endocitosis

2.a) Generalidades.

La Endocitosis es un proceso general por el que las células se comunican entre sí, a través de la internalización de moléculas nutricionales y regulatorias. Depende del movimiento continuo y altamente controlado de proteínas que se encuentran embebidas en las membranas celulares (40).

Es un proceso que requiere energía y es usado por todas las células nucleadas para internalizar fluidos y partículas (41).

Las estructuras que participan en la endocitosis son al menos 4:

- a) Superficie celular o membrana plasmática

- b) Vacuolas fagocíticas o vacuolas pinocíticas, que participan en el transporte de sustancias extracelulares hacia el interior de la célula, con vida media de segundos a minutos.

Las vacuolas pinocíticas no exceden de un 3.5% del volumen celular o de un 10-15% del área de superficie de la célula.

Las vacuolas fagocíticas son vesículas que contienen en su mayoría proteínas similares a la membrana plasmática. Cuando se marca con I¹²⁵ la membrana plasmática, se detectan hasta 20 polipéptidos que son similares en peso molecular a los obtenidos en las membranas de vacuolas fagocíticas y membrana plasmática.

- c) Gránulos digestivos o secundarios que participan en la digestión y/o liberación de moléculas internalizadas hacia el citoplasma.

- d) Un sistema vacuolar que sintetiza las hidrolasas lisosomales, proteínas secretoras, que incluyen el aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas primarios.

Los endosomas son una población heterogénea de vacuolas, que a través de movimientos internos del sistema locomotor de las células, son internalizadas grandes porciones de moléculas y fluidos externos, en dirección de los lisosomas (41).

2.b) Pinocitosis

Es el tipo de endocitosis mediante el cual, se ingieren solutos o fluidos del medio extracelular, a través de pequeñas vesículas denominadas pinosomas. Virtualmente todas las células eucarióticas están continuamente ingiriendo parte de su membrana plasmática en forma de pinosomas. El total de membrana internalizada (97%) es reciclada en 60 minutos, desde un pool de membrana pinosomal. Este proceso es continuo, denominándose como pinocitosis de fase fluida.

Las vesículas pinocíticas llegan a los lisosomas, don

de a través de una fusión pinosoma-lisosoma, mediada por un pH ácido, se transferirá el contenido vesicular. Pueden seguir otras rutas antes de llegar a lisosomas, tal es el caso de la endocitosis mediada por receptores, de la que se hablará más adelante. Solo un 3% de la membrana internalizada se atrapa como parte de las membranas lisosomales secundarias y se recicla después de un tiempo de residencia de 60 minutos.

Hay cierta transferencia selectiva del contenido de los pinosomas hacia los lisosomas, y los constituyentes de la membrana endosomal se quedan disponibles para su reciclaje o transferencia separada.

Los pinosomas primarios tienen un promedio de 0.3 micras en diámetro.

El reciclaje de membrana desde el compartimento pinosomal ocurre después de un tiempo promedio de residencia de aproximadamente 3 minutos.

Los receptores de superficie celular son internalizados en un pool intracelular de receptores que tienen aproximadamente 2-3 veces el tamaño del pool de la superficie celular, en términos de numerosas receptores.

Aproximadamente hay un enriquecimiento de 20 veces más de receptores, comparando en la superficie celular, si se asume que estos receptores están principalmente acomodados en el pool intracelular pequeño de membranas que reciclan.

Estos receptores pasan mucho tiempo (15 minutos) de su viaje completo (20 minutos), en el pool intracelular (42).

Se reporta que hay un reciclaje directo entre la membrana pinocítica y el compartimento lisosomal en las células tipo L (43).

La pinocitosis en macrófagos implica 2 compartimentos, operando en serie, una con un recambio rápido ($t_{1/2}$ 5-8 min), y el otro considerablemente más lento ($t_{1/2}$ 3-10 hrs) (44).

El acoplamiento de la endocitosis y exocitosis se cree juega un papel importante en balancear el flujo de membrana hacia y desde la superficie de la célula eucariótica.

Cuando se lleva a cabo la iodación de proteínas de membrana, a 4 grados, se provee proteínas de superficie celular externa con una marca enlazada covalentemente. El recambio de componentes membranales es bajo, comparado con el flujo de membrana externa. La membrana tiene que ser reutilizada durante ciclos funcionales sucesivos para limitar la necesidad de resíntesis de componentes membranales (44).

Estas proteínas no se usan posteriormente para la síntesis de novo después de su degradación proteolítica de la membrana (45). La marca se observa a los 15 minutos principalmente en vesículas, mientras que a los 30-45 minutos se halla en las lisosomas, mientras que a los 90 minutos se detecta en aparato de Golgi (46).

Reportes con microscopía electrónica señalan que cuando se marca con I-125, catalizado con lactoperoxidasa, un 20% de marca se pierde rápidamente, con $t_{1/2}$ de 20-25 minutos, mientras que el 75% permanece con $t_{1/2}$ de 7-9 hrs. Estos resultados pueden reflejar más de una ruta para la

internalización y el reciclaje de los componentes que han sido endocitados. Los más rápidos, probablemente vayan directo a los lisosomas para su degradación, mientras que los lentos, son componentes que se reciclan a la superficie celular y se reusan durante varias rondas de ingestión de material extracelular (47).

Cuando se marca con I-125 la membrana de células fagocíticas, a 4 grados centígrados, las glicoproteínas ácidas de alto peso molecular son las que mejor se marcan. Por tanto cuando se sigue su internalización por microscopía electrónica, estas se observan a los 5 minutos de aumentar la temperatura a 37 grados, asociadas a microtubulos. A los 15 minutos esta pasa a lisosomas, después de 1 hora se observan en Golgi y membrana externa (48).

La pinocitosis puede ser afectada por la concentración de aminoácidos externos. Esta modulación se ve reflejada en el movimiento intracelular, provocando un camino directo a los lisosomas, donde debido a la proteólisis en esta vesícula, se requiere de un aumento de la concentración interna de aminoácidos externos, dispuestos a iniciar la síntesis de proteínas (49).

Hay diferencia en la adherencia e internalización de las proteínas: proteínas catiónicas se enlazan a la cubierta superficial cargada negativamente de los macrófagos. Después de ingerirlas, están lleva una ruta directa hacia los lisosomas, después aparecen en el aparato de Golgi. Las proteínas aniónicas no se enlazan fuertemente a la superficie celular y son internalizadas exclusivamente hacia lisosomas (50).

Los fosfolípidos son sintetizados en sitios diferentes de aquellos que se usan para la síntesis de proteínas. Poco se sabe acerca de su comportamiento a nivel del tráfico intracelular. Se necesita al menos algún paso de transferencia diferencial para la síntesis de novo de los fosfolípidos, comparado con las proteínas de membrana.

En leucocitos polimorfonucleares, se ha observado que la pinocitosis es un fenómeno reversible, donde los pinosomas se fusionan con organelos citoplasmáticos, probablemente lisosomas y se reintegran a membrana plasmática. (51).

2.c) Fagocitosis

La fagocitosis es un componente principal de la actividad defensiva del huésped, a través de células especializadas, en contra de microorganismos y agentes que detecta como ajenos.

El macrófago ha sido postulado como un elemento muy activo en la defensa del huésped. El primer reporte data desde que el Dr. I. Metchnikoff en 1894, especuló acerca del papel que juegan las células fagocíticas en el mecanismo de defensa de los organismos vivos superiores (52).

Los macrófagos se originan en la médula ósea, circulan en la sangre como monocitos, migran a los tejidos, donde maduran funcional y morfológicamente para convertirse en macrófagos típicos histiocíticos o exudativos (53).

Los macrófagos son células muy activas que responden a señales celulares y hormonales, por lo que su participación es

muy importante a nivel de numerosos eventos fisiológicos y patológicos. Estas células pueden interactuar con numerosas moléculas extracelulares -proteínas y polisacáridos- y pueden internalizarlas y someterlas a cambios metabólicos intracelularmente. Estas moléculas pueden ser solubles o formar parte de la estructura de microorganismos (54).

Producen sustancias que participan en la regulación inmune y en las reacciones inflamatorias. Tales como las proteínas del complemento, ácido araquidónico, factores reguladores del crecimiento, interleucinas, proteasas, etc. La producción de estas sustancias dependerá de la interacción con otro tipo de células, como linfocitos T o B, PMN, etc., que puede ser por contacto directo o a través de factores solubles.

Poseen receptores de superficie para las linfoquinas, proteínas reguladoras inmunes, para las fracciones Fc y C3 del complemento, interferón gamma, etc. En general participan en los procesos infecciosos, en la modulación de las respuestas inmunológicas y en la inflamación (55).

No se conoce exactamente que y como las propiedades superficiales y fisicoquímicas determinan la internalización en los fagocitos. La ingestión fagocítica requiere de una perturbación de la membrana celular fagocítica y de un mecanismo molecular que provea una transducción de la señal bioquímica generada (56).

Es crucial para el fagocito poder discriminar entre las partículas ingeribles y no ingeribles, aún cuando las partículas estén muy próximas a la membrana plasmática de la célula fagocítica. El proceso de la fagocitosis se ha dividido en 7 eventos morfológicos iniciales (57).

1) Ciertas proteínas de superficie promueven el reconocimiento por el fagocito.

2) Se recibe un mensaje, a través del reconocimiento del ligando por el pegaje con su receptor, probablemente una señal bioquímica.

3) El fagocito transmite el mensaje hacia su citoplasma promoviendo mecanismos efectoras.

4) La membrana plasmática se adhiere fuertemente a la partícula.

5) Los pseudópodos se ensamblan a través de las proteínas que los forman.

6) Se mueven alrededor de la partícula.

7) Los extremos de los pseudópodos se fusionan en el extremo distal de la partícula.

8) La invaginación de la partícula en forma de fagosoma.

9) Fusión de la membrana fagosomal con los lisosomas a través del movimiento generado a través de los microtubulos.

10) Digestión de la partícula a través del sistema enzimático lisosomal.

11) Reconstitución de los receptores en la superficie celular, mediante un cambio de pH en el medio interno de las vesículas fagolisosomales.

Los factores que regulan la fagocitosis son entre otros:

a) Propiedades de superficie de la partícula. Tales como la carga, hidrofobicidad, composición química, influyen en la ingestión de partículas, ya sea sintéticas, derivadas químicamente o naturalmente, como eritrocitos y bacterias (58).

Aparentemente es más fácil que se ingieran partículas que tengan propiedades tales como que sus superficies estén modificadas químicamente o desnaturalizadas (59).

Muchas bacterias patógenas tienen estructuras (cápsulas) que inhiben sus enlaces o ingestión con los fagocitos. Se ha establecido que un fagocito englobará partículas cuya hidrofobicidad superficial es mucho más grande que la propia, pero no partículas cuyas superficies son más hidrofílicas que las propias (1).

b) Los anticuerpos, tales como tipo IgG, IgM, los cuales cubre las superficies de las partículas que opsonizan y promueven su fagocitosis.

c) El complemento. La fracción C3b, C3d, que permiten bajo ciertas condiciones el enlace e ingestión de partículas.

d) Propiedades superficiales características del fagocito, tales como los receptores inmunológicos y los inespecíficos, el grado de activación y liberación de factores superficiales.

Las consecuencias metabólicas de la fagocitosis son:

a) Metabolismo oxidativo. La actividad oxidativa resultante de la activación de una enzima NADH enlazada a la membrana plasmática, convierte el O_2 a H_2O_2 vía aniones superóxido, además este H_2O_2 es el que maneja la vía Hexosa-monofosfato (60).

b) Hay un incremento en la incorporación de lisofosfatidos, en fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina (61) hay un aumento en la ingestión de P^{32} en ácido fosfatídico y fosfatidil inositol, además un flujo de ácidos grasos de triglicéridos celulares a lecitinas (62). Hay un aumento de síntesis de fosfatidilcolina a partir de lisofosfatidos, aumenta un 5% de lecitina, el cual se incorpora a la membrana plasmática.

c) Secreción de hidrolasas ácidas y neutrales. Los colimorfonucleares liberan enzimas ácido-hidrolasa en el sitio en respuesta a la ingestión de partículas (63).

Los macrófagos secretan proteasas neutrales, tales como activadores de plasminogeno, colagena, elastasa.

d) Inducción de síntesis de enzimas lisosomales. La endocitosis de material digerible parece regular los niveles de enzimas intracelulares (64), no así las partículas inertes o no digeribles.

e) Nucleótidos cíclicos. Se reportan aumento de GMPc por efecto de la fagocitosis de partículas.

ii) Fagocitosis de parásitos intracelulares.

La ingestión y muerte intracelular de parásitos intracelulares es reconocido como un mecanismo central de defensa. Muchos organismos usan las vías endocíticas para

penetrar a la célula y poder subsistir y replicarse. Algunos lo hacen a través de moléculas específicas o receptores en la superficie celular (63).

La presencia continua de receptores celulares en las células para organismos potencialmente letales, puede ser que sea el producto de una función fisiológica normal en el macrófago o el producto de la evolución, y que estos parásitos puedan apropiarse de esto para sus fines.

A continuación ejemplos de parásitos que se internalizan a través de endocitosis mediada por receptores:

a) Agentes que entran en la matriz citoplásmica. El ejemplo más claro es el de los virus, tal como el de la vaccinia. Este virus entra a través de endocitosis dejando su cubierta lipoproteínica, en membrana, resultando en la liberación de su DNA viral hacia la matriz citoplásmica, donde se lleva a cabo su replicación.

Otro ejemplo viene a ser los tripanostigotes de *Trypanosoma cruzi* (64), los cuales entran a través de endocitosis mediada por una glicoproteína en la membrana y logra escapar de la vacuola fagocítica, llegando a la matriz citoplásmica donde se replica.

b) Agentes que se replican dentro de los lisosomas. En esta sección se encuentra a las especies *M. abortus*, *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes*. Estas bacterias se secuestran dentro del lisosoma, donde se replican y potencialmente destruyen a las células (67). Algunos reovirus son capaces de sobrevivir al ambiente lisosomal. Este es único entre los virus animales (68).

c) Agentes que se replican dentro de los fagosomas. Los parásitos *Chlamydia* (69), *Toxoplasma* (70), entran a las células dentro de vacuolas endocíticas, previniendo la fusión de estas vacuolas con los lisosomas de la célula huésped. Esto probablemente debido a la liberación o producción de metabolitos o productos biosintéticos. Algunas especies de *Mycobacterium* también lo logran (71).

La fagocitosis de *M. bovis* BCG afecta o altera la expresión de receptores de membrana en macrófagos peritoneales inducidos por aceite de parafina (72). Estos receptores fueron determinados para eritrocitos recubiertos con anticuerpos y complemento.

2. d) Endocitosis mediada por receptores.

Las células eucarióticas tienen sus receptores distribuidos a nivel de su superficie celular; estos se difunden en la membrana esporádicamente en ausencia de ligandos (73), o en forma de depresiones especializadas denominadas pozas cubiertas (74). Es aquí donde los ligandos y sus receptores se acumulan como primer paso de entrada en la célula (75).

Estas depresiones pasan a formar a los endosomas (76), o receptáculos (77). Algunas invaginaciones que se forman continuamente por medio de un proceso continuo, se les denomina vesículas cubiertas, estas están compuestas principalmente por una proteína denominada clatrina, la cual le da forma y

consistencia a la vesícula.

Estas vesículas pueden formarse en ausencia de ligando. Miden aproximadamente 2000 angstroms, en diámetro, pero al se fusionan llegan hasta 6000 angstroms. Tienen un pH interno aproximado de 4.5 (78). Contienen cantidades apreciables de enzimas hidrolíticas funcionales (79).

Ponen movimientos saltatorios a lo largo de los microtubulos (80). Se ponen en contacto con elementos de trans-Golgi, liberando sus ligandos en el lumen del aparato de Golgi y rozando su membrana y sus componentes con el sistema membranar de Golgi, con una t1/2 de 5-40 minutos.

Se la región trans-reticular de Golgi, el destino del ligando y receptor se lleva a cabo. Algunos ligandos y receptores son regresados a la superficie celular donde el ligando se libera de nuevo en el medio y el receptor puede ser reusado. Algunos ligandos son dirigidos a lisosoma y sus receptores regresan a la superficie para reusarse (asialoglicoproteína, alfa-2-macroglobulina, LDL) y finalmente algunos ligandos y sus receptores son enviados a lisosomas para degradarse (EGF y su receptor). Algunos elementos tubulares, asociados a los microtubulos, probablemente se involucran directamente en la vía exocítica.

La mayoría de los receptores son proteínas transmembranales. Se difunden lateralmente en la membrana plasmática. Se cree que la movilidad del complejo formado se aproxima a la del receptor no ocupado. La restricción de la movilidad de receptores se debe a asociaciones con proteínas citoplásmicas (80).

A temperaturas de 4 grados, las células no inmovilizan sus receptores proteínicos, las movilidades sólo son 4 veces mas bajas que a 37 grados (81).

A 4 grados, los ligandos se difunden azarosamente sobre la membrana, si se aumenta la temperatura a 37 grados, estas se redistribuyen rápidamente y se localizan en forma de pozos cubiertos, internalizándose en dirección de los lisosomas.

El enlace en la membrana plasmática a sitios específicos, permite no solo efectos en la fagocitosis, sino también juegan un papel en la regulación de la quimiotaxis, en la producción de varios productos de O2 tóxicos, incluyendo el superóxido y peróxido (82). La secreción de varios productos celulares, prostaglandinas y la sustancia reactiva de la anafilaxia (83).

Algunos sitios de enlace pueden mediar solo adherencia, otros pueden ser importantes para la fusión fagolisosomal, para la acidificación de vesículas endocíticas o la degradación intracelular.

Los organismos pueden interactuar a través de sus superficies con diferentes tipos de capturas y con diferentes afinidades.

En la interacción ligando-receptor, influyen la población celular, la etapa de desarrollo, las condiciones de cultivo, el estado de activación y la presencia de varios productos de linfocitos.

Cuando se activa un macrófago, la membrana plasmática de éstos macrófagos, difiere en numerosas actividades

por marcadores tales como el aumento de ciertas enzimas y marcadores antigénicos.

Entre las principales funciones de la endocitosis mediada por receptores están sin duda, la nutrición, entrada de hierro, colesterol, vitamina B12, hormonas. Remueve sustancias del fluido extracelular para su degradación (complejos alfa-2-macroglobulinas-proteasas) o el transportar sustancias a través de la célula (IgA, IgG etc.) El remover hormonas como la EGF y su receptor, la insulina, tiroxina y triyodo-tironina .

Los factores que afectan la entrada de ligandos a través de los receptores son: a) El enlace de un ligando a un receptor membranar. Si la afinidad del receptor por el ligando es alta y hay un numero amplio de sitios , las moléculas se asociaran en pocas segundos.

b) La razón a la que los complejos ligando-receptor se difunden en la membrana plasmática. Las constantes de difusión afectaran la entrada.

c) La eficiencia de los complejos ligando-receptor para ser atrapados en pozos cubiertos.

d) La proporción a la cual estos pozos cubiertos vayan a formar receptosomas o endosomas.

1) Endocitosis mediada por receptores inmunológicos.

Una de las formas en que un organismo entra a las células fagocíticas, es a través de la opsonización. En este caso, los microorganismos se enlazan por medio de opsoninas del suero o tejidos. estas opsoninas son los anticuerpos y el complemento.

Las células humanas y los de raton tienen receptores Fc en sus membranas. En el ratón, el FcRI reconoce moléculas de IgG2a, y el FcRII reconoce IgG1 y la IgG2b. En células humanas, son reconocidas las 2 clases de receptor, además de IgG3 e IgG1 (84).

El receptor Fc tiene un peso molecular de 50-70 Kd, dependiendo de el procedimiento de aislamiento.

Algunos parásitos estimulan una respuesta humoral que aumenta su fagocitosis mediada Fc. Parásitos tales como *S. pneumoniae*, *M. influenzae*, *M. meningitidis*, *S. mutans*, *S. agalactiae* (85).

La reacción receptor Fc induce varios cambios en ciertos parásitos, tales como *I. sporoblasti*, que cuando no se encuentra opsonizado, previene la señal de la respiración oxidativa, y además no se fusionan fagosoma y lisosoma (86).

Mientras que para el complemento, las células tienen reacción a través de receptores membranales, tipo C3 y C4 (87). El receptor CRI reconoce C3b y C4b. Esta presente en linfocitos, monocitos y neutrófilos (88). El receptor CR2 reconoce C3d y solo detecta en linfocitos B (89). En general C3 promueve lo enlace en membranas y promueve las actividades fagocíticas (90).

Especies menos virulentas de *S. typhimurium* son capaces de fijar C3 por una vía alterna de complemento, y es mas fácil de fagocitarse (91).

ii) Endocitosis mediada por receptores no inmunológicos.

Estos tipos de receptores incluyen aquellos que unen ligandos exógenos, a través de receptores parecidos a lectinas, en general glicoproteínas.

Las moléculas parecidas a lectinas podrían estar implicadas en la fagocitosis de *S. typhimurium*, *M. aerogenes* y de *E. parvum* (92).

Hay ciertos receptores parecidos a lectinas que reconocen glicoproteínas con residuos de manosa o fucosa (93), otros unen galactosa (94).

