

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11261  
8  
24j

**PAPEL DE LOS ANTICUERPOS EN LA REGULACION DEL PROCESO  
TUBERCULOSO**

**T E S I S**

para optar al grado de

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**( I N M U N O L O G I A )**

que presenta:

**Q.B.P. HERLINDA MEJIA LOPEZ**

**MEXICO, D.F.**

**1990**

División de Estudios Superiores, Coordinación de Maestrías y  
Doctorados en Ciencias Biomédicas.

Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina  
U.N.A.M.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

## CONTENIDO

	Págs.
RESUMEN.....	viii
ANTECEDENTES.....	1
Papel de la respuesta inmune en la patogénesis de la tuberculosis.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
HIPOTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	8
RUTA CRITICA.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
Individuos.....	9
Antígenos.....	9
Mitógeno.....	9
Intradermorreacciones.....	9
Determinación de inmunoglobulinas específicas.....	9
Adsorción del suero anérgico con BCG.....	10
Adsorción del suero con proteína A-Sepharosa.....	10
Obtención de células.....	11
Separación de poblaciones adherentes y no adherentes...	11
Tratamientos adicionales de las poblaciones celulares..	12
Transformación linfocítica (TL).....	12
Determinación de anticuerpos sobre la superficie celular por la técnica de inmunofluorescencia.....	13

Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS.....	14
Transformación linfocítica de poblaciones celulares sometidas a diferentes tratamientos adicionales:	
1.- Con suero inmune.....	15
2.- Con suero inmune adsorbido con BCG.....	16
3.- Con altas concentraciones de antígeno.....	17
Determinación de anticuerpos sobre la superficie celular.....	17
DISCUSION.....	19
SUMMARY.....	23
REFERENCIAS.....	24

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Págs.

Tabla 1. Datos generales de los individuos estudiados..	29
Tabla 2. Presencia de inmunoglobulinas sobre la superficie de las células de pacientes tuberculosos.....	30
Tabla 3. Presencia de inmunoglobulinas sobre la superficie de las células no adherentes.....	31
Fig. 1. Dosis respuesta al PPD (A) y PHA (B) en la prueba de TL.....	33
Fig. 2. Efecto del tratamiento con suero inmune de pacientes anérgicos en diferentes poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+...	34
Fig.3. Efecto del tratamiento con suero inmune adsorbido con BCG.....	35
Fig. 4. Efecto del tratamiento con altas concentraciones de antígeno en diferentes poblaciones celulares de pacientes tuberculosos.....	36
Fig. 5. Microscopia de fluorescencia de células no adherentes de pacientes TBP PPD+ y TBP PPD-.....	37
Fig. 6. Inmunolectroforesis de las IgGs purificadas..	38
Fig. 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las IgGs purificadas.....	39

## RESUMEN

Datos previos sugieren que un componente específico del suero inmune tuberculoso inhibe la respuesta celular de pacientes tuberculosos. La caracterización de la población celular que está interactuando con el anticuerpo, así como la clase de inmunoglobulina que participa en este efecto inhibitorio, es el objeto de la presente investigación.

El efecto del suero inmune de pacientes tuberculosos anérgicos, adsorbido o no con BCG, fue estudiado tanto en células adherentes como no adherentes de pacientes reactivos. Se cuantificó la reactividad de los cocultivos de estas células por la prueba de transformación linfocítica (TL) al antígeno PPD. Se utilizó suero de individuos sanos como testigo. Por otro lado, se trataron células adherentes y no adherentes de pacientes anérgicos con altas concentraciones de PPD. Se realizaron cocultivos de estas células y sus respuestas también fueron determinadas por la TL al PPD. Se procesaron células de pacientes TBP PPD+ como testigo.

Se encontró inhibición de la TL inducida por el antígeno, sólo en los cocultivos que contenían células no adherentes de pacientes reactivos tratadas con suero anérgico; y la adsorción del suero con BCG abolió el efecto inhibitorio. Además, sólo los cocultivos que contenían células no adherentes de pacientes anérgicos tratadas con altas concentraciones de PPD, recuperaron la capacidad de proliferación linfocítica cuando fueron estimulados con la dosis óptima del mismo antígeno. Estos hallazgos sugieren que la población celular no adherente, tanto de pacientes reactivos como de anérgicos, es el posible blanco del factor inhibitorio del suero inmune. Los resultados destacan el comportamiento específico del factor inhibitorio, puesto que éste es adsorbido con BCG, y apoyan como presuntos responsables a los anticuerpos. Por ensayos de inmunofluorescencia se mostró la presencia de IgG e IgM sobre la superficie de células no adherentes de pacientes anérgicos y de pacientes reactivos tratadas con suero anérgico o IgG específica. Finalmente, el tratamiento con altas concentraciones de antígeno sobre células no adherentes de pacientes anérgicos, elimina la inmunofluorescencia de su superficie.

## ANTECEDENTES

La tuberculosis en sus diversas formas clínicas es una enfermedad infecciosa que figura, en la historia de los padecimientos humanos, como una de las más frecuentes y de alta mortalidad (1,2). En la actualidad, a pesar de la existencia de la quimioterapia y de la inducción de las defensas propias del hospedero por medio de la vacunación, sigue siendo causa de gran preocupación para las autoridades de salud, sobre todo en sectores de la población de bajos recursos económicos (3).

La resistencia a la infección es fundamental en el curso de la enfermedad y parece que está relacionada con la capacidad del organismo para desarrollar una defensa local, cuya consecuencia es la disminución o eliminación del bacilo en los tejidos, sin que para esto sea relevante la participación de los anticuerpos específicos, como ocurre en el caso de padecimientos infecciosos extracelulares. La coexistencia de otras enfermedades predispone a la infección tuberculosa (4), así como ciertas actividades ocupacionales que facilitan el deterioro del parénquima pulmonar, debido al depósito de polvo metálico o de partículas de carbón o de piedra (5,6).

Algunos factores biológicos como genotipo, edad, y sexo entre otras, participan en ocasiones de manera determinante en la incidencia de la tuberculosis (7,8). La predisposición a ésta se hace más evidente en familias con hábitos higiénicos inadecuados y promiscuos, en cambio, la enfermedad presenta una menor incidencia entre quienes practican costumbres higiénicas apropiadas, buena alimentación, ejercicio, etc. Así, la posibilidad de adquirir tuberculosis activa, se reduce enormemente cuando se logra evitar la exposición a dosis altas del bacilo tuberculoso y se mantiene un nivel adecuado de bienestar físico.

El agente etiológico de la tuberculosis humana es el actinomiceto Mycobacterium tuberculosis, también conocido como bacilo de Koch o bacilo tuberculoso, el cual es un parásito intracelular facultativo y tiene como célula hospedera al macrófago del individuo infectado. El primer contacto entre el hospedero y el parásito se lleva a cabo en los alveolos pulmonares. Se considera que los macrófagos proveen el principal arsenal de ataque contra estas bacterias, y de cierto modo se plantea que la virulencia de este bacilo está relacionada con su capacidad de multiplicación y sobrevivencia dentro del fagocito (9).

La respuesta inmune a la tuberculosis puede ser determinada por un tipo de hipersensibilidad cutánea (hipersensibilidad tardía), prueba que se realiza por la aplicación subcutánea del antígeno microbiano. Inicialmente, se utilizaba bacilos viejos muertos o el filtrado de cultivo del microorganismo (tuberculina), hoy en día se aplica un derivado proteico purificado obtenido del cultivo del bacilo y conocido con las siglas de PPD (purified protein derivative). En un principio se sabía que esta respuesta no podía ser transferida por suero inmune a receptores normales. Fue hasta 1945 que Chase (10) encontró, que la capacidad de respuesta cutánea era transferible por células linfoides obtenidas de donadores con hipersensibilidad a la tuberculina; este hecho mostró, por lo consiguiente, que la inmunidad a la tuberculosis puede ser transferida a receptores normales por medio de células. En la actualidad se conoce que esta respuesta está mediada por una población de linfocitos T inmunocompetentes, específicamente sensibilizados, que controlan la respuesta de los macrófagos por la secreción de linfocinas. Estos linfocitos pueden ser identificados en subpoblaciones, que reciben diferentes cognotaciones, debido a que en su superficie presentan antígenos que los diferencian en poblaciones celulares funcionalmente distintas (11).

La naturaleza celular de la respuesta inmune antituberculosa fue confirmada por Suter (12) y Mackaness (13), quienes han demostrado que los linfocitos resultantes de una interacción específica con el microorganismo infectante, son capaces de inducir la activación de los macrófagos, los cuales ejercen una acción más eficiente en la eliminación del parásito.

Estos autores, sugieren además, que la inmunidad mediada por células está involucrada con la capacidad de conferir resistencia a parásitos intracelulares.

Como la defensa inmune en la tuberculosis se debe fundamentalmente a linfocitos T, la participación de la respuesta inmune humoral se ha relegado a un segundo término.

La variación de los niveles de respuesta celular, se manifiesta a través de una reactividad celular alta, normal, baja o ausente, y es crítica en la caracterización del cuadro tuberculoso. La capacidad de respuesta inmunológica en la tuberculosis, refleja con frecuencia el estado clínico del paciente en un momento determinado. Los individuos con tuberculosis que presentan, baja reactividad celular y altos títulos de anticuerpos, tienen mal pronóstico, y

aquellos con normal o alta reactividad celular y bajos o no detectables títulos de anticuerpos presentan buen pronóstico (9,14).

Con base en el espectro clínico e inmunológico, en algunas enfermedades infecciosas, se han elaborado clasificaciones que enmarcan los posibles estadios de estas enfermedades (15,16). Lenzini y Rottoli (16) en el caso de la tuberculosis, lograron establecer una importante relación entre el estado clínico del paciente y la respuesta inmune celular y humoral, clasificando a los pacientes tuberculosos en cuatro grupos: reactivo, reactivo intermedio, no reactivo intermedio y no reactivo. Estos autores plantean que en la tuberculosis humana existen dos formas polares: tuberculosis reactiva y tuberculosis no reactiva. Las formas reactivas manifiestan una evidente capacidad de respuesta mediada por células, con poca o nula producción de anticuerpos; las formas no reactivas se caracterizan por presentar una pobre o ausente respuesta inmune celular y una elevada producción de anticuerpos.

La ausencia de la respuesta celular, tanto en la tuberculosis, así como en la lepra, se ha referido como anergia (14-17). Varios investigadores han descrito la falta de respuesta al antígeno PPD en pruebas cutáneas y en pruebas de transformación linfocítica (14,16-19), sin embargo, la respuesta de transformación inducida por mitógenos es contradictoria (19,20).

