

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

21  
Lej.

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA DE UN  
SOBRENADANTE DE MACROFAGOS ESTIMULADOS  
CON PROTEINAS DE *M. tuberculosis*

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

PRESENTA

IMPRESO CON  
FALLA DE ORIGEN

Luis Felipe Montaña Estrada

Mexico D.F.

1992

TUTOR| DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

**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.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS _____	
RESUMEN _____	
INTRODUCCION _____	
Que es la tuberculosis _____	1
Características de las micobacterias _____	7
La micobacteria y la respuesta inmune _____	8
MATERIAL Y METODOS _____	
Medios de siembra _____	17
Obtención de cepas de referencia _____	17
Obtención de cepas de pacientes _____	18
Esquema de siembra de micobacterias _____	18
Obtención del extracto proteico _____	19
Extracto a diferentes porcentajes de precipitación _____	20
Electroforesis en poliacrilamida-----	21
Obtención de células periféricas mononucleares _____	21
Obtención y características de la línea J. 774.A1 _____	22
Producción de sobrenadante con acción supresora _____	22
Ensayo de proliferación con sobrenadante--	24
Producción y purificación de IL-1 _____	25
Ensayo de detección de IL-1 _____	26

Producción de suero hiperinmune anti-extracto _____	27
Producción de anticuerpos monoclonales _____	28
ELISA _____	29
Inmunoelectrotransferencia _____	30

## RESULTADOS \_\_\_\_\_

Caracterización del extracto proteico de M. tuberculosis _____	32
Estandarización del ensayo de proliferación _____	32
Inducción de sobrenadante supresor _____	33
El extracto proteico de M. tuberculosis no es supresor _____	34
La actividad supresora del sobrenadante derivado de células adherentes es concentración dependiente y es termolabil _____	36
La producción del sobrenadante con actividad supresora, por las células adherentes, es tiempo dependiente _____	36
Al iniciarse la actividad mitogénica el sobrenadante supresor ya no ejerce su efecto _____	39
El efecto supresor es primordialmente sobre PHA _____	40
Inhibición en la producción de sobrenadante supresor _____	40
El sobrenadante con actividad supresora es inducido por extracto protéico de micobacterias aisladas de pacientes _____	43
El sobrenadante con actividad supresora no es prostaglandina _____	44
El porcentaje de precipitación del extracto sí afecta la inducción de actividad supresora en el sobrenadante _____	45

La actividad supresora del sobrenadante se incrementa con la dialisis_____	45
La supresión también afecta a la estimulación antígeno específica_____	47
La supresión es reversible_____	47
La inducción de sobrenadante supresor se inhibe ligeramente en presencia de el anticuerpo monoclonal MM-TB1-D.6_____	48
Reversión de la actividad supresora con material enriquecido en IL-1_____	51
DISCUSION_____	53
REFERENCIAS_____	68

## RESUMEN

En el presente trabajo se describe la producción y la excreción, por parte de macrófagos tanto humanos como murinos expuestos a un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, de un componente protéico, soluble, no dializable y termolabil capaz de inhibir la respuesta proliferativa de células periféricas mononucleares humanas a la fitohemaglutinina. La inducción del componente responsable es dosis dependiente y se mantiene durante 7 días, en forma de meseta, a partir de las 48 horas de haber estimulado al macrófago. La producción del componente con actividad supresora se bloquea al incubar los macrófagos con suero hiperinmune dirigido contra las proteínas presentes en el filtrado. El componente responsable de la supresión no se produce por *M. tuberculosis* sino que corresponde a un producto de síntesis del macrófago. El anticuerpo monoclonal MM-TB1-D.6, que reconoce un epítopo presente en una proteína de 65 kDa y en el doblete 31/33, inhibió parcialmente la producción del componente supresor. La incubación de macrófagos con las proteínas de 18, 31 y 33 kDa aisladas de *M. tuberculosis* indujeron un sobrenadante con actividad supresora el cual pudo bloquear la respuesta proliferativa de timocitos murinos a la interleucina 1.

Todo parece indicar que la actividad que se describe corresponde a un inhibidor de IL-1. La presencia de estos inhibidores se ha descrito en pacientes con fiebre, con esclerodermia o infectados con virus, incluyendo al responsable del síndrome de inmunodefici-

ciencia adquirida, sin embargo, hasta la fecha no se había descrito que **M. tuberculosis** tuviera la capacidad de inducir la producción de estas proteínas reguladoras.

La producción del inhibidor de IL-1 derivado de un fragmento peptídico de la proteína de 65 kDa presente en **M. tuberculosis**, y que pudiera corresponder a una porción de proteína de choque térmico, permitiría establecer una explicación de la relación entre los macrófagos supresores descritos en tuberculosis, pero que hasta la fecha no se han podido caracterizar fenotípicamente, y los linfocitos T cooperadores los cuales son funcionalmente deficientes en tuberculosis. La síntesis del inhibidor autólogo de IL-1 en las fases tempranas de la infección da al **M. tuberculosis** ventaja biológica.

## INTRODUCCION

La tuberculosis es probablemente una de las enfermedades más antiguas reconocida por la humanidad; se conocen restos, que datan de la época Neolítica, que muestran enfermedad de Pott. Durante los siglos XVII a XIX D.C., la "Gran Plaga Blanca" fue la principal causa de muerte en Europa<sup>1</sup>.

La tuberculosis es una entidad clínico-patológica producida primordialmente por bacterias del genero *Mycobacterium* especie tuberculosis<sup>2</sup>. Las otras micobacterias que se ha demostrado causan enfermedad en el humano y que se conocen como atípicas son: *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. zslugai*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, *M. gastri*, *M. terrae-triviale*, *M. fortuitum-chelonei*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans*, *M. bovis* y *M. balnei*<sup>3-5</sup>.

Las micobacterias se pueden demostrar en las secreciones del organismo tales como expectoración, líquido de derrame pleural, líquido pericárdico, etc.. utilizando tinciones para bacilos ácido-alcohol resistentes como la de Ziehl-Nielsen (carbolfucsina y azul de Loeffler) o la de Kinoyoun (fucsina-fenol-alcohol-agua y azul de Loeffler), o bien tinciones con colorantes fluorescentes tales como la auramina-rodamina<sup>6</sup>.



La enfermedad se caracteriza por atacar individuos que se encuentran en malas condiciones de higiene, habitación y alimentación<sup>7</sup>. La enfermedad puede ser de primoinfección o de reinfección. En 1970 se estimaba que mas de la mitad de la población mundial había sido infectada con la micobacteria y además se sabe que, globalmente, hay 20 millones de nuevos casos activos, que infectan entre 50 y 100 millones de personas en las áreas de mayor prevalencia, y 3 millones de muertes, por año<sup>8</sup>. Esta situación no ha mejorado mucho<sup>9</sup>.

En la primoinfección la micobacteria se localiza en el foco primario, o foco de Gohn, que se encuentra en una zona subpleural del parénquima pulmonar; de ahí se disemina a los ganglios hiliares regionales constituyendo el complejo primario de Ranke. Cuando la infección no se controla, el complejo empieza a aumentar de tamaño y empiezan a verse afectadas áreas extensas del parénquima pulmonar, así como un mayor numero de ganglios hiliares. Conforme aumenta el tamaño de la lesión, el material caseoso se va licuificando lo que permite la eliminación de micobacterias a través de los bronquios, su diseminación a otras áreas del parénquima y en ocasiones su diseminación a todo el organismo por erosión de la capa íntima de los vasos arteriales<sup>10</sup>.

Estos eventos se pueden integrar en cuatro etapas<sup>11</sup>: la primera en la que el bacilo que entró por inhalación al alvéolo es inge-

rido por un macrófago alveolar y generalmente destruido. La eliminación del germen depende de la actividad microbicida y de la virulencia de la bacteria. Si el bacilo sobrevive, se inicia la segunda etapa que es de simbiosis. En esta, los bacilos se multiplican en monocitos que llegan de la circulación periférica atraídos por los factores quimioattractantes liberados por el bacilo y por los macrófagos activados. En esta fase los macrófagos no dañan al bacilo pues aun no han sido activados y los bacilos no son tóxicos para el macrófago ya que todavía no se inicia la respuesta de hipersensibilidad tardía por parte del huésped; la simbiosis permite la proliferación bacilar y la atracción celular al sitio de lesión. Cuando el crecimiento de los bacilos termina se inicia la tercera fase que corresponde a la respuesta inmune celular que trata de inhibir el crecimiento de las bacterias; si falla, el huésped utiliza a la hipersensibilidad tardía para causar necrosis caseosa con el objeto de matar a los macrófagos no activados en los que el crecimiento del bacilo se ve favorecido. El bacilo puede sobrevivir en el material caseoso pero no se puede multiplicar dando oportunidad a que lleguen, en los individuos resistentes, nuevos macrófagos activados los cuales destruyen a los bacilos y forman el granuloma por efecto de citocinas liberadas por linfocitos T; sin embargo, en los individuos susceptibles los macrófagos que llegan no están activados favoreciendo la reproducción de las bacterias. Si por alguna razón [enzimas hidrolíticas o respuesta tardía a antígenos secretados de la micobac-

teria] la lesión caseosa se licuifica, la enfermedad progresa, independientemente de si el individuo es resistente o no, ya que este material favorece la reproducción extracelular de las micobacterias.

La tuberculosis de reinfección se da en individuos que tuvieron primoinfección sin embargo se apoya más que la reinfección sea exógena. No se puede descartar la diseminación de micobacterias a partir del complejo primario. Este tipo de tuberculosis se localiza preferencialmente en las regiones subapicales de los lóbulos superiores de los pulmones y la licuefacción del material de las zonas de necrosis caseosa dan lugar a las cavernas; estas cavernas pueden tener drenaje bronquial y en ocasiones se observa la presencia de vasos de calibre macroscópico que atraviesan la caverna y que no han sido destruidos por el proceso de necrosis<sup>10</sup>.

El bacilo tuberculoso se disemina principalmente por gotas y por el esputo de individuos con lesiones pulmonares abiertas; las gotas de la expectoración son probablemente mas efectivas, ya que se secan rápidamente y forman núcleos de aproximadamente 5 micras de diametro que penetran mas fácilmente a los alvéolos. El bacilo puede sobrevivir hasta 6 semanas en ambientes húmedos o en el esputo seco.

La incidencia de la enfermedad es elevada en los grupos sociales

pobres que viven en condiciones de hacinamiento, hombres mayores de 65 años, solos, que viven en los barrios bajos de ciudades grandes, muchas veces alcohólicos y desnutridos<sup>12,13</sup>. Algunos razas humanas (esquimales, indios americanos, negros) parecen tener susceptibilidad genética a la tuberculosis<sup>1,14</sup>.