El reciclaje de receptores es un proceso continuo hacia dentro y fuera de las células. Los receptores para LDL, por ejemplo, se mueven de un organelo a otro como resultado de dos eventos secuenciales: a) La segregación de otras proteínas por el movimiento lateral en el plano de la membrana; b) La internalización de membranas enriquecidas con receptores que eventualmente se fusionarán con un organelo diferente.

FIGURA No.3

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

**CULTIVO DE MACROFAGOS (LINEA CELULAR J774)
EN DMEM , 5% S.F.B., 37 C.**

**INFECCION CON *Mycobacterium tuberculosis*
PROPORCION MACROFAGO : BACTERIAS 1 : 100**

**CINETICA DE FAGOCITOSIS A DIFERENTES TIEMPOS
INCUBANDO A UNA TEMPERATURA DE 37 GRADOS**

**AL FINAL DE CADA TIEMPO DE LA CINETICA DE FAGOCITOSIS,
MARCAJE DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA CON I-125,
CATALIZADO POR LA ENZIMA LACTOPEROXIDASA, A TEMPERATURA
DE 4 GRADOS.**

SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA CON NP-40 (0.5%)

CENTRIFUSACION A 13 000 rpm

MONITOREO DE LAS PROTEINAS TOTALES MARCADAS CON I-125 (cpm)

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-6% AL 10%

**DETECCION DE ANTIBIENOS
BACTERIANOS POR INMUNO
ELECTROTRANSFERENCIA**

AUTORADIOGRAFIA

METODOLOGIA

1) CULTIVO CELULAR

Se usó la línea celular de macrófagos de origen murino, denominada J774.1 (93). Estas células se mantuvieron en cultivo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma, Chev.), complementado con suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO) al 5% (inactivado previamente a 36 grados centígrados), además de 2 mM de L-glutamina (GIBCO), penicilina (100 ug/ml) (Sigma), estreptomicina (100 ug/ml) (Sigma), una solución 20 mM de HEPES (Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanol sulfónico) (Res. Organica). Las células se mantuvieron en cultivo a 37 grados centígrados bajo una atmósfera húmeda y una mezcla de 95% de aire y un 5% de dióxido de carbono.

2) CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*.

Las cepas de *M. tuberculosis*, H37 Rv (TMC-102) y de la cepa H37 Ra (ATCC-25177) fueron obtenidas del American Type Culture Collection. Se mantuvieron estas cepas en cultivo en el medio líquido de Proskauer-Bock-Yousans (93). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 grados. La fase de crecimiento óptimo cesó las 4 semanas. alcanzó. Las bacterias crecen en la parte superior del medio líquido, formando una película consistente. La masa bacteriana se separa del medio líquido por filtración con un papel filtro tipo Whatman No. 3 (W & R, Boston, Ltd.). Posteriormente el sobrenadante se filtro inicialmente a través de membranas de nitrato de celulosa con un poro de 0.45 micras, luego a través de una membrana con un poro de 0.22 micras (Millipore). La masa bacteriana separada del sobrenadante se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), a una concentración de 0.01M, con un pH de 7.2. Esta suspensión se lavó 2 veces con la misma solución amortiguadora. Posteriormente se guardó a una temperatura de 4 grados centígrados hasta su uso.

3) PREPARACION DE EXTRACTO PROTEINICO DE UN FILTRADO DE UN CULTIVO DE M. tuberculosis.

Las proteínas presentes en el filtrado libre de bacterias fueron aisladas por precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio, a una concentración final de 50% (p/v). Se dejó incubando toda la noche a una temperatura de 4 grados centígrados, en agitación. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 40,000 x g a una temperatura de 4 grados. El precipitado se separó del sobrenadante y se suspendió en una solución salina de fosfatos (PBS), a una concentración de 0.01 M, pH 7.4. Esta solución contenía además de un inhibidor de proteasas, el fluoruro de metil-fenil-sulfonilo, (PMSF) (Sigma), a una concentración final de 200 mg por mililitro de solución precipitada. Este precipitado se dializó contra una solución de PBS, 0.01M, pH 7.2 (1 lt x 3). La concentración de proteínas en las muestras fue determinada por el método de Lowry et al. (97) usando una solución de albúmina sérica bovina (ASB) como patrón (Tipo VI, Sigma). Se ajustó a una concentración de 4 mg. por ml. Se guardó en viales Eppendorf a una temperatura de -70 grados hasta su uso.

4) PREPARACION DEL SUERO HIPERINMUNE CONTRA M. tuberculosis.

Se preparó un suero hiperinmune en conejos hembras, adultos, raza New Zealand White. El esquema de inmunización fue de dar una inoculación semanal por la vía intramuscular, durante 5 semanas. Cada inyección consistió de 3.0 mg de extracto proteínico de filtrado de cultivo de micobacterias, cepa H37 Rv, con 5 mg. de cepa muerta por calor (a 60 grados durante 1 hora), usando como vehículo al hidróxido de aluminio. Antes de la primera inmunización se obtuvo suero de los conejos para checar una posible reacción cruzada de los conejos sin inmunizar.

A aquellos que les fueran detectados anticuerpos fueron eliminados del ensayo. Al final del esquema de inmunización, se obtuvo un antisuero con altos títulos de anticuerpos dirigidos contra un extracto antigénico de filtrado de cultivo de micobacterias. Este suero mostró además un número máximo de bandas de precipitación, en la técnica de inmunoelectroforesis, comparables a las reportadas anteriormente por Janicki (99).

5) ENSAYO DE FAGOCITOSIS DE M. tuberculosis

Los ensayos de fagocitosis se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo siguiente: a) Preparación de las células fagocíticas. Las células fagocíticas de la línea celular J774.1 que se mantuvieron en cultivo hasta que llegaron a la confluencia en sus respectivas cajas de cultivo, fueron despegadas de estas por medio de el uso de un "policifa" de hule latex. Este procedimiento se realizó cuidadosamente y en medio de cultivo de DMEM. Las células se lavaron posteriormente con DMEM. Se determinó su viabilidad por medio del método de exclusión del colorante azul de tripano (115). Brevemente, se basa en la propiedad que tiene el colorante de penetrar las membranas de células muertas o dañadas, no así en las vivas - aunque en tiempos cortos-, que no le incorporan. Las células se mezclan con el colorante a una dilución de 1:5. Se depositan 50 microlitros en la cámara de Neubauer y se cuentan las células viables que se hallan en cada uno de los cuadros grandes que se hallan en los extremos de la cámara.

Se ajustó la población celular a una concentración de 1×10^6 células por ml de medio DMEM, con una viabilidad siempre mayor de 98%. Se depositó 1 ml. de la suspensión celular, en cada pozo de las cajas de cultivo (costar), que contienen 4 pozos, cada uno con una superficie de 35 mm de diámetro. El medio de cultivo iba suplementado con FBS al 5%, aminoácidos no-esenciales, L-glutamina 2mM, y antibióticos.

b) Preparación de las micobacterias. Las bacterias filtradas de su medio de cultivo se resuspendieron en solución de PBS 0.01 M, pH 7.2 y se depositaron en tubos de rosca que contenían perlas de vidrio. Estas perlas ayudaron a disgregar las bacterias cuando se homogenizan en un vortex. La masa bacteriana fue homogeneizada así durante unos minutos, luego se lavó 2 veces con solución de PBS, a 3000 rpm, 30 minutos. Enseguida se lavó con medio de cultivo DMEM. Se resuspendió el sedimento y se pasó a través de un filtro (Millipore) que contenía una membrana de acetato de celulosa con un poro de 1.2 micras. Este filtrado contenía muy pocas agregadas bacterianas.

Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml en medio de cultivo DMEM. Se tomó una alícuota, se hicieron varias diluciones y se sembró en medio de cultivo sólido de Middlebrock 7H10 agar, donde se midieron por un lado la viabilidad y por otro lado las CFU (unidades formadoras de colonia), que nos sirven de control.

c) Fagocitosis de micobacterias muertas.

El procedimiento estándar para preparar micobacterias muertas es el siguiente: las bacterias fueron incubadas durante 1 hora a una temperatura de 45 grados (100). Al término se lavaron las bacterias con PBS 0.01M, pH 7.2, dos veces, 30 minutos. Las bacterias se ajustaron a 1×10^8 bacterias por ml. Se tomó una alícuota que se sembró a diferentes diluciones en medio sólido de

Middlebrock 7H10, donde se checó la viabilidad de las copas muertas. Al término de 8 semanas no hubo crecimiento alguno.

La estrategia para llevar a cabo una cinética sincronizada de la co-internalización de proteínas asociadas a la membrana de las células fagocíticas, fué a través del uso de temperaturas menores de 10 grados, que impide el tráfico intracelular a partir de la membrana externa hacia organelos subcelulares. Se logró comparar también estos eventos cuando no se lleva a cabo este tipo de sincronización.

La infección de las células se lleva a cabo adicionando a cada pozo de células en cultivo (1×10^6) 1 mililitro de bacterias (1×10^8) en medio de DMEM, e incubadas durante 1 hora a una temperatura de 4 grados. Esta temperatura y el tiempo no afectan la viabilidad celular, conservándose mas del 98 %. Aproximadamente un 1-5% de las células se despegan por efecto de esta temperatura.

Las cinéticas empiezan cuando a partir del tiempo 0 (T_0), tiempo después de la incubación en frío, se aumenta la temperatura a 37 grados. Las células son lavadas 3 veces con PBS 0.01M para eliminar bacterias no adheridas al macrófago. Luego se adiciona medio (pre-incubado a 37 grados) suplementado con 5% de SFB.

Los eventos moduladores se siguieron a través de una cinética de fagocitosis que abarca los siguientes tiempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 90, 120, 180, 240 y 360 minutos. Al final de cada tiempo, las células son lavadas 3 veces con PBS frío.

Enseguida se dispuso a marcar radiactivamente con el isotopo I-125 las proteínas accesibles en la membrana de superficie por medio de la técnica de catálisis enzimática por la enzima lactoperoxidasa.

6) ENDOCITOSIS DE EXTRACTO DE PROTEINAS OBTENIDAS DE UN FILTRADO DE CULTIVO DE *M. tuberculosis*.

Las proteínas obtenidas por precipitación con solución saturada de sulfato de amonio, se ajustaron a una concentración de 200 ug/ml en medio de cultivo para células, DMEM.

Un total de 1×10^6 células adherentes, viables, por cada pozo de la caja de cultivo, se incubó en presencia de 1 ml de la suspensión de extracto proteico, a una temperatura de 4 grados durante 15 minutos. Luego se lavó 2 veces con una solución de PBS, 0.01M, pH 7.2, frío. Después se inició la cinética de fagocitosis adicionando medio DMEM suplementado con 5% SFB, incubando las células a 37 grados .

Determinamos el efecto que tienen estas proteínas extraídas de cultivos de bacterias tanto del tipo H37Rv, virulenta, como del tipo H37Ra, avirulenta, sobre el proceso de co-internalización de proteínas asociadas a la superficie de los macrófagos, que así mismo pudieran participar en el proceso de fagocitosis tanto de las mismas micobacterias como de partículas latex. Al igual que en la fagocitosis de las bacterias, cuando finalizo la cinética, las células fueron lavadas dos veces con PBS 0.01M, pH 7.2, en frío.

7) FAGOCITOSIS DE PARTICULAS LATEX

Una de los controles usados en estos experimentos es el determinar los efectos que tienen las partículas latex sobre las cinéticas de co-internalización y reciclaje. Para este tipo de ensayos se usaron partículas latex de 0.8 micras de tamaño (Bacto BIFCO), a una concentración de 0.05% (p/v), en medio de cultivo. Se depositó 1 ml de esta suspensión, (homogeneizando previamente en un vortex), en las cajas de cultivo de 6 pozos, conteniendo 1×10^6 células cada pozo. Se incubaron a una temperatura de cuatro grados centígrados, durante 1 hora. Posteriormente se lavó 2 veces con una solución de PBS, 0.01M, pH 7.4. Enseguida se incubó a 37 grados con medio de cultivo DMEM, suplementado con 5% de SFB, iniciándose así la cinética de fagocitosis.

Paralelamente se llevó a cabo una cinética de fagocitosis sin una sincronización previa a temperaturas bajas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

8) FAGOCITOSIS DE E. coli

Determinamos el efecto que tiene sobre las cinéticas de co-internalización y reciclaje de proteínas superficiales de células fagocíticas, la infección de macrófagos con bacterias tipo extracelular, tal como la E. coli.

Las bacterias se prepararon como sigue: se separaron del medio de cultivo de BHI-agar y se depositaron en un tubo conteniendo 5mls de solución de PBS 0.01M, pH 7.0. Se lavaron dos veces con esta solución a una velocidad de 2000 rpm. Se ajustaron por nefelometría a una concentración de aproximadamente 1×10^8 bacterias por ml de medio de cultivo BHIEM.

Para los ensayos de fagocitosis, se depositó 1 ml de esta suspensión en cada uno de los pozos conteniendo 1×10^4 células viables. Se sincronizó la infección incubando durante 1 hora a cuatro grados centígrados. Después se lavó 2 veces con solución salina de PBS, a pH 7.2, frío.

Inmediatamente después, se incubaron a 37 grados en una estufa de dióxido de carbono al 5%, mezclado con aire al 95%, iniciando así la cinética de fagocitosis. Los experimentos se hicieron por triplicado.

9) MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS PROTEINAS DE SUPERFICIE CON I-125

Para poder detectar las proteínas expuestas en la superficie del macrófago durante la cinética de fagocitosis, se llevó a cabo el marcaje radiactivo de estas proteínas con el isotopo I-125, que es un emisor de radiaciones gamma.

Se usó el método descrito por Hubbard (101), usando como catalizador a la enzima lactoperoxidasa y al sistema donador de peróxido de hidrógeno, glucosa-glucosa oxidasa. El marcaje se llevó a cabo a temperaturas menores de 10 grados, retardando así los procesos de internalización y reciclaje en las células (102), así como también favorecer un marcaje eminentemente superficial ya que se impide la internalización de la enzima y por tanto, la yodinación de organelos y/o membranas internas.

Se llevó a cabo el protocolo siguiente: Se preparó un buffer de yodinación con los siguientes componentes: D-glucosa (J. T. Baker) a una concentración de 20 mM, lactoperoxidasa (Sigma) 100 ug/ml, glucosa oxidasa (Aspergillus niger, Sigma) 500 ug/ml, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M, a un pH 7.0. Se adicionó por cada 1×10^6 células, 150 uCi de NaI-125 (Amersham) en 1 ml del buffer de yodinación. Se incubó a cuatro grados durante 15 minutos. Tiempo después se detuvo la reacción

con una solución amortiguadora de yoduro de potasio (J.T. Baker) a una concentración de 5M, a un pH de 7.4 y se lavaron 3 veces con esta solución. Después de este tratamiento, la viabilidad de las células se mantuvo arriba de un 90%.

10) SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS CON NONIDET P-40

Para poder extraer las proteínas superficiales de las células fagocíticas que fueron accesibles a la yodinación, se preparo una solución al 0.5% del detergente no-iónico, Nonidet P-40 (Calbiochem), en una solución amortiguadora de Tris salina, a una concentración de 50 mM, a un pH de 8.0. Además se mezcló con una solución que contenía una serie de inhibidores enzimáticos, tales como: PMSF, a una concentración de 0.067 ug/ml, Ácido para-hidroxil-metil benzoico (Sigma) 0.04%, azida de sodio (Sigma) 0.02%, EDTA (Sigma) 5 mM, Pepstatina-A (Sigma) 1 ug/ml, yodacetamida (Sigma) 50 mM.

Por cada 1×10^6 células se depositaron 200 ul de esta mezcla. Se incubaron durante 30 minutos a una temperatura de 4 grados centígrados. Posteriormente se llevó a viales Eppendorf (Biorad) de capacidad de 250 ul.

Se centrifugaron durante 10 minutos a una velocidad de 13000 rpm a 4 grados. Se separó el precipitado del sobrenadante y se hicieron alícuotas por separado, conservándose a una temperatura de -70 grados, protegidos dentro de viales de plomo. Otras alícuotas del sobrenadante se mezclaron con el coctel usado para electroforesis en geles de poliacrilamida y se hirvieron durante 5 minutos en presencia de agentes reductores como el mercaptoetanol. Estas alícuotas se conservaron a -20 grados hasta su uso.

11) DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN LAS PROTEÍNAS PRECIPITABLES CON ACIDO TRICLOROACETICO

Se determinó la radioactividad presente en las proteínas que pueden ser precipitadas del sobrenadante con ácido tricloroacético (J.T. Baker) al 10%. Brevemente, el protocolo se basa en el siguiente ensayo: se preparo una solución de ácido tricloroacético al 10%, con ABS tipo VI, al 0.001%. Por cada 10 ul de sobrenadante se adicionan 5 ul de ATC frío. Se reposa 5 minutos a cuatro grados centígrados, luego se centrifuga a una velocidad de

13000 rpm, en frío. El precipitado se separa del sobrenadante y se transfieren a tubos de ensayo desechables para poder cuantificar las cuentas por minuto (cpm) asociadas a las proteínas exclusivamente y la radiactividad que se encuentre libre, en el sobrenadante. Esta determinación se lleva a cabo en un contador de radiaciones gamma (Tri-Packard). El 90% de la radiactividad se encuentra asociada a proteínas.

Para la determinación de las cpm totales, se deposita en viales desechables, aproximadamente 10 μ l de las proteínas marcadas con I-125 y se cuentan directamente en el contador gamma.

12) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS SOLUBILIZADAS EN NP-40.

La concentración de las proteínas marcadas con I-125, solubilizadas en NP-40, fue determinada por el método de Peterson (103). Brevemente, se llevan las muestras a un volumen de 1 ml con H₂O destilada. Se adiciona 0.1 ml de dodecilsulfato de sodio al 0.1%. Luego de 10 minutos se adiciona 0.1 ml de ácido tricloroacético al 7% en frío. Se mezcla y posteriormente se centrifuga a 10000 rpm por 10 minutos, se descarta el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 1 ml de H₂O y se añade 1.0 ml de una mezcla en proporciones iguales de los siguientes compuestos: Carbonato de sodio al 10%, sulfato de cobre al 0.1% y tartrato de sodio al 0.2%, NaOH 0.6N, SDS al 10%, en H₂O.

Después de mezclar por 5 minutos, se adiciona 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:3 en H₂O. Se determina a 750 nm después de media hora. Las lecturas se interprimen en una curva patrón usando ABS (tipo VII).

13) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para poder separar, las proteínas de membrana solubilizadas en detergente, y además poder identificar el peso molecular de cada una de estas, usamos una de las técnicas más útiles de los últimos años, la técnica de la electroforesis, usando como soporte los geles de poliacrilamida.

Una técnica modificada que usa al detergente dodecil sulfato de sodio, lo reportó inicialmente Laemmli (104). Este sistema es una modificación del sistema continuo reportado por Weber (105).

Las proteínas de membrana marcadas con I-125 y solubilizadas en detergente, fueron mezcladas en proporción 1:1 con una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.133M

(BIORAD), conteniendo además, glicerol 20%, sulfato dodecil de sodio (BIORAD) al 10%, 2-mercaptoetanol al 10%, EDTA disódico (Sigma), rojo de fenol al 0.1%, esta mezcla se llevó a temperatura de ebullición durante 5 minutos.

Estas proteínas se corrieron en geles de poli-acrilamida en presencia de sulfato dodecil de sodio, el cual nos permite determinar el peso molecular de las proteínas cuando se comparan con los corrimientos de proteínas con un peso molecular conocido.

Los geles fueron preparados según el sistema discontinuo de Laemmli, usando un gel concentrador o superior de una concentración de acrilamida final al 3%, y un gel separador o inferior al 10%. El gel concentrador se preparó mezclando una solución de acrilamida (BIORAD) al 30%, bis-acrilamida (BIORAD) al 0.6%, Tris-HCl 0.125M, SDS (BIORAD) al 0.1%, solución de N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamina (TEMED) y de persulfato de amonio (BIORAD) al 0.025%, como catalizadores, a un pH de 6.8.

Mientras que el gel separador se preparó mezclando acrilamida al 30%, bis-acrilamida al 0.6%, tris base al 0.375M, SDS al 0.1%, a un pH final de 8.8.

Se depositó aproximadamente 50 ug de proteína por carril en cada gel. Se corrió a una corriente constante de 15 miliamperes en el gel concentrador y a una corriente de 20 amperes para el gel separador, a una temperatura constante de 8 grados centígrados.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo usando como solución amortiguadora: Tris 0.025M, glicina 0.192M, sulfato dodecil de sodio al 0.1%, con un pH 8.3.

Se corrieron al mismo tiempo, proteínas estándares de peso molecular conocido: lisosina de un peso molecular de 14,000 daltones, inhibidor de tripsina de soya, de peso molecular de 21,500 d.; anhidrasa carbonica de 31,000 d.; ovalbumina, de peso 45,000 d.; albumina serica bovina 66,200 d.; fosforilasa -B de 92,500 d., b-galactosidasa 116,250 daltones.

Después del corrimiento electroforético, los geles se tizaron con el colorante azul de coomassie al 0.6% en una solución de metanol-ácido acético a una proporción de 10-20% v/v. Se destilaron con una solución de ácido acético al 10% y se secaron al vacío en un secador de geles (BIORAD). El gel seco se prepara para la autoradiografía, exponiéndolo a un film para rayos X (Kodak X-Omat) previamente sensibilizado, en una cámara oscura, herméticamente cerrada, a una temperatura de -70 grados centígrados.

14) ELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

Se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas marcadas con I-125 a papeles de nitrocelulosa (BIORAD) por 0.45 micras de acuerdo al método descrito por Towbin (104).

El método se basa en la transferencia de las proteínas corridas en los geles de poliacrilamida hacia papeles de nitrocelulosa, usando una corriente constante de 1 amperio, (a 25 voltios), durante 1 hora, a temperatura ambiente. La electrotransferencia se desarrolló usando como solución amortiguadora a una mezcla de Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20%, a un pH de 8.3.

El papel de nitrocelulosa con las proteínas electrotransferidas fue incubado con una solución de albúmina al 3%, en solución amortiguadora de PBS 0.01M, Tween 20 (BIORAD) al 0.1%, durante toda la noche a 4 grados centígrados, en un agitador (Belco). Esta solución se usó para bloquear el pegado inespecífico en el papel de nitrocelulosa. Las tiras de papel de nitrocelulosa se lavaron 5 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, Tween-20 al 0.1%, en un agitador orbital.

Se incubaron posteriormente con el primer anticuerpo, que para este tipo de ensayos fue el suero hiperinmune desarrollado en conejos. Se usó a una dilución de 1:50 durante 3 horas a una temperatura de 37 grados., en un agitador orbital. Después de la incubación, se lavaron 5 veces con una solución de PBS-Tween 20 al 0.1%, en agitación constante. Posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo, que para el tipo de ensayos de detección con un suero hiperinmune, se utilizó a la Proteína A (Amersham), que tiene gran afinidad por los anticuerpos tipo IgG de conejo. Esta proteína se diluyó 1:400 en solución de PBS-Tween 20, y se incubó con las tiras de papel, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se lava 5 veces con la solución de PBS-Tween 20, 0.3%.

Para amplificar la interacción entre primero y segundo anticuerpo, se incubó con la enzima estreptavidina peroxidasa (Amersham), a una dilución de 1:400 con una solución de PBS-Tween 20 al 0.3%. Esta incubación se realizó durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La estreptavidina no enlazada fue removida lavando 3 veces con una solución de PBS-Tween 20 al 0.3%, y un último lavado con solución de PBS. Las bandas de precipitación se hicieron visibles haciéndolas reaccionar con el sustrato 4-cloro-naftol (SIGMA) a una concentración final de 0.05 p/v, además de peróxido de hidrógeno a una concentración de 0.003% y Metanol al 20% en una solución de PBS. La reacción fue detenida añadiendo una solución de PBS-Tween 20 al 0.1%.

15) PURIFICACION DE ANTICUERPOS MEDIANTE LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON PROTEINA A-SEFAROSA

Se usó una columna de Sefarosa-Proteína A (Pharmacia) de aproximadamente 1.0 ml de volumen. Esta columna fue equilibrada con solución de PBS 0.1M, pH 8.0. Se aplicó aproximadamente 0.5 ml (3 veces) de la muestra de suero hiperinmune desarrollado en conejos. Se incubó durante 2 hr a temperatura de 4 grados.

Se usó una solución salina de fosfatos para lavar la columna y eliminar todo lo que no se pegó a la proteína-A. Después de lavar bien la columna, (D.O.=0, a 280 mμ), se eluyó la IgG pegada a la proteína-A con una solución de ácido acético 0.1M con 0.15M de NaCl. Se probó también despegar con una solución de Tris-HCl-Glicina 0.1M a un pH 2.0, dando los mismos resultados. Se colectaron fracciones de 1 ml, a una razón de 0.5 ml por minuto. Se neutralizó con solución de Tris-Base 0.1M, pH 8.0.

Las fracciones con D.O. alta fueron recolectadas y dializadas contra un solución de fosfatos salina 0.1M, pH 7.2 a una temperatura de 4 grados. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Se ajustó a una concentración de 8 mg/ml.

Para verificar la pureza del anticuerpo, este se corrió en una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sulfato dodecil de sodio, en condiciones reducidas, observándose sin contaminaciones aparentes.

Para demostrar la actividad del anticuerpo después de purificado por cromatografía, se realizó una inmunoelectroforesis contra un extracto antigénico de un filtrado de cultivo de micobacterias.

16) MARCAJE DE ANTICUERPOS CON FLUOROCROMOS

Se llevó a cabo el marcaje de los anticuerpos anti-*M. tuberculosis*, con los fluorocromos isocianato de fluoresceína (Sigma) y tetra-metil rhodamina (Molecular probes) de acuerdo al método descrito por Soding (107).

Para esto, se disolvió el isocianato de fluoresceína en solución salina amortiguadora de carbonatos, al 0.5M, pH de 9.2, a una concentración final de 8-10 ug/ml. La muestra se dializó contra una solución amortiguadora de boratos salina, 0.05M, a pH de 8.5, durante 4-5 hrs se cambió posteriormente por una solución amortiguadora de boratos, a pH de 9.2, durante 2 horas, a una temperatura de 4 grados.

El anticuerpo se acopló al fluorocromo cuando se dializó este contra 100 mg de fluoresceína/ml, en solución amortiguadora de boratos, a pH de 9.2 durante 14-16 horas. Luego se detuvo la reacción cuando se dializó la reacción contra una solución amortiguadora de fosfatos, 0.02M, a pH 7.0 durante 2-3 horas.

Para separar la fluoresceína libre de la conjugada. Esta mezcla se paso a través de una columna de Sephadex-G25. Se uso como eluyente a la solución amortiguadora de fosfatos al 0.02M, a pH 7.0.

Se determinó la razón fluoresceína:proteína con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína : Fluoresceína} = \frac{2.67 \times \text{DO } 495}{\text{DO } 280 - 0.35 \times \text{DO } 495}$$

$$\text{DO } 280 - 0.35 \times \text{DO } 495$$

Se uso un rango molar óptimo de fluoresceína: proteína de aproximadamente 2:1.

Mientras que para el marcaje de los anticuerpos con tetra-methyl rhodamina (Molecular probes), esta se preparó a una concentración de aproximadamente 5mg/ml en dimetil sulfoxido. La preparación fue exactamente igual que para el marcaje con isotiocianato de fluoresceína.

17) MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las células fagocíticas se incubaron a una temperatura de 37 grados en pozos de 35 mm, a una razón de 1×10^6 células /ml de medio DMEM, suplementado con SFB al 3%.

Enseguida se infectaron con 1×10^8 micobacterias/ml. Las bacterias fueron opsonizadas con anticuerpos tipo IgG anti-M. tuberculosis acoplado con isotiocianato de fluoresceína (IgG-ITCF). Después de 6 horas de fagocitosis con este tipo de micobacterias, se lavó 3 veces con solución de PBS, y se añadió 1×10^8 micobacterias /ml, esta segunda carga bacteriana fue preparada con micobacterias opsonizadas con anticuerpos tipo IgG anti-M. tuberculosis acopladas con tetramethyl-rhodamina (Research Organics, Co) (IgG-THR).

Después de 1 hr de infección, se lavó con solución de PBS, 3 veces y se fijó con metanol-PBS al 70%, para su observación por microscopía de fluorescencia. Se usó para tal efecto un microscopio de epifluorescencia Zeiss, y filtros de 480-490 para ITF y 510-520 para THR. Se tomaron fotos a 40x, 100x,

usando una película asa-100 (Fujicolor ,S.A.)

IV) RESULTADOS

Se llevaron a cabo los ensayos de fagocitosis de micobacterias a diferentes concentraciones de bacterias en relación a la concentración de macrófagos. Estas proporciones variaron desde 1:10, 1:100, 1:1000 (macrófago:bacterias).

Buscamos obtener una proporción adecuada y suficiente para observar algún efecto sin alterar la viabilidad del macrófago. Estos resultados se muestran en la Tabla II. Se reporta aquí que, al cabo de 360 minutos, el número promedio de bacterias por macrófago, cuando se infecta a una proporción de 1:100, es de aproximadamente 2.3 (D.E. 0.3), mientras que cuando se infectan los macrófagos a una proporción de 1:1000 bacterias por macrófago, el número promedio de bacterias se incrementa a 3.2 (DE 4.9).

La viabilidad de los macrófagos se ve disminuida hasta casi un 40% de células viables a esta proporción de bacterias por macrófago (1:1000). Este resultado se observa en un lapso de 6 horas, mientras que al cabo de 24 hr la viabilidad celular llega a ser de sólo un 20% de la población total. Así que se decidió a realizar infecciones a una proporción de 100 bacterias por cada macrófago.

Tabla II

FAGOCITOSIS DE M. tuberculosis a razón de 1:10, 1:100, y 1:1000 macrófagos:bacterias.

TIEMPO (min)	RAZON 1:10		RAZON 1:100		RAZON 1:1000	
	#Bac#/Mac##	%Viab	#Bac/Mac	%Viab	#Bac/Mac	%Viab
60	0.5	95	2.6	98	2.7	ND
180	1.3	90	2.01	93	6.2	80
360	2.1	ND	2.3	90	4.0	45
24 hr	ND	90	2.0	91	ND	20

Número de Bacterias determinadas por tinción de Ziehl-Neelsen
Análisis de 100 macrófagos
ND = No Determinado

Uno de los posibles mecanismos que ejercen las micobacterias para poder sobrevivir dentro del macrófago es lograr un control en los receptores membranales de las células fagocíticas evitando reinfecciones en el mismo macrófago. Esto es, una micobacteria (s) que ha infectado a un macrófago evitaría la entrada de un número mayor de bacterias en el mismo macrófago.

Entonces diseñamos un experimento en el cual se infecta inicialmente con bacterias opsonizadas con una sonda fluorescente, en este caso anticuerpos tipo IgG acoplados a ITCF, y después de 6 horas se re infecta con una segunda dosis de micobacterias, pero ahora opsonizadas con anticuerpos tipo IgG acoplados a Tetrametil-rodamina.

Se determinó visualmente el número de bacterias opsonizadas con anticuerpos marcados con ITCF, en las células infectadas inicialmente y se reportó como el % de infección inicial, enseguida se determinó el número de bacterias opsonizadas con anticuerpos marcados con tetrametil-rodamina, denominadas como bacterias re infectantes, reportándose estas como % de re infección.

En la figura No 5 se muestra una fotografía de una preparación para microscopía de fluorescencia en la que se observan los macrófagos infectados con micobacterias opsonizadas con anticuerpos fluoresceinados (IgG-ITCF). En la parte superior se muestra la fotografía de macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con IgG-ITCF, vistas a través de un filtro con longitud de onda de 450-490 nm. En la parte inferior se muestra la foto de los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con anticuerpos IgG-ITFC, vistos a través de un filtro con longitud de onda de 520 nm, para THR.

En la figura No 6 se presenta una fotografía de una preparación de macrófagos infectados inicialmente con bacterias opsonizadas con IgG-ITCF, y posteriormente se re infectaron con bacterias opsonizadas con anticuerpos marcados con THR (IgG-THR). En esta se observa que cuando se infecta un macrófago con bacterias fluoresceinadas, este macrófago no muestra indicios de re infección con micobacterias rodaminadas.

Estas observaciones se presentan numericamente en las figuras siguientes. En estas gráficas se muestran los resultados de la fagocitosis de las micobacterias usando dos tipos de sondas, ITCF y THR. En la Figura 7, se reporta el # de bacterias marcadas con IgG-ITF promedio, determinado en una población de 100 macrófagos. El promedio es de 2.3 (S.E. 0.3) bacterias por macrófago. Además se muestra aquí la distribución porcentual de infección en los macrófagos expuestos a bacterias opsonizadas, donde un 44% de macrófagos no están infectados, un 56% tiene entre 1 y 2 bacterias promedio, mientras que un 14% oscila entre 3 y 4 bacterias por macrófago y el restante % contiene al menos 5 bacterias.

En la figura No 8 se observa la distribución porcentual del número de bacterias opsonizadas con IgG-TMR, que infectan a un macrófago inicialmente. Se demuestra que no existe diferencias en el número de bacterias que pueden infectar a un macrófago cuando estas se opsonizan con IgG-TMR.

Mientras que en la figura No 9 se reporta el % de fagocitosis de micobacterias opsonizadas con anticuerpos rodaminados en los macrófagos que han sido infectados inicialmente con bacterias opsonizadas con IgG-ITF. Observese que conforme aumenta el número promedio de bacterias fagocitadas inicialmente (hasta un máximo de 7), una segunda infección se verá reducida en cuanto al número de bacterias que pueden infectar a un macrófago que por lo menos tiene alguna bacteria previamente fagocitada..

Así, de 100 macrófagos contados, un 30% contiene entre 1 y 2 bacterias opsonizadas con IgG-ITF en promedio, y de estas un 60% contiene al menos 1 bacteria opsonizada con IgG-TMR, mientras que un 20% de macrófagos que tiene un promedio de 3 a 4 bacterias opsonizadas con IgG-ITF, contiene un 10 % de bacterias opsonizadas con IgG-TMR y cuando han fagocitado más de 5 bacterias fluoresceinadas, que representan el 15% aproximado de la población total, no se localizan bacterias marcadas con anticuerpos IgG-TMR.

En la figura No. 10, se representa la distribución de los porcentajes de infección en macrófagos que han sido incubados inicialmente con micobacterias opsonizadas con IgG-ITCF y posteriormente infectadas con micobacterias opsonizadas con IgG-Rhodamina. Se obtuvo como resultado que macrófagos que están infectados con micobacterias fluoresceinadas en números menores de 2 bacterias por célula, tienen reinfecciones mayores que las que tienen los macrófagos infectados inicialmente con micobacterias fluoresceinadas en números mayores de 3 bacterias.

Cuando los macrófagos no fagocitan inicialmente micobacterias fluoresceinadas, aproximadamente un 40% de la población total determinada no se reinfecta. Un 30% se reinfecta con un promedio de entre 1-2 bacterias, y el restante 10% se mantiene entre 3 y 4 bacterias reinfectantes.

Comparativamente, cuando las bacterias se infectan con 1 o 2 bacterias fluoresceinadas principalmente, solo un 35% de estas se reinfectan con 1 o 2 bacterias, y un 7% con 3 o 4 bacterias. Cuando la cifra de infección aumenta inicialmente a 3-4 bacterias por célula, el número de bacterias reinfectantes son entre 1 a 2 bacterias por macrófago. Si se fagocitan entre 5 o 6 bacterias inicialmente, un 40% se mantiene sin reinfectarse, un 40% restante se mantiene entre 1-2 bacterias, cuando aumenta a más de 7 bacterias por célula, esta influye para obtener un 40% de reinfección solamente con 1 o 2 bacterias rodaminadas.

Uno de los controles usados fue el de infectar inicialmente con partículas latex, y detectar el efecto de una partícula inerte en la reinfección de los macrófagos. Entonces se incubó inicialmente con partículas latex y luego de 4 horas,

se infectó con micobacterias opsonizadas ya fuera con IgG-ITF o IgG-TMR. Un 30% de los macrófagos no se reinfectan con micobacterias, un 30% contiene entre 1-2 bacterias, un 25 % contiene de 3-4 bacterias, mientras que el restante 15% queda entre 5 o más bacterias. No se observó diferencias significativas entre usar bacterias opsonizadas con IgG-ITF o IgG-TMR. Los resultados se observan en la figura 11, para la fagocitosis de bacterias opsonizadas con IgG-ITF, y la figura 12 para el caso de bacterias opsonizadas con IgG-TMR.

Enfocándose al efecto a nivel de proteínas de membrana de las células fagocíticas, se llevó a cabo un protocolo experimental tal que se pudo comparar la capacidad que tienen las cepas de micobacterias con distinta virulencia, para poder modificar la cinética de cointernalización y de reciclaje de aquellas proteínas que, localizadas en membrana externa, se asocian directa o indirectamente a su fagocitosis.

Este protocolo se basó en poder monitorear las proteínas superficiales antes y después de la fagocitosis de cada una de estas cepas de M. tuberculosis. Este monitoreo se realizó siguiendo la accesibilidad de las proteínas superficiales al marcaje con el isótopo radiactivo, 125 I, después de una cinética de fagocitosis sincronizada. Al final de este marcaje, se enlublizaron los macrófagos marcados en su membrana con NP-40 al 0.5% y se centrifugó a 13000 rpm para separar material pesado del soluble. Enseguida se tomaron alícuotas de estas fracciones solubles y se precipitaron con ATC para determinar la marca total asociada a proteínas. Esta marca la hemos denominado como cpm totales, los resultados se muestran en las figuras 13 a 16.

En estas figuras se reporta el promedio de 2 experimentos realizados por triplicado. Además cada uno de estos datos se han corregido de acuerdo a la concentración en proteínas totales de cada una de las muestras.

Esta determinación se realizó de acuerdo al método modificado de Peterson (119), el cual no se ve afectado por la presencia de detergentes y detecta concentraciones desde 5 microgramos de proteínas.

En la figura No 13a y 13b, se muestran las cinéticas de co-internalización y reciclaje, respectivamente, de proteínas de membrana de macrófagos sin infectar. Esta cinética sirvió como control respecto a la cual se compararon los resultados obtenidos en los siguientes ensayos.

Se observa que cuando se sincroniza a temperaturas menores de 10 grados, las proteínas de membrana aparentemente muestran un ciclo normal para llevar a cabo los procesos de internalización y reciclaje. Este ciclo tiene aproximadamente una duración de 1 hora, a partir del tiempo 0 de la cinética. El tiempo 0 se define como el tiempo a partir de que la temperatura de incubación se eleva a 37 grados.

A partir de aquí se pueden distinguir 2 ciclos sincronizados, donde el macrófago esta internalizando y reciclando sus proteínas de superficie. Cuando se realizó el monitoreo de estas proteínas en macrófagos sincronizados a temperaturas bajas, no se observa una periodicidad aparente en tiempos cortos, tal como lo observamos cuando se lleva a cabo una

sincronización previa. Esto es, la variación en la concentración de proteínas accesibles en la membrana no muestra una periodicidad aparentemente sino hasta las 3 horas de incubación, cuando se disminuye a un 70% del total de proteína accesible.

En las siguientes figuras se muestra el efecto que tienen la fagocitosis de bacterias y de partículas inertes sobre las cinéticas de cointernalización y reciclaje de proteínas membranales cuando se lleva a cabo una sincronización a temperaturas bajas.

Al comparar las cinéticas de cointernalización de las proteínas asociadas a la fagocitosis sincronizada de partículas latex, se observa que en la primera fase, denominada de cointernalización o de fagocitosis, hay una disminución de la marca radiactiva accesible en la membrana, a los 10 minutos de iniciada la fagocitosis. Recuperándose hasta los 30 minutos, cuando nuevamente obtenemos un mínimo en la marca, siendo esta de un 45% del total disponible en la membrana en el tiempo 0 de fagocitosis. Este primer ciclo se completa a los 40 minutos de iniciada la cinética, tal como sucede con los macrofagos que no han sido infectados. Estos resultados se observan en las figuras No. 14a y 14b.

Posteriormente se determinaron 2 ciclos de presentación de proteínas a los 120 minutos y a los 240 minutos.

Sigamos ahora con el efecto que causa la fagocitosis de micobacterias tipo H37 Ra, la cepa avirulenta de M. tuberculosis, y la cepa H37 Rv, cepa virulenta. Estos resultados se presentan en las figuras 15 y 15.

Las cinéticas de las proteínas de membrana asociadas a la fagocitosis de la cepa avirulenta, H37Ra, vivas, presentan un retraso en el primer ciclo que se detecta en los macrofagos normales. Se encontro que hay un mínimo a los 25 minutos de iniciada la fagocitosis, reflejando un retraso en la entrada de proteínas en la membrana, recuperándose hasta los 90 minutos. Tiempo necesario para que se cumpla un ciclo en las células no infectadas. Estos resultados se muestran en las graficas 15a y 15b.

Observamos un efecto similar ocasionada por la fagocitosis de H37 Ra muerta durante el primer ciclo. La figura No. 16a representa esta cinética de cointernalización.

En el segundo ciclo, a los 180 minutos, las bacterias vivas logran retrasar la presentación de proteínas en la superficie del macrofago hasta en un 40% aproximadamente, mientras que las bacterias muertas no inducen cambios en la presentación de proteínas superficiales en el macrofago infectado. Esto se observa hasta las 6 horas de iniciada la cinética. Los resultados se muestran en la grafica No. 16 b.

Cuando se fagocitan bacterias de la cepa virulenta H37 Rv viva, durante la cinética de cointernalización, se observa que a los 25 minutos de la fagocitosis hay un mínimo en la marca que, comparativamente con el control, refleja un retraso en la internalización de las proteínas accesibles en la membrana. Lo mismo sucede cuando se fagocitan bacterias muertas. La marca en la membrana se recupera a los 40 minutos, observándose que la

cepa H37 Rv muerta induce un aumento en la presentación de proteínas de superficie en el macrófago, como se ve en la fig. 17 b.

La cepa H37 Rv viva, por el contrario, inhibe la presentación superficial de las proteínas asociadas a la fagocitosis: retrasa los ciclos hasta las 2 hr. Presenta un mínimo a las 3 hr de iniciada la fagocitosis, recuperándose así a las 4hr y manteniéndose así hasta el final de la fagocitosis. Ver las figuras 18a y 18b.