La anergia fue definida por primera vez por von Pirquet como el mecanismo contrario a la alergia. El término anergia ha causado gran controversia y durante mucho tiempo se consideró como una falta de respuesta en la función inmune. En busca de la explicación para este fenómeno, durante la década de los 70's surge una conceptualización diferente, con base en un sistema de control de inmunorregulación con retroalimentación negativa o de un efecto supresor sobre la respuesta inmune. Este concepto permite la posibilidad de entender a la anergia no simplemente como la ausencia de respuesta, sino como el estado de la estimulación de una respuesta inmune en el que funciona activamente un modelo supresor.

El fenómeno de anergia ha sido enmarcado en la tuberculosis y en otras enfermedades intracelulares, puesto que no corresponde a lo que se conoce etimológicamente como estado anérgico (ausencia total de respuesta), y en la tuberculosis se explica como la incapacidad de los linfocitos T para responder al antígeno específico (9,14).

Varios mecanismos son sugeridos para explicar este fenómeno (14,21-24): a) la reacción inflamatoria puede abatirse debido a un defecto en la producción de las linfocinas (21,22); b) los niveles elevados de inmunoglobulinas y anticuerpos específicos pueden bloquear a la inmunidad mediada por células (14,16); c) los linfocitos circulatorios reactivos al PPD pueden ser atrapados en nódulos linfáticos de algunos pacientes tuberculosos anérgicos (23); d) algunos pacientes tuberculosos anérgicos presentan en su circulación, una población de monocitos que puede suprimir la actividad in vitro de linfocitos reactivos al PPD (24). Cuando menos, uno de estos mecanismos puede estar involucrado en la regulación de la anergia al PPD en pacientes con tuberculosis pulmonar. En vista de la recuperación del estado anérgico, esto es, la capacidad de volver a manifestar la reacción de hipersensibilidad tardía, en sujetos que responden al tratamiento, es posible que el mecanismo de anergia sea más bien el resultado de la enfermedad que la causa de la misma.

#### PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA PATOGENESIS DE LA TUBERCULOSIS

En la tuberculosis, así como en otros tipos de infecciones intracelulares, la patogenia y la inmunidad no se pueden considerar como temas separados dada la complejidad de la defensa del hospedero y la controvertida naturaleza del mecanismo de agresión del agente infeccioso. En condiciones de inmunocompetencia, el sistema inmune es capaz de resolver una infección por Mycobacterium, mediante la eliminación del agente etiológico por sus efectores celulares. Sin embargo, en los casos en que la infección provoca daño tisular severo y sostenido, el sistema inmune parece no ser eficiente en la eliminación del microorganismo, pero sí en la producción de lesiones compatibles con las observadas en la hiperactivación de la respuesta inmune celular (hipersensibilidad tardía).

Ante un sistema inmune sin alteraciones detectables y en presencia de una tuberculosis severa, es posible pensar en mecanismos que le permitan al Mycobacterium evadir a los efectores inmunológicos, como son, baja antigenicidad del microorganismo, resistencia a la lisis extracelular, actividad antifagocítica, etc. Alternativamente es importante considerar la existencia de mecanismos que modifiquen los procesos de regulación de la respuesta inmune.

Algunas aportaciones experimentales apoyan el hecho de que fallas en la eliminación del microorganismo producen alteraciones en la regulación de la respuesta inmune, dando como consecuencia, una incapacidad para resolver la infección. Estudios llevados a cabo in vitro, sugieren que Mycobacterium tuberculosis puede evadir la actividad bactericida de los macrófagos, evitando la fusión de los lisosomas con los fagosomas que contienen a los bacilos (25-27). Este fenómeno se debe, posiblemente, a los grupos polianiónicos (sulfátidos), presentes en la pared celular del bacilo (28). También se ha demostrado que Mycobacterium tuberculosis escapa del fagosoma por rompimiento de la membrana fagosómica (29). Por otro lado, no se ha logrado identificar hasta el momento ninguna toxina que ejerza in vitro, en los fagocitos, un efecto tóxico primario, aunque se menciona a los lípidos y grasas de alto peso molecular como factores de impedimento en la digestión intramacrofágica del bacilo (30).

El estado de hipersensibilidad tardía de la respuesta celular, desarrollado en el paciente tuberculoso, contribuye en forma importante a la lesión tisular y a la necrosis caseosa. La activación de macrófagos por los linfocitos T sensibilizados, desencadena una respuesta, que al no estar bajo un sistema de control favorable produce lesión; así los macrófagos estimulados, al intensificar su actividad para limitar el desarrollo micobacteriano, podrían dañar gravemente tejidos normales. El daño histico entre otras cosas, refleja la descarga de enzimas hidrolíticas, producto de los macrófagos dañados, al igual que los efectos inflamatorios de los linfocitos T (9,17). Por lo tanto, la existencia de mecanismos reguladores es fundamental para la expresión adecuada de la respuesta inmune celular, permitiendo que ésta participe eficazmente en defensa del hospedero contra el proceso tuberculoso, sin que se alcancen niveles exagerados de sensibilidad celular, la que contribuye a la patología de esta infección. Entre los componentes que participan en la regulación de la respuesta inmune se encuentran células T que actúan en el circuito de supresión, células accesorias de la supresión y también los productos finales de la respuesta inmune humoral, esto es, los anticuerpos, los cuales pueden autorregularse por un mecanismo de retroalimentación y además interferir con o sobre la respuesta inmune mediada por células. La actividad de los anticuerpos sobre la respuesta celular ha sido estudiada a través de la regulación idiotípica en modelos no infecciosos (31,32). En la actualidad, existe gran interés en el estudio del efecto de los anticuerpos en la respuesta celular, generada por procesos de etiología bacteriana o fúngica y se ha planteado que en las infecciones causadas por organismos intracelulares, los anticuerpos no están

comprometidos directamente con la protección del hospedero, sino que posiblemente desempeñan una acción reguladora (19,20,33,34).

Heilman y McFarland (35) demostraron que componentes séricos provenientes de pacientes tuberculosos, inhiben la transformación linfocítica (TL) de células de individuos sanos PPD+ estimuladas con el antígeno específico. Proponen que estos componentes séricos son los anticuerpos, sin embargo, no aclaran el papel de éstos, ya que el efecto inhibitorio se obtuvo con la presencia permanente del suero tuberculoso en el cultivo celular. Este hecho permite plantear que la inhibición se puede deber a factores inespecíficos presentes en el suero, o bien, que el anticuerpo neutraliza al antígeno antes de que éste llegue a los receptores celulares, paso indispensable para llevar a cabo la transformación linfocítica.

En el modelo murino, Colizzi y cols. (33) observaron que las células linfoides de ratones inmunizados con BCG, no transfieren la respuesta de hipersensibilidad tardía al PPD a ratones normales, cuando antes de la transferencia, las células linfoides son tratadas con auto-anticuerpos con actividad anti-receptor para el antígeno.

La presencia de factores inhibidores de la estimulación linfocítica en suero de pacientes con otros padecimientos ha sido descrito por varios autores (36-38). Recientemente Kerr y cols. (20) y Hussein y cols. (39), describieron que el suero de pacientes con lepra lepromatosa es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos de sangre periférica de sujetos normales, cuando éstos son estimulados por el mitógeno fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), siendo este efecto eliminado al tratar el suero con proteína A de *Staphylococcus aureus*, lo que sugiere que el factor inhibidor es una IgG. Además, el factor inhibidos pudo ser absorbido por linfocitos T activados, actuando al parecer por inhibición de un evento temprano, que precede a la liberación de interleucina-2 (IL-2).

En el modelo de coccidioidomicosis, Cox y Pope (40) mostraron que es una IgG sérica y no los complejos inmunes, el factor responsable de la inhibición de la transformación linfocítica inducida por el antígeno específico.

Por último, Mejía-López y cols. (19), lograron reproducir in vitro la anergia celular característica de la tuberculosis pulmonar no reactiva, mediante la incubación de células de pacientes tuberculosos PPD+ con suero inmune de tuberculoso

anérgico. Además, la recuperación de la reactividad antígeno-específica de células de pacientes anérgicos, se obtuvo por incubación con altas concentraciones de PPD, seguida de lavados sucesivos y estimulación final con dosis óptimas del mismo antígeno. Tanto el efecto de inhibición con suero como el de recuperación de la reactividad de células anérgicas al antígeno, parecen ser específicos puesto que no se obtienen con suero normal ni se afectan por la respuesta a la PHA.

Aunque no se descarta la posibilidad de que sean complejos inmunes los responsables del efecto inhibitor del suero, al considerar los antecedentes citados, existen datos que apoyan el papel de los anticuerpos como posibles moléculas reguladoras en la tuberculosis y que están vinculados con los siguientes hechos: 1) relación de altos títulos de anticuerpos y niveles bajos de respuesta celular o viceversa (14,16); 2) inhibición de la intradermorreacción al PPD por auto-anticuerpos anti-idiotipo (33); 3) inhibición de la transformación linfocítica por anticuerpos anti-Mycobacterium (19,35); 4) utilización de altas dosis de antígeno para eliminar el componente inhibitor responsable del bloqueo de células de pacientes tuberculosos anérgicos (19); y 5) reinhibición con suero inmune de las células anérgicas "desbloqueadas" (19).

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el presente estudio, se propone obtener mayor información sobre el mecanismo por el cual el factor inhibitor del suero inmune ejerce su efecto en la respuesta celular del proceso tuberculoso. Para ésto se tratará de identificar, la población de células linfoides que está interactuando con este factor, así como su naturaleza química y sus características de reactividad inmunológica.

#### HIPOTESIS

El suero inmune de pacientes tuberculosos, bajo ciertas circunstancias, es capaz de inhibir la manifestación de la respuesta celular de estos pacientes. El efecto se debe a la acción de una inmunoglobulina sobre una población celular del paciente tuberculoso.

## OBJETIVOS

1. Obtener evidencias de que los anticuerpos específicos actúan como factores reguladores de la respuesta inmune celular en la tuberculosis.
2. Identificar la clase de inmunoglobulina que es responsable de este efecto.
3. Caracterizar la(s) población(es) celular(es) comprometida(s) en el fenómeno de inhibición mediado por anticuerpos.

## RUTA CRITICA

1. Separar sueros de individuos sanos y de pacientes tuberculosos anérgicos, estos últimos, con altos títulos de anticuerpos específicos.
2. Tratar los sueros por diferentes procedimientos para poder identificar el factor inhibidor, por adsorción de los sueros: a) con BCG; b) con proteína A-Sepharosa.
3. Obtener linfocitos de individuos sanos (testigo), de tuberculosos reactivos y de tuberculosos anérgicos.
4. Integrar los datos clínicos con los de laboratorio.
5. Enriquecer poblaciones adherentes y no adherentes de los individuos estudiados y proceder a diferentes tratamientos con suero, antes de la estimulación con antígeno y mitógeno, de los cocultivos de las poblaciones tratadas individualmente; esto se hará para identificar en cual de ellas se manifiesta el efecto de inhibición por suero inmune.
6. Promover el "desbloqueo" de las células no reactivas por tratamiento con altas concentraciones de PPD y cocultivarlas.
7. Evidenciar la presencia de anticuerpos sobre la superficie de células sometidas a diferentes tratamientos, mediante el método de inmunofluorescencia, utilizando anti-gammaglobulinas humanas marcadas con isotiocianato de fluoresceína.