La incidencia de muertes por tuberculosis en los EU ha disminuido de 150 blancos y 450 no blancos x 100,000 habitantes en 1910, a 2.5 y 8, respectivamente, en 1973<sup>15</sup>. La incidencia de casos nuevos en los EU ha disminuido de 52 x 100,000 hab. en 1953 a 10.3 x 100,000 hab. en 1990; sin embargo estas cifras tienden a incrementarse tal y como lo demuestra la incidencia de casos nuevos en Nueva York que en 1989 era de 36 x 100,000 hab. y en 1990 había aumentado a 48 x 100,000 hab.<sup>16</sup>; así mismo no podemos olvidar la heterogeneidad geográfica que muestra diferencias importantes en la incidencia de la enfermedad en un mismo país. En 1990 se calculó, en Miami, una incidencia de 75.9 x 100,000 hab. mientras en Boston fue de 20.9<sup>16</sup>. El promedio general en los EU en la década de los 80 fue de 30,000 casos nuevos y 3,000 muertes por año.

Desafortunadamente las cifras en México no son tan alentadoras. La incidencia de casos nuevos por año es de 22 x 100,000 hab<sup>17</sup>. Sin embargo hay que resaltar el beneficio que se ha obtenido con las campañas permanentes de vacunación, control y detección de casos nuevos, ya que en 1972 la morbilidad en México fue de 32.8

x 100, 000 hab. También en nuestro país observamos la heterogeneidad geográfica, ya que estados como Guerrero, Chiapas o Baja California Norte tienen una incidencia más elevada que Sinaloa o Chihuahua<sup>17</sup>.

Este problema no es privativo de la República Mexicana; el censo de la Oficina Panamericana de la Salud menciona que en 1974 la tasa de morbilidad por tuberculosis por 100,000 habitantes varió entre 3.4 para Costa Rica y 19.4 para Paraguay. En 1984 estas cifras fueron de 1.6 y 8.3, respectivamente<sup>18</sup>.

Las complicaciones que produce la tuberculosis pulmonar se pueden englobar en dos grupos: intratorácicas y extratorácicas. En el primero tenemos a la hemorragia pulmonar, las adherencias pleurales que por lo general se localizan en las porciones apicales de ambos pulmones, el engrosamiento de la pleura (paquipleuritis) y el empiema, en el cual la cavidad pleural se llena de bacilos y material purulento dando con frecuencia origen a fístulas las cuales son de difícil manejo<sup>10</sup>.

Las complicaciones extratorácicas se pueden dividir en dos subgrupos: diseminación y amiloidosis secundaria. La diseminación se puede dar a porciones superiores del aparato respiratorio, al aparato digestivo, al sistema nervioso central, a los huesos y a los riñones. Estos últimos son más afectados por el depósito de

material amiloideo que por la diseminación de micobacterias<sup>10</sup>.

**CARACTERISTICAS DE LAS MICOBACTERIAS.**- Las micobacterias son bacterias de forma bacilar que se tiñen difícilmente pero una vez teñidas y dependiendo de la integridad de su estructura celular, resisten la decoloración por ácido o por alcohol. Por lo general crecen en masa debido al carácter hidrofóbico de la superficie de la célula. Son aerobios estrictos y derivan su energía de la oxidación de compuestos sencillos de carbono. Estan constituidos por lípidos, proteínas y polisacáridos. Los organismos "eugónicos" forman colonias rugosas con bordes irregulares y su crecimiento es estimulado por glicerol. Los bacilos se ordenan en cadenas paralelas y forman cordones serpentinos microscópicos (factor cuerda), los cuales por ser potentes inhibidores de la migración de leucocitos se han relacionado con la virulencia. Estos cordones se extraen a partir de bacilos virulentos con éter de petróleo<sup>10</sup>.

La mayoría de los lípidos estan unidos a las proteínas y/o a los polisacáridos. Posiblemente los lípidos son los responsables de la mayoría de las reacciones celulares y el análisis de los lípidos por cromatografía de gas ha revelado patrones especie-especificos<sup>19,20</sup>. Todos estos elementos se encuentran fundamentalmente en la pared celular. La figura 1 esquematiza la localización y los componentes de la pared celular de la micobacteria.

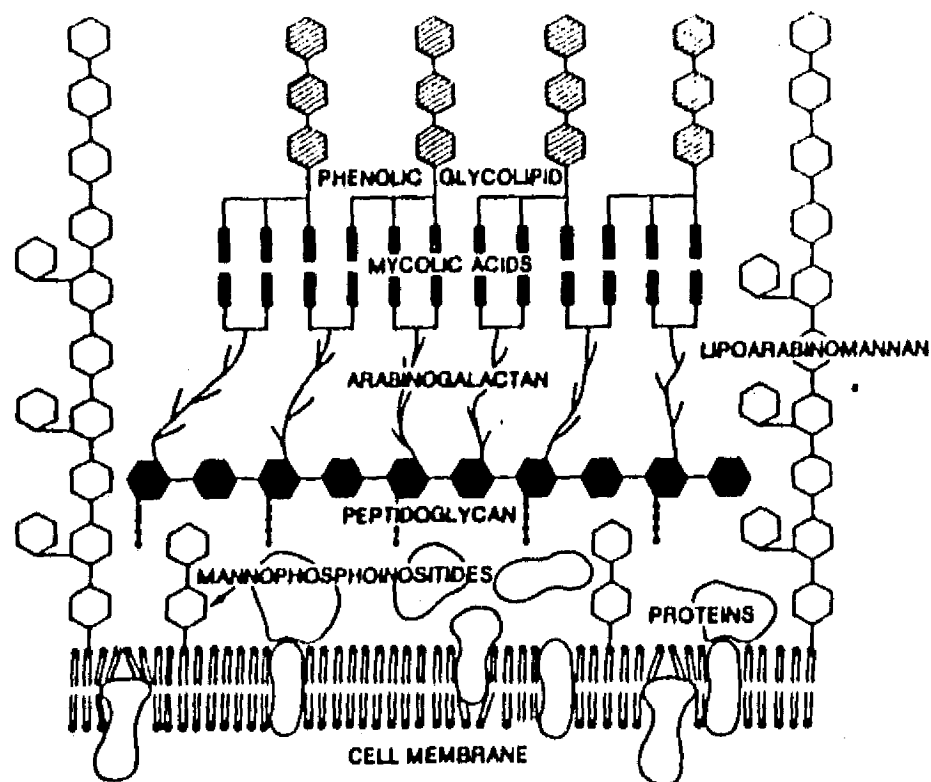


Figura 1.) Modelo químico esquematizado de la pared celular de la micobacteria (tomado de *Microbial Determinants of Virulence and Host Response*, Ayoub EM, Cassell W, Branche WC & Henry TJ (eds.), American Society for Microbiology, Washington CD, 1990).

**LA MICOBACTERIA Y LA RESPUESTA INMUNE.**- Para poder analizar los numerosos efectos que *M. tuberculosis* ejerce sobre la respuesta inmune sería indispensable esquematizar de manera muy simple, esta última<sup>21</sup>. Aun así sería difícil integrar todos los sitios de acción de la micobacteria y/o alguno de sus componentes. Por lo tanto se resumen los efectos más claros sobre la respuesta inmune celular.

La tuberculosis es una enfermedad cuyo agente etiológico, identificado hace más de 100 años por Robert Koch, es un patógeno intracelular facultativo que se replica en los macrófagos y que

induce entre otras cosas activación de los linfocitos T y los macrófagos, formación de granulomas, producción de anticuerpos, fenómenos de autoinmunidad, actividad adyuvante de la respuesta inmune y, lo que más interesa en esta tesis, fenómenos de inmunosupresión.

Antes de detallar los efectos sobre la respuesta inmune celular que más relacionados están con los resultados que se muestran en este trabajo, se presentará un panorama general. El conocimiento de la enfermedad tuvo gran desarrollo al demostrar que el fenómeno de protección observado en cobayos sensibilizados con bacilos, conocido como "fenómeno de Koch", era mediado por células<sup>22</sup>; posteriormente la demostración de que la inmunidad protectora depende de la activación de macrófagos mediada por células T<sup>23,24</sup>. Gran cantidad de estudios posteriores avalan, sin dejar lugar a dudas, el papel tan importante que juegan los linfocitos T<sup>25-29</sup>.

De los linfocitos T que participan en la inmunidad contra la micobacteria, sobresalen los CD3+, CD4+, CD8- que responden a antígenos exógenos presentados por células presentadoras de antígeno en el contexto de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad [CMH]<sup>30</sup>. La eliminación de células infectadas se realiza por linfocitos citotóxicos CD3+, CD4-, CD8+ los cuales reconocen antígeno en el contexto de moléculas clase I del CMH<sup>31,32</sup>. La actividad lítica no está dada únicamente por células CD8+ ya



que se ha descrito actividad lítica antígeno específica por células CD4<sup>+</sup><sup>33</sup>.

La presentación de antígenos exógenos a linfocitos T es un proceso que efectúan de manera primordial células de estirpe monocito-macrófago que expresan en su superficie gran cantidad de moléculas clase II del CMH<sup>34</sup>. Entre estas se encuentran monocitos circulantes, células de Kupffer, células dendríticas, y otros fagocitos mononucleares. El factor determinante es la presencia de moléculas clase II ya que células no fagocíticas tales como las células dendríticas interdigitantes o las células de Langerhans si presentan el antígeno a las células T.

Los antígenos que son reconocidos por células T además deben desdoblarse y procesarse dentro de la célula presentadora de antígeno. Los fragmentos de antígeno generados se unen a las proteínas codificadas por genes del CMH antes de ser expuestos en la superficie de la célula presentadora de antígeno para reaccionar con el receptor específico en la célula T<sup>35</sup>. Se sabe que hay dos vías de procesamiento y de presentación, la primera se da con antígenos que se encuentran en el citoplasma y se unen a moléculas clase I del CMH, y la segunda, se da con antígenos presentes en las vesículas fagocíticas los cuales se unen a moléculas clase II<sup>36</sup>. La unión a complejos clase I/antígeno se ve favorecida por la presencia de CD8 en la superficie de la célula T, mientras que la

unión del complejo clase II/antígeno se favorece por moléculas CD4. La localización del antígeno dentro de la célula presentadora de antígeno modula el papel de dicho antígeno en la respuesta inmune. Además se requiere que la célula presentadora de antígeno genere señales adicionales [contacto celular y liberación de citocinas solubles] para que los linfocitos T sean activados<sup>37</sup>. Al parecer la función del linfocito T activado se modifica por estas segundas señales y no es solo producto del reconocimiento de un antígeno en particular que induce, siempre, una forma particular de activación inmune.