Se comparó el efecto que pudiera tener sobre las cinéticas la fagocitosis de bacterias extracelulares tales como E. coli. Los resultados muestran que este tipo de bacterias, a diferencia de las micobacterias, estimulan la presentación de proteínas superficiales durante el primer ciclo, manteniéndose así hasta 4 horas después del inicio de la fagocitosis. Presentan un mínimo a los 5 minutos de iniciada esta. El efecto se logra también cuando se fagocitan bacterias muertas. Ver figuras 19a y 19b.

Una de las posibles explicaciones al efecto que producen las micobacterias vivas, es que sea a través de la liberación de factores solubles que actuando a nivel de membrana o de organelos internos como fagosomas, inhiben o activan en todo caso, los mecanismos de movilización y presentación en membrana, de las proteínas que son detectables por marcaje con I¹²⁵. Por lo que se hicieron experimentos de endocitosis con las proteínas del filtrado de cultivo de micobacterias, cepa H37 Rv.

En estos experimentos se determinó que existe un mínimo en la presentación de proteínas de membrana accesibles al marcaje con I¹²⁵, que se observa aproximadamente en 60 minutos, para luego recuperarse a las 2 hr de iniciada la fagocitosis. Se determinó otro ciclo a las 3 hr y solo se recupero hasta el final de la cinética. Ver las Figuras 20a y 20b.

Buscando reproducir el efecto que pudiera tener una célula viva, y metabólicamente activa, se llevó a cabo la fagocitosis de partículas latex, que inducirían un efecto único de fagocitosis, y posteriormente se incubó con extracto de proteínas solubles de M. tuberculosis. Se obtuvo un mínimo a los 5 minutos como en el control y otro mínimo a los 30 minutos, recuperándose así hasta los 60 minutos. A partir de este tiempo, la marca asociada a proteína se mantiene por arriba de un 70% de la proteína disponible en la membrana hasta las 3 horas, cuando se determina otro mínimo. La cinética se recupera lentamente hasta un 80% del total, cuando se llega al final de la cinética de 6 horas. Ver figuras 21a y 21b.

A continuación se muestran los resultados de los ensayos usando una estrategia de sincronización que no requería de incubaciones a temperaturas bajas.

Cuando se comparan las cinéticas de cointernalización y reciclaje, de los macrófagos que han sido expuestos a M. tuberculosis, H37 Rv, vivas, se obtiene un mínimo en la marca radiactiva a los 15 minutos de iniciada la cinética, representando menos del 40% de la marca total en el tiempo 0. Esta marca se recupera rápidamente a los 25-30 minutos y se mantiene en este rango hasta completar un ciclo a los 60 minutos. A las 2 hrs. vuelve a movilizarse hasta en un 40 % del

total y se completa otro ciclo a las 3 horas. Posteriormente se mantiene por debajo del 50 % hasta el término de la cinética. Ver figuras 22 y 23.

Se muestra que el efecto logrado por las bacterias vivas durante la primera fase es similar al producido por la infección con bacterias muertas. La marca se recupera a los 60 minutos y posteriormente se mantiene debajo del 50% del total, tal como lo hacen las bacterias vivas, al final de la cinética. Ver figuras 22 y 23.

Por otra parte, cuando se infectan los macrófagos con las cepas avirulentas, hay un efecto en la movilización de las proteínas de membrana que se encuentran involucradas en el proceso de fagocitosis. A los 25 minutos de iniciada la cinética, la cointernalización provoca un mínimo de marca accesible en la membrana, que representa un 40% del total posible. Este efecto también se observa cuando se infecta con las bacterias muertas. Esto se ve en la figura 24.

Cuando se infecta con bacterias avirulentas vivas, la marca de proteínas accesibles en la membrana se mantiene menor de un 40% hasta las 2 hr de la cinética. Aquí se ve un aumento de un 40%, que se mantiene hasta el final de la cinética.

En el caso de las bacterias muertas, se alcanza un máximo a las 2 hrs., cuando se obtiene casi un 100% más que en la marca original. A partir de este tiempo, la marca tiende a disminuir hasta un 30% del total cuando se termina la cinética.

En los ensayos de fagocitosis de partículas latex, se observa un mínimo en la marca a los 10 minutos, llegando al 50% del total. Posteriormente hay ciclos a los 60 minutos, 120 y en contraste al control, se llega a un 40% a las 3 hrs., manteniéndose así hasta las 6 hr. Ver la figura 26.

La fagocitosis de proteínas de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, provocan un mínimo a los 10 minutos de iniciada la cinética, que representa al 30% del total disponible en la membrana. Recuperándose a un 70%, a los 20 minutos, para luego mantenerse así hasta el final de la cinética. Ver la fig. 27.

En la Figura 28 se muestran las autoradiografías de los geles de polisacrilamida de las proteínas superficiales, marcadas con 125 I. El análisis de estos perfiles electroforéticos muestra que hay proteínas que selectivamente se están co-internalizando con las bacterias, viva o muerta. Resumimos estos resultados en la Tabla No. II

Hemos encontrado una proteína cuyo peso molecular es de 23 Kd desaparece al final de la cinética por efecto de la fagocitosis de micobacterias. Mientras que otra proteína cuyo peso molecular es de 70 Kd y una de 112 Kd se mantienen presentes en el transcurso de toda la cinética. Mientras que una proteína de 30 Kd muestra una cinética similar a la mostrada por las proteínas totales de los macrófagos infectados con bacterias virulentas vivas. Esto es, se obtiene un mínimo a los 15 minutos y un máximo a los 60 minutos.

Llevamos a cabo una serie de ensayos para detectar a los antígenos micobacterianos que pudieran estar presentes en la membrana del macrófago. Seguimos esta expresión antigénica, bajo

las mismas condiciones que se llevo a cabo la cinética de coinernalización y reciclaje de las proteínas de membrana.

Las proteínas de membrana solubilizadas en detergente se corrieron en electroforesis en gels de poliacrilamida y se electrotransfirieron a tiras de papel de nitrocelulosa. Estas proteínas inmovilizadas fueron incubadas con un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis, detectando los antígenos presentes, con el sistema Proteína-A -Biotina, Estreptavidina-Peroxidasa.

Se usaron por supuesto varios controles, uno de ellos usando un primer anticuerpo sin Proteína-A como segundo reactante. El otro consistió en el uso de Proteína A como sonda sin un primer anticuerpo como ligando. Y por último se uso un suero normal como primer anticuerpo.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.

En esta gráfica se presenta el total de bandas representativas de los antígenos que son reconocidas por el suero hiperinmune. Enseguida se muestra la cinética de expresión de antígenos de M. tuberculosis en las membranas de los macrófagos tomando control al tiempo 0, que son los macrófagos sin infectar.

Se han detectado por lo menos 6 antígenos micobacterianos cuyos pesos moleculares oscilan entre 30Kd y 90 Kd. Se observa que hay algunos antígenos que muestran una cinética muy similar a las proteínas del macrófago, mientras que otras tienen un comportamiento diferente.

Se compararon las actividades de cepas de mycobacterias con diferente virulencia, la H37Ra, avirulenta y la H37Rv, la virulenta, así como el efecto de la viabilidad sobre el procesamiento y/o expresión de estos antígenos. Solamente la viabilidad afecta el número y cantidad de antígenos detectables, mientras que la virulencia no tuvo algún efecto.

Cuando se fagocitan micobacterias vivas, se detectan antígenos cuyo peso molecular es de 85Kd, 75Kd, 60 Kd., 52Kd, y 45 Kd, en la fagocitosis de bacterias muertas, se detectan solamente proteínas con P.M. de 45Kd, 53Kd y 35Kd. Probablemente esto se deba en parte al mecanismo de procesamiento antigénico inducido por las bacterias vivas o por la liberación de factores solubles.

En los controles no se observó algún tipo de antígeno o de reacción cruzada.

Otra fase de estos ensayos de detección de antígenos fue la de utilizar como sistema revelador a una serie de anticuerpos monoclonales producidos contra Mycobacterium tuberculosis (110).

En la Tabla III se señalan las características de estos anticuerpos.

TABLA III

CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-M. tuberculosis

Anticuerpo Monoclonal	Clase de Anticuerpo	Antígeno (peso molecular)	Especie
WTB72-A2	IgG1	77 Kd	<u>M. tuberculosis</u>
WTB71-A2	IgG2b/K	44 Kd	"
WTB Ag-B1 TB-78	IgG1	33 Kd	"

Estos anticuerpos monoclonales fueron usados para detectar a los antígenos micobacterianos en los papeles de nitrocelulosa. Cuando se realiza la detección con el anticuerpo monoclonal TB72, este reconoce al menos 2 antígenos. Su peso molecular aproximado es de 76 Kd, y el otro de 48 Kd.

El reconocimiento se realiza tanto en bacterias virulentas vivas como muertas. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal TB78, reconoce también un antígeno de PM 33 Kd y otro de 35 Kd. Mientras que el monoclonal TB71, reconoce una proteína de 41 Kd y otra de 45 Kd.

V) DISCUSION DE RESULTADOS

Una de las principales actividades que desarrollan los macrófagos es, sin duda, la fagocitosis. Este proceso implica en sus etapas iniciales, un reconocimiento a nivel de superficie. Este reconocimiento se sustenta en estructuras, en su mayoría proteínas, que participan en la detección y el anclaje de los "agentes extraños" a la superficie del macrófago, donde a su vez se genera una señal que induce la internalización de estos agentes a través de un mecanismo denominado de "zipper".

Los receptores asociados a la membrana del macrófago tienen las características de ser específicos y/o inespecíficos. Esta característica depende de la naturaleza del ligando, así como la del receptor. Así, por ejemplo, se reconocen en las células fagocíticas receptores específicos para la fracción cristizable de las inmunoglobulinas, Fc. A partir de esta característica se describen dos tipos de receptores Fc, el FcR1 y el FcR2, que dependen principalmente del tipo de inmunoglobulina a la que se pegan (84).

Por otra parte, se describen también los receptores

que median el enlace de aquellas partículas opsonizadas con la fracción C3b del complemento (87). Los receptores no específicos, se caracterizan por mediar el enlace de organismos cuya pared o membrana externa está formada principalmente por glicoproteínas. A este tipo de enlace se le denomina de "puente" (92).

En este tipo de receptores diferentes a los que median respuestas inmunes características, se encuentran también los que han resultado ser específicos para cierto tipo de parásitos, tales como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* (111), y algunos tipos de virus. Se reporta que en el caso de algunas bacterias gram-negativas, existe el consumo de receptores por parte de ciertas especies, para evitar así la entrada de otras bacterias a través de estos mismos receptores (108).

Este primer paso en el proceso de la fagocitosis, determinado por las características del ligando, el receptor y su resultante interacción, es indicador de la(s) ruta (s) posteriores que han de seguir estos complejos ligando-receptor dentro de la célula. Así, se describe como el enlace mediado por un anticuerpo monovalente tendrá como ruta final llegar a un ambiente prelisosomal, donde se separarán ligando y receptor mediante una acidificación de esta vesícula, regresando así el receptor directamente a la membrana de la célula. Cuando este receptor es un anticuerpo polivalente, el camino intracelular que sigue lo lleva directamente a un ambiente lisosomal, donde ligando y receptor se separan, pero el receptor ya no se recicla a la membrana (112).

Al parecer se han encontrado modificaciones significativas en la concentración y actividad de ciertas proteínas de membrana, por efecto de la fagocitosis (113). Estos cambios se han observado a través de un seguimiento con marcaje radiactivo y por análisis en electroforesis en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones.

Los experimentos desarrollados en este trabajo de tesis son consistentes en cuanto a los resultados que se han obtenido previamente por estos autores. La búsqueda primara de receptores específicos y de cambios, posteriormente, a nivel de proteínas de membrana por efecto de la fagocitosis, han activado el desarrollo de un modelo que sirva para ayudar a entender mejor la relación que se establece entre un parásito intracelular y la célula hospedera.

En el caso de *M. tuberculosis* no se ha encontrado un receptor específico a nivel de membrana que promueva su entrada a las células fagocíticas. Se han enfocado los estudios a nivel de comportamiento de micobacterias opsonizadas, las cuales median su enlace e internalización en el macrófago a través de receptores para la fracción Fc de los anticuerpos que se hallan opsonizando a las micobacterias. Al respecto se reporta que monocitos humanos de pacientes tuberculosos, muestran un aumento en el número de receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas.

En la lepra, se reporta que *M. leprae* está aparentemente modulando los receptores inmunológicos, tipo Fc, que se hallan disponibles en las membranas de los macrófagos

infectados inicialmente (109).

Reportes recientes muestran que probablemente haya algun tipo de receptor en las células oligodendrocíticas sobre la cual *M. leprae* se adhiere y penetra a estas células (114). Este reporte indica también la probabilidad de que sea una glicoproteína con residuos de manosa (115).

De igual forma dadas las características que tiene *M. tuberculosis*, es importante conocer o determinar en la relación que se lleva a cabo entre la célula huésped y la micobacteria, cuales son las primeras etapas, sobre todo a nivel de membrana. Es posible que las micobacterias ejerzan un control en la infección inicial, modificando las características a nivel de receptores y en las características propias que le dan a la membrana una fluidez y una dinámica propia?. Se ha reportado recientemente que extractos de pared de cierto tipo de micobacterias ejercen cambios a nivel de la fluidez de membrana. Estos cambios indudablemente que afectan el reconocimiento entre células, caso concreto el de la actividad citotóxica de los macrófagos en contra de células tumorales.

Que cambios induce internamente una bacteria o extracto proteico de estas, en los macrófagos infectados tal que entre otras características promueva un aumento en su actividad fagocítica?, o provoquen la liberación de factores supresores?.

La bacteria reclutaria específicamente receptores membranales, independientemente de su opsonización, internalizándose en la célula, formando un ambiente favorable para su sobrevivencia. Esto se basaría principalmente en el bloquear la acidificación de los fagosomas, que normalmente generaría una posterior fusión entre estos y los lisosomas, o en el escapar del fagosoma hacia el espacio intracitoplásmico. En algunos casos se reporta la inactivación de las enzimas lisosomales, esto pudiera ser a través de la liberación de factores solubles.

Los resultados mostrados aquí, pueden ser indicativos de la capacidad que tiene un parásito intracelular para modificar una dinámica membranal. Esta dinámica se manifiesta por una actividad de internalización y de reciclaje de las proteínas de membrana, y de su síntesis de novo.

Se reporta que el macrófago interioriza el 50% de su membrana aproximadamente en 30 minutos y se renueva por completo a las 6 horas.

En estudios realizados con microscopía electrónica se observó que un 25% de polipeptidos membranales marcados por iodación, se internalizan rápidamente, con una vida media de 20-25 minutos, mientras que el 75% restante permanece en la membrana con una vida media de 7-9 horas. A los 15 minutos se observó la marca en vesículas, mientras que en lisosomas se detectó a los 30-45 minutos, y en aparato de Golgi a los 30 y 90 minutos.

Estos datos proveen información acerca de la existencia de un flujo bidireccional entre membrana y lisosomas, además indica que la ruta que siguen las proteínas membranales

puede ser también dirigida hacia el aparato de golgi.

Estas determinaciones se correlacionan bien con la cinética de fagocitosis desarrollada. Esta se dividió en dos etapas: una en la que al cabo de 30 min se internaliza y otra al cabo de 4 hr, denominada de reciclaje.

Se determinaron las cinéticas en macrófagos sin infectar, de acuerdo a dos estrategias: la primera basada en una sincronización a temperaturas menores de 10 grados, la otra sin sincronización, llevándose a cabo a 37 grados. La primera se basó en sincronizar a bajas temperaturas, durante 1 hora, tiempo en el que se retrasan los procesos dinámicos a nivel de membrana. El tráfico de membrana hacia lisosomas y Golgi prácticamente se detiene. Cuando se sube la temperatura a 37 grados, estas proteínas se movilizan rápidamente de la membrana hacia los lisosomas y/o compartimentos intermedios.

En la cinética desarrollada en las células fagocíticas, sin infectar, sincronizando a temperaturas menores de 10 grados, se observaron 2 ciclos definidos de internalización y reciclaje. El primero se lleva a cabo después de 1 hora de iniciada la cinética, tiempo suficiente para que el macrófago internalice su membrana de un 30 a un 50%, y el reciclaje. Después de este ciclo, los macrófagos muestran otros dos ciclos, con máximos y mínimos con una periodicidad de 1 hora.

Si no se realiza una sincronización a temperaturas de 10 grados, no observamos ciclos tan definidos como en las células sincronizadas. Solo en tiempos muy largos detectamos cambios que involucran un 30-40 % del total de proteínas accesibles a la marca radiactiva en el tiempo 0.

Estos resultados indicaban que había un efecto de temperatura tal que sería difícil no asociar este a alguno de los cambios provocados directamente por la fagocitosis de bacterias, por lo que se decidió comparar estos 2 tipos de estrategia de fagocitosis. Además, cuando se llevan a cabo sincronizaciones de fagocitosis, es muy importante tratar de adecuar la adherencia de las bacterias a los macrófagos en un tiempo razonable, y a temperaturas tales que los niveles de internalización sean mínimos. Con esto se evita que bacterias que no hallan sido adheridas en un tiempo razonable, se estén fagocitando posteriormente, alterando así las cinéticas de internalización y reciclaje.

Al comparar estas dos estrategias, buscamos algún tipo de similitud en los efectos provocados por las micobacterias en tiempos tardíos de las cinéticas de fagocitosis.

Cuando se ha llevado a cabo la fagocitosis de partículas latex, en una forma sincronizada, no se observan alteraciones de los ciclos de procesamiento normales en el macrófago tal como se esperaría si suponieramos efectos a nivel de estructuras bacterianas características y por supuesto de la actividad metabólica característica de una célula bacteriana. Se observa una internalización de un 50% del total de la membrana a los 30 minutos. En la segunda fase se observan 2 ciclos, a las 2 y 4 horas de la cinética. El número de partículas que puede ingerir el macrófago es difícil de controlar.

Se ha observado (datos no publicados) por microscopía electrónica, que aproximadamente 20-25 partículas latex son ingeridas por macrófago.

Cuando se lleva a cabo la fagocitosis de bacterias que no necesariamente tienen las características de ser parásitos intracelulares como las micobacterias, y además poseen una estructura química en la pared distinta y una actividad bioquímica muy diferente, como es el caso de las Escherichia coli, se observan patrones de conducta distintos a los observados para las partículas latex y para las micobacterias.

En este caso se observa que hay un aumento de la cantidad de proteínas accesibles a la marca radiactiva, probablemente asociada a una activación macrofágica, causada tal vez por el lipopolisacárido de la pared de la E. coli.

En las cinéticas de fagocitosis sincronizadas, la presencia de micobacterias vivas o muertas es suficiente para retardar el primer ciclo de esta cinética que se da en los macrófagos sin infectar. Es evidente en este resultado el efecto que está teniendo la pared bacteriana, la cual se mantiene intacta en las bacterias muertas, o por lo menos la mayoría de los componentes que estarían afectando el movimiento membranar en el macrófago. En este caso una interacción entre la pared bacteriana y la membrana del macrófago, a nivel de los fosfolípidos cargados negativamente, impediría un movimiento rápido o alteraría la fluidez de la membrana. Esto afectaría quizás la agregación de receptores y su posterior internalización, por lo menos en un tiempo largo, que se vería reflejado en un mínimo en la marca disponible en membrana a los 25-30 minutos de iniciada la sincronización.

En esta etapa, cuando se realiza una infección no sincronizada de bacterias vivas, observamos un mínimo a los 15 minutos, mientras que en las muertas se observa a los 25 minutos, comparable a la infección llevada a cabo sincronizadamente.

En la segunda fase, cuando se compara la infección sincronizada de micobacterias virulentas muertas, se observó que inducen un aumento en la presentación de proteínas en la membrana; mientras que al contrario de estos efectos, la fagocitosis no sincronizada, retardan la presentación de estas proteínas a partir del segundo ciclo, hasta el final de la cinética.

El hallazgo relevante es cuando se comparan las cinéticas de las bacterias vivas virulentas, tanto en infecciones sincronizadas como en no sincronizadas. Se observa que a partir del 1er. ciclo, a los 60 minutos, hay un efecto sobre el segundo ciclo a los 120 y a los 180 minutos, en que se llega a un mínimo de marca disponible en la membrana, recuperándose en el siguiente ciclo, y así al final de esta cinética se mantiene por debajo del 50%, indicando probablemente un efecto en la presentación de proteínas que se sintetizan de novo, o se están reciclando.

Así, hay un efecto muy importante de las bacterias vivas virulentas sobre la dinámica de las proteínas de membrana del macrófago, y que es independiente del efecto de temperatura en la sincronización de la infección.

Mientras que las bacterias virulentas, muertas, en infecciones sincronizadas, al parecer inducen una activación a nivel de membrana caracterizada por un aumento en la presentación de proteínas accesibles a la marca radiactiva.

Las bacterias avirulentas muertas, también producen este efecto en tiempos largos de la infección.

Cuando se realiza el experimento con un extracto proteico de un filtrado de cultivo de M. tuberculosis, cepas virulentas, se tiene que el efecto se traduce en un retardo de la cinética de co-internalización hasta los 15 minutos, donde se obtiene un mínimo en la marca, este mínimo es el mismo que se produce cuando se infecta con la bacteria completa. Después se empieza a recuperar a los 30 minutos, cerrándose así un ciclo a los 60 minutos. Posteriormente a partir de los 120 minutos, cuando se cumple el segundo ciclo, el extracto proteico provoca una caída gradual en la cantidad de proteínas accesibles en la membrana.