## MATERIALES Y METODOS

**INDIVIDUOS:** Se estudiaron 24 pacientes tuberculosos reactivos y 14 pacientes tuberculosos no reactivos o anérgicos, provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), SS, México, D.F. La secuencia de los procedimientos diagnósticos siguió el camino ordinario: historia clínica, examen físico, radiológico y de laboratorio, incluyendo baciloscopia. Cada paciente fue clasificado como reactivo (TBP PPD+) o anérgico (TBP PPD-), con base en la presencia o ausencia de respuesta intradérmica al PPD. Adultos sanos de ambos sexos fungieron como testigos. Se obtuvo consentimiento de todos los individuos involucrados en este estudio, así como del Comité Ético y Científico del INER.

**ANTIGENOS:** Para la intradermorreacción se empleó el derivado proteico purificado (PPD), donado por el Instituto Nacional de Higiene, S.S. México, D.F. y la histoplasmina gentilmente proporcionada por la Dra C. Toriello, del Laboratorio de Micología Básica, del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. México, D.F. Se aplicaron 2 Unidades de Tuberculina (UT) y/o 4 UT de PPD/0.1 ml con intervalos de 10 días. La histoplasmina fue utilizada a una concentración de 17  $\mu\text{g}$  de proteína/0.1 ml. Para otros ensayos, el PPD fue ajustado a 1 000  $\mu\text{g}$  de proteína/ml, determinada por el método de Lowry y cols. (41). A partir de esta concentración, se obtuvieron las dosis de antígeno empleadas en los ensayos in vitro.

**MITOGENO:** Se utilizó fitohemaglutinina de Phaseolus vulgaris (PHA) (Microlab de México, D.F.). La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry y cols. (41), ajustándose a 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de RPMI-1640 (GIBCO Laboratorios, Grand Island, N.Y.).

**INTRADERMORREACCIONES:** Todos los individuos estudiados fueron sometidos a la prueba intradérmica tanto con el antígeno específico (PPD), como con un antígeno no relacionado (histoplasmina). El resultado de la prueba se leyó a las 24, 48 y 72 h después de su aplicación y se consideró reacción positiva cuando la zona de induración eritematosa fue mayor de 8-10 mm.

**DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS:** Se siguió la técnica de ELISA indirecta, según Voller y cols. (42). Resumiendo, se utilizaron placas de 96 pozos (Nunc, Denmark, W.-Germ), de fondo plano, conteniendo por pozo, 100  $\mu\text{g}$  de PPD/100  $\mu\text{l}$  de amortiguador de recubrimiento (carbonato-

bicarbonato pH 9.6). Se aplicó, a cada pozo, 100  $\mu$ l de cada dilución (a partir de 1:20) del suero problema en amortiguador salino de fosfatos-tween 20, pH 7.4. Para revelar se utilizaron 100  $\mu$ l del conjugado polivalente anti-Ig humana acoplada a fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a una dilución 1:1000 en el mismo amortiguador, añadiéndose posteriormente 100  $\mu$ l de la solución de sustrato p-nitrofenilfosfato (Sigma) preparado a una concentración de 10 mg/10 ml de amortiguador dietanolamina a un pH 9.8. Se incubó a temperatura ambiente en la obscuridad durante 20 min. Se detuvo la reacción adicionando 50  $\mu$ l de NaOH 3M, a cada pozo, y las placas se leyeron a 405 nm en un lector de micro-ELISA (Dynatech Laboratories Inc. modelo MR-300 Alejandría, VA.), expresando los resultados en densidad óptica (D.O.). Se tomaron como positivas las lecturas superiores a los valores promedio de los sueros procedentes de sujetos sanos PPD- .

ADSORCION DEL SUERO ANERGICO CON BCG: A una suspensión, de 2.5 mg de BCG (Instituto Nacional de Higiene), en 1 ml de amortiguador salino de fosfatos 0.1 M pH 8.0, se le adicionó igual volumen de suero inmune diluido 1:2 en el mismo amortiguador. Se incubó a 37°C por 1 h en agitación constante y posteriormente se centrifugó a 2,500 g por 30 min. El sobrenadante fue dializado contra solución salina balanceada y antes de su empleo en pruebas de inhibición de la transformación linfocítica, se determinaron proteínas por el método de Lowry y cols. (41), así como el título de anticuerpos anti-PPD por la técnica de ELISA indirecta (42).

ADSORCION DEL SUERO CON PROTEINA A-SEPHAROSA: A una columna de proteína A-Sepharosa CL-4B (Sigma), equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.1M pH 8.0, se aplicaron 2.5 ml del suero de pacientes anérgicos, adicionado de 2 ml del mismo amortiguador e incubando 30 min a 4°C. Después de pasar el suero por la columna 2 veces, se colectó el material no retenido y se almacenó a -20°C. Se lavó la columna con amortiguador de fosfatos 0.1M pH 8.0, hasta obtener una densidad óptica de cero. El material retenido por la columna fue eluido con amortiguador de glicina-HCl 0.1M pH 2.6. Se ajustó el pH del material a 7.0 con Tris-base 0.2 M pH 9.0. Se almacenó a -20°C, previa concentración por Amicon utilizando una membrana PM 10 (Amicon Colexington, Mass.). Antes de su utilización se determinó el título de la IgG con actividad anti-PPD tanto al material no retenido, como al eluido con tris-HCl, para lo cual se utilizó la técnica de ELISA indirecta (42), usando como conjugado anti-IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina. Las IgGs purificadas fueron caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (43) e inmunolectroforesis (IEF) (43). En la IEF se utilizaron placas de agarosa al 1 % en amortiguador de

barbital pH 8.4. La electroforesis de las muestras de IgGs se realizó en una cámara a 1.9 V durante 90 min. En seguida, se procedió a la difusión, a 4°C por 24 h, de una anti-IgG humana como revelador. Después de varios lavados, las placas fueron teñidas con azul de Coomassie (1:10 en ácido acético al 7 %), y finalmente desteñidas con ácido acético al 7 %. La técnica de PAGE-SDS se realizó en gel de poliacrilamida al 7.5 % pH 8.8. Las muestras se corrieron inicialmente a 100 V y después a 30 V durante 24 h, y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Se utilizó como referencia una IgG humana purificada, gentilmente proporcionada por el Departamento de Biología Experimental de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares bajos (Sigma).

**OBTENCION DE CELULAS:** Se realizó a partir de 15 a 20 ml de sangre periférica tanto de pacientes como de testigos, cosechada estérilmente en tubos Vacutainer heparinizados (Becton Dickinson, México, D.F.). Se mezcló la sangre con el anticoagulante y se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml estéril con tapón (Nunc), que contenía el mismo volumen de gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma) y se centrifugó por 45 min a 400  $\mu$ g. Se separó el paquete de células blancas, a las cuales, después de lavar 3 veces con RPMI 1640, se les determinó la viabilidad usando la técnica de exclusión con azul de tripano. Finalmente, las células se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células/ml, manteniéndolas en RPMI 1640 con 20 mM de amortiguador HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Laboratorios In Vitro, S.A. México, D.F.), 2 mM de L-glutamina y piruvato (Microlab) y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina (Scheramex, México, D.F.), siendo éste el medio suplementado. Las células obtenidas fueron separadas en subpoblaciones y sometidas a diferentes tratamientos.

**SEPARACION DE POBLACIONES ADHERENTES Y NO ADHERENTES:** Se procedió a la separación de las células en poblaciones adherentes y no adherentes, mediante la incubación de  $40 \times 10^6$  células/10 ml de RPMI suplementado, en botellas de cultivo (Nunc), durante 24 h. Se separó el sobrenadante enriquecido de células no adherentes y las que permanecieron adheridas se lavaron y se despegaron de las botellas con tripsina (Merck Schuchardt, W.-Germ), en una concentración de 0.25% P/V en amortiguador salino de fosfatos pH 8.0, incubando 3-5 min a 37°C. Por último, tanto la población adherente como la no adherente fueron lavadas varias veces por separado con RPMI 1640 y se resuspendió, cada una en 5 ml de RPMI suplementado. Se determinó la viabilidad por la técnica de exclusión con azul de tripano. Se utilizó también la prueba de esterasa inespecífica (44) (Sigma), para cuantificar el número de células esterasa positivas por cada 100 células y

se determinó el total de monocitos en cada población. La población de células adherentes de todos los individuos estudiados presentó un promedio de 83% de células esterasa positivas, mientras que en las no adherentes, el índice promedio fue de 1.3%.

TRATAMIENTOS ADICIONALES DE LAS POBLACIONES CELULARES: 1. Con suero inmune de pacientes anérgicos (19). Este tratamiento se realizó en ambas poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+ (reactivos). Las condiciones de incubación fueron: 400  $\mu\text{g}$  de proteínas del suero/ $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI 1640 suplementado, durante 12 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. El efecto del suero inmune sobre cada población fue estudiado por la prueba de transformación linfocítica (TL) (45) de cocultivos de diferentes poblaciones tratadas con el suero. Se utilizó el mismo tratamiento para los testigos de suero normal de sujetos sanos PPD- ; 2. Con suero inmune adsorbido con BCG. Ambas poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+, fueron incubadas, por separado, con 400  $\mu\text{g}$  de proteína de suero inmune adsorbido con BCG/ $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI 1640 suplementado, durante 12 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. El efecto del suero adsorbido, fue estudiado por la prueba de TL de los cocultivos de las diferentes poblaciones tratadas con el suero adsorbido. La incubación de células totales de los mismos pacientes con suero inmune anérgico (no adsorbido), funcionó como uno de los testigos de la prueba. 3. Con altas concentraciones de antígeno (19). Las células adherentes o no adherentes de cada paciente TBP PPD- (anérgico), fueron incubadas con altas concentraciones de PPD (400  $\mu\text{g}$  de proteínas/ $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI 1640 suplementado), durante 6 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Después de la incubación y de varios lavados, se procedió al ensayo de TL de los cocultivos de las diferentes poblaciones tratadas con altas concentraciones de antígeno. Como testigos se procesaron poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+.