Para una presentación óptima del antígeno debe generarse un circuito en el que participen la liberación de interleucina-1, interleucina-2, interferon gamma, expresión de los receptores para interleucina-2 en el linfocito T activado, incremento de la expresión de moléculas clase II tanto en la célula presentadora de antígeno como en el linfocito T activado, y finalmente, la liberación de inhibidor de interleucina-1 que actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa que bloquea este circuito evitando la perpetuación ad infinitum del sistema<sup>21</sup>. La figura 2 resume la respuesta inmune que se da en la tuberculosis. Este circuito es capaz de generar una respuesta inmune protectora cuando esta balanceado, cuando por alguna razón se desequilibra el individuo presenta la enfermedad.

Se conocen varias fallas del sistema inmune de los pacientes con tuberculosis. Si son consecuencia de la enfermedad o la preceden son motivo de controversia. La mayoría de las alteraciones parecen estar relacionadas con los macrófagos, los cuales juegan un papel importante en la respuesta a la infección, por ser la célula hospedera natural de la micobacteria.

La monocitopoyesis en el paciente con tuberculosis no severa esta incrementada; esto genera la liberación prematura de monocitos de médula<sup>14,38</sup> los cuales obviamente no han terminado de madurar<sup>39,40</sup>; este incremento de monocitos tiene como finalidad reclutar rápidamente macrófagos en los sitios de inflamación e inducir una formación rápida de granulomas<sup>41</sup>. Estos macrófagos se activan y exhiben cambios morfológicos y metabólicos que conllevan un incremento en su actividad bactericida [aumento de tamaño, mayor número de lisosomas, incremento en su capacidad de adherirse, actividad respiratoria elevada, aumento en el transporte y metabolismo de glucosa, en la producción de superóxido, en la producción de peróxido de hidrógeno, y en la concentración de colesterol en la membrana celular]<sup>42-45</sup>. Sin embargo la producción de prostaglandina E2 y la actividad tumoricida de los macrófagos no se afecta. Todos estos cambios que se dan en tuberculosos no graves son opuestos a los observados en pacientes con tuberculosis pulmonar severa en los cuales la actividad fagocítica y bactericida de los macrófagos esta reducida<sup>46</sup> probablemente como conse-

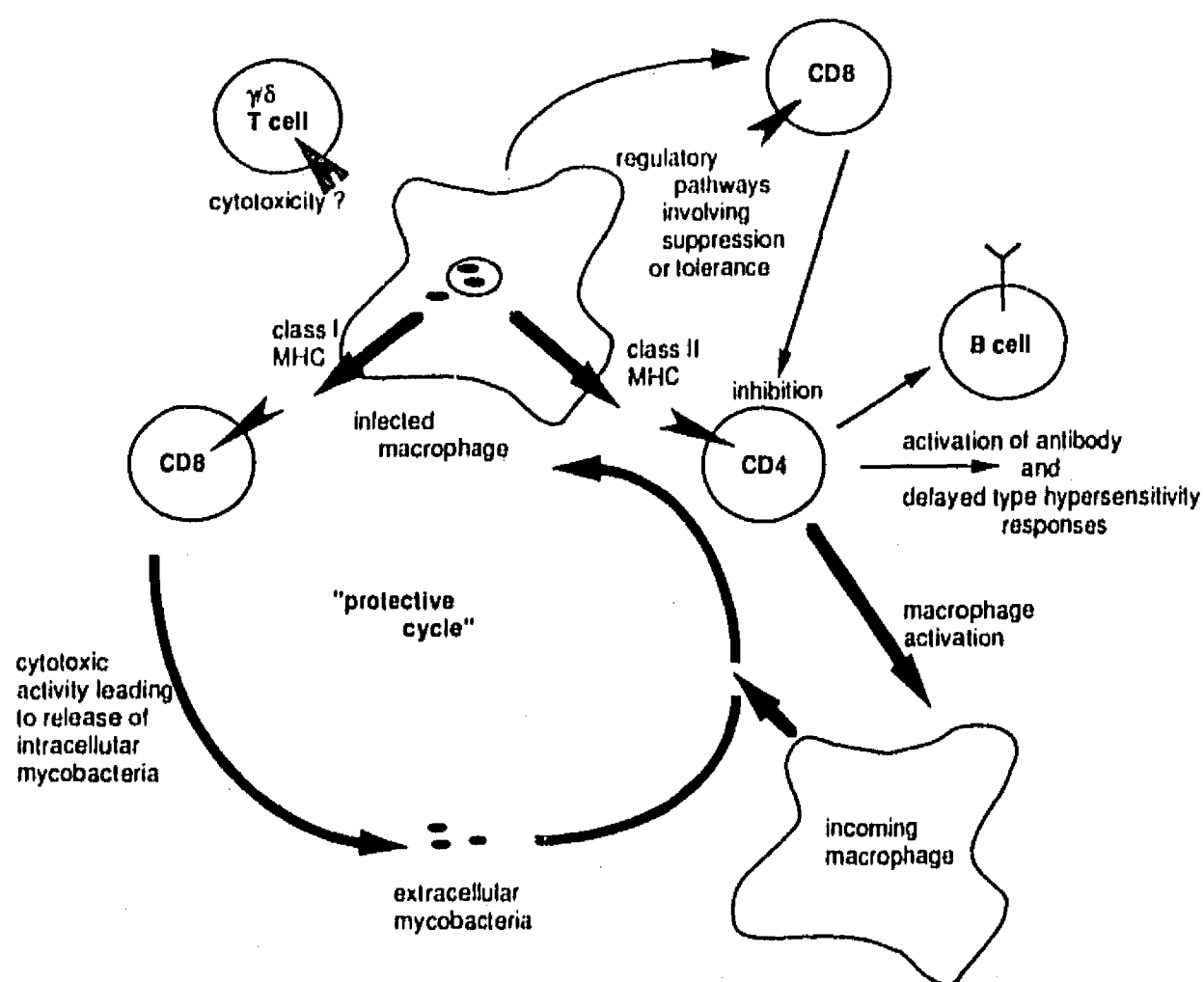


Figura 2.) Multifuncionalidad de la respuesta inmune contra la micobacteria. La infección con una micobacteria patógena resulta en la estimulación de numerosas funciones inmunes. La activación de macrófagos por células T CD4+ antígeno-específicas se cree que es primordial en el mecanismo de lisis micobacteriana, sin embargo esta actividad debe coordinarse con la lisis de macrófagos infectados por células T citotóxicas. Es probable que las células T con receptor gama/delta sean particularmente importantes durante las etapas tempranas de la respuesta inmune.

cuencia de la inhibición en la fusión fagolisosomal<sup>47,48</sup> y/o la disrupción de las membranas fagosomales<sup>49</sup>; así mismo, la capacidad quimotáctica de los macrófagos de los pacientes con tuberculosis severa esta reducida probablemente por fallas intrínsecas<sup>50,51</sup>. Llama la atención el hecho de que en la infección por *M. leprae* no haya inhibición de la fusión fagolisosomal<sup>52</sup> a pesar

de ser micobacterias que tienen efectos biológicos similares. Se han descrito micobacterias capaces de elaborar una toxina que inhibe la fagocitosis de los macrófagos<sup>53</sup>.

La producción de IL-1 por parte de macrófagos aislados de pacientes tuberculosos esta en controversia; hay autores que observan que la producción es normal aun en ausencia de un estímulo<sup>54</sup>; otros encuentran que en condiciones basales no hay producción de IL-1 pero refieren que la producción se incrementa si se estimula a los monocitos con PPD o con LPS<sup>40</sup>. Es probable que estos resultados tan contradictorios tengan relación con la cantidad de macrófagos inmaduros en la circulación en algun momento del proceso de enfermedad. La importancia de este fenómeno es que la IL-1 es capaz de suprimir la respuesta de una línea celular T respondedora a PPD<sup>55</sup>.

Toossi<sup>56</sup> ha mostrado la expresión de receptores para IL-2 en la superficie de monocitos aislados de pacientes tuberculosos. Es probable que estos receptores capturen la poca IL-2 producida por los linfocitos T y adyuven a la pobre respuesta que a esta interleucina tienen los linfocitos T de los pacientes tuberculosos<sup>57</sup>.

A las fallas del macrófago aislado del paciente con tuberculosis severa se debe añadir la disminución en la expresión de moléculas clase II del CMH, quizá como consecuencia de un incremento en

la liberación de monocitos inmaduros o bien debido a la presencia de algún factor sérico que inhiba dicha expresión<sup>58</sup> siendo esta ultima posibilidad la más factible, ya que la expresión normal de moléculas Dr en estos macrófagos se restablece a las 24 horas del cultivo in vitro.

Si bien es cierto que la expresión adecuada de moléculas clase II en la superficie del macrófago es una condición primordial para el estímulo de la célula T cooperadora, en la tuberculosis el mecanismo no parece ser tan claro, si bien es cierto que la expresión de algunos alelos Dr, especialmente el Dr1, se asocia con mala presentación antigénica<sup>59</sup> y con una pobre respuesta al PPD. El fenotipo de las células obtenidas de estos pacientes es HLA-B14,Dr1 contrario al de los buenos respondedores que es A9,B40<sup>60</sup>. Al parecer la molécula que reconocen las células periféricas mononucleares respondedoras a PPD aisladas de pacientes tuberculosos no es el Dr sino alguna de las MB, DC o MT<sup>61-63</sup>.

La información anterior revela como el macrófago tiene una función crucial en la respuesta inmune protectora contra la micobacteria, pero también demuestra como las alteraciones en estas células se asocian a la enfermedad. También se han encontrado problemas en otras poblaciones celulares del sistema inmune.

Se desconoce cual es el papel de los linfocitos T gama/delta aun-

que se sabe que responden a antígenos micobacterianos<sup>64,65</sup>. Estas células difieren de los linfocitos T cooperadores (CD4+) y de los supresores (CD8+), y su actividad no tiene restricción por el CMH lo cual sugiere que su función sea diferente a la de dichas células ya que el reconocimiento que hacen estos linfocitos de los antígenos micobacterianos es diferente<sup>66</sup>. Los linfocitos T CD4+ de los pacientes tuberculosos no son capaces de producir IL-2 ni de reaccionar con ella<sup>57,67</sup>. A pesar de la controversia con respecto a la existencia de linfocitos T supresores, se ha descrito un incremento de esta población en sangre periférica<sup>68</sup> que pudiera corresponder a los linfocitos contrasupresores para monocitos supresores.

La información sobre las fallas en las poblaciones celulares T, ya sean cooperadoras, citotóxicas, de hipersensibilidad tardía, o cualquiera de las otras poblaciones, es muy escasa.

El trabajo que se describe en esta tesis sugiere que un posible mecanismo de falla en los linfocitos T se debe a la liberación de una proteína inmunoreguladora por parte de los macrófagos que pudiera integrar el concepto del macrófago supresor<sup>69,70</sup> con una disfunción de células T.

## MATERIAL Y METODOS

**MEDIOS DE SIEMBRA.**- Las micobacterias utilizadas en este proyecto se sembraron inicialmente en medio de Lowenstein-Jensen <sup>10</sup> y después se inocularon en matraces con medio de Proskauer-Beck-Youmans (PBY) <sup>71</sup>. El extracto del filtrado de cultivo siempre se obtuvo del medio de PBY.