Este comportamiento se asemeja al provocado por las bacterias vivas en tiempos largos, por lo que considero que el efecto en esta etapa de la cinética se debe en gran parte a la liberación de factores solubles bacterianos.

Los efectos mostrados hasta aquí, pueden ser indicativos de la capacidad que tiene una bacteria intracelular, para modificar una dinámica membranaral. Esta dinámica como lo hemos planteado, se manifiesta por una actividad de internalización y reciclaje de proteínas, así como de una síntesis de novo.

Evidentemente la temperatura no es el único método para sincronizar a una célula, hay numerosas drogas reportadas en la literatura que podrían afectar el ciclo celular y las dinámicas a nivel de internalización y de tráfico intracelular, consideramos hacer solamente este tipo de sincronización. Será interesante realizar posteriormente otro tipo de sincronización, que ayude a resfirmar o no estos resultados.

Quisiera discutir un poco mas el efecto provocado por las micobacterias en las siguientes figuras. En la figura No 30, se muestra que cuando se lleva a cabo la primera fase, de co-internalización, se afecta cuantitativamente más cuando se lleva a cabo la fagocitosis de las cepas avirulentas, que cuando se compara con un extracto proteico de un filtrado de cultivo de M. tuberculosis, cepa virulenta. Llegando hasta un 20% del total de marca accesible en la membrana para el primer caso, mientras que cuando se lleva a cabo con cepas avirulentas, este llega a ser de un 50%. El control tiene un mínimo en esta etapa de un 65%.

A pesar de que hasta el momento no hay un indicativo aparente de virulencia, estos efectos pudieran estar asociados parcialmente a este efecto de virulencia.

En esta etapa las bacterias virulentas vivas tienen un efecto de promoción de la presentación de las proteínas de superficie inmediatamente después de lograr un mínimo. El % al que llegan es de un 80% respecto del total posible al tiempo cero, a los 25 minutos de iniciada la cinética. Las bacterias

mueras logran disminuir hasta un 20% del total, a los 30 minutos, logrando completar así un ciclo.

El extracto proteico llega a tener hasta un 63 % del total posible en el tiempo inicial aparentemente, el extracto proteico solo puede llegar a este nivel de disminucion durante toda la cinetica. Ver figura No. 31.

En las figuras 32 y 33 se muestran los máximos y mínimos obtenidos en la segunda etapa de la cinetica. En el caso de las bacterias virulentas vivas, es de un 10% más del que se tiene en el tiempo inicial. Las bacterias virulentas muertas se mantienen cerca del 100% cuando llegan a su máximo. En cambio las bacterias avirulentas promueven la presentación de proteínas en los macrofagos infectados hasta en un 40% más del total en el tiempo 0. Las bacterias muertas lo llevan hasta un 100% más del inicial cuando logran llegar a un máximo. Esto es muy interesante, ya que significaría por un lado que las bacterias avirulentas tienen la capacidad de promover la presentación de proteínas mas que las virulentas, por otro lado, las virulentas no generan una respuesta mas alla de la normal, completando sus ciclos con casi el % inicial.

En el caso de los mínimos en esta segunda etapa, las bacterias vivas o muertas, virulentas o avirulentas, provocan un mínimo correspondiente al 20%.

Cuando se analiza individualmente el comportamiento de las proteínas asociadas a la membrana, participantes en el proceso de la fagocitosis de las cepas virulentas y avirulentas de M. tuberculosis, se observa que hay proteínas que siguen las cinéticas como el total de las proteínas, indicando que su participación está asociada a la entrada de bacterias. Dentro de este grupo hemos detectado a proteínas cuyo peso molecular es de 28 Kd, 20Kd, 35 Kd, 45 Kd. Mientras que otras al parecer no participan directamente en este proceso pero siguen una cinética independiente del proceso fagocítico, tal es el caso de una proteína cuyo peso molecular aparente es de 110 Kd. Esta se internaliza a los 20 minutos y desaparece después de 4 horas de fagocitosis. Esta proteína pudo haber seguido la ruta siguiente, se internaliza junto con la bacteria, pero al llegar a lisosomas, esta no se recicla ya sea por una alcalinización producida por la misma bacteria o por su destrucción en el lisosoma por efecto de un pH ácido. Solo al cabo de 4 hrs. cuando se ha enviado una señal a ribosomas para síntesis de novo, y quizás la proteína haya sido glicosilada al pasar por Golgi, esta reaparece en la membrana. Ahora bien, si esta proteína es degradada, algunos de estos péptidos probablemente deben haber sido exocitados.

Se ha reportado que la fagocitosis requiere de cierto tipo de proteínas diferentes a los receptores inmunológicos, que dependiendo del ligando, son co-internalizados y posteriormente degradados en las vesículas lisosomales, detectándose después fragmentos correspondientes de menor peso molecular.

Por otra parte se reportan cambios en las proteínas de membrana por efecto de la fagocitosis de bacterias gram negativas, lo que resulta en la agregación de los leucocitos

polimorfonucleares. Detectar la presencia de una proteína de 150 Kd., asociada a la agregación celular. Estos experimentos demuestran la importancia de los receptores en membrana cuando se lleva a cabo la fagocitosis.

En experimentos realizados en nuestro Laboratorio se ha obtenido información acerca de este fenómeno, en el cual proteínas solubles filtradas de medio de cultivo bacteriano, han provocado efectos inhibitorios en la adherencia y en general en la morfología de las células fagocíticas. Es probable que algunas de las proteínas que han desaparecido en la membrana puedan estar relacionadas con el efecto de adherencia. Se requiere de un análisis más profundo de estos fenómenos, que evidentemente afectan en la dinámica de la membrana celular.

Se ha tratado de identificar alguna proteína de membrana que sea específica en el reconocimiento de micobacterias, o que participe en ningún proceso regulatorio inducido por la fagocitosis. Sin embargo no se ha encontrado algún tipo de marcador que diferenciara la entrada de bacterias virulentas de las avirulentas.

Comparando el sistema de detección en la fagocitosis de micobacterias virulentas, vivas o muertas, tenemos que cuando se usa el suero hiperinmuno se reconocen en las bacterias vivas aproximadamente 5 antígenos, cuyos pesos moleculares son de 85Kd., 75 Kd., 48 Kd., 53 Kd y 45 Kd., mientras que en las bacterias muertas proteínas de peso molecular de 65 Kd., 59 Kd., y 35 Kd. Esto pudiera ser el resultado de un procesamiento antigénico diferencial, o debido a que los antígenos que se encuentran inactivados en el papel de nitrocelulosa no sean necesariamente idénticos conformacionalmente a los presentados in vivo. Esto ha sido siempre un grave problema para la detección de antígenos bacterianos y de otro origen, ya que las reacciones cruzadas son muy altas y el sistema de revelado no es lo suficientemente adecuado para detectarlos.

Uno de los inconvenientes es que las proteínas se encuentran en una forma no nativa y, por tanto, la conformación que guardan en el papel de nitrocelulosa muchas veces impide el reconocimiento de los epítopos a los cuales va dirigido el anticuerpo.

Usamos una serie de monoclonales contra antígenos purificados de extracto proteico de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, para mejorar la detección de estos antígenos y poder asociarles algún tipo de función o actividad biológica en la relación bacteria-huesped. Estos monoclonales denominados como MTB71, MTB76, y MTB72 reconocen antígenos micobacterianos de un peso molecular de 44Kd., 33 Kd., y 77 Kd., respectivamente.

Cuando los probamos contra estas membranas de macrófagos infectados con bacterias vivas virulentas y virulentas muertas, encontramos que reconocían estos antígenos en las células a partir de los 5 minutos, y se mantenían así durante toda la cinética, excepto para el caso de el antígeno cuyo peso molecular era de 29 Kd el cual se observó que a partir de los 6 horas había desaparecido de la membrana de los macrófagos

infectados con bacterias vivas o muertas. El antígeno de peso molecular 93 Kd, se halla presente durante toda la cinética; probablemente éste antígeno tenga una gran afinidad por la membrana del macrófago y sería un buen candidato para el estudio de su procesamiento independiente de los otros antígenos. El antígeno de peso molecular 77 Kd solo se localiza en los primeros minutos de la cinética, y desaparece hasta las 4 horas de iniciada la cinética; probablemente éste antígeno es procesado por los macrófagos infectados con bacterias vivas virulentas y desechado por vía de exocitosis. En las bacterias muertas no se observa. De igual forma detectamos un antígeno de PM de 68Kd. Este antígeno ha sido un candidato para usarlo en el diagnóstico de la tuberculosis, así como en el desarrollo de una vacuna. Este antígeno permanece en membrana durante toda la cinética. Uno de los problemas a los que nos enfrentamos es el de purificar realmente membranas plasmáticas y evitar contaminantes; no estamos ajenos a ésta crítica, sin embargo, éstos resultados son tentativos, para poder explicar un fenómeno a nivel de membrana.

Los resultados dan pautas para seguir en ésta búsqueda de respuestas para explicar uno de los tantos procesos que induce la fagocitosis de un parásito intracelular con las características de M. tuberculosis.

Otro de nuestros resultados interesantes, es el efecto que tienen las bacterias que han sido fagocitadas inicialmente por un macrófago, sobre una segunda carga de micobacterias. Hay varios puntos a decir sobre este fenómeno; según nuestros resultados, cuando se fagocitan más bacterias en la primera carga bacteriana, que tiene como promedio de 2 bacterias por macrófago, la segunda carga bacteriana infectará menos a las que tengan dentro mayor número de bacterias. Esto, en pocas palabras significaría que hay un efecto de las bacterias que infectan primero, tal que impiden la reinfección en estos macrófagos. Este efecto se ha visto cuando hay competencia por receptores entre bacterias gram negativas, para con leucocitos policromoculares.

Considero aquí que entre otras causas probables, sea que debido a que la fagocitosis de partículas tiene una cinética tipo Michaelis - Menten, se llega a un estado de saturación tal que el macrófago ya no puede fagocitar más.

Otra posible explicación es que las bacterias que infectan primero a una célula fagocítica afectan a los receptores impidiendo su regreso a la membrana plasmática, y por tanto la internalización de bacterias adicionales. Esto se podría lograr a través de una alcalinización lisonal mediada por factores asociados a la superficie bacteriana o por la liberación de factores solubles al medio, donde los receptores se separarían de sus ligandos por efecto de un pH ácido.

VI) CONCLUSIONES

Hemos caracterizado los ciclos de cointernalización y reciclaje de las proteínas que se encuentran accesibles en la membrana del macrófago, cuando se monitorean con el marcaje radiactivo usando el isótopo I^{125} y catalizado con lactoperoxidasa. Estos ciclos de internalización se pueden sincronizar a temperaturas de 4 grados centígrados. Cuando se realiza esta sincronización se pueden detectar ciclos de cointernalización y reciclaje que duran aproximadamente 40 minutos. Hemos detectado un mínimo a los 5 minutos y un máximo de la marca accesible respecto al inicio de la cinética, en los 40 minutos después de iniciada ésta.

La fagocitosis de Mycobacterium tuberculosis altera la cinética de cointernalización, retrasando la entrada de estas proteínas hasta los 25 a 30 minutos. Este retraso se refleja cuantitativamente en casi un 50% del total de marca accesible en el tiempo cero.

Las bacterias vivas virulentas provocan un retraso en la segunda etapa, denominada de reciclaje, de hasta 1 hora, comparativamente a las células sin infectar.

Las bacterias vivas avirulentas provocan un retraso en la cinética hasta las 2 horas, a partir del cual mantiene el nivel de marca menor de un 50% hasta las 4 horas.

Las bacterias muertas avirulentas, modulan la cinética sincronizada, tal que, son capaces de modular la presentación de proteínas después del segundo ciclo. Esta modulación se ve reflejada en un aumento en la marca radiactiva accesible en la membrana respecto del tiempo 0. Esta se mantiene hasta el 3 er. ciclo.

Cuando se compara el efecto que tienen bacterias que no se encuentran normalmente de vida intracelular, que además se componen de una pared muy diferente a la de M. tuberculosis, tal como las E. coli, se observó que tienen efecto sobre la presentación de proteínas, aumentando esta en el primer ciclo, manteniéndose así hasta casi el final de la cinética.

La fagocitosis de partículas latex no logra alterar los ciclos de procesamiento y reciclaje de las proteínas de membrana externa de los macrófagos, cuando se realiza una cinética sincronizada a 4 grados.

Las proteínas que se obtienen de un filtrado de un cultivo de M. tuberculosis, logran modificar las cinéticas de cointernalización, retardando la movilización de estas proteínas de membrana hasta en 1 hora. Mientras que en tiempos posteriores el efecto es tal que retarda las cinéticas de reciclaje. En esta etapa el efecto de las proteínas solubles es muy parecido al efecto que logran las bacterias vivas virulentas en una

fagocitosis sincronizada.

Cuando se comparan las cinéticas de cointernalización y reciclaje de las proteínas marcadas con I¹²⁵ de fagocitosis no sincronizadas a temperaturas menores de 4 grados, se observaron efectos muy diversos, debido a que las sincronizaciones no son posibles a tiempos cortos. Sin embargo las bacterias vivas virulentas logran producir efectos muy similares en las cinéticas de cointernalización y reciclaje a las producidas en las fagocitosis sincronizadas.

Consideramos de valor, estos resultados ya que probablemente el efecto que se está llevando a cabo sobre la membrana sea por un lado, en etapas iniciales de la fagocitosis, un efecto de superficie, debido a las características superficiales de la pared de las micobacterias, que influyen sobre la movilidad de los receptores y sobre la fluidez de la membrana, alterando los patrones normales de cointernalización de estas proteínas.

Por lo que se refiere a las etapas tardías, cuando se están desarrollando los procesos de reciclaje de estas proteínas cointernalizadas con las micobacterias, se observan efectos moduladores debido principalmente a la liberación de productos solubles micobacterianos en el lumen de las vesículas fagocíticas, retrasando el reciclaje de ciertas proteínas y evitando por completo el de otras.

Por tanto, algunas proteínas de la superficie del macrófago son selectivamente internalizadas con la bacteria, de éstas, algunas son degradadas como resultado de la fagocitosis de estas micobacterias, mientras que otras solo en tiempos tardíos se observan de novo en la superficie.

Estos efectos moduladores de los receptores en la superficie del macrófago, se ven reforzados por el hallazgo de que una carga bacteriana inicial de micobacterias sobre el macrófago provoca tal efecto que la disponibilidad de receptores está disminuida para que una segunda carga bacteriana tenga posibilidades de reinfectar a estos macrófagos. Suponemos que hay un límite de bacterias que pueden infectar inicialmente a un macrófago y que estas bacterias son lo suficientemente activas para modular su microambiente tal que no tengan competencia por él y así poder replicarse lo mas adecuadamente posible.

El macrófago tiene importantes tareas en la regulación inmune. Una de ellas, es sin duda, el procesamiento y presentación antigénica a otras células del sistema inmune. Este procesamiento implica la degradación de los microorganismos o material particulado que está siendo fagocitado.

El procesamiento de antígenos de macrófagos infectados con M. tuberculosis está influenciado principalmente por las características superficiales y la actividad metabólica que desarrollan las bacterias intracelularmente para poder luchar por su supervivencia.

Hemos podido detectar por medio de la técnica de inmunoelectrotransferencia a los antígenos predominantes en las membranas de los macrófagos de la línea celular J774.1, que se han infectado con M. tuberculosis.

Los pesos moleculares de los antígenos predominantes que se han detectado usando un suero hiperinmune anti-*M. tuberculosis* son: 60Kd, 45 Kd, 45 Kd, 37 Kd y 14 Kd.

Esta cinética de presentación no depende de la virulencia.

Se usaron también una serie de anticuerpos monoclonales, que son capaces de distinguir antígenos específicos de *M. tuberculosis*, sin embargo, se reconocieron también otros antígenos diferentes a los que originalmente han sido dirigidos. Existiendo una gran reacción cruzada con otras proteínas o productos de degradación bacteriana. Los pesos moleculares son de 77 Kd, 44Kd, 33 Kd.

En general las cinéticas de presentación de antígenos bacterianos se correlacionan con la dinámica total de las proteínas que se cointernalizan y se reciclan en el macrófago. Solo algunos antígenos pudieran estar actuando independientemente de estas dinámicas.

Para finalizar se podría hablar de un posible modelo que mejor resumiera estos hallazgos. Esto se muestra en la figura No. 25. *M. tuberculosis* ejerce como mecanismo de defensa la modulación de las dinámicas y tráfico intracelular de las proteínas asociadas a su fagocitosis. Esta modulación puede ser a nivel de impedir el reciclaje de proteínas membranales o de impedir su síntesis de novo. Así mismo la liberación de factores solubles pueden estar ejerciendo diferentes efectos moduladores de la actividad del macrófago.

FIGURA No. 5
FAGOCITOSIS DE *Mycobacterium tuberculosis* OPSONISADO CON
ANTICUERPOS TIPO IgG ACOPLADOS CON ITFC.



FIGURA No 3
FAGOCITOSIS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS OPSONIZADO CON
ANTICUERPOS TIPO IgG ACOPLADOS CON TBN POR MACROFAGOS
PREVIAMENTE INFECTADOS CON IgG-ITFC

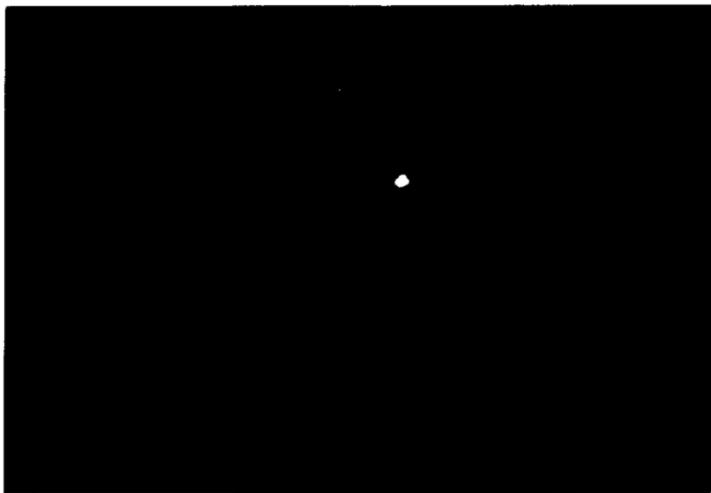


FIGURA No. 7

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA FAGOCITOSIS CON M. tuberculosis
OPSONIZADAS CON IgG-ITF

FU

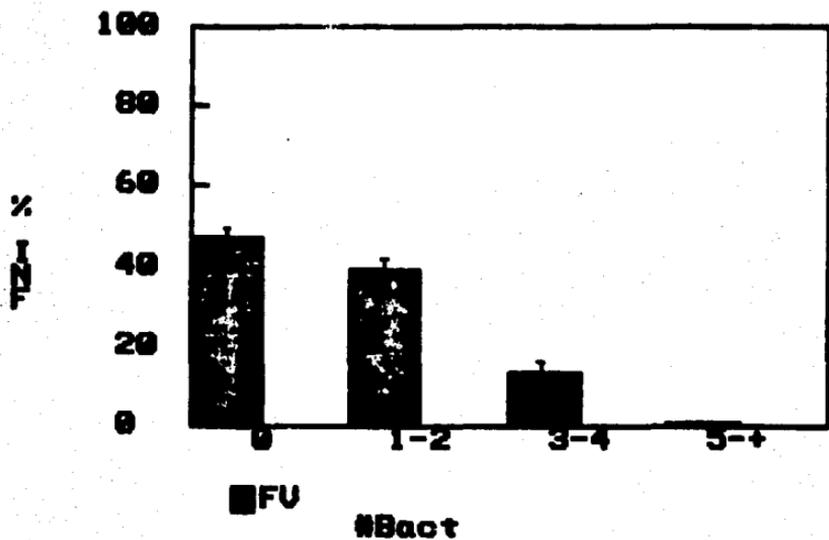


FIGURA No. 8

DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL % INFECCION CON M. tuberculosis
OPSONIZADO CON IgG-TMR

RhU

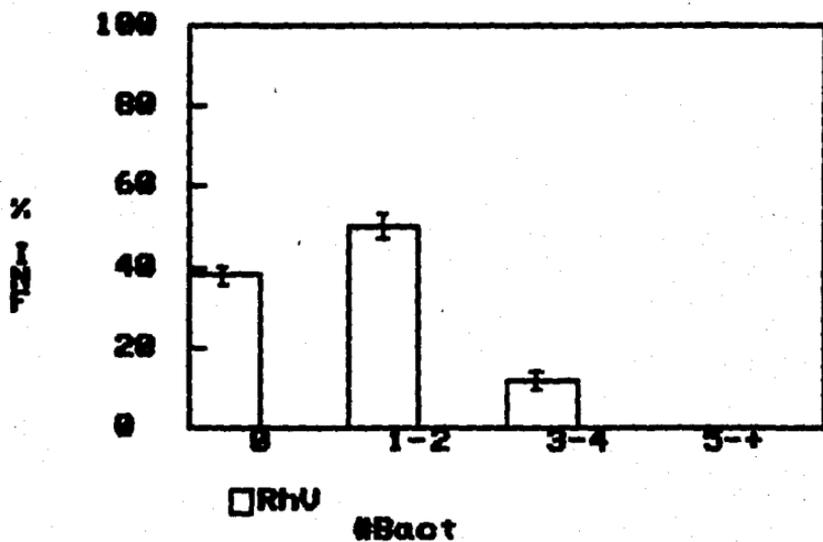


FIGURA No 9

FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS OPSONIZADA CON THP POR EFECTO DE UNA PREVIA FAGOCITOSIS CON M. TUBERCULOSIS OPSONIZADA CON ITF