TRANSFORMACION LINFOCITICA (TL): La capacidad de respuesta de las poblaciones enriquecidas de células adherentes y no adherentes, sometidas a los diferentes tratamientos adicionales, fue determinada por la prueba de transformación linfocítica (45), de cocultivos de ambas poblaciones en relación 1:1. En resumen, las células adherentes tratadas con los diferentes sueros o con altas dosis de antígeno, fueron cocultivadas con células no adherentes sin los respectivos tratamientos y viceversa. Como testigo, se procesaron simultáneamente células totales de cada individuo sin tratamiento adicional. Una vez establecidos los cocultivos y los cultivos de las células totales, se procedió a la estimulación con 50  $\mu\text{g}$  de PPD/ $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI 1640 o con 100  $\mu\text{g}$  de PHA/ $1 \times 10^6$

células/ml de RPMI 1640, siendo las dosis estimulantes de PPD y PHA previamente establecidas. La adición de antígeno a las células totales y a los cocultivos, se hizo en el momento en que se mezclaron las poblaciones, siendo que las células ya tenían un tiempo de incubación de 24 h desde su obtención. La adición del mitógeno a los testigos de estimulación inespecífica de células totales, se realizó a las 72 h antes de cosechar el cultivo. En determinadas circunstancias la incubación se prosiguió hasta 126 ó 132 h, dependiendo del cultivo, adicionando  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina 3H (actividad específica, 6.7 Ci/mmol, Dupont-New England Nuclear Research Products, Boston, Mass.) a  $1 \times 10^6$  células, 18 h antes de cosecharlas.

Los pasos subsiguientes siguieron el procedimiento establecido para la prueba de transformación linfocítica (45). En todos los experimentos se determinó la respuesta basal de las células, para obtener el índice de estimulación (I.E.), el cual se expresó como el cociente entre el valor de las lecturas de los cultivos estimulados y el de las lecturas de cultivos sin estimular. Cada experimento se hizo por duplicado.

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR POR LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA:** Se procesaron para inmunofluorescencia (46) las células totales, las poblaciones enriquecidas de células adherentes y de no adherentes, de todos los grupos de individuos estudiados; las diferentes poblaciones fueron previamente incubadas con suero anérgico, con IgGs purificadas por proteína A-Sepharosa, o bien tratadas con altas concentraciones de antígeno. Se tomaron muestras de  $20 \mu\text{l}$  conteniendo  $2 \times 10^5$  células y se colocaron en laminillas excavadas. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con acetona al 100% durante 3 min. A cada muestra se agregó, por separado,  $20 \mu\text{l}$  del conjugado anti-IgG o anti-IgM humana acoplada a isotiocianato de fluoresceína (Sigma), diluido 1:30 P/V en amortiguador salino de fosfatos-azul de Evans. Se incubaron las muestras en cámara húmeda a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 min. Se lavaron 2 veces con amortiguador salino de fosfatos pH 7.2, durante 5 min, en agitación constante. Se secaron las laminillas a temperatura ambiente y se montaron con una solución de amortiguador de fosfatos-glicerina a pH 7.8. En todos los experimentos se procesaron testigos de células sin tratamiento, para determinar la inmunofluorescencia inespecífica. Las laminillas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, W.-Germ.). Los resultados se expresaron por el índice de fluorescencia, el cual representa el promedio de cuatro campos ópticos de lectura. Se obtuvieron fotografías de las células fluorescentes, empleando películas Ektachrome 400 Asa

(Eastman Kodak Co. Rochester, N.Y.), a un tiempo de exposición de 4 a 6 min con filtro azul.

**ANALISIS ESTADISTICO:** Se calcularon las medias y las desviaciones estandar de los indices de estimulación de cada grupo de células sometidas a los diferentes tratamientos. Se consideraron las diferencias significativas, cuando el valor de  $p \leq 0.01$  para un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , determinado por la prueba de U de Mann-Whitney (47).

## RESULTADOS

Los datos clínicos y generales de los individuos estudiados se encuentran en la tabla 1. Todos los pacientes estaban bajo el tratamiento antituberculoso convencional, con hidracida del ácido isonicotínico (HAIN), etambutol y rifampicina.

La respuesta celular de los individuos estudiados fue determinada in vivo por la intradermoreacción al PPD. Los pacientes TBP PPD+ desarrollaron reacción cutánea positiva, con zonas de induración eritematosa entre 10 y 30 mm, mientras que los pacientes TBP PPD- se caracterizaron por la ausencia de respuesta cutánea en repetidos desafíos. Paralelamente se empleó un antígeno no relacionado, la histoplasmina, únicamente como testigo de reactividad cruzada, presentando lecturas negativas en todos los casos. Estos datos se complementaron con los hallazgos de laboratorio y con la respuesta al tratamiento antifímico, siendo que los pacientes TBP PPD+ resultaron en su mayoría con una baciloscopia pobre y evolución favorable al tratamiento, mientras que en los pacientes TBP PPD- la baciloscopia fue abundante, no hubo mejoría clínica, ni respuesta a los antifímicos y una evolución crítica del padecimiento, hecho que se considera propio del estado anérgico.

El suero inmune de pacientes anérgicos, utilizado en los experimentos de inhibición, mostró mayor título de anticuerpos que los sueros de tuberculosos reactivos al PPD, ya que en la determinación de anticuerpos específicos por la técnica de ELISA, se obtuvieron lecturas promedio de densidad óptica (D.O.) desde 1.92 a 0.78, correspondiendo a las diluciones de 1:20 y 1:640 respectivamente, en tanto las muestras séricas de pacientes tuberculosos reactivos fueron de 0.38 a 0.16 D.O. a las mismas diluciones. En los sujetos normales donadores sanos voluntarios, las lecturas promedio fueron de 0.018 D.O., confirmando la baja reactividad y negatividad de estos dos últimos tipos de sueros probados (19).

Para la realización de la prueba de transformación linfocítica fue necesario determinar las condiciones óptimas de estimulación del antígeno y del mitógeno utilizados. Los resultados se muestran en la figura 1 A y B. Se observa una respuesta máxima a las dosis de 50-100  $\mu\text{g}$  de PPD y a 100  $\mu\text{g}$  de PHA en los individuos sanos PPD+ y en los pacientes TBP PPD+. Por el contrario, las células de sujetos sanos PPD- sólo respondieron a PHA.

Para explicar la baja respuesta proliferativa al PPD de los linfocitos de pacientes tuberculosos anérgicos, se pueden considerar cuando menos dos mecanismos:

A) La presencia de un factor sérico que interfiere con el estímulo antigénico de los linfocitos, y/o

B) Que el estado refractario al estímulo antigénico reside en i) incapacidad genética de células linfocíticas u otra deficiencia funcional en el linfocito o ii) la célula presentadora del antígeno procesa y/o presenta inadecuadamente los antígenos de PPD al linfocito.

En el presente proyecto enfocamos la investigación a resolver el primer planteamiento, tratando de determinar si los anticuerpos participan de alguna manera, inhibiendo la respuesta proliferativa de los linfocitos respondedores al PPD.

Para analizar esta posibilidad empleamos células capaces de responder al PPD, las cuales se analizaron por su susceptibilidad a ser inhibidas en su respuesta proliferativa por efecto del suero inmune.

El ensayo de interferencia se realizó por la preincubación de las poblaciones celulares con los sueros, analizando su respuesta posterior al PPD.

#### TRANSFORMACION LINFOCITICA DE POBLACIONES CELULARES SOMETIDAS A DIFERENTES TRATAMIENTOS ADICIONALES

1. CON SUERO INMUNE: Los resultados de este tratamiento sobre las poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+, se presentan en la figura 2. Las células no adherentes incubadas con suero anérgico, inhibieron la transformación linfocítica al PPD de los cocultivos entre éstas y las células adherentes no tratadas; dando un valor promedio de los índices de estimulación (I.E.) de 1.6, que comparado a la media de los I.E. obtenidos con las mismas células incubadas con suero normal, presentan una diferencia

significativa ( $p = 0.002$ ). Por el contrario, con el tratamiento de células adherentes no se observó inhibición, ya que en los cocultivos con células no adherentes sin tratar se obtuvo un I.E. promedio de 5.0 y la diferencia de estos resultados, comparados con el tratamiento con suero normal, no fueron significativos ( $p = 0.028$ ). Al incubar ambas poblaciones con suero inmune, se manifestó nuevamente el efecto inhibitorio, con un I.E. promedio de 2.8, encontrándose una diferencia significativa ( $p = 0.016$ ) cuando fue comparado con las mismas células tratadas con suero normal. Los índices de estimulación para las poblaciones totales, en respuesta al antígeno PPD o al mitógeno PHA fueron elevados, dando valores promedio de 8.7 y 10.5 respectivamente. La incubación con suero normal no produjo inhibición sobre las poblaciones celulares de los pacientes reactivos, ya que los índices obtenidos fueron altos en todos los cocultivos formados, respondiendo éstos de un modo semejante a los testigos de células totales estimuladas con PPD o PHA.

2. CON SUERO INMUNE ADSORBIDO CON BCG: Con el fin de estudiar la especificidad del factor inhibidor del suero inmune, éste fue adsorbido con BCG y posteriormente probado en los experimentos de inhibición sobre las poblaciones celulares de 3 pacientes TBP PPD+. La figura 3 muestra los resultados de este tratamiento, donde se observa que el efecto inhibidor fue eliminado por la adsorción con el BCG, puesto que los valores de I.E. fueron semejantes en todos los cocultivos de las diferentes poblaciones tratadas con el suero adsorbido, así como en el testigo de estimulación de células totales. Esto es, se encontró un I.E. de 6.0 y 6.3 para los cocultivos que contenían células no adherentes o bien células adherentes tratadas respectivamente; y además un I.E. = 7.1 para los cocultivos en donde el tratamiento se aplicó a ambas poblaciones. Finalmente, el I.E. del testigo de estimulación fue de 7.2. Se determinó que existe una diferencia significativa entre los índices mencionados y el encontrado para el tratamiento de células totales con suero anérgico sin adsorber ( $p = 0.015$ ).

La prueba de ELISA reveló un título de anticuerpos anti-PPD de 1:40 para el suero adsorbido, siendo que el suero anérgico no adsorbido presentó un título de 1:1280.

Con el propósito de liberar a las células del anticuerpo inhibidor de la TL, se preincubaron con un exceso de PPD y se lavaron posteriormente. Este tratamiento condujo a una recuperación de la capacidad de respuesta proliferativa al PPD.