El medio PBY se preparó de acuerdo a la siguiente fórmula: asparagina, 5.0 g; fosfato monobásico de potasio, 5.0 g; sulfato de potasio, 0.5 g; citrato de sodio, 0.617 g; cloruro de magnesio, 0.190 g; glicerol, 50 ml. Una vez mezclados los componentes se ajustó el pH de la solución a 6.8 con NaOH 5 M y se aforo a 1000 ml. Se envasó la solución en botellas de 500 ml de capacidad y se esteriliza durante 15 minutos a 21 Kg/cm<sup>2</sup>. El medio de Lowenstein-Jensen (L-J) fue obtenido en la sección de Microbiología, Laboratorio Clínico, I.N.E.R.

**OBTENCION DE CEPAS DE REFERENCIA.**- Las cepas que proporcionó el Dr. Blancarte del Laboratorio Central de Referencia de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis fueron las siguientes: **M. tuberculosis** H37Rv (TMC 102) y H37Ra (TMC 201). El número de pases a las que habían sido sometidas se desconoce pero fueron catalogadas bioquímicamente en el Instituto de Epidemiología "Emilio Coni", Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud,



Santa Fe, Argentina.

**OBTENCION DE CEPAS DE PACIENTES.**- Debido a la posibilidad de encontrar diferencias importantes en el comportamiento de las cepas de referencia con aquellas que infectan a los pacientes, se aislaron micobacterias provenientes de la expectoración de pacientes con baciloscopia positiva para probar si eran capaces de inducir la producción de sobrenadante supresor.

La expectoración se trató con hidróxido de sodio al 4% (v/v) durante 5 minutos para posteriormente centrifugarse durante 20 minutos a 3500 rpm; el precipitado se lavó cuando menos 4 veces por centrifugación con agua destilada estéril hasta llevar la muestra a pH neutro <sup>10</sup>. Una vez ajustado el pH, se procedió a sembrar la muestra en medio de L-J.

**ESQUEMA DE SIEMBRA DE MICOBACTERIAS.**- Las cepas de referencia como las aisladas de pacientes, sembradas en L-J se incubaron 5 semanas a 37°C; la mayoría de las siembras después de este lapso mostraba colonias de aspecto rugoso y color amarillo mate. Antes de sembrar dichas colonias en PBY se corroboró que fueran *M. tuberculosis* por pruebas bioquímicas las que efectuó la QFB. Carmen Vela (Jefe de la sección de Microbiología, Laboratorio Clínico, I.N.E.R).

La resiembra a PBY se efectuó con aproximadamente  $1 \times 10^6$  micobacterias, en matraces Ehrlen-Meyer de 250 ml conteniendo 150 ml de PBY, que se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  hasta llegar a la fase de crecimiento estacionario (aproximadamente 8 semanas). A partir de estos cultivos se obtuvo el extracto protéico.

**OBTENCION DEL EXTRACTO PROTEICO.-** El extracto protéico se preparó a partir de un filtrado del medio de cultivo de **M. tuberculosis** cepas H37Rv, H37Ra o cepas de pacientes, sembradas en PBY y procesado de acuerdo al método que se describe a continuación.

Una vez que las micobacterias sembradas llegan a la fase de crecimiento estacionario se separo la masa bacteriana del medio de cultivo por filtración a través de dos filtros de papel Whatman #3. El material obtenido se pasa de manera secuencial por filtros Millipore con poro de  $0.45 \mu\text{m}$  y  $0.22 \mu\text{m}$ , respectivamente. Las proteínas del filtrado se obtienen a través de la precipitación con sulfato de amonio a una saturación final del 80% añadiendolos lentamente, con agitación continua y a  $4^\circ\text{C}$  durante 18 horas, al termino de las cuales se centrifuga durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  a 23,600 g en un rotor JA-21 en una centrífuga preparativa Beckman J-20.

El material precipitado se resuspendio en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.2 (PBS) la cuál contenía 0.2 mg /ml

de fenilmetilsulfonil fluoruro <sup>72</sup>, como inhibidor de proteasas. Los experimentos posteriores demostraron que la producción del sobrenadante supresor no se relaciona con la presencia o ausencia del inhibidor enzimático.

El precipitado se dializo en membranas con un corte de 12,000 a 14,000 daltons, a 4°C durante un promedio de 36 horas contra PBS efectuandose constantes cambios. El volumen de diálisis para cada cambio fué de 2 litros y la decisión para terminar la diálisis se basó en la negatividad de la prueba de precipitación del sulfato con cloruro de bario utilizandose el líquido de diálisis. Algunos lotes de los extractos se delipidizaron con tres extracciones secuenciales de cloroformo (v/v) antes de la diálisis <sup>73,74</sup>.

El material obtenido se almacenó invariablemente en criotubos de 1.5 ml de capacidad en nitrógeno líquido, previa determinación de la concentración protéica utilizando el método de Lowry <sup>75</sup>, y con albumina bovina fracción V como patron de la curva de titulación.

**EXTRACTO PROTEICO PREPARADO CON DIFERENTES CANTIDADES DE SULFATO DE AMONIO.**- Con el objeto de averiguar si se podía enriquecer el extracto con la proteína responsable de la inducción de la producción del factor supresor, se agregó sulfato de amonio para tener concentraciones finales del 40, 60 y 100%. Estos extractos se analizaron por electroforésis para determinar las variaciones

en su contenido y se les determinó su capacidad para inducir el factor supresor.

**ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.**- Cada lote de extracto fué sometido al análisis electroforético siguiendo el método de Laemmli <sup>76</sup>. Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol y hervidas durante 5 minutos. Todos los experimentos se efectuaron a 4°C en geles de acrilamida al 10%. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie brillante al 0.06% en ácido acético:metanol:agua (1:3:6) con agitación continua durante 14 horas y desteñidos con ácido acético:metanol:agua.

**OBTENCION DE CELULAS PERIFERICAS MONONUCLEARES.**- Las células se purificaron a partir de 20 ml de sangre heparinizada, la que fué diluida v/v con solución salina fosfato, por gradiente de centrifugación en ficoll-hypaque centrifugando durante 35 minutos a 1200 rpm a 4°C. Las células se recuperaron de la interfase por medio de una pipeta Pasteur y se lavaron en dos ocasiones con solución salina a 1000 rpm. Se determinó su viabilidad por exclusión con azul de tripán. El número de células vivas fué mayor al 90% <sup>77,78</sup>. En todos los experimentos las células se ajustaron a  $4 \times 10^6$  por ml en DMEM suplementado.

Las células adherentes humanas se purificaron en cajas de petri estériles de vidrio (60 x 15 mm) sembrándose con 3 ml de células

mononucleares e incubandose durante 1 hora a 37°C en una atmósfera humidificada con 7% de CO<sub>2</sub>. Al termino de la incubación, se eliminó el sobrenadante y la caja se lavo dos veces con 5 ml de medio de cultivo. Las células que quedan adheridas a la superficie de vidrio se recuperaron con un "gendarme" estéril y se lavaron dos veces con medio de cultivo y se resuspendieron a 7x10<sup>5</sup> por mililitro, previa determinación de su número y su viabilidad por exclusión con azul de tripán (>90%) <sup>78</sup>.

**OBTENCION Y CARACTERISTICAS DE LA LINEA J.774.A.1.-** Esta línea fue obsequiada por el I.I.B de la U.N.A.M. y corresponde a la línea TIB-67 de la ATCC <sup>79</sup>. Deriva de un tumor de origen espontáneo generado en 1986 en una hembra de la cepa Balb/c. Es una línea con características de monocito-macrófago cuyo crecimiento es inhibido por LPS, PPD y sulfato dextrán; sintetiza grandes cantidades de IL-1 y posee receptores de membrana para inmunoglobulina y complemento. Esta línea se mantiene cambiandole medio (DMEM) cada 72 horas y en los experimentos que se describen no se utilizaron células que tuvieran mas de 3 semanas de haber sido descongeladas. Cuando no se utilizaron, se congelaron a una densidad de 4x10<sup>8</sup> en una mezcla de medio:suero (1:9) y se almacenaron en nitrógeno líquido.

**PRODUCCION DEL SOBRENADANTE CON ACCION SUPRESORA.-** Se uso la siguiente metodología: 7x10<sup>5</sup> células adherentes (ya sean humanas o

de la línea celular J.774.A1) se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo suplementado y se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos de 2ml de volumen, dejándolas adherir durante 18 horas antes de utilizarlas para el experimento <sup>80</sup>.

Las células adherentes fueron estimuladas con diferentes concentraciones del extracto protéico de *M. tuberculosis*, cepa de referencia y cepas aisladas de pacientes, durante 1 hora a 37°C en una atmósfera húmeda con 7% de CO<sub>2</sub>. Al termino de éste periodo de incubación, las células de cada pozo se lavaron dos veces con medio sin suero y se agrego 1 ml de medio de cultivo suplementado por cada pozo, dejando incubar las células por diferentes periodos. Al final de los tiempos de incubación se recolectó el sobrenadante de cada pozo, se centrifugó a 4°C durante 3 minutos en una microfuga y se guardo a -70°C. Los sobrenadantes se descongelaban el día del ensayo.

Se ensayaron otras proteínas no relacionadas con el extracto micobacteriano tales como albumina bovina en dosis similares.

Algunos sobrenadantes se obtuvieron de células J.774 estimuladas con extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de diferentes cantidades de suero hiperinmune anti-extracto o bien, en presencia de diferentes cantidades de líquido de ascítis de híbridos productores de anticuerpos monoclonales anti proteínas

del extracto. Los controles en estos ensayos fueron los sobrenadantes de células estimuladas únicamente con el anticuerpo.

**ENSAYOS DE PROLIFERACION CON SOBRENADANTES.**- Se determino la actividad del sobrenadante derivado de macrófagos estimulados con proteínas de *M. tuberculosis* sobre la respuesta a mitógenos de células periféricas mononucleares de individuos sanos PPD positivos.

En placas de 96 pozos de fondo plano se sembraron  $4 \times 10^5$  células periféricas mononucleares en  $100 \mu\text{l}$  y se añadieron  $100 \mu\text{l}$  de una concentración [10x] de la óptima de diferentes mitógenos, determinada previamente en ensayos de titulación con células periféricas humanas. Los mitógenos que se utilizaron fueron: fitohemaglutinina (PHA,  $1 \mu\text{g}$  /pozo), concanavalina A (Con-A,  $.5 \mu\text{g}$ /pozo), lectina de *Lens culinaris* (LCL,  $.5 \mu\text{g}$ /pozo), extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv ( $1 \mu\text{g}$ /pozo), PPD ( $1 \mu\text{g}$ /pozo), OKT-3 ( $0.1 \mu\text{g}$ /pozo). Cuando se probó el sobrenadante derivado de macrófagos estimulados con extracto protéico se incluyeron  $100 \mu\text{l}$  por pozo y se ajustó la concentración de las células de tal manera que tuvieran la misma cantidad de células por pozo en un volumen de  $50 \mu\text{l}$ . Los cultivos se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 7% de  $\text{CO}_2$  y se les dio un pulso con  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina tritioada las últimas 18 hrs. Al término de la incubación se cosecharon los cultivos y la incorporación de timidina se determinó en un

contador beta LS-100c <sup>77</sup>.