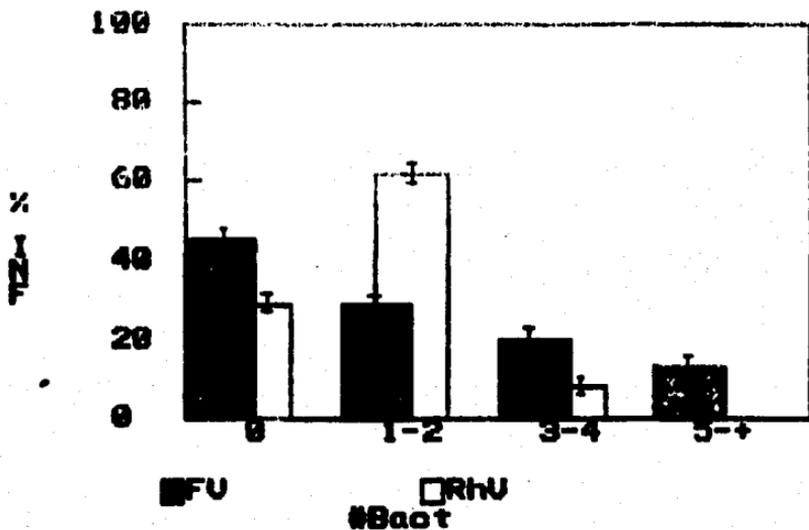


FIGURA No 10

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS
OPSONIZADAS CON TMR POR EFECTO INICIAL DE LA FAGOCITOSIS DE
M. TUBERCULOSIS OPSONIZADA CON ITF

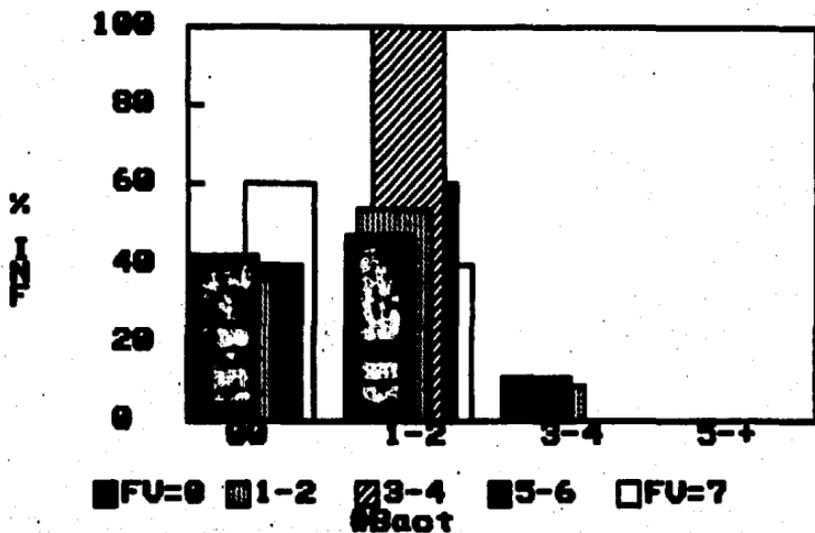


FIGURA No 11

FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS OPSONIZADAS CON ITF POR EFECTO DE LA FAGOCITOSIS DE PARTICULAS LATEX

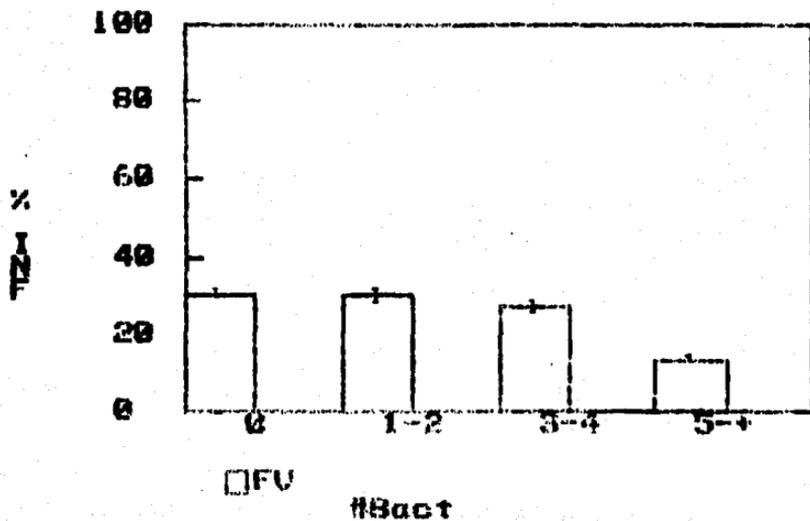


FIGURA No. 12

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA FAGOCITOSIS DE M. tuberculosis
OPSONIZADAS CON MF, PREVIA INGESTION DE LATEX

L + FU

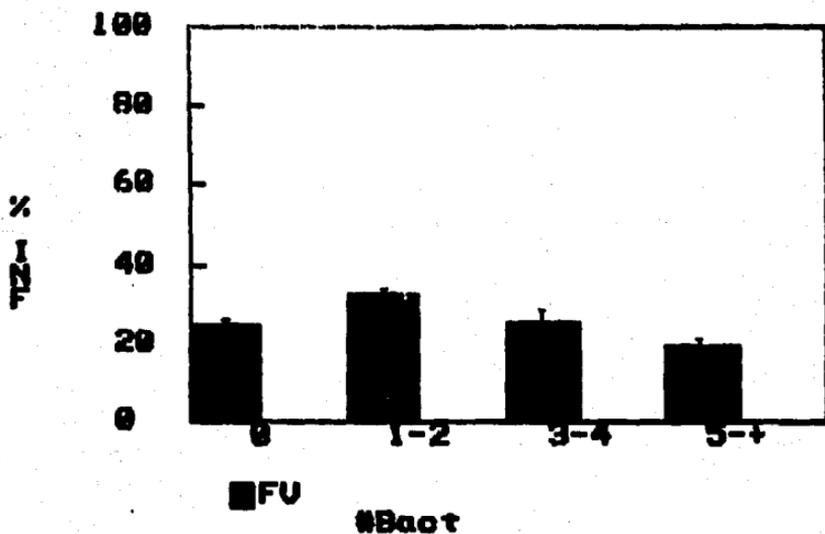


FIGURA No. 13a

CINETICAS DE COINTERNALIZACIÓN DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A MEMBRANA EXTERNA DE MACROFAGOS DE LA LINEA CELULAR J774 MARCADAS CON 125 , SINCRONIZADAS A 4 °C .

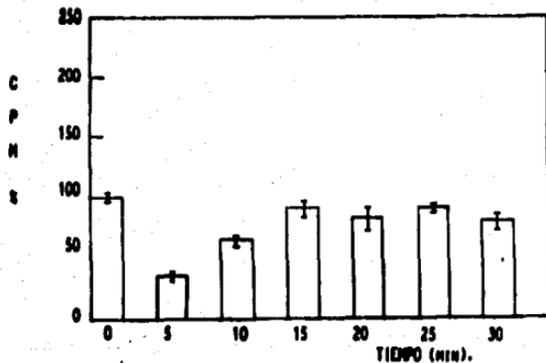


FIGURA No. 13b

CINETICAS DE REGICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA MEMBRANA EXTERNA DE MACROFAGOS DE LA LINEA CELULAR J774.1 , MARCADAS

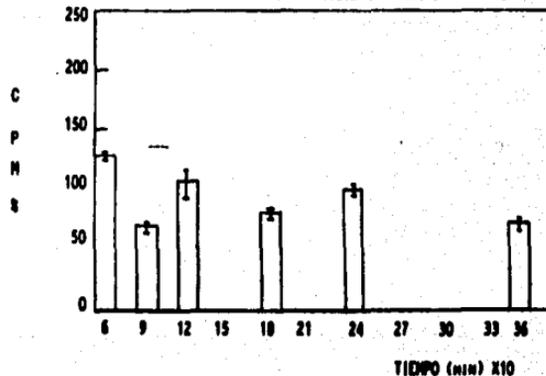


FIGURA No 14a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE MACROFAGOS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE LATEX

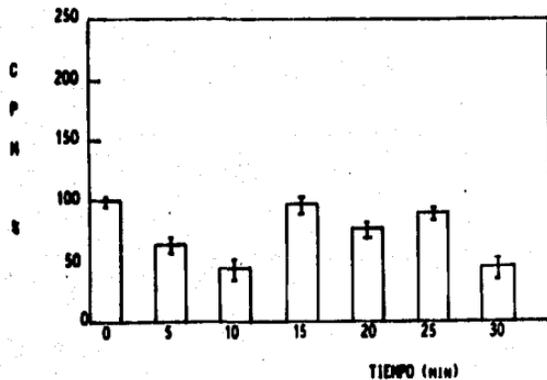


FIGURA No 14b

CINETICAS DE RECICLAJE DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA DE MACROFAGOS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE PARTICULAS LATEX

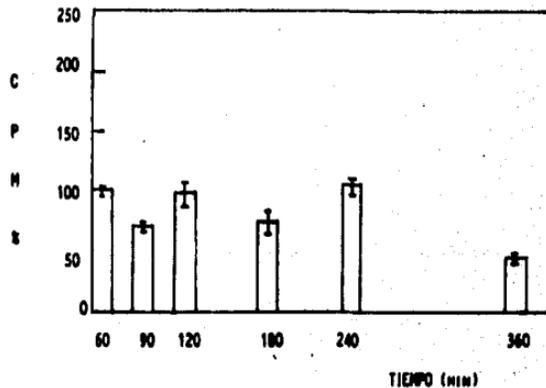


FIGURA No 15a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE *M. TUBERCULOSIS* , CEPA H37 Ra VIVA

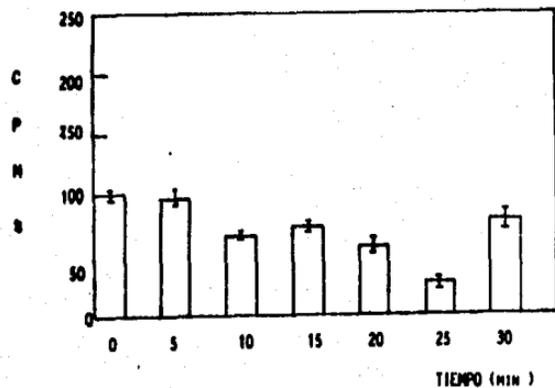


FIGURA No 15b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* , CEPA H37 Ra VIVA

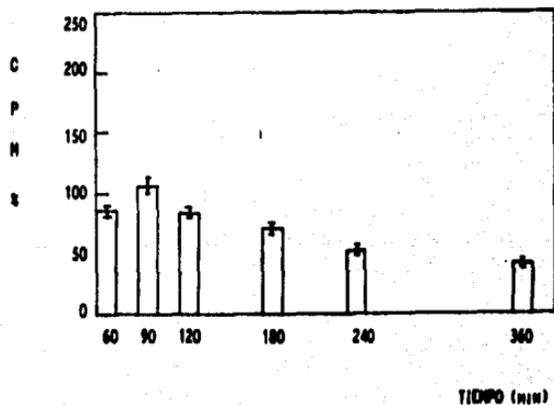


FIGURA No 16a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA
FAGOCITOSIS DE *M. TUBERCULOSIS*, CEPA H37 Ra MUERTA

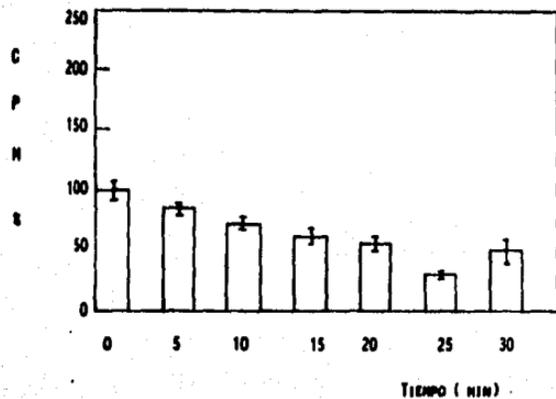


FIGURA No 16b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS
DE *M. TUBERCULOSIS*, CEPA H37 Ra MUERTA

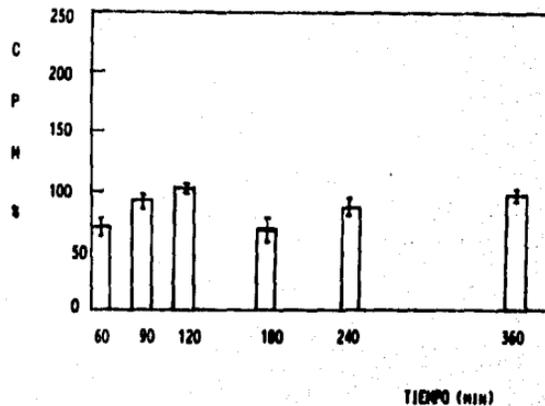


FIGURA No 17a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE *M. TUBERCULOSIS*, CEPA H37 Rv MUERTA

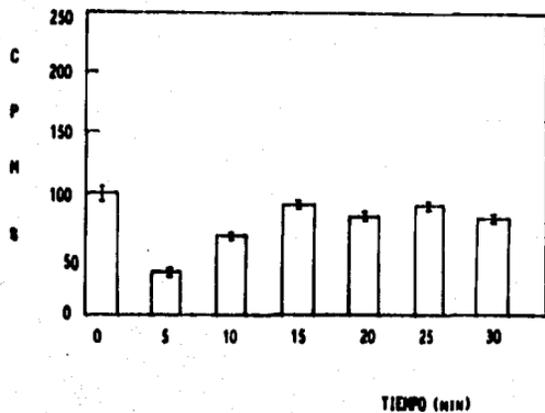


FIGURA No 17 b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, CEPA H37 Rv MUERTA

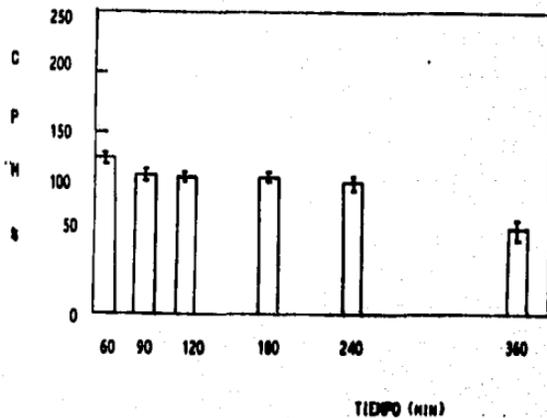


FIGURA No 18 a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA
FAGOCITOSIS DE *M. TUBERCULOSIS* . CEPA H37 Rv VIVA

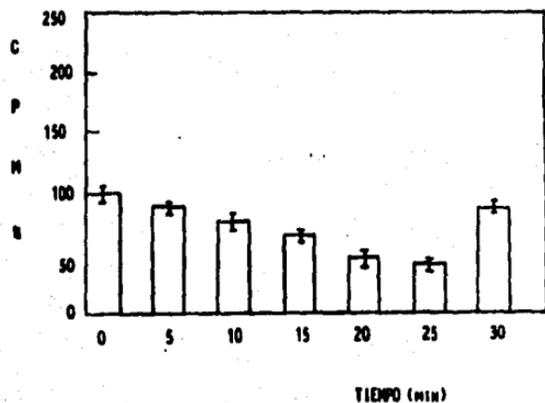


FIGURA No 18 b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS
DE *M. TUBERCULOSIS* . CEPA H37 Rv VIVA

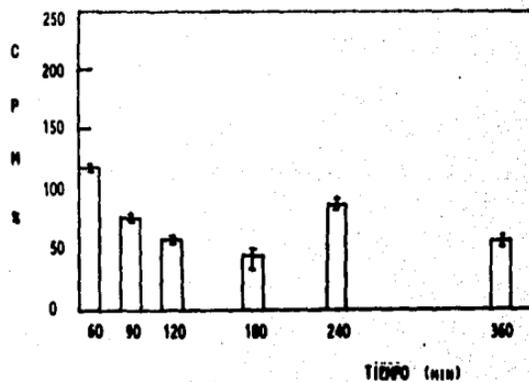


FIGURA No 19a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE E. COLI VIVAS

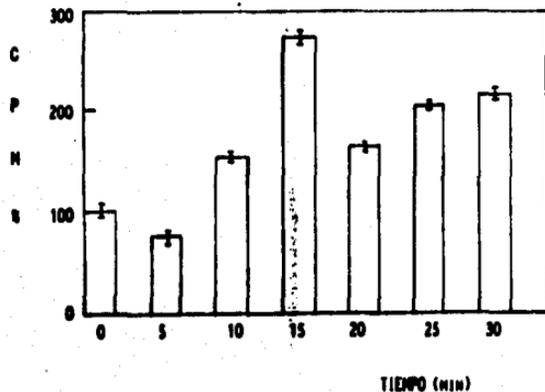


FIGURA No 19b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE E. COLI VIVAS

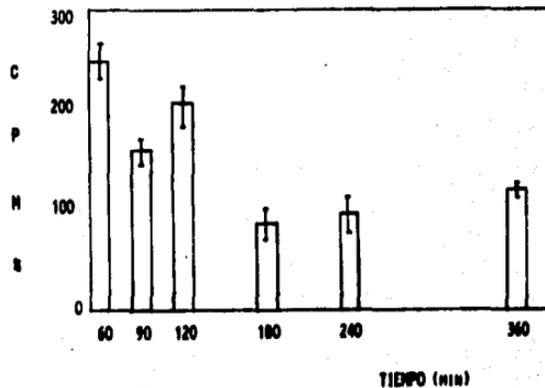


FIGURA No 20a

CINETICA DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE EXTRACTO PROTEICO DE CULTIVO DE M. TUBERCULOSIS. CEPA H37 Rv

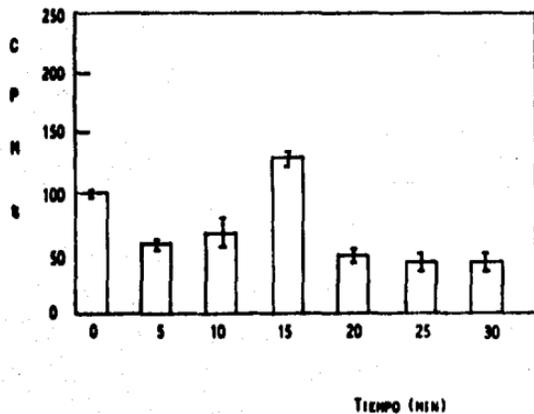


FIGURA No 20b

CINETICA DE REINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE EXTRACTO PROTEICO DE CULTIVO DE M. TUBERCULOSIS. CEPA H37 Rv

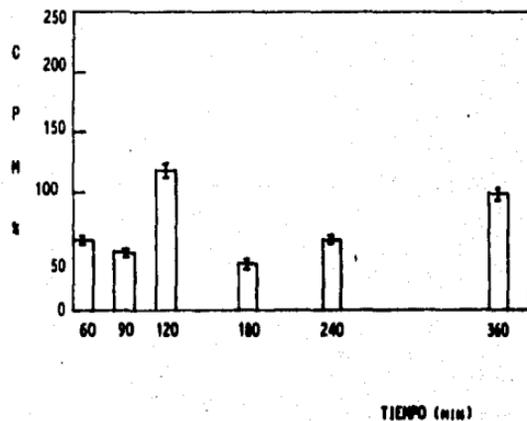


FIGURA No 21 a

CINETICA DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE PARTICULAS LATEX Y EXTRACTO PROTEICO DE M. TUBERCULOSIS, CEP H37Rv

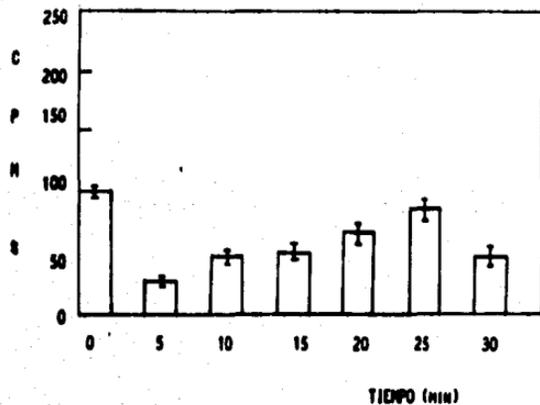


FIGURA No 21 b

CINETICA DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE PARTICULAS DE LATEX Y EXTRACTO PROTEICO DE UN CULTIVO DE M. TUBERCULOSIS, CEPA H37 Rv

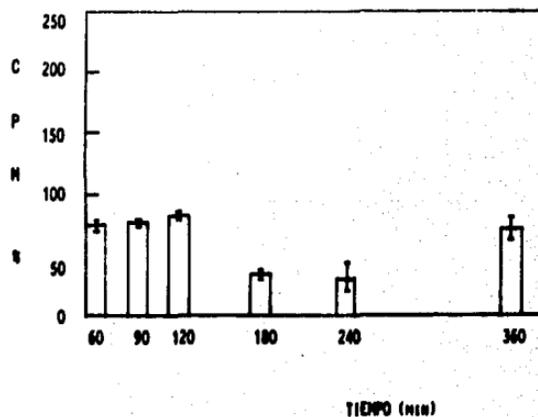
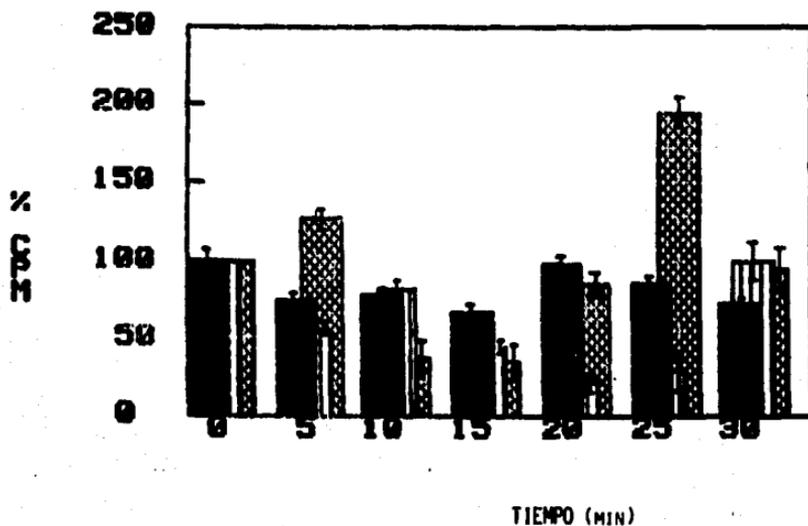


FIGURA No 22

CINETICA DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS , CEPAS H37 Rv VIVAS Y MUERTAS.