3. CON ALTAS CONCENTRACIONES DE ANTIGENO: La figura 4 muestra que este tratamiento, sobre células no adherentes de pacientes TBP PPD-, permitió que en los cocultivos entre éstas y las células adherentes no tratadas, se manifestara la recuperación en la respuesta al antígeno; siendo sus índices de estimulación mas altos con un valor promedio de 3.8, el cual es superior al encontrado para los testigos de células anérgicas totales sin tratar que fue de 2.2. La diferencia entre estos resultados alcanzó niveles significativos ( $p = 0.01$ ). Los cocultivos de células adherentes tratadas y de células no adherentes sin tratar dieron por lo general I.E. bajos, como lo indica el valor medio de 1.7. Como este valor es inferior a las lecturas obtenidas con los testigos de estimulación de células anérgicas totales, sugiere que no se presentó recuperación de la reactividad celular. El tratamiento de ambas poblaciones con altas concentraciones de antígeno, produjo resultados similares a los de los cocultivos que contenían células no adherentes tratadas, como lo indica el valor promedio de I.E. = 3.8, siendo que la diferencia entre este grupo y el testigo sin tratamiento de células anérgicas totales dió una  $p = 0.05$ . En general, las células de los pacientes TBP PPD- fueron reactivas a la PHA, con un I.E. promedio de 5.3, lo que indica que la anergia fue específica para el antígeno.

Los resultados de este tratamiento sobre las células no adherentes de pacientes TBP PPD+, que funcionaron como testigos, sugieren un posible bloqueo en la capacidad reactiva de estas células por las altas dosis de antígeno utilizadas; ya que sus cocultivos expresaron I.E. muy bajos con un valor promedio de 0.71 y 0.76. Sin embargo, el tratamiento de las células adherentes de estos pacientes reactivos con altas dosis de antígeno, no muestra un efecto tan marcado, respondiendo sus cocultivos con un I.E. promedio de 3.0. Los testigos de estimulación al antígeno y a la PHA de las células totales de los pacientes TBP PPD+ dieron índices de estimulación promedio de 4.2 y 4.6 respectivamente.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR: La técnica de inmunofluorescencia fue utilizada para demostrar la presencia de inmunoglobulinas sobre la superficie de poblaciones celulares (Fig 5). Células de pacientes reactivos incubadas con suero normal, anérgico o con IgGs purificadas, así como células de pacientes no reactivos que recibieron tratamiento con altas dosis de antígeno, fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando anti-IgG ó anti-IgM conjugadas con fluoresceína. Células de ambos grupos de pacientes sin respectivos tratamientos, así como células de individuos sanos PPD+ y PPD-, funcionaron como testigos en las diferentes series de experimentos. La

secuencia de resultados obtenidos, con la técnica de inmunofluorescencia, se observa en las tablas 2 y 3.

En la tabla 2 se advierte que poblaciones celulares no adherentes de pacientes TBP PPD-, portan abundante cantidad de IgG en su superficie, como se reveló con el conjugado anti-IgG fluoresceinado. También se observaron en menor cantidad, células no adherentes conteniendo IgM en su superficie. Por otro lado, cuando estas mismas células fueron sometidas a tratamiento con altas concentraciones de antígeno, no se apreciaron marcas fluorescentes a la observación microscópica. Tampoco se encontraron células marcadas, cuando la población estuvo enriquecida de células adherentes. Cuando se analizaron células de pacientes reactivos (Tabla 2), sólo se encontró la presencia de inmunoglobulinas en las células no adherentes que fueron incubadas con suero anérgico. Las células que no recibieron tratamiento con suero, así como las adherentes con o sin tratamiento, no presentaron fluorescencia.

Frente a la necesidad de expresar resultados más cuantitativos, se calcularon los índices de fluorescencia en los experimentos subsecuentes (Tabla 3). Al tomar en consideración los resultados de la tabla 2, únicamente se procesaron células no adherentes de pacientes reactivos, así como de testigos sanos, y se incluyó el tratamiento con IgGs purificadas (Tabla 3). Los mayores índices de fluorescencia se obtuvieron en las células de pacientes o de sanos PPD+ que fueron tratadas con suero anérgico o con IgG específica. Mientras que las células de pacientes TBP PPD+ tratadas con suero normal o con IgG normal, así como las células de los testigos PPD-, presentaron bajos índices de fluorescencia. Previa su utilización en los experimentos de inmunofluorescencia, se determinó, por diferentes técnicas, la actividad y pureza de las IgGs obtenidas. Por la técnica de ELISA (42), utilizando PPD como antígeno y revelando con una anti-IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina, los resultados mostraron la actividad antígeno-específica de la IgG purificada de suero inmune anérgico (IgG específica), dando una D.O. de 0.56 correspondiendo esta lectura a la dilución 1:160, mientras que para la IgG procedente de suero normal la D.O. promedio para todas las diluciones fue de 0.016. Además, la purificación de estas inmunoglobulinas fue comprobada por la prueba de inmunolectroforesis empleando como revelador una anti-IgG humana (Fig. 6), y por la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 7).

## DISCUSION

En los padecimientos intracelulares como la histoplasmosis, la lepra y la tuberculosis, entre otros, cuando se desarrollan formas diseminadas graves, se presentan diferentes alteraciones inmunológicas (14-16,34,21-25). En tales circunstancias, estas enfermedades comparten características de baja o ausente reactividad celular, hecho que es conocido como anergia (14) y que coincide con niveles elevados de anticuerpos. Esta anergia que es únicamente celular, ha sido identificada in vivo en pruebas cutáneas, así como in vitro a través de la prueba de transformación linfocítica (18,19,34). Normalmente, la existencia de este estado es simultáneo a la persistencia del microorganismo intracelularmente.

Aunque existen diferentes estudios sobre la interacción entre respuesta humoral y celular en el padecimiento tuberculoso, los realizados por Mejía-López y cols. (19) sugieren que los anticuerpos o complejos inmunes presentes en el suero inmune, son los posibles responsables de la inhibición de la respuesta celular, determinada por la prueba de transformación linfocítica (19). La inhibición fue obtenida solamente con suero inmune que contenía altos títulos de anticuerpos anti-PPD, lo que apoya un reconocimiento específico, posiblemente por anticuerpos, y descarta la participación de otros componentes séricos como C3, proteína C-reactiva,  $\alpha$ 1-anti-tripsina, que no tienen un comportamiento específico pero que han sido comprometidos en la regulación de la respuesta celular. El hecho de que el suero inmune no actúe sobre la respuesta mitogénica inducida por la PHA, en células tratadas con este suero, confirma el efecto específico de la inhibición por suero y sugiere que los receptores celulares para el mitógeno no fueron bloqueados (19). Por otro lado, resultados obtenidos con células de pacientes tuberculosos anérgicos, sometidas a tratamiento con altas concentraciones de antígeno, antes de la estimulación con dosis óptima de éste, sugieren que el componente inhibidor del suero se encontraba probablemente unido a la superficie de las células originarias de pacientes anérgicos (19). Con base en estos datos, en el presente trabajo se investigó la población celular capaz de ser afectada en presencia del suero anti-tuberculoso, y además, se caracterizó el componente sérico responsable del efecto de inhibición específica.

Tomando en cuenta que el paciente tuberculoso reactivo es un sujeto respondedor al antígeno, como se ve en la figura 1, y que esta respuesta puede ser inhibida in vitro por suero inmune (19), se obtuvieron de estos pacientes células adherentes y no adherentes, siendo cada población incubada separadamente con suero inmune o normal y mezcladas (cocultivos) para su posterior estimulación. El análisis de

los resultados mostró que solamente los cocultivos que contenían células no adherentes tratadas previamente con suero anérgico fueron inhibidos (Fig.2). Además, los resultados de la adsorción con BCG (Fig.3) apoyan que el factor inhibidor del suero es quizás una inmunoglobulina específica.

Sabiendo que las células de pacientes anérgicos no responden a la estimulación con el antígeno específico, pero que el tratamiento de éstas con altas concentraciones de PPD, antes de la estimulación final con la dosis óptima del mismo, permite "limpiar" la superficie de las células anérgicas volviéndolas nuevamente reactivas al antígeno (19); se obtuvieron de los pacientes anérgicos, células adherentes y no adherentes, siendo cada población tratada separadamente con altas concentraciones de PPD y mezclas (cocultivos) para su posterior estimulación con el mismo antígeno. El tratamiento de las células no adherentes permitió recuperar la reactividad de cocultivos conteniendo estas células, lo cual sugiere que las células no adherentes estaban inhibidas desde su obtención y que la presencia de altas cantidades de antígeno desplazó el elemento o componente "inhibidor", presente en su superficie, dejándolas aptas para responder al antígeno (Fig.4). Sin embargo, en la misma figura, se puede observar que el tratamiento con altas concentraciones de antígeno, indujo un efecto inhibidor sobre las células de los cocultivos de los testigos reactivos (TBP PPD+). Si se considera que las células reactivas, en presencia de exceso de antígeno, saturan sus receptores celulares para éste, entonces, se explicaría el porque no respondieron al estímulo con las dosis óptimas de PPD previamente establecidas (Fig.1A). Tanto los resultados de los experimentos de recuperación de reactividad de células anérgicas como los de inhibición de las células de los testigos reactivos, apoyan fuertemente que el receptor para el antígeno es el componente de superficie involucrado en la recuperación de la respuesta de reactividad celular, y por lo tanto, el posible blanco del factor inhibidor del suero.

En virtud de que el factor inhibidor del suero inmune es específico, puesto que sólo se encuentra en sueros inmunes con altos títulos de anticuerpos para Mycobacterium y es eliminado por la adsorción con BCG y que además no interfiere en la estimulación inducida por la PHA, se sugiere que el factor inhibidor podría ser un anticuerpo.

Tomando en cuenta que la recuperación de células anérgicas se hace por tratamiento con altas dosis de antígeno, se cree que el exceso de éste, desplaza al componente específico del suero inmune de la superficie de las

células, donde posiblemente actúa sobre el receptor para el antígeno. Este efecto podría ser de tipo anti-receptor, quizás por un reconocimiento a través de autoanticuerpos anti-idiotipo o bien de anticuerpos anti-Mycobacterium tuberculosis con actividad anti-idiotípica cruzada. Tal planteamiento no es novedoso, puesto que en el trabajo de Colizzi y cols. (33) se deja entrever esta acción anti-receptor.

En las enfermedades crónicas hay producción de auto-anticuerpos. En el caso particular de las micobacterias, se ha reportado que existe mimetismo molecular, provocando reactividad cruzada entre varios determinantes de las micobacterias y componentes del hospedero, induciéndose así condiciones de autoinmunidad en individuos susceptibles (48). Los experimentos realizados en el presente estudio, no fueron orientados a la determinación del efecto anti-receptor del factor inhibidor del suero inmune, sin embargo, esta idea será motivo de investigaciones futuras.