Para determinar la especificidad del sobrenadante supresor también se efectuaron ensayos de proliferación utilizando el extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv y PPD concentrado; los ensayos de titulación previos con estos reactivos en el sistema que tradicionalmente se utiliza mostraron que la dosis óptima de estimulación fue de 1  $\mu$ g/pozo para ambos.

En algunos ensayos se incorporó al pozo en el que había sobrenadante supresor y mitógeno, diferentes cantidades de suero hiperinmune anti-extracto para determinar si el efecto supresor no era consecuencia de una proteína de *M. tuberculosis* que estuviese presente en el sobrenadante por no haber efectuado un buen lavado o bien, que la supresión fuese consecuencia de una proteína de *M. tuberculosis* expresada en la superficie del macrófago y que ejerciera un efecto directo sobre las poblaciones celulares T.

**PRODUCCION Y PURIFICACION PARCIAL DE INTERLEUCINA 1.**- El sobrenadante de medio de cultivo de células J.774.A1 (50 ml) mantenidas en cultivo durante 72 horas se precipitó con 60% de sulfato de amonio en agitación continua a 4°C durante 18 horas. Al término de este lapso el precipitado se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se resuspendió en 5 ml de solución salina. El precipitado así obtenido se dializó contra



solución salina hasta que la prueba del cloruro de bario fuera negativa. Al término de la diálisis se aplicó la muestra a una columna de Sephadex G-100 de 1.2 x 50 cms equilibrada con solución salina. La columna había sido previamente calibrada con azul de dextrán, albumina bovina sérica, ovalbumina y hemoglobina a una velocidad de 25 ml/hr, antes de someter la solución problema a la cromatografía de filtración <sup>81</sup>.

La muestra enriquecida con IL-1 se cromatografió a 25 ml/hora obteniendo fracciones de 3.1 ml. La muestra enriquecida con IL-1 se encontró entre los tubos 25 a 32. El material purificado se juntó y se precipitó con sulfato de amonio al 100% durante 18 horas a 4°C con agitación continua; posteriormente se centrifugó la muestra a 14,000 rpm durante 30 minutos a 4°C y el precipitado se re-suspendió en solución salina y se dializó extensivamente contra solución salina, al finalizar se filtró el material a través de membrana Millipore de 0.22  $\mu$ m guardándolo a 4°C hasta el día del ensayo <sup>81,82</sup>.

**ENSAYO DE DETECCION DE IL-1.**- La presencia de interleucina 1 en el sobrenadante de células J.774, o bien en la fracción enriquecida se efectuó con el ensayo clásico de proliferación de timocitos murinos en presencia de dosis submitogénicas de fitohemaglutinina <sup>77,78,83</sup> que se determinó en ensayos previos haciendo una curva de titulación del mitógeno a partir de 0.1 a 1  $\mu$ g/pozo uti-

lizando  $1 \times 10^5$  células de timo de ratones hembras cepa Balb/c por pozo. Una vez conocida la dosis, se procedió a repetir el ensayo con el mismo número de células incluyéndose en los pozos diferentes cantidades de sobrenadante de células J.774, fracción enriquecida de IL-1, y sobrenadante con actividad supresora. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 7% humidificada; los cultivos fueron pulsados con  $1 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada las últimas 18 horas antes de ser cosechados y contar la incorporación de radioactividad en un contador Beckman de centelleo líquido.

**PRODUCCION DE SUERO HIPERINMUNE ANTI-EXTRACTO.**- Este suero se obtuvo en conejos Nueva Zelanda de 2 kgs de peso los cuales fueron inmunizados por vía intramuscular en regiones cercanas a nódulos linfáticos con una suspensión hecha con 3.3 mg de extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv, 1.5 mg de masa bacteriana de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (obtenida de los cultivos en PBY, esterilizada durante 1 hora en autoclave y puesta a secar en un horno de secado a  $70^\circ\text{C}$ ) y 1 ml de hidróxido de aluminio. Se aplicaron dos refuerzos con el mismo material a la 3 y 6 semana de la aplicación inicial y finalmente, a la 8 semana, se aplicó un último refuerzo por vía intravenosa con 2 mg de extracto protéico en  $200 \mu\text{l}$  de PBS. Al tercer día se sangró al animal y se probó por inmunodifusión radial el título de anticuerpos contra los componentes del extracto protéico. Posteriormente se sangró a los

animales, con el título más elevado, a blanco. De la sangre se obtuvo el suero y se almacenó en alicuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; en los ensayos de proliferación, el suero se filtró a través de una membrana de Millipore de  $0.22\ \mu\text{m}$ .

**PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.**- Con objeto de encontrar el esquema de inmunización más adecuado para poder obtener títulos séricos de cuando menos 1:25,000 por ELISA para incrementar las posibilidades de obtener anticuerpos monoclonales (Dr. Armando Isibasi) los ratones hembras Balb/c de 4-6 semanas de edad fueron inmunizados por vía intraperitoneal con diferentes cantidades de extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv en  $100\ \mu\text{l}$  de adyuvante incompleto de Freund, semanalmente durante 3 semanas antes de aplicar un último refuerzo por vía intravenosa con  $10\ \mu\text{g}$  de extracto en PBS. Una vez obtenido el esquema óptimo y habiendo corroborado el título de anticuerpos, se procedió a realizar la fusión celular.

La fusión de las células esplenicas murinas con células de la línea Sp2 se realizó con polietilenglicol 4000 al 50% en medio sin suero, siguiendo el protocolo de Kohler y Milstein<sup>84</sup> con algunas modificaciones<sup>85,86</sup>; los híbridos se seleccionaron con medio selectivo de HAT y al cabo de 12 días se eliminó la aminopterina del medio para favorecer el crecimiento de los pozos con clonas. Solamente aquellos pozos poseedores de clonas de rápido creci-

miento cuyos sobrenadantes reaccionaron por ELISA <sup>78</sup> contra 1  $\mu$ g del extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv fueron subclonados por el método de dilución limitante <sup>77</sup> hasta en 3 ocasiones para asegurar la monoclonalidad del híbrido, corroborando en cada clonación la positividad por ELISA del sobrenadante. Como control en cada ELISA se utilizó sobrenadante de la línea Sp2 y una dilución 1:100 del suero hiperinmune anti-extracto protéico <sup>78</sup>.

Para obtener el líquido de ascítis enriquecido con anticuerpo derivado de los híbridos, se inmunizó por vía intraperitoneal a 5 ratones Balb/c hembras de 5 semanas con 500  $\mu$ l de Pristane una semana antes de aplicarles  $7 \times 10^6$  híbridos en 100  $\mu$ l de PBS; al cabo de aproximadamente 10 a 12 días los ratones originaron tumores peritoneales ascíticos de los cuales se extrajo por punción, con aguja (5 ml por ratón). Este líquido se centrifugó y el sobrenadante, después de probarlo por ELISA contra extracto protéico de *M. tuberculosis* se guardó en alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$  <sup>85</sup>.

**ELISA.**- Este ensayo se efectuó en placas de 96 pozos (Dynatech). A la matriz sólida se fijó en ensayos de titulación previos desde 5 hasta 0.01  $\mu$ g de extracto protéico en buffer carbonato, pH 9.6. Para titular la concentración ideal de antígeno se utilizaron varias diluciones del suero hiperinmune anti-extracto. Estos ensayos demostraron que una dilución 1:400 del suero hiperinmune reconocían adecuadamente una concentración de 0.5 $\mu$ g por pozo.

Los ensayos de ELISA se realizaron siempre con 1  $\mu$ g/pozo de extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv. El antígeno, en un volumen de 50  $\mu$ l, se fijo con solución amortiguadora de carbonatos a la placa. Una vez que esté seco, la placa se saturó con gelatina al 0.3% en la solución amortiguadora de carbonatos durante 18 horas a 4°C y se lavó con PBS/3% Tween 20 y posteriormente se incubó con el primer anticuerpo durante 4 horas a temperatura ambiente, con agitación continua; al finalizar esta primera incubación, se lavó nuevamente con PBS/Tween y con PBS antes de incubarlo con el segundo anticuerpo (ya sea anti-gammas de ratón o de conejo, peroxidadas) diluido de acuerdo a las recomendaciones del productor en PBS/Tween. La segunda incubación se efectuó durante 90 minutos y al finalizar se volvió a lavar exhaustivamente la placa con PBS /Tween y PBS antes de visualizar la reacción con ortofenilendiamina en presencia de peróxido de hidrógeno; la reacción se paró con ácido sulfúrico 2.5 M. La placa se leyó a 480nm ajustándose el fondo con un pozo en el cual se incubó solamente el primer anticuerpo. Cada placa tuvo un control positivo con el suero hiperinmune.

**INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**- Se colocaron 60  $\mu$ g de extracto protéico de *M. tuberculosis* H37Rv por carril y se sometieron a electroforesis según el método previamente descrito colocando 3 mg de cada muestra. Al finalizar, se tiñó un carril con azul de coomassie en agua para corroborar que la electroforesis había sido ade-

cuada; el gel se equilibraba en solución de transferencia antes de colocarlo en el papel de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin <sup>87</sup>. Una vez equilibrado el gel, se colocó en la cámara de electrotransferencia (Hoeffner) y se transfirió a 1 amperio durante 1 hora a 4°C. Después el papel se saturó con albumina bovina al 3% en agitación continua durante 18 horas, se lavó con PBS/0.3% Tween 20, se secó y se guardó a temperatura ambiente hasta el momento de ser utilizado. Las proteínas transferidas en estas condiciones, siguen reaccionando con anticuerpos específicos durante 6 meses.

La tira de papel transferida y saturada se incubó en agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo (1:200 del suero hiperinmune anti-extracto o 1:80 del líquido de ascitis), posteriormente la tira se lavó de 3 a 5 ocasiones con PBS/Tween y después otras tantas veces con PBS antes de volver a incubar la tira con un anticuerpo anti gammaglobulinas de conejo o de ratón, de acuerdo a cada caso; dichos anticuerpos eran peroxidados y diluidos 1:2000 como lo sugiere el fabricante. Esta incubación fue de 1 hora. Al finalizar la segunda incubación la tira se lavó exhaustivamente con PBS/tween y PBS antes de revelar la reacción con ortofenilendiamina o con diaminobencidina en presencia de peróxido de hidrógeno. Cuando la reacción se hizo visible se colocó la tira de papel en agua hirviendo para desnaturar a la enzima y se secó con toallas de papel.