CONTROL ■
H37 Rv MUERTA ▨
H37 Rv VIVA ■

FIGURA No 23

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS
DE *M. TUBERCULOSIS* , CEPA H37 Rv VIVA Y MUERTA

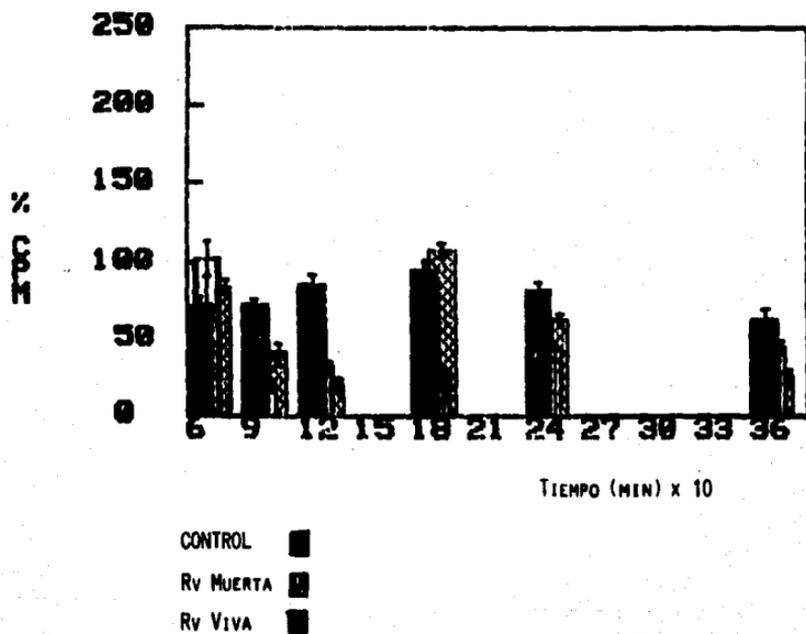


FIGURA No 24

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS , CEPAS H37 RA VIVA Y MUERTA

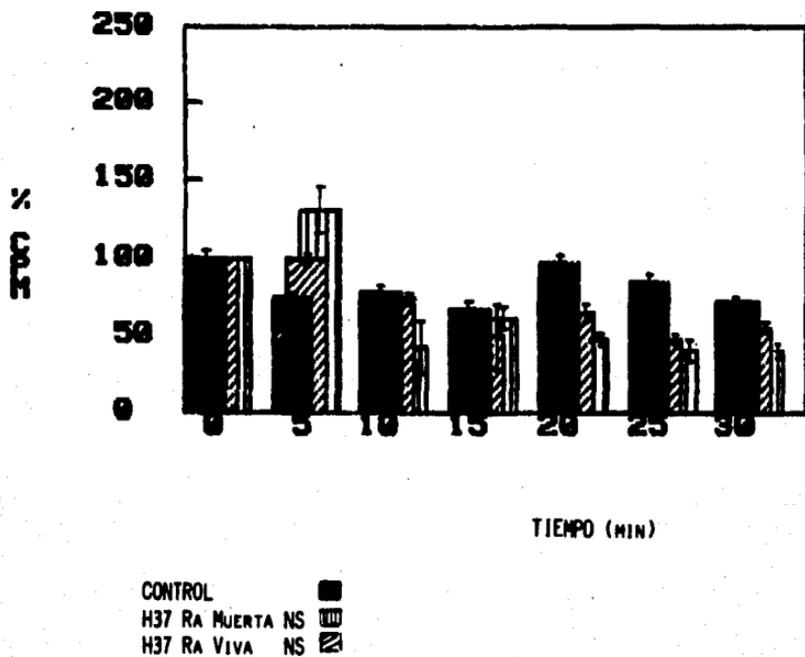


FIGURA No 25

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS, CEPA H37 RA VIVA Y MUERTA

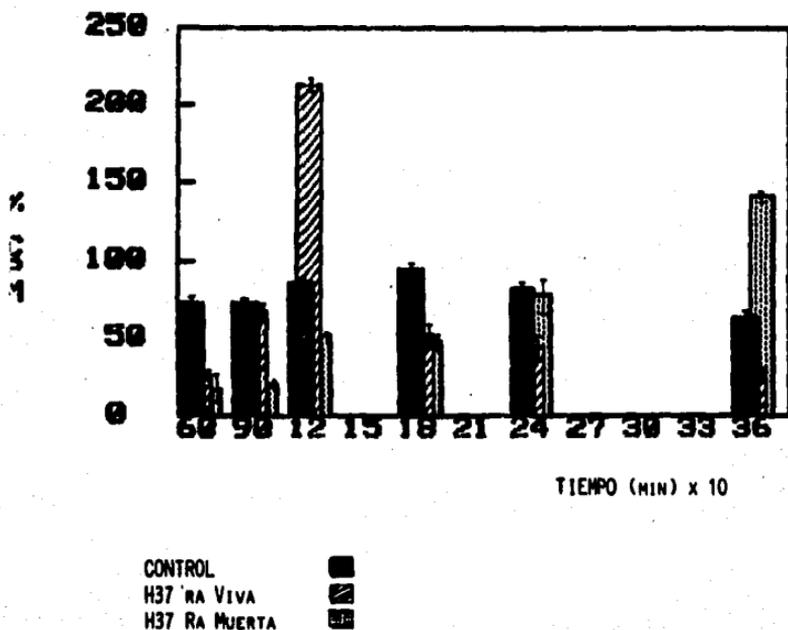
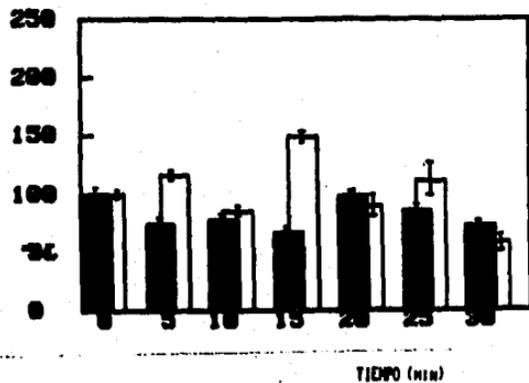


FIGURA No 26 a

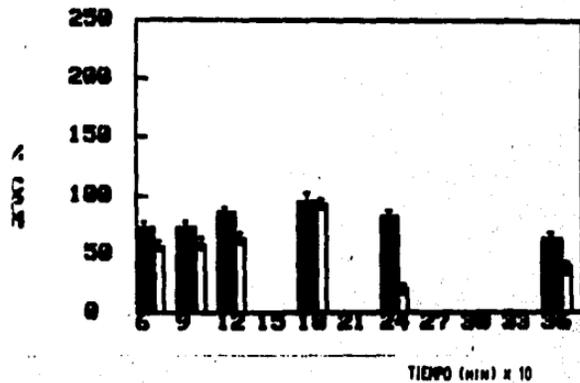
CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA --
FAGOCITOSIS DE PARTICULAS LATEX



CONTROL ■
PARTICULAS LATEX □

FIGURA No 26 b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS
DE PARTICULAS LATEX



CONTROL ■
PARTICULAS LATEX □

FIGURA No 27a

CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS NO SINCRONIZADA DE EXTRACTO DE PROTEINAS DE UN FILTRADO DE CULTIVO DE *M. TUBERCULOSIS*, CEPA H37 Rv

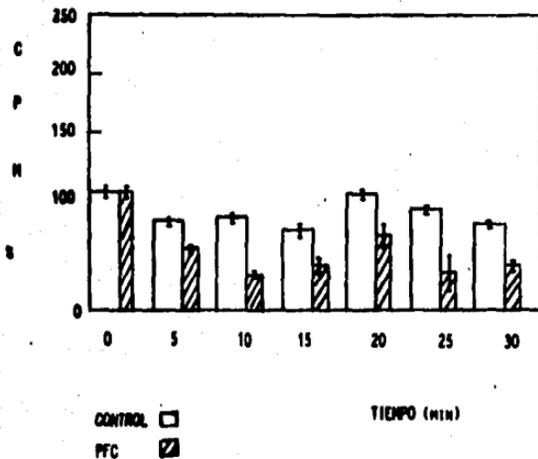


FIGURA No 27b

CINETICAS DE RECICLAJE DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS NO SINCRONIZADA DE PROTEINAS DE FILTRADO DE CULTIVO DE *M. TUBERCULOSIS*, CEPA H37 Rv

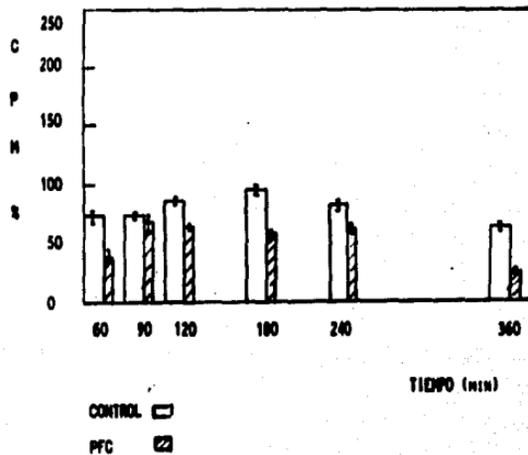


FIGURA No 28

AUTORADIOGRAFIA DE LOS PERFILES ELECTROFORETICOS DE LAS
PROTEINAS ASOCIADAS LA FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS ,
CEPA H37 Rv VIVA

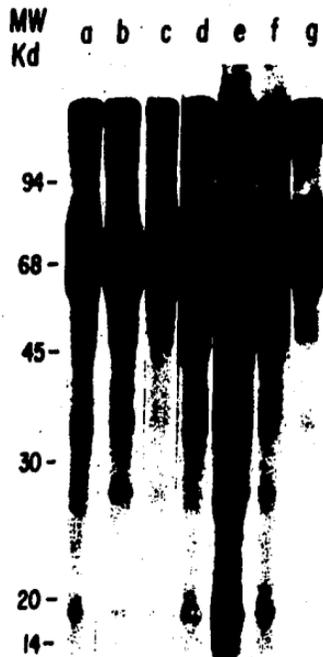
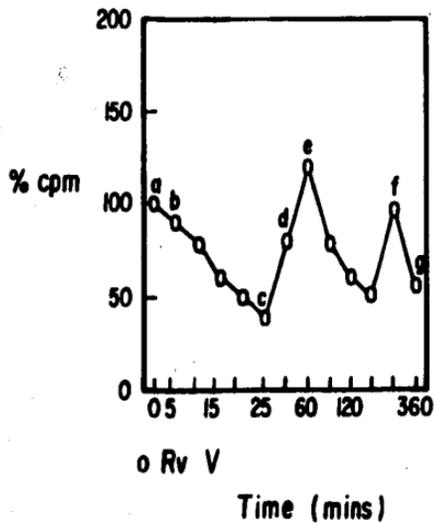
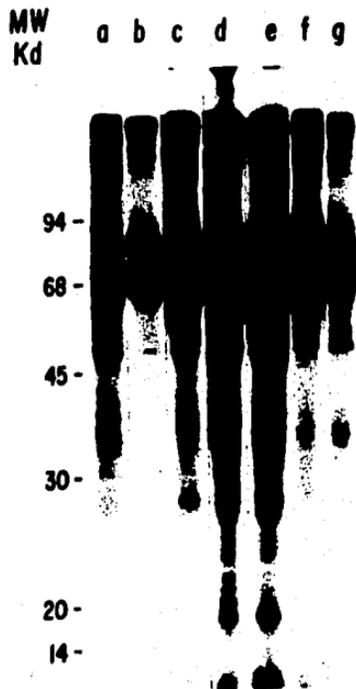
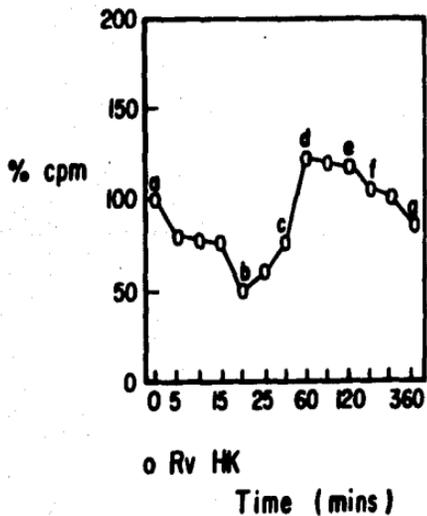


FIGURA No 29

AUTORADIOGRAFIA DE LOS PERFILES ELECTROFORETICOS DE LAS
PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE *M. TUBERCULOSIS* .
CEPA H37 Rv MUERTA



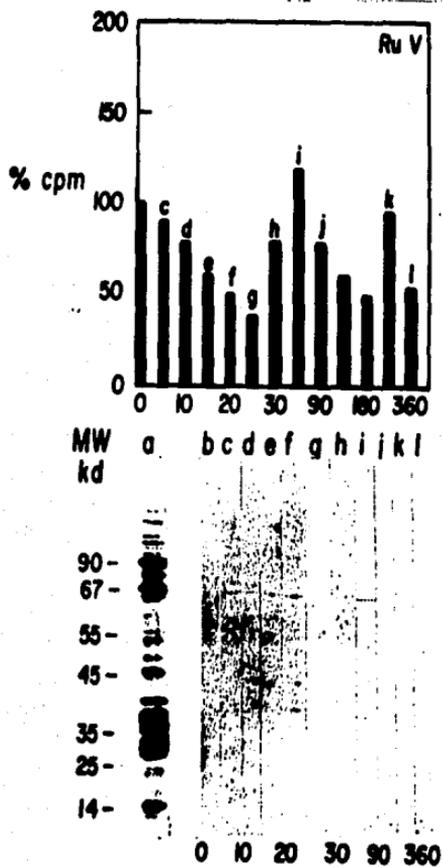


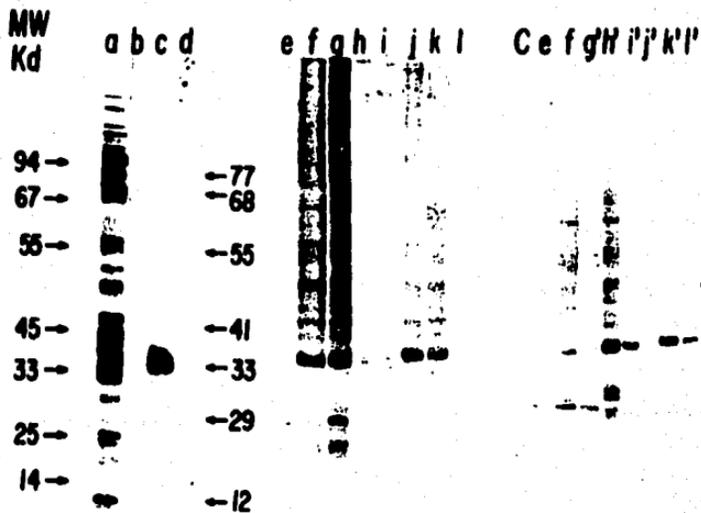
FIGURA No. 30a

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE PAF DE M. tuberculosis USANDO
SUERO HIPERIMUNE

- | | |
|-------------|----------|
| a = Control | f = 20' |
| b = 0' | g = 25' |
| c = 5' | i = 60' |
| d = 10' | j = 360' |
| e = 15' | |

FIGURA No. 30b

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE PAF'S DE M. tuberculosis USANDO Ace
MONOCLONALES



e = S.H.
b = MTB71
c = MTB78
d = MTB72
e = f5
f = f10

h = f25
i = f30
j = f60
k = f120
l = f320
C = f0

FIGURA No. 31

VALOR MINIMO (cpm) DE LAS CINETICAS DE COINTERNALIZACION DE
PAF DE M. Tuberculosis