Se han descrito anticuerpos con actividad anti-linfocito en el suero de pacientes con lepra (49), así como también se han demostrado anticuerpos de clase IgM e IgG anti-timocito (50), aunque, no se ha encontrado correlación entre los niveles de estos anticuerpos y una depresión en la proliferación de linfocitos en respuesta a antígenos micobacterianos.

La presencia de anticuerpos de la clase IgG sobre la superficie de células no adherentes, de pacientes TBP PPD+ y de sujetos sanos PPD+, tratadas con suero inmune de paciente anérgico o con IgG específica, fue observada por inmunofluorescencia indirecta (Tablas 2 y 3, Fig. 5C). Además, el hecho de que las células no adherentes obtenidas directamente de pacientes TBP PPD- muestren alta fluorescencia al ser reveladas con el conjugado fluoresceinado de anti-IgG humana, sugiere que esta población trae una IgG en su superficie desde su origen (Tabla 2, Fig. 5A). Por último, la ausencia de fluorescencia en células no adherentes de pacientes anérgicos, sometidas al tratamiento con alta concentración de antígeno, comprobó las observaciones anteriores y apoya el planteamiento de que las células de pacientes anérgicos "cargan" anticuerpos desde su procedencia, y que el tratamiento dado a éstas, removió el componente adherido a su superficie (Tablas 2 y 3). En un modelo infeccioso similar Bullock y Fasal (51), identificaron a una IgG como inhibidor de la respuesta celular en la lepra lepromatosa, la cual se encuentra aumentada en estos pacientes, lo que concuerda con la información previa obtenida en nuestro laboratorio, para el modelo tuberculoso, donde

identificamos altos títulos de IgG en pacientes tuberculosos anérgicos (19). Finalmente Bjune y cols. (52), identificaron que el factor inhibidor en lepra es capaz de atravesar placenta, lo que nuevamente apoya nuestra observación en la tuberculosis de que el factor inhibidor del suero inmune es un anticuerpo de clase IgG.

Es importante destacar que tanto los resultados de inmunofluorescencia como los de cocultivos en la transformación linfocítica, confirman que la población no adherente es la que está comprometida con el fenómeno de inhibición, y que el efecto es específico puesto que la IgG purificada de suero inmune de pacientes anérgicos, es la que se identifica en la superficie de esta población (Tablas 2 y 3, Figs. 2-7).

Aunque los datos presentados sostienen que el suero inmune, particularmente la IgG específica, actúa sobre células no adherentes, es importante analizar el efecto que tiene sobre la población adherente, formada en su mayoría por monocitos esterase positivos. Debido a que estas células internalizan partículas o moléculas, podría sugerirse que en el caso de ellas, el efecto observado no se debe a un bloqueo de receptores para el antígeno, sino a la inducción de un factor supresor. No obstante, en ninguno de los cocultivos que contenían células adherentes tratadas, se pudo probar el efecto inhibidor de la reactividad celular. Sin embargo, no se puede descartar con este trabajo la presencia de factores supresores solubles, producidos tanto por células adherentes como por no adherentes, después del tratamiento con el suero inmune.

Los resultados presentados, sugieren que un componente específico del suero inmune inhibe la respuesta celular, por que actúa en células no adherentes impidiendo la estimulación por el antígeno específico, tanto en los pacientes tuberculosos anérgicos in vivo como en células de los pacientes reactivos cuando se induce inhibición in vitro con suero inmune. Será motivo de investigaciones futuras el determinar la presencia de factores supresores inducidos por la interacción anticuerpo/célula o complejo inmune/célula y caracterizar con anticuerpos monoclonales, la subpoblación celular que está actuando en este tipo de interacción.

### SUMMARY

Previous observations by the authors, suggest an specific inhibitory effect of tuberculous immune serum in the cellular response of tuberculous patients. This study is aimed at characterizing the cell population that is interacting with the antibody, as well as the immunoglobulin class involved in the inhibitory phenomenon.

The action of anergic immune sera adsorbed or not with BCG was studied on adherent and non-adherent cells from PPD+ tuberculous patients. Coculture of both cells was quantified by lymphocyte transformation (LT) test induced by PPD. Normal sera from healthy donors were used as controls. Furthermore, adherent and non-adherent cell populations from anergic tuberculous patients (PPD-) were separately treated with high PPD concentrations. Cell cocultures were performed, and their reactivities were also quantified by the LT test to PPD. Cells from PPD+ tuberculous patients were used as controls.

Results showed that only cocultures with non-adherent cells from PPD+ patients, treated with anergic sera, inhibited the LT assay when stimulated by the specific antigen, and serum adsorption with BCG eliminated the inhibitory effect; moreover, only cocultures with non-adherent cells from PPD- patients, treated with high PPD doses, were able to recover their ability to transform lymphocytes when stimulated with the optimal antigen dose. These findings suggest that the non-adherent cell population from reactive and anergic patients are the cell targets for the serum inhibitory effect. These results point out the specific behaviour of the inhibitory factor, since inhibition was eliminated by BCG adsorption, and support the role of antibodies as the probable responsible for this effect. Immunofluorescence assays showed IgG and IgM over the surface of non-adherent cells from anergic patients and from PPD+ tuberculous patients treated with anergic sera or specific IgG. This fact was confirmed by the immunoglobulin removal with high PPD concentration and subsequent loss of immunofluorescence.

## REFERENCIAS

- 1.- Shimaó, T. 1982. Las encuestas de prevalencia de la tuberculosis. Bol. U.I.C.T. 57: 127-133.
- 2.- Sakula, A. 1982. La historia del bacilo tuberculoso narrada por "la balada de la jeringa". Bol. U.I.C.T. 57: 192-193.
- 3.- Waaler, H.T. 1982. Tuberculosis y desarrollo socioeconómico. Bol. U.I.C.T. 57: 207-211.
- 4.- Hershfield, E.S. 1979. Tuberculosis in the world. Chest 76: 805-811.
- 5.- Fung C.H., J.W. Lo., T.N. Yonan, F.J. Milloy, M.M. Hakami, and G.W. Changus. 1977. Pulmonary blastoma. An ultrastructural study with a brief review of literature and a discussion of pathogenesis. Cancer 39: 153-163.
- 6.- Misra, D. P., E.V. Sunderrajan, M.J. Rosenholtz, and D.J. Hurst. 1983. Malignant fibrous histiocytoma in the lung masquerading as recurrent pulmonary thromboembolism. Cancer 51: 538-541.
- 7.- Girard, J. P., M. Paychere, M. Cuevas, and B. Fernandes. 1977. Cell-mediated immunity in an ageing population. Clin. Exp. Immunol. 27: 85-91.
- 8.- Dannenberg, A.M. Jr. 1989. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev. Infect. Dis. II: S369-S377.
- 9.- Stites, D.P., J.D. Stobo, and J.V. Wells. 1988. Inmunología Básica y Clínica. 6a ed. El Manual Moderno. México, D.F.
- 10.- Chase, M.W. 1945. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59: 134-135.
- 11.- Knapp, W., P. Rießer, B. Dörken, R.E. Schmidt, H. Stein, and A. E. G. Kr. v.d. Borne. 1989. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. Immunol. Today 10: 253-261.
- 12.- Suter, E. 1954. Multiplication of tubercle bacilli within mononuclear phagocytes in tissues cultures derived from normal animals and animals vaccinated with BCG. J. Exp. Med. 20: 94-132.

- 13.- Mackaness, G.B. 1954. The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits. *Am. Rev. Tuberc.* 69: 495-504.
- 14.- Gatner, E.M.S., and R. Anderson. 1982. Immune responses and immunostimulation in tuberculosis therapy. *S. Afr. Med. J.* 61: 707-710.
- 15.- Ridley, D.S., and W. H. Jopling. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Leprosy* 34: 255-273.
- 16.- Lenzini, L., P. Rottoli, and L. Rottoli. 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 27: 230-237.
- 17.- Youmans, G.P. 1982. Tuberculosis. In: Youmans, G.P., P.Y. Paterson, and H.M. Sommers (eds.). *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*. 3th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. p. 348-367.
- 18.- Taylor, M.L., H. Mejia-López, H. Rubio-Monteverde, O. Vaca-García, M.R. Reyes-Montes, J. Villalba-Caloca. A. Cruz-Chávez, y J.M. Cristerna-Aguirre. 1984. Inmunorregulación de infecciones intracelulares: Papel de los anticuerpos en los modelos tuberculosis e histoplasmosis. *Neumol. Cir. Tórax Méx.* 45: 32-36.
- 19.- Mejia-López, H., O. Vaca-García, J.M. Cristerna-Aguirre, A. Cruz-Chávez, M. Selman-Lama and M.L. Taylor. 1990. Tuberculous anergic sera or protein derivative treatment induces modification in lymphocyte transformation of cells from patients with tuberculosis. *J.Clin. Microbiol.* 28: 344-349.
- 20.- Kerr, M.A., Y.M. Hussein, R.C. Potts, J. Swanson Beck, and M.M. Sheriff. 1987. Characterization of a factor in leprosy serum that inhibits the growth of mitogen-stimulated normal human lymphocytes. *Immunology* 61: 117-123.
- 21.- Waxman, J., and M. Lockshin. 1973. *In vitro* and *in vivo* cellular immunity in anergic military tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 107: 661-664.
- 22.- Shiratsuchi, H., Y. Okuda, and I. Tzuyuguchi. 1987. Recombinant human interleukin-2 reverses in vitro-deficient cell-mediated immune responses to tuberculin purified protein derivative by lymphocytes of tuberculous patients. *Infect. Immun.* 55: 2126-2131.

- 23.- Rook, G.A.W., J. W. Carswell, and J.L. Stanford. 1976. Preliminary evidence for the trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of "anergic" tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 26: 129-132.
- 24.- Ellner, J.J. 1978. Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. *Ann. Int. Med.* 89: 932-933.
- 25.- Armstrong, J.A., and P.D'Arcy Hart. 1971. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis. with observations of fusion of lysosomes with phagosome. *J.Exp. Med.* 134: 713-740.
- 26.- Frehel, C., C. de Chastellier, T. Lang, and N. Rastogi. 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic Mycobacterium avium. *Infect. Immun.* 52: 252-262.
- 27.- D'Arcy Hart, P., M.R. Young, A. H. Gordon, and K.H. Sullivan. 1987. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. *J. Exp. Med.* 166: 933-946.
- 28.- Goren, M.B., P. D'Arcy Hart, M.R. Young, and J.A.Armstrong. 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 2510-2514.
- 29.- Myrvik, Q.N., E.S. Leake, and M.J. Wright. 1984. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of Mycobacterium tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 322-328.
- 30.- Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood, and M. McCarty. 1978. *Tratado de Microbiología*. 2a ed. Salvat Editores. Barcelona. p. 871-872.
- 31.- Yamamoto, H., and D.H. Katz. 1979. Effective suppression of hapten-specific delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in mice by anti-idiotypic antibodies. In: Bach, F.H., B. Bonavida, E.S. Vitetta, and F.C. Fox (eds.). *T and B Lymphocytes: Recognition and Function*. Academic Press. New York. p. 305-315.