## RESULTADOS

**Caracterización del extracto protéico de M. tuberculosis.-** El patrón electroforético del extracto protéico de tres siembras diferentes de *M. tuberculosis* H37Rv fue similar (Fig.1). La precipitación de las proteínas del filtrado a saturaciones menores al 80% hace que se pierdan muchos componentes los cuales no precipitan a concentraciones del 60%; a la vez, la precipitación con sulfato de amonio a una concentración final del 100%, no incrementó el número de componentes y sí dificultó mucho la eliminación del sulfato de amonio. La presencia del inhibidor enzimático, en el extracto, no afectó el patrón electroforético (Fig.1 carril 4).

La concentración promedio de proteína por cada 100 ml de medio de Proskauer-Beck-Youmans fué de 10 mg de proteína.

**Estandarización del ensayo de proliferación.-** La tabla 1 muestra los resultados de un ensayo representativo. Los mitógenos que se describen en este estudio son de un solo lote y cada uno de ellos fué titulado individualmente con células de individuos sanos tanto PPD positivos como negativos. En cada experimento se incluyó un control positivo con la dosis mitogénica óptima de fitohemaglutinina. Si el control positivo daba resultados fuera de un

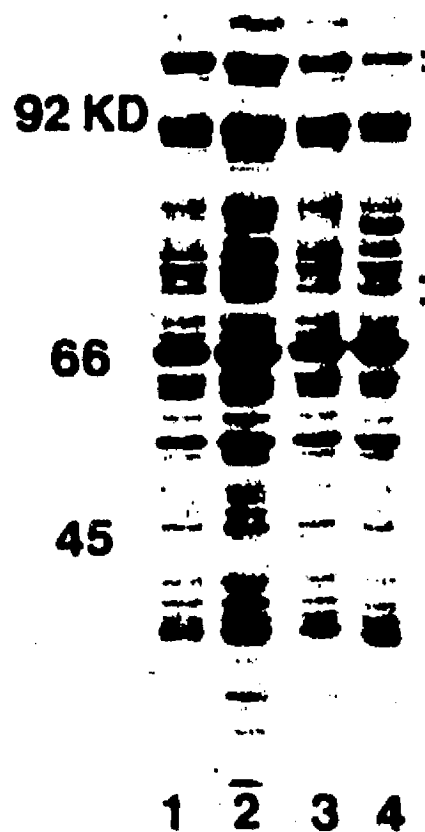


Figura 1.- Carriles 1,2 y 3 representan los extractos protéicos obtenidos de tres siembras diferentes de *M. tuberculosis* H37Rv precipitados al 80%; el carril 4 muestra el mismo extracto obtenido en el carril 3 pero en presencia de inhibidor enzimático. A la izquierda los controles de peso molecular.

margen del 20% de los resultados de la titulación, el experimento se descartaba.

**Inducción de sobrenadante supresor.-** Experimentos anteriores en los que se utilizaba como controles a los sobrenadantes de célu-

**Tabla 1.- Titulación de los diferentes mitógenos en células periféricas mononucleares humanas de un individuo sano PPD positivo**

No células	fondo	PHA ( $\mu\text{g/ml}$ )			CON-A ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		5	10	50	1	5	50
$3 \times 10^6$	395	14970	18325	11767	11887	19262	12424
$2 \times 10^6$	528	10869	13703	10205	15709	16891	10026

Resultados expresados en cuentas por minuto

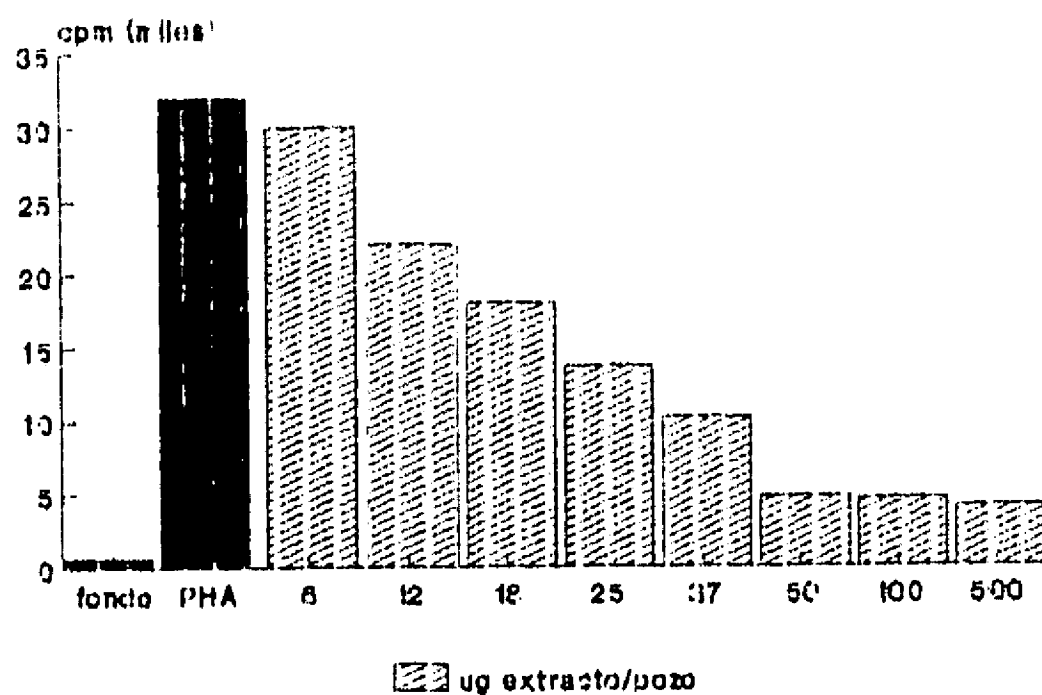


las adherentes humanas tratadas con diferentes proteínas, incluyendo bajisimas concentraciones de PPD, sugerian la presencia de una actividad capaz de inhibir moderadamente la respuesta de células periféricas mononucleares a la fitohemaglutinina.

La inducción y liberación al medio externo del factor supresor esta directamente relacionado con la concentración de extracto protéico que se añade a las células adherentes, ya sean humanas o de la línea J.774 (Fig.2). La incubación de las células adherentes con 5  $\mu$ g de extracto indujo un sobrenadante con pobre actividad supresora, la actividad supresora del sobrenadante se fué incrementando conforme se fué aumentando la cantidad de extracto hasta llegar a una meseta; como se puede ver en la misma figura 2 y en la tabla 2, la inducción maxima se logró con 50  $\mu$ g de extracto; concentraciones mayores no incrementaron la actividad supresora.

**El extracto protéico de M. tuberculosis no es supresor.**- Antes de poder confirmar si el efecto de supresión se debía a la liberación por parte de células adherentes ya sea murinas o humanas de un factor soluble, había que establecer que el efecto no era consecuencia de un componente del extracto protéico por un mal lavado de las células adherentes al finalizar la incubación inicial.

La incubación de células periféricas mononucleares humanas con



700,000 macrófagos/pozo

Figura 2.- Concentración de extracto que se requiere para inducir la producción y liberación del factor supresor por los macrófagos. Curva dosis-respuesta. Resultados se muestran en  $\mu\text{g}$  de extracto/700,000 células.

extracto a la misma concentración que la utilizada para inducir el sobrenadante supresor no inhibió la actividad de ninguno de los cuatro diferentes mitógenos que se probaron (Fig.3). Los resultados obtenidos en los pozos control en los que solo se aplicó

Tabla 2.- Respuesta de células mononucleares humanas a sobrenadante producido con células adherentes humanas y con J.774

	SOBRENADANTE	
	humano	murino
fondo	1034 $\pm$ 355	883 $\pm$ 421
PHA	29957 $\pm$ 2370	37654 $\pm$ 2991
SnCtl	28429 $\pm$ 3065	36112 $\pm$ 2814
SnSup	4074 $\pm$ 883	3087 $\pm$ 752

Resultados se expresan como cuentas por minuto; SnCtl = sobrenadante control; SnSup = sobrenadante supresor obtenido con 50  $\mu\text{g}$

el extracto protéico demuestran que la actividad mitogenica de los extractos per se es pobre debido a que las células que se utilizaron fueron de un individuo sano no respondedor al PPD cutaneo.

**La actividad supresora del sobrenadante derivado de células adherentes depende de la concentración y es termolábil.-** La actividad supresora del sobrenadante es directamente proporcional a la cantidad de sobrenadante presente en el ensayo de proliferación (Tabla 3). Este resultado señala de manera indirecta que el elemento responsable de la supresión probablemente funcione a través de mecanismos ligando-receptor potencialmente saturables en la célula efectora, que en el caso específico de los ensayos corresponde a los linfocitos OKT4<sup>+</sup>. Así mismo la actividad supresora se pierde casi completamente al hervir el sobrenadante durante 15 minutos; esta característica hace sospechar que el responsable de la supresión sea de caracter protéico (Tabla 3)

**La producción del sobrenadante con actividad supresora por las células adherentes, es dependiente del tiempo.-** La posibilidad de que la producción de la actividad supresora se deba a una unión ligando-receptor se confirmó con estos experimentos en los que se ve que la liberación, en el sobrenadante, del responsable de la actividad supresora no se libera inmediatamente después de haberse puesto en contacto la célula adherente con el extracto protéico-

Tabla 3.- La actividad del sobrenadante supresor es dependiente de la concentración y es termolabil

	cpm	% supresión
fondo	474 ± 172	-
PHA	42290 ± 4811	-
SnCtl	43885 ± 4655	-
SnSup s/d	5370 ± 1077	87.3
SnSup 1:1	9219 ± 1391	78.2
SnSup 1:2	18480 ± 1969	56.3
SnSup 1:4	25374 ± 2331	40.0
SnSup 1:8	38357 ± 1032	9.3
SnSup s/d hervido	972 ± 233	2.3

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; % supresión esta calculado con respecto a la respuesta a PHA; SnCtl = sobrenadante control; SnSup = sobrenadante supresor; SnSup s/d = sobrenadante supresor sin diluir.