COINTERNALIZACION

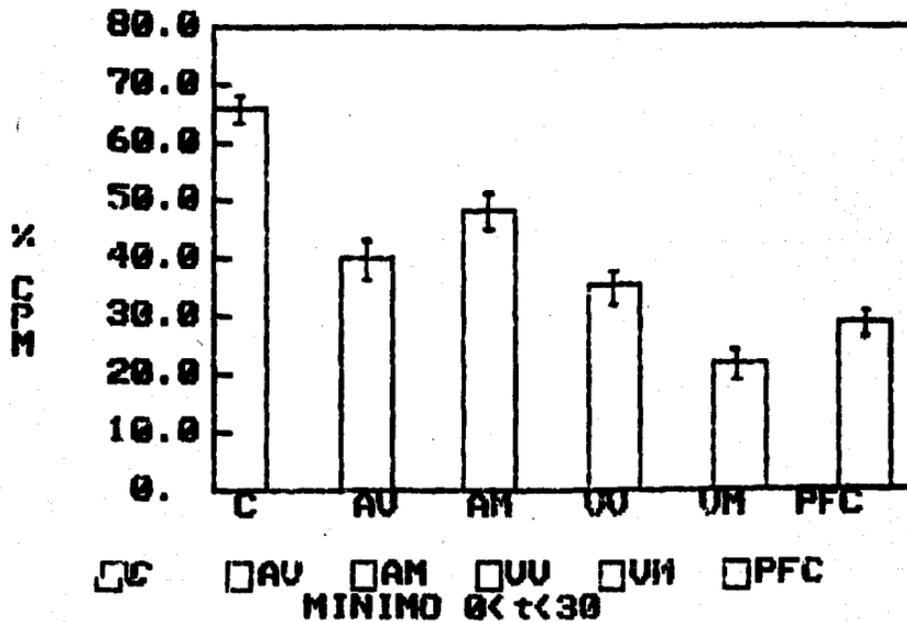


FIGURA No. 31

VALOR MAXIMO (cpm) DE LA CINETICA DE COINTERNALIZACION PAF
DE M. tuberculosis

COINTERNALIZACION

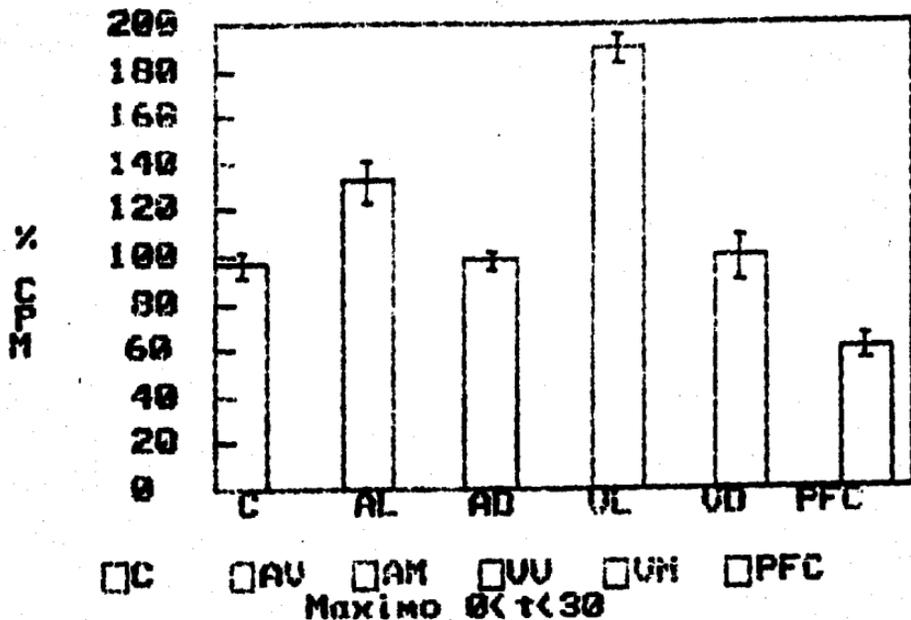


FIGURA No. 39

VALOR MINIMO (cpm) DE LA CINETICA DE RECICLAJE DE PAF DE
M. tuberculosis

RECICLAJE

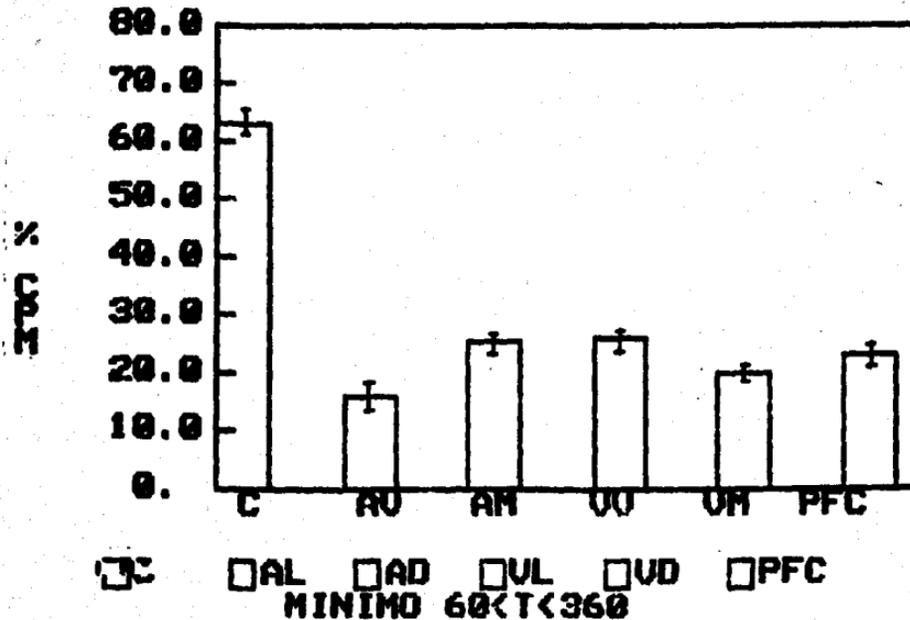


FIGURA No. 34

VALOR MAXIMO (cpm) DE LA CINETICA DE RECICLAJE DE PAF DE
M. tuberculosis

RECICLAJE

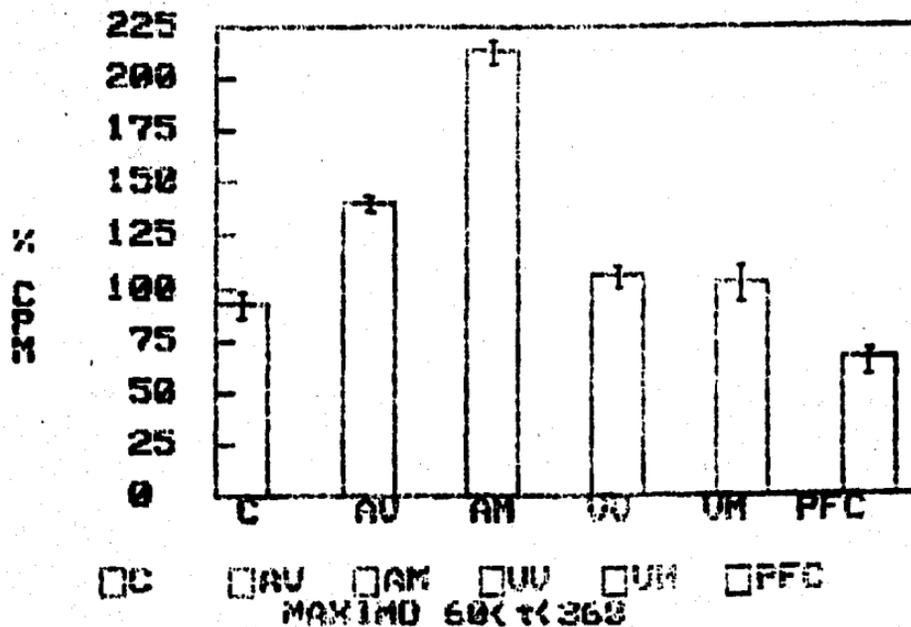


TABLA IV

CINETICA DE PRESENTACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA FAGOCITOSIS DE M. TUBERCULOSIS

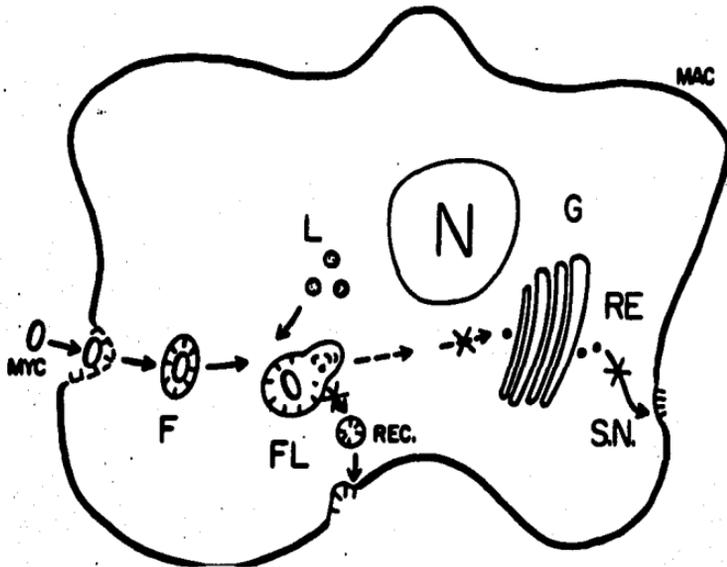
PM	H37Rv Muerta								H37Rv Viva						
	t	0	25	30	60	130	180	360	0	5	2	30	60	180	360
112		++	-	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+
94		++	-	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
70		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
50		+++	+	++	+++	+++	+	++	++	++	+	+++	+++	++	+
30		++	-	++	++	+	+	+	++	+++	+	+	+++	+	-
25		+++	-	+	++	++	-	-	++	++	-	+	+	+	+

+ Presente

- No Presente

FIGURA No 35

M. TUBERCULOSIS ES CAPAZ DE MODULAR EL RECICLAJE Y /O SINTESIS DE NOVO DE PROTEINAS ASOCIADAS A LA MEMBRANA DE LAS CELULAS FAGOCITICAS QUE PARTICIPAN EN SU FAGOCITOSIS



VIII) BIBLIOGRAFIA

- 1) Van Oss, C.J. 1978. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:19-39.
- 2) Pierce, C.H., Bubas, R.J., Schaefer, W.B. 1953. *Jour. Exp. Med.* 97 (89): 205.
- 3) Weir, D.M., Ogmundstotter, H. 1977. *Clin. Exp. Imm.* 30:323.
- 4) Mosser, B.M., Edelson, P.J. 1984. *En Cont. Top. Imm.*, Vol 13, Plenum Press eds., N.Y. U.S.A. : 71.
- 5) Hansen, G.A. 1874, *Norr. Mag. Lægevidensk* 4 : 1-8.
- 6) Koch, R. 1882, *Berlin Klin. Wochenschr.* 19:221-30 .Citado en Daniel, T.H., 1980. *The Immunology of Tuberculosis, Clinics in Chest Medicine, Vol 1 (2):139.*
- 7) Constock, G. 1982, *Tuberculosis. En Bacterial Infections of humans. Epidemiology and Control.* A. Evans & H. Feldman eds. Plenum Press, N.B.C. New York .
- 8) Styblock, K., Rouillon, A. 1981, *Bull. Int. Union Tuberc.* 54: 118-24.
- 9) WHO, *Statistics Annual*, 1984., Geneva : 54.
- 10) National Tuberculosis and Resp Dis Assoc. *Diagnostic Stds and Class of Tb and other mycob disease*, 1974.
- 11) Lenzin, L., Rottoli, P., Rottoli, Y. 1977, *Clin. Exp. Imm* 27:230.
- 12) Bloom, B.R., Chase, H.W. 1947, *Progr. Allergy* 10:151-58.
- 13) Chapman, J.S., 1972. *Acta Pathol Microb. Scand. Sect. A.* 80:199-244 (Suppl 233).
- 14) Bhatnagar, R., Malaviya, A.N., Narayanan, S., Rajgopal, P., Kumar, R., Bharadwaj, O.P. 1977, *Am. Rev. Resp. Dis.* 115:207-212.
- 15) Schmidt, E., Meuret, G., Stix, J., 1977, *Britt. Jour. Haematol.* 35:11-17.
- 16) Volkman, A., Gowans, J.L., 1945. *Brit. Jour. Exp. Pathol.*, 46:62-70.
- 17) Berziker, I., Goldman, R., 1983. *Jour. Ret. Soc.* 33: 207-20.
- 18) Dannenberg, A.H., Ando, H., Shima, K., Tsuda, T. 1978. *O.S.S.P.* 759.
- 19) Karnovsky, M.L., Lazzara, J.K., 1978. *Jour of Imm.* 121:809-13.
- 20) Adams, D.O., Hamilton, J.A., 1984. *Ann Rev. Imm.*, 2:283-318.
- 21) Cohn, Z. A. 1978. *Jour. of Imm.* 121:813-16.
- 22) Adams, D.O., Hamilton, J.A., 1984. *Ann. Rev. Imm.*, 2:283-318.
- 23) Magliulo, E. de Fec, I., Strippe, A., Scovola, O. 1973. *Clin. Exp. Imm.* 14:371-6.
- 24) Chaparas, S.D., 1982. *CRC, Critical Rev. Mic.* 15-197.
- 25) De Vries, E. van der Wey, J.P., Boekes, G., Steven, M.M., Cate, A. 1984. *R. Eur Jour of Imm.*, 14:122-128.
- 26) Ellner, J.J., 1978. *Jour. of Imm.* 121 (4):2573-79.
- 27) Nathan, C., Karnovsky, M.L., David, J.R., 1971. *Jour. Exp. Med.* 133: 1354-1374.
- 28) Mackaness, G. 1944. *Symp. Soc. Gen. Microb.* 14:213-240.
- 29) Schmidt, M.E., Douglas, S.D., 1977. *Jour. Lab. Clin. Med.* 209:332-340.

- 30) Podlask, D., Sher, A.N., Chaparas, S.D., Baese, M.R., 1976. *Can. Res.* 36:1233-1237.
- 31) Jackett, P.S., Abor, V.R., Lowrie, D.B., 1980. *Jour. Gen. Microb.* 121, 381-386.
- 32) Wade, A.A., Mendelsohn, D., Raboon, D.R., 1963. *Jour. Imm.* 130 (4): 2265-2270.
- 33) Rook, G.A.W., Steele, J., Fraher, L., Barker, S., Karmali, R., O'Riordan, J., Stanford, J. 1984, *Immunology*, 57, 159-63.
- 34) Mackness, G., 1968. *Am. Rev. Resp. Dis.* 97:337-44.
- 35) Godfrey, H.P., Gell, P.G.H. 1978. *Physiol. Biochem. Pharmac.* 84:1-92.
- 36) Bass, S.N., Spagnulo, P.J., Ellner, J.J., 1981, *Am. Rev. Resp. Dis.* 124:643-646.
- 37) Antony, V.B., Sahn, S.A., Harada, R.N., Repine, J.E. 1983. *Chest.* 83 (Suppl 95-6).
- 38) Tamayo, R.P., 1978, *Patologia General*, 155-165.
- 39) Assad, F., 1983. *Bull. WHO* 61:779.
- 40) Aahn, H., Kauffmann, S.H.E., 1983. *Rev. Inf. Dis.* 3:1221.
- 41) Young, R.A., Bloom, B.R., Grossinsky, C.H., Ivanyi, J., Thomas, D., Davis, R.W., 1983. *P.N.A.S. U.S.A.*: 2383.
- 42) Kauffmann, S.H.E., Vath, J., Thole, J, Van Embden J.D.A., Emerich, T. 1987. *Eur. Jour. Imm.* 17:351-357.
- 43) Oftung, F., Mustafa, A.S., Husson, R., Young, R.A., Godal, T. 1987: *Jour. Imm.* 138 (3): 927-31.
- 44) Orme, I.M., 1987. *Jour of Imm.*, 138 (1):193-298.
- 45) *Am. Thorac., Soc., CDC., NIH*, 1986. *Am Rev. Resp. Dis.*, 134:401-423.
- 40) Singer, J., Nicholson, R.L., 1972. *Science*, 175:720.
- 41) Silverstein, S., Steinman, R., Cohn, Z.A., 1977. *Ann. Rev. Biochem.* 46:669.
- 42) Thilo, L., 1983. *B.B.A.*, 822:243-66.
- 43) Vandeurs, R., Nilausse, K. 1982, *Jour. Cell. Biol.* 94:279-286.
- 44) Besterman, J.M. 1981. *Jour. Cell Biol.* 91:716-727.
- 45) Hubber, A.C., Cohn, Z.A., 1976. *En Biochemical Analysis of membranes*, A.H. Maddy edit, J. W. & Sons, N.Y. 427-501.
- 46) Thyberg, J. 1986. *Eur. Jour. Cell. Biol.* 40:37-43.
- 47) Stenseth, K., Thyberg, J., 1986. *Eur. Jour. Cell. Biol.*, 40:37-43.
- 48) Thyberg, J., 1980. *Eur. Jour. Cell. Biol.*, 23:95-103.
- 49) Besterman, J.M., Airhart, J.A., Low, B., Robert, E., Ramela, D.E., 1983. *J. Cell. Biol.* 96:1386-1591.
- 50) Stenseth, K., Medin, U., Thyberg, J. 1983. *Eur. Jour. Cell Biol.*, 31:15-25.
- 51) Dukas, G., Lauffenburger, A., Zigmund, S., 1983. *Jour. Cell. Biol.* 96:1642-1650.
- 52) Metchnikoff, E. 1905, *Immunity in Infective Diseases*. London, Cambridge University press. Citado en Stossel, T. P., 1974. *N.E. Jour. of Med.*, 290 (13):717.
- 53) van Furth, R., 1970. *Semin. Hematol.*, 7:125-141.
- 54) Coleman, D.L., 1986. *Eur. Jour. Clin. Microb.*, 1-5.
- 55) Stossel, T. P., 1974. *New England Jour. Med.*, 290:717-723, 724-780, 833-839.
- 56) Stendahl, O., Hed, J., Kihlstrom, E., Magnusson, K.E., Tagesson, C., 1977. *FEBS Letters* 81 (1):118-121.

- 57) Rabinovitch, M., 1968. *Sem. Hemat.*, 5:134.
 58) Rabinovitch, M., 1967a. *Exp. Cell. Res.*, 54:604-14.
 59) Griffin, F.M. Jr., Silverstein, S.C., 1974. *Jour. Exp. Med.* 139:323-324.
 60) Klebanoff, J.J., 1975. *Sem Hematol.* 12:117-42.
 61) Eisebach, P., 1968. *Jour. Clin. Invest.* 47:2217-29.
 62) Eisebach, P., Farrow, S., 1969. *B.B.A.*, 174:438-41.
 63) Gordon, S.J., Unkeless, J.C., Cohn, Z.A., 1974. *Jour. Exp. Med.*, 140:995.
 64) Gordon, S., Todd, J., Cohn, Z. A., 1974. *Jour. Exp. Med.*, 139: 1228.
 65) Mollan, J.J., McLaren, L.E., Syvertun, J.T., 1959. *Jour. Exp. Med.*, 110:65-80.
 66) Nogueira, M., Cohn, Z.A., 1974. *Jour. Exp. Med.*, 143:1402-20.
 67) Armstrong, J.A., Hart, P.D.A., 1971. *Jour. Exp. Med.*, 134:713-40.
 68) Silverstein, S.C., Christian, J.K., Acs, G., 1974. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 375-408.
 69) Frits, R.R., 1972. *Jour. Bact.*, 110:106-21.
 70) Jones, T.C., Hirsch, J.G., 1972. *Jour. Exp. Med.* 136:1173-94.
 71) Armstrong, J.A., Hart, P.D.A., 1975. *Jour. Exp. Med.*, 142:1-16.
 72) Ezekowitz, R., Austyn, J., Stahl, P., Gordon, S. 1981. *Jour. Exp. Med.* 154:60.
 73) Willingham, M., Pastan, I., 1982. *Jour. Cell. Biol.* 94:207-212.
 74) Goldstein, J.L., Anderson, R.G., Brown, M.S., 1979. *Nature*, 279 (5715):479-85.
 75) Anderson, R.G., Brown, M.S., Goldstein, J.L. 1977. *Cell*, 10:381-344.
 76) Marsh, M., Helenius, A., 1980. *Jour. Mol. Biol.*, 142(3): 439-54.
 77) Willingham, M., Pastan, I., 1980. *Cell*, 21:67-77.
 78) Tycko, B., Maxfield, F.R., 1982. *Cell*, 28:643-651.
 79) Willingham, M., Pastan, I., 1980. *Cell*, 21:57-77.
 80) Pastan, I., Willingham, M. 1981.b, *Science* 214:504-509.
 81) Hillman, B.H., Schelessinger, J., 1982. *Biochemistry* 21:1647-72.
 82) Johnston, R., Chadwick, D., Pabst, M. 1980. *Mononuclear phagocytes*. 1143-1159. *Eds M. Hijhoff, The Hague Holland.*
 83) Scott, W., Briko, J., Hazill, A., Kempe, J., Cohn, Z.A., 1980. *Jour. Exp. Med.* 152:324.
 84) Grey, M., Anderson, C., Hausser, C., Barnhistic, B., Von Eschen, K., Chiller, J. 1974. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 41:315.
 85) McCarty, M., 1980. *Microbiology*. Davis, B., Dulbecco, R., 407. H. & Row. Hagenstrom MO.
 86) Willson, C., Tsai, V, Remington, J. 1980. *Jour. Exp. Med.*
 87) Bianco, C., Mussenzeig, V., 1977. *Complement receptors. En Cont.*, *Top. in Mol. Imm.*, Vol 6 (Porter, R. edit) pp 145-174, Plenum Press, N.Y.
 88) Fearon, D., 1980. *Jour. Exp. Med.*, 152:20.
 89) Dobson, J., Vambris, J., Ross, G., 1981. *Jour. Imm* 126:693.
 90) Bianco, C., Griffin, F., Silverstein, S., 1975. *Jour. Exp.*

- Med. 141:1278.
- 91) Liang-Takasaki, C., Grossman, N., Leyre, S. 1983. *Jour Imm*, 130:1847.
 - 92) Weir, O. 1986. *Immunology Today*. 1:45.
 - 93) Stahl, P., Schlessinger, P., Sigardsen, E., Rodman, J.S., Luy, C., 1980. *Cell* 19:207-15.
 - 94) Kolb, H., Kolb-Bachofen, V., 1978. *B.B.A.*, 63:2.
 - 95) Ralph, P., Makkowenz, I., 1978. *Nature* 257:393-394.
 - 96) Daniel, T.M., Fergusson, L.E., 1970. *Infect. Imm.*, 1:164.
 - 97) Lowry, O.H., Rossenborough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. *Jour. Biol. Biochem.*, 193:245.
 - 98) Janick, B.W., Chaparas, S.D., Daniel, T.M., Kubica, G.P., Wright, G.L., Yee, G.S., 1972. *Am. Rev. Resp. Dis.* 104, 602.
 - 99) Hudson, L. *Practical Immunology*, 1980. Blackwell Scientific, London.
 - 100) Kaye, P. M., Feldmann, H., 1986, 64:20-27.
 - 101) Hubbard, A.L., Cohn, Z.A., 1976. *En Biochemical Analysis of membranes*, John Wiley & Sons, N.Y.:427-501.
 - 102) Silverstein, S.C., Steinmann, R.N., Cohn, Z.A. 1977, *Ann. Rev. Biochem.* 46:667-722.
 - 103) Peterson, G.L., 1977. *Anal. Biochem.* 63:344.
 - 104) Laemmli, U.K., 1970. *Nature* 227:680-685.
 - 105) Weber, K., Osborn, M. 1969, *Jour. Biol. Chem.* 244:4406-4412.
 - 106) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. *P.N.A.S. U.S.A.* 76:4350-4354.
 - 107) Goding, J.W., 1976. *Jour. Imm. Methods.*, 13:215.
 - 108) Hart, P.B.'A, Spencer, L.K., Nikolontopoulos, A., Lopez, A.F., Vadas, M.A., McDonald, P.J., Finlay-Jones, J.J., 1986. *Infect. Imm.* 52 (1): 245:51.
 - 109) Birdi, J., Mistry, N.F., Mahaderan, P.R., Antia, N.H. 1983. *Infect. Imm.* 41:121.
 - 110) Ivanyi, J., Morris, J.A., Keen, H., 1985. *En Monoclonals antibodies against bacteria*. Ac. Press, New York, U.S.A. 159.
 - 111) Murray, H., 1981. *Jour. Exp. Med.*, 153:1302.
 - 112) Brown, M., Anderson, R. G., Goldstein, R., 1983, *Cell* 32:643.
 - 113) Kaplan, G., Unkeless, J.C., Cohn, Z.A., 1979. *.P.N.A.S. U.S.A.* 76(8):2824-29.
 - 114) Saito, H., Tomioka, H., Sato, K., Watanabe, T., 1986. *Infect. Imm.* 51(1): 157-162.
 - 115) Saito, H., Tomioka, H., Watanabe, T., Sato, K. 1986. *Infect Imm.* 51(1):163-67.