- 32.- Yamamoto, H., M. Nonaka, and D.H. Katz. 1979. Suppression of hapten-specific delayed-type hypersensitivity responses in mice by idiotype specific suppressor T cells after administration of anti-idiotypic antibodies. *J. Exp. Med.* 150: 818-829.
- 33.- Colizzi, V., M. Giuntini, C. Garzelli, M. Campa, and G. Falcone. 1983. Auto-anti-idiotypic antibodies inhibit T-cell-mediated hypersensitivity in BCG-infected mice. *Cell. Immunol.* 80: 205-210.
- 34.- Taylor, M.L., S. Diaz, P.A. Gonzalez, A. C. Sosa, and C. Toriello. 1984. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: a hypothetical approach. *Rev. Infect. Dis.* 6: 775-782.
- 35.- Heilman, D.H., and W. McFarland. 1966. Inhibition of tuberculin-induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. *Int. Arch. Allergy* 30: 58-66.
- 36.- Nelson, D.S. 1972. Mouse serum factor depressing lymphocyte transformation. *Experientia* 28: 1227-1228.
- 37.- Ford, W.H., E.A. Caspary, and B. Shenton. 1973. Purification and properties of a lymphocyte inhibition factor from human serum. *Clin. Exp. Immunol.* 15: 169-179.
- 38.- Mortensen, R.F., A.P. Osmand, and H. Gewurz. 1975. Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-dependent lymphocytes and alteration of their functions. *J. Exp. Med.* 141: 821-839.
- 39.- Hussein, Y.M., M.A. Kerr, and J. Swanson Beck. 1987. The mechanisms of action of the factor in leprosy serum that inhibits the growth of mitogen stimulated normal human lymphocytes. *Immunology* 61: 125-129.
- 40.- Cox, R.A., and R.M. Pope. 1987. Serum-mediated suppression of lymphocyte transformation responses in coccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 55: 1058-1062.
- 41.- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 42.- Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe Laboratories Inc., London. p. 37-40.

- 43.- Stanworth D.R., and M.W. Turner. 1978. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their sub-units. In: Weir, D.M. (ed). Handbook of Experimental Immunology. 3th ed Blackwell Scientific Publication. Oxford. p. 6.1-6.102
- 44.- Yam, L.T., C.Y. Li, and W. H. Crosby. 1971. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Amer. J. Clin. Phathol. 55: 283-290.
- 45.- Haneberg, B., F. Wesenberg, and D. Aarskog. 1978. Lymphocyte multiplication in vitro induced by mitogens and antigens. Scand. J. Immunol. 8: 9-13.
- 46.- Wick, G., S. Baudner, and F. Herzog. 1978. Immunofluorescence: Contributions to the theory and practice of immunofluorescence. Ed. Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn.
- 47.- Siegel. S. 1977. Estadística no-paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Ed. Trillas. México.D.F. p. 240-244.
- 48.- Shoenfeld, Y., and D.A. Isenberg. 1988. Mycobacteria and autoimmunity. Immunol. Today 9: 178-182.
- 49.- Kreisler, J.M., A. Arnaiz, B. Pérez, and A. Bootello. 1975. Lymphocytotoxins in leprosy. Int. J. Leprosy 43: 91-94.
- 50.- Bahr, G.M., G.A.W. Rook, E. Moreno, P.M. Lydyard, F.Z. Modabber, and J.L. Stanford. 1980. Use of the ELISA to screen for anti-thymocyte and anti- $\beta_2$  microglobulin antibodies in leprosy and SLE. Immunology 41: 865-873.
- 51.- Bullock, W.E., and P. Fasal. 1971. Studies of immune mechanisms in leprosy. III. The role of cellular and humoral factors in impairment of the in vitro immune response. J. Immunol. 106: 888-899.
- 52.- Bjune, G., E. Duncan, R.S. Barnetson, and R. Melson. 1978. In vitro modulation of lymphocyte response to phytohaemagglutinin by plasma in mother and baby at the time of birth. Increased lymphocyte responses in babies of mothers with lepromatous leprosy. Clin. Exp. Immunol. 32: 517-522.

**TABLA 1. DATOS GENERALES DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS.**

GRUPO	PPD	BAAR	No DE INDIVIDUOS	EDAD (AÑOS)	SEXO	PROCEDENCIA
SANOS	-	-	6	22-35	4 F, 2 M	VOLUNTARIOS
SANOS	+	-	4	21-46	4 F	VOLUNTARIOS
TUBERCULOSOS PULMONARES CRONICOS (1)		+	24	19-65	24 M	INER*
TUBERCULOSOS PULMONARES AVANZADOS (2)	-	+++++	14	15-75	14 M	INER*

BAAR = Bacilos ácido alcohol resistentes.

\* = Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

(1) = TBP PPD+ (reactivos).

(2) = TBP PPD- (anérgicos).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**TABLA 2. PRESENCIA DE INMUNOGLOBULINAS SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS CELULAS DE PACIENTES TUBERCULOSOS**

INDIVIDUOS	POBLACION CELULAR	TRATAMIENTO ADICIONAL	CONJUGADO ANTI-IgG	FLUORESCENCIADO ANTI-IgM
TBP PPD-	NO ADHER	CON PPD*	-	-
		SIN PPD	++++ <sup>e</sup>	++
	ADHER	CON PPD*	-	-
		SIN PPD	-	-
TBP PPD-	NO ADHER	CON PPD*	-	-
		SIN PPD	+++	++
	NO ADHER	CON SUERO ANER**	++++ <sup>e</sup>	++
		SIN SUERO ANER	-	-
TBP PPD+	ADHER	CON SUERO ANER**	-	-
		SIN SUERO ANER	-	-

Se trabajó  $1 \times 10^6$  células /20  $\mu$ l/pozo.

e = Exceso de células fluorescentes.

\* = Tratamiento con altas concentraciones de PPD.

\*\*= Tratamiento de inhibición con suero inmune de pacientes anérgicos (ANER)

NO ADHER = Células no adherentes.

ADHER = Células adherentes.

**TABLA 3. PRESENCIA DE INMUNOGLOBULINAS SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS CELULAS NO ADHERENTES.**

INDIVIDUOS	TRATAMIENTO CON SUERO o IgG	INDICE DE FLUORESCENCIA	
		ANTI-IgG	ANTI-IgM
TBP PPD+	ANERGICO	6.0	1.0
	NORMAL	1.0	2.0
TBP PPD+	ANERGICO	2.0	1.0
	NORMAL	1.0	1.0
TBP PPD+	IgG ESPECIFICA*	4.9	0.2
	ANERGICO	1.8	0.95
	NORMAL	0.95	0.0
	IgG ESPECIFICA	2.0	ND
TBP PPD+	IgG NORMAL**	0.2	ND
	ANERGICO	3.0	ND
	NORMAL	1.0	ND
	IgG ESPECIFICA	2.0	ND
TBP PPD+	IgG NORMAL	0.0	ND
	ANERGICO	5.0	ND
	NORMAL	0.0	ND
	IgG ESPECIFICA	2.0	ND

TABLA 3. (CONTINUACION).

INDIVIDUOS	TRATAMIENTO CON SUERO o IgG	INDICE DE FLUORESCENCIA	
		ANTI-IgG	ANTI-IgM
SANO PPD+	IgG ESPECIFICA	2.0	0.2
	ANERGICO	0.7	0.0
	NORMAL	ND	0.0
SANO PPD+	IgG ESPECIFICA	0.5	ND
	IgG NORMAL	0.25	ND
	ANERGICO	0.5	ND
	NORMAL	0.2	ND
SANO PPD-	IgG ESPECIFICA	0.2	0.0
	ANERGICO	0.1	ND
	NORMAL	0.0	0.0
SANO PPD-	IgG ESPECIFICA	0.0	ND
	ANERGICO	0.0	0.0
	NORMAL	0.0	ND

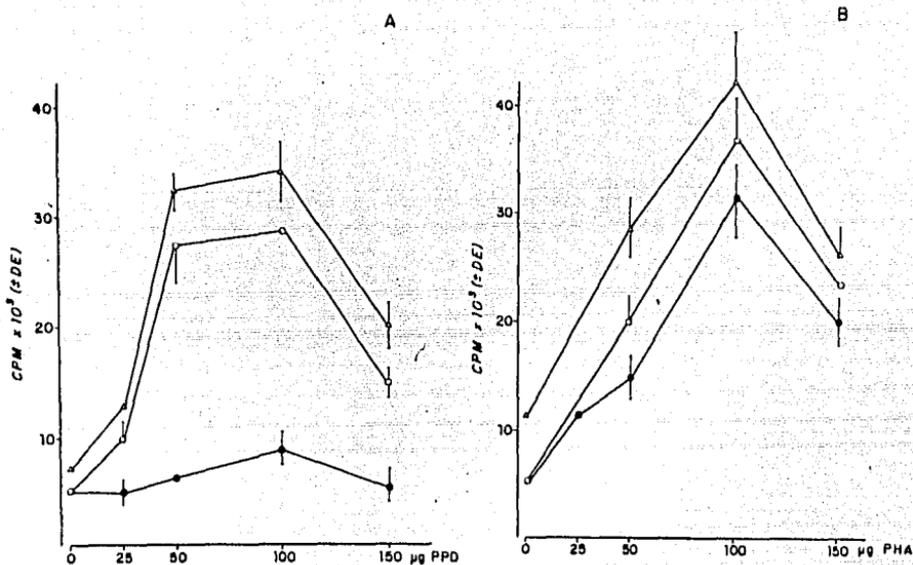
Se trabajó  $2 \times 10^4$  células/20  $\mu$ l PBS, pH 7.2.

\* = IgG específica purificada a partir de suero inmune de paciente anérgico.