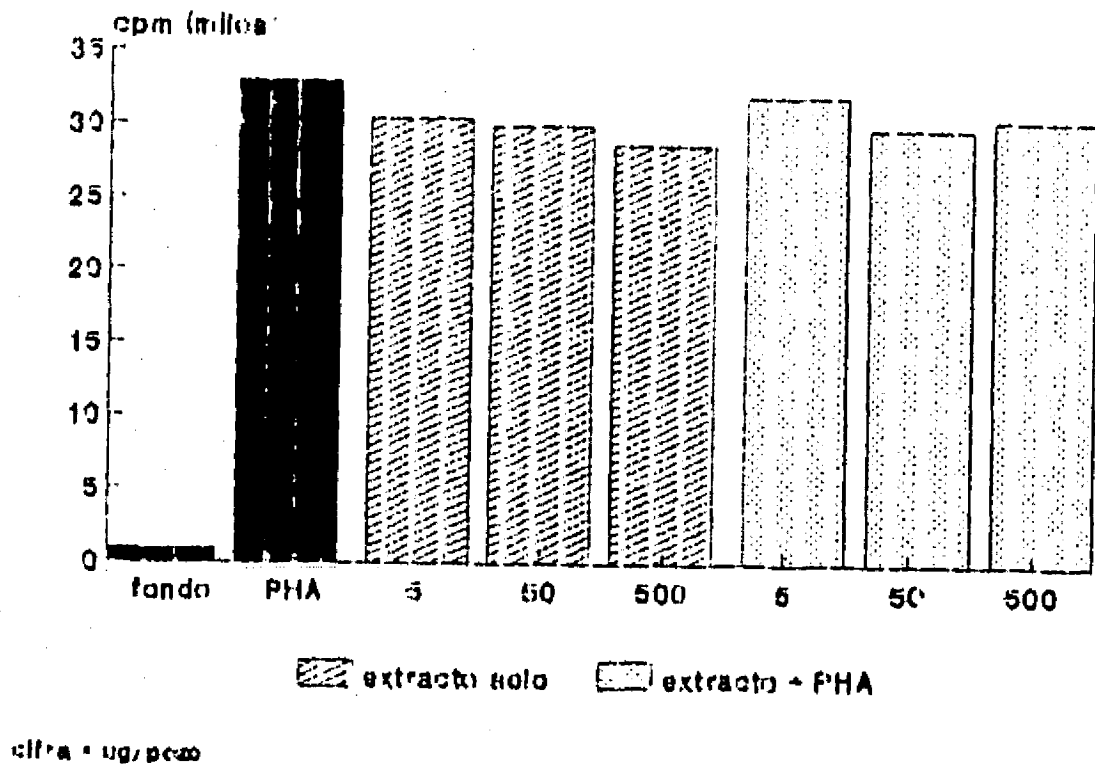


Figura 3.- Histograma en el que se demuestra que el extracto protéico de *M. tuberculosis* no inhibe la actividad mitogénica de la fitohemaglutinina sobre células periféricas mononucleares. Las cifras en el eje de las x corresponde a la concentración en µg de extracto/pozo.

co, sino que es indispensable que pase un lapso considerable de tiempo (48 horas) para que se pueda tener una actividad supresora maxima del sobrenadante. El factor inhibidor es secretado por las células adherentes ya que el control, que consistió en sobrenadante de células adherentes murinas no estimuladas con extracto colectado a los mismos tiempos, no indujo supresión (Tabla 4).

Esta cinetica de producción de sobrenadante supresor se extiende mas alla de las 48 horas ya que un sobrenadante de 120 horas tuvo actividad supresora (Tabla 5); sin embargo, este experimento no fué concluyente ya que es perfectamente posible que el elemento responsable sea liberado solamente durante las primeras 48 hrs y se mantenga estable en las condiciones en las que se mantienen los cultivos. Por lo anterior se decidió probar el sobrenadante

**Tabla 4.- Actividad supresora de sobrenadantes colectados a diferentes intervalos de tiempo**

	cpm	% supresión
fondo	537 ± 196	-
PHA	37579 ± 2953	-
SnCtl	42971 ± 4633	-
Sn 12 h	35936 ± 2290	4.3
Sn 24 h	31491 ± 3812	16.2
Sn 48 h	3457 ± 972	90.8
Sn 72 h	3720 ± 1044	90.1

cpm = cuentas por minuto; % supresión se calcula sobre la estimulación ejercida por la PHA; SnCtl = sobrenadante control. Los tiempos de recolección del sobrenadante con actividad supresora se consideraron después de haber estimulado células de la línea J774 con 50 µg de extracto protéico. Resultados se expresan ± error estandar de la media.

**Tabla 5.- Actividad supresora de sobrenadantes colectados a lapsos de tiempo mayores a las 72 horas**

	cpm	% supresión
fondo	1435 ± 521	-
PHA	34946 ± 3551	-
SnCtl	32078 ± 3599	-
SnSup #1	10861 ± 2338	68.9
SnSup #2	12729 ± 2843	63.5

sobrenadante colectado a las 120 horas de haber estimulado a las células adherentes, mientras que el #2 corresponde a otro sobrenadante colectado 120 horas después de lavar y cambiar medio a las 48 horas.

de 120 horas de células adherentes estimuladas con extracto a las cuales se les cambió medio a las 48 horas. Los resultados demostraron que la producción de sobrenadante con actividad supresora no se limita a un período dado, sino que una vez que la célula recibe la señal adecuada, sintetiza de manera continua el elemento responsable de la actividad supresora del sobrenadante.

**Al iniciarse la actividad mitogénica el sobrenadante supresor ya no ejerce su efecto.-** La actividad supresora del sobrenadante se da solamente si compete desde el principio del ensayo con el mitógeno (Tabla 6); si no se interfiere con el mitógeno en las fases iniciales de la activación de la célula periférica mononuclear, la actividad supresora ya no se da. El hecho de que la diferencia en supresión entre el sobrenadante aplicado a los 30 minutos y a las 6 horas sea tan marcado, apoya esta explicación.

**Tabla 6.- El efecto supresor se da sólo en las células mononucleares que no han sido estimuladas**

	cpm	% supresión
fondo	944 ± 351	-
PHA	60308 ± 4288	-
SnCtl	63412 ± 3977	-
ensayo #1	11147 ± 2230	81.5
ensayo #2	51864 ± 3328	14.0
ensayo #3	57424 ± 3745	4.7

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; el porcentaje de supresión se calcula sobre la estimulación con PHA; el ensayo # 1 corresponde a un ensayo en el que el Sn supresor y la PHA se pusieron al mismo tiempo; mientras que en el ensayo # 2 el SnSup se agregó 30 min después de haber estimulado con la PHA y en el # 3 se agregó a las 6 horas de haber estimulado con PHA.

El efecto supresor se da sobre linfocitos recién purificados y también se observa en linfocitos que antes de ser estimulados con el mitógeno han permanecido en cultivo durante 4 días; es obvio que la respuesta al mitógeno por parte de estas células es menor que la observada en células recién obtenidas. Sin embargo llama la atención el hecho de que al parecer estas células cultivadas son más sensibles al efecto supresor (Tabla 7).

**El efecto supresor es primordialmente sobre células estimuladas por PHA.-** La inhibición del sobrenadante derivado de macrófagos fué primordialmente sobre mitógenos T tales como la PHA y la lecitina de *Lens culinaris*; sobre fitolaca, que es un mitógeno de linfocitos B, no ejerció ningún efecto (Figura 4).

**Inhibición de la producción de sobrenadante supresor.-** La presen-

Tabla 7.- La actividad supresora del sobrenadante se da tanto en células periféricas recién aisladas como en células mantenidas en cultivo durante 96 horas

	recién aisladas		cultivadas	
	cpm	% sup	cpm	% sup
fondo	521 ± 221	-	675 ± 184	-
PHA	34964 ± 4205	-	21651 ± 3351	-
SnCtl	32894 ± 3965	5.8	20466 ± 2944	5.4
SnSup	18941 ± 2677	45.7	2960 ± 832	86.3

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; % sup = porcentaje de supresión con respecto a la respuesta a el mitógeno; las células recién aisladas se estimularon 2 horas después de haberlas obtenido del donador. Las células cultivadas fueron mantenidas en cultivo durante 4 días cambiandoles de medio cada 2 días.

cia de suero hiperinmune anti-extracto protéico en el ensayo de producción de sobrenadante con actividad supresora bloqueo de manera casi total la liberación del componente responsable de la supresión. La cantidad de suero hiperinmune adicionado a cada pozo fué de 100  $\mu$ l lo que dió una concentración final por pozo de 1:10, o sea que se incubaron las células adherentes con extracto en presencia de un exceso de anticuerpo, ya que este mismo anticuerpo es capaz de detectar 55 bandas en las inmunoelectrotransferencias a una dilución de 1:400. De esta manera se pudo comprobar que el componente responsable de la inducción de actividad supresora es antigénico y es inhibido por los anticuerpos (Figura 5).

Cabe hacer notar que una vez producido y liberado el componente



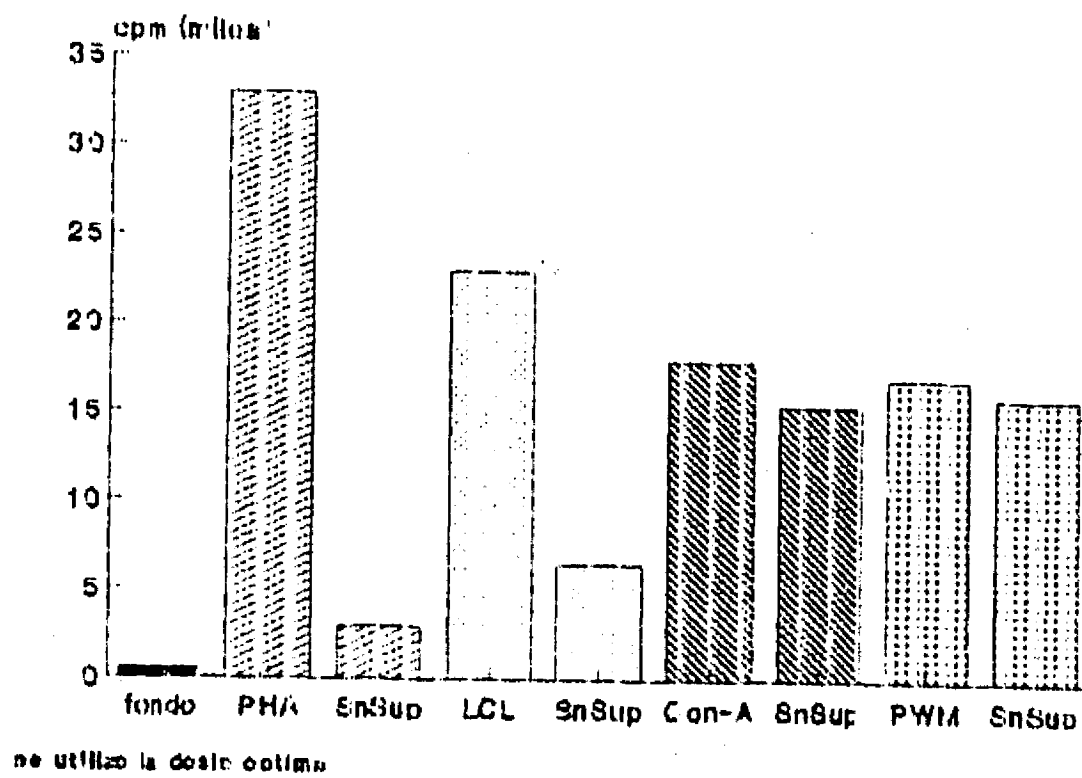


Figura 4.- El sobrenadante con actividad supresora afecta a los linfocitos T. Se observa como la inhibición es mayor sobre la blastogenesis inducida por los mitogenos para células T PHA y LCL.

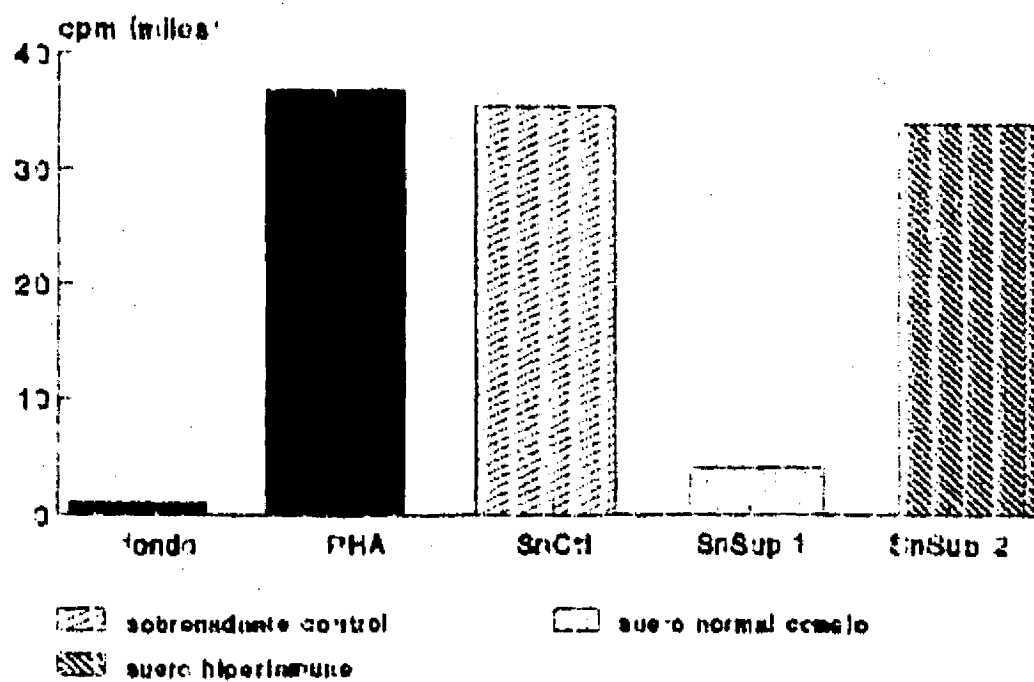


Figura 5.- La liberación del factor supresor por los macrófagos (SnSup1) se inhibe cuando se incuban con extracto y suero hiperinmune (SnSup2).

responsable de la supresión en el sobrenadante de las células adherentes previamente estimuladas con el extracto protéico, la presencia de suero hiperinmune ya no ejerce ningun efecto, por lo que el responsable de la supresión no es una proteína de la micobacteria que haya quedado como contaminante en el sobrenadante, ni tampoco es un producto peptídico de proteínas de la micobacteria (Tabla 8).

**El sobrenadante con actividad supresora es inducido por extracto protéico obtenido de micobacterias aislada de pacientes.-** Para saber si diferentes micobacterias también son, con respecto a las de referencia, capaces de inducir la producción de sobrenadante con actividad supresora, se probaron extractos obtenidos de doce diferentes micobacterias, todas ellas típicadas como **M. tuberculosis**, aisladas de pacientes con diagnóstico de tuberculosis

**Tabla 8.- La adición de suero hiperinmune a el sobrenadante con actividad supresora no ejerce ningun efecto**

	cpm	% supresión
fondo	1216 ± 497	-
PHA	48320 ± 3356	-
SnCtl	47250 ± 2922	2.3
SnSup	1756 ± 391	96.4
SnSup + suero conejo	2720 ± 569	94.3
SnSup + suero hiperinm	2470 ± 755	94.8

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; % supresión se calculó sobre la estimulación obtenida con el mitógeno; el suero de conejo que se adiciono fué el obtenido de un animal adulto nunca inmunizado; el suero hiperinmune es contra todas las proteínas que puedan ser antigénicas y que componen el extracto protéico de **M. tuberculosis H37Rv**

pulmonar. Los resultados demostraron que todas estas micobacterias producen el componente responsable de inducir la síntesis del sobrenadante con actividad supresora (Tabla 9) y no tuvo ninguna relación con el estadio clínico del paciente del cual se aislaron.

**El sobrenadante con actividad supresora no es una prostaglandina.**- La incubación de las células adherentes tanto humanas como murinas con indometacina (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; stock 1 mg/500 $\mu\text{l}$  alcohol + 500  $\mu\text{l}$  de medio) posterior al reto con el extracto, produjo un sobrenadante que mantuvo su actividad supresora (Figura 6).

**Tabla 9.- Inducción del sobrenadante supresor con extractos proteicos obtenidos de micobacterias aisladas de pacientes con TBP**

	cpm	% supresión
fondo	182 $\pm$ 103	-
PHA	23526 $\pm$ 2266	0.0
SnSup H37Rv	3458 $\pm$ 1071	81.6
SnSup A. Pacheco	569 $\pm$ 341	96.9
C. Valdez	797 $\pm$ 423	95.7
R. Galvan	1063 $\pm$ 989	94.3
M. Rivas	1060 $\pm$ 540	94.3
L. Mojica	1343 $\pm$ 997	92.8
G. Palma	1724 $\pm$ 1243	90.8
G. Castro	1747 $\pm$ 870	90.7
E. Guzman	13255 $\pm$ 3671	43.6
J. Sanchez	13926 $\pm$ 3561	40.8
H. Franco	16337 $\pm$ 2955	30.5
F. Guzman	16629 $\pm$ 4420	29.3
A. Pliego	17412 $\pm$ 3879	25.9
S. Bocanegra	18309 $\pm$ 3391	22.1

cpm = cuentas por minuto  $\pm$  error estandar de la media; % supresión se calcula de acuerdo a la estimulación obtenida con el mitógeno; para la inducción de sobrenadante supresor se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de extracto de cada una de las micobacterias aisladas

El porcentaje de sulfato de amonio al precipitar el extracto afecta la actividad supresora inducida por el sobrenadante.- En un intento por enriquecer al componente responsable de la producción de la actividad supresora se precipitó un lote de extracto al 60% y 80%, encontrando que el precipitado al 80% induce una actividad supresora mayor que el precipitado con 60%. La presencia del inhibidor enzimático no modifico los resultados. En las electroforesis de estos dos precipitados no se encontro ninguna diferencia relevante a la que se pudiera asignar la capacidad inductora de la supresión (Tabla 10).

La actividad supresora del sobrenadante se incrementa al eliminar compuestos de bajo peso molecular.- La actividad supresora se in-

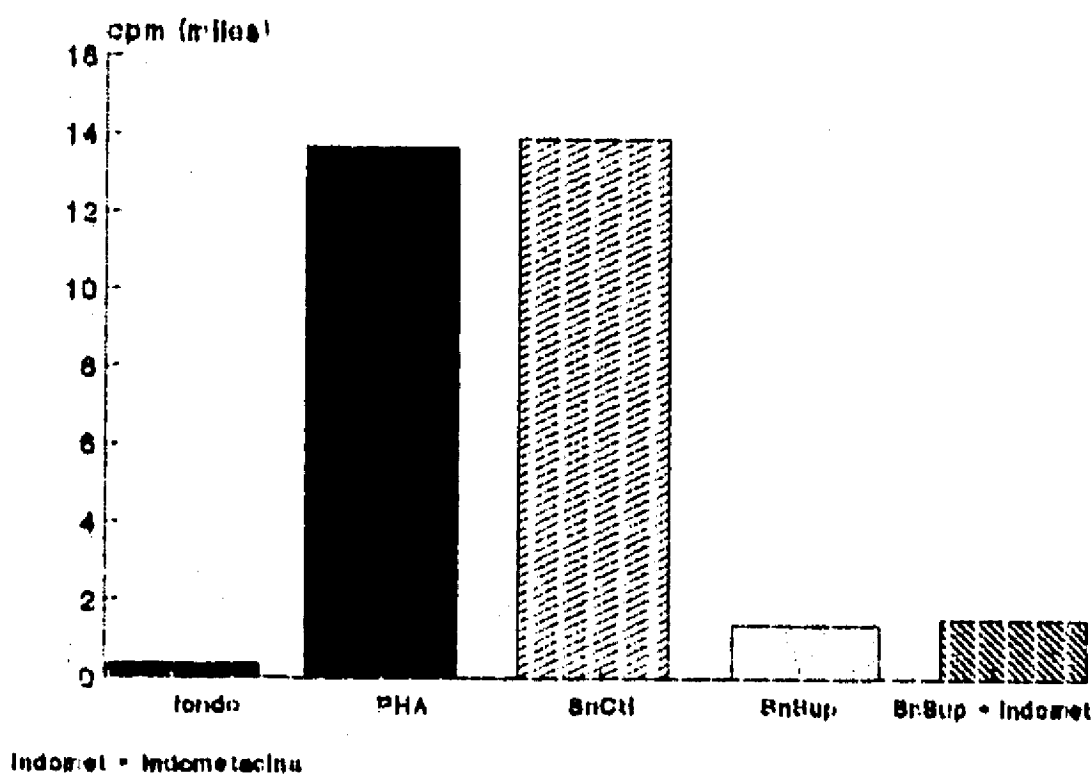


Figura 6.- La incubación de los macrófagos con indometacina no altero la actividad supresora del sobrenadante, sugiriendo que la actividad supresora no se debe a prostaglandina E<sub>2</sub>.

**Tabla 10.- Inducción del sobrenadante supresor con un extracto protéico precipitado al 60 u 80% de sulfato de amonio, con o sin inhibidor enzimático**

	cpm	% supresión
fondo	607 ± 221	-
PHA	55092 ± 4522	-
SnSup 60%	22134 ± 3395	59.8
SnSup 60% + PMSF	23496 ± 3977	57.3
SnSup 80%	12438 ± 3381	77.4
SnSup 80% + PMSF	12673 ± 2336	76.9

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; % supresión se calcula sobre la estimulación inducida por el mitógeno; el 60 u 80% traduce el porcentaje final de precipitación de un extracto protéico de un mismo lote; PMSF = fluoruro de fenilmetilsulfonil (inhibidor de enzimas que posean residuos de tiro-sina)

crementó tres veces cuando el sobrenadante fue dializado durante 24 horas (Tabla 1). La actividad supresora del sobrenadante se debe a componentes de peso molecular mayor a los 11,000 - 15,000 daltons que es el límite de corte de las bolsas de dialisis. También se puede encontrar la actividad supresora