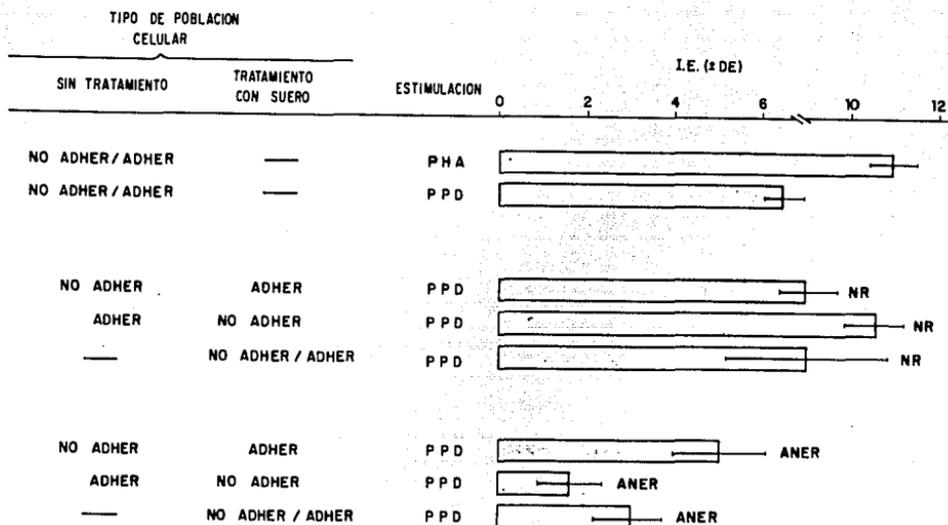
\*\* = IgG normal purificada a partir de suero de sujetos sanos

PPD--Las IgGs fueron obtenidas por cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharosa 4B.

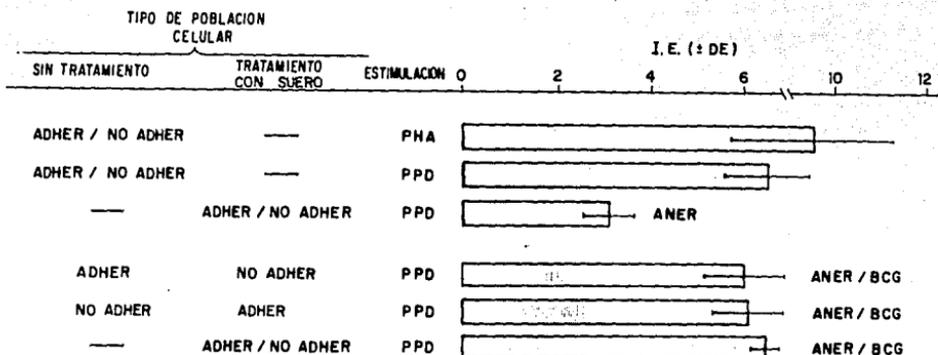
ND = No determinado.



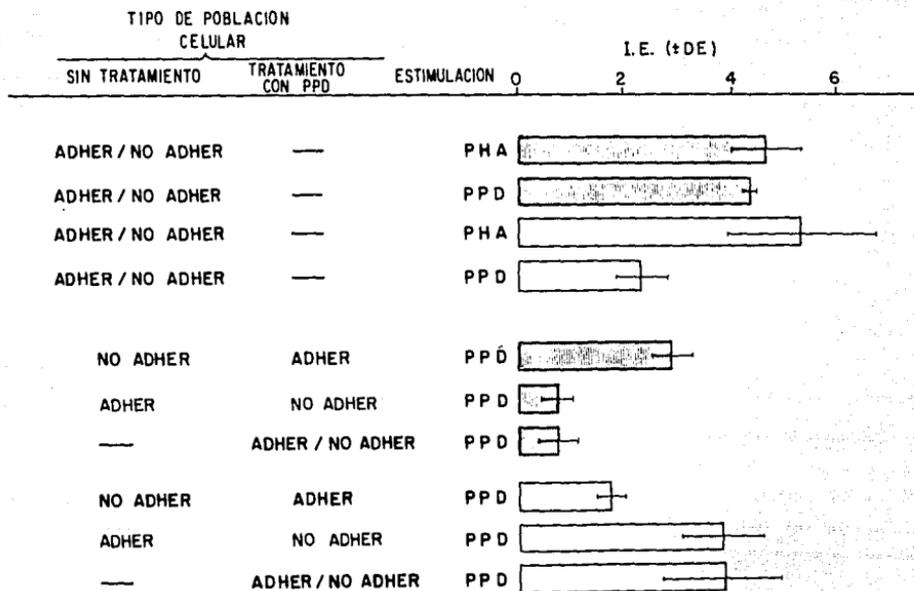
**FIG. 1.** Dosis respuesta al PPD (A) y PHA (B) en la prueba de TL. Células de 6 individuos sanos PPD+ (○—○), 2 individuos sanos PPD- (●—●) y 6 pacientes reactivos (△—△) fueron separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque. Se usaron diferentes dosis (0, 25, 50, 100 ó 150 µg de proteínas) de PPD o de PHA. La prueba de TL se realizó como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media de cada grupo  $\pm$  desviación estandar (D.E.).



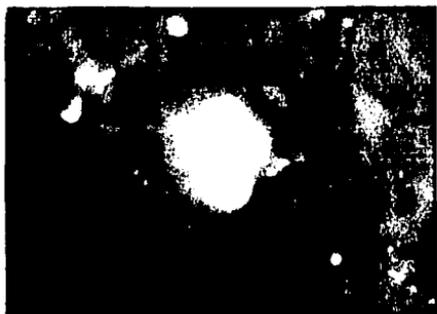
**FIG.2.** Efecto del tratamiento con suero inmune de pacientes anérgicos en diferentes poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+. Células adherentes o no adherentes, de cada paciente, fueron incubadas separadamente, durante 12 h, con suero anérgico (ANER) o suero normal (NR). Se muestra en la figura la población que recibió el tratamiento con suero, así como la población testigo sin tratamiento. Después de la incubación se lavaron las células y se realizaron cocultivos, los cuales fueron estimulados con PPD. Ver detalles en Materiales y Métodos. Se procesaron testigos de estimulación de células totales con PPD y PHA. Las barras expresan el índice de estimulación (I.E.) de 7 pacientes tratados con suero anérgico y 3 con suero normal  $\pm$  desviación estandar (D.E.).



**FIG.3.** Efecto del tratamiento con suero inmune adsorbido con BCG. Células adherentes y no adherentes, de cada paciente TBP PPD+ fueron incubadas separadamente, durante 12 h con suero anérgico adsorbido con BCG. Se muestra en la figura la población celular que recibió el tratamiento con suero adsorbido. Después de la incubación se lavaron las células y se realizaron cocultivos, los cuales fueron estimulados con PPD. Ver detalles en Materiales y Métodos. Se utilizó como testigo células totales tratadas con suero anérgico sin adsorber. Las barras expresan el índice de estimulación (I.E.) de 3 pacientes TBP PPD+  $\pm$  desviación estándar (D.E.).



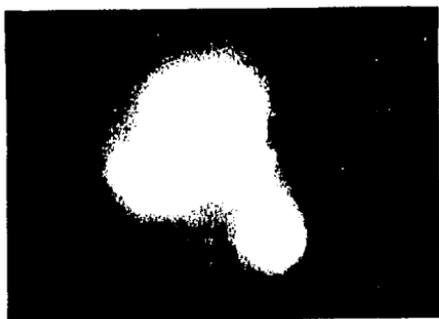
**FIG. 4.** Efecto del tratamiento con altas concentraciones de antígeno en diferentes poblaciones celulares de pacientes tuberculosos. Células adherentes y no adherentes, de cada paciente TBP PPD- (□), fueron incubadas separadamente, durante 6 h, con 400  $\mu$ g de PPD. Se utilizaron como testigos poblaciones celulares de pacientes TBP PPD+ (▨). Se muestra en la figura la población celular que recibió tratamiento con altas concentraciones de antígeno. Después de lavar las células se realizaron cocultivos, los cuales fueron estimulados con PPD. Ver detalles en Materiales y Métodos. Se procesaron también testigos de estimulación de células totales con PPD y PHA. Las barras representan el índice de estimulación (I.E.) de 4 pacientes TBP PPD- y 3 pacientes TBP PPD+  $\pm$  desviación estandar (D.E.).



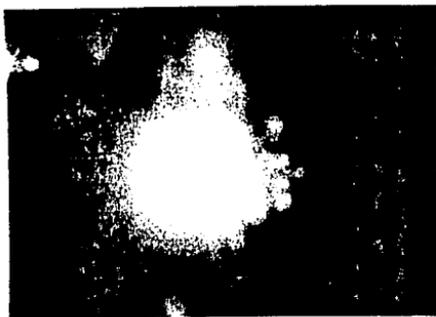
A



B

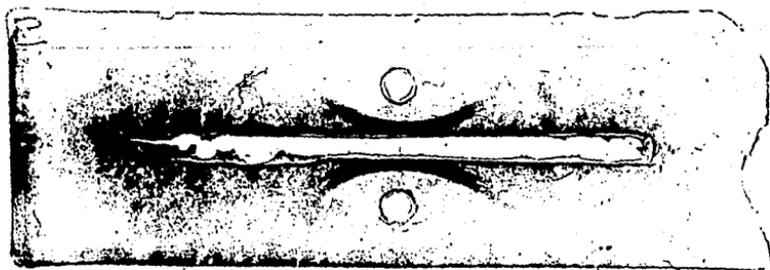


C

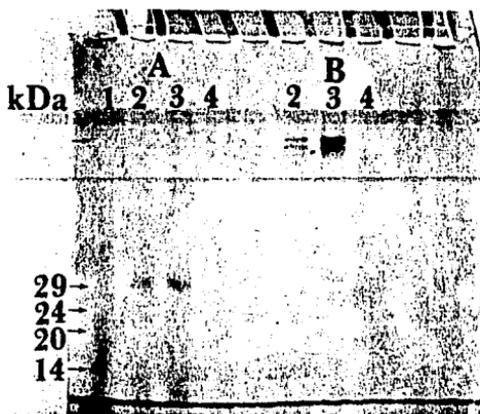


D

FIG. 5. Microscopia de fluorescencia de células no adherentes de pacientes TBP PPD+ y TBP PPD-. Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, empleando conjugados de anti-Igs humanas acopladas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) Ver detalles en Materiales y Métodos. A) Células no adherentes de pacientes TBP PPD- revelados con anti-IgG-FITC. B) Células no adherentes de pacientes TBP PPD- reveladas con anti-IgM-FITC. C) Células de pacientes TBP PPD+ tratadas con suero inmune y reveladas con anti-IgG-FITC. D) Células de pacientes TBP PPD+ tratadas con suero inmune y reveladas con anti-IgM-FITC. Ektachrome 400 Asa. A y C 1280 X, B y D 3200 X.



**FIG. 6.** Inmunoelectroforesis de las IgGs purificadas. Las condiciones de la IEF se detallan en Materiales y Métodos. A) IgG de suero inmune; B) IgG de suero normal; C) anti-IgG humana.



**FIG. 7.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las IgGs purificadas. Las condiciones de la PAGE-SDS se detallan en Materiales y Métodos. 1) Patrón de pesos moleculares bajos; 2) IgG de suero inmune; 2) IgG de suero normal; 4) IgG humana testigo. A) En condiciones reductoras; B) En condiciones no reductoras: 2,3,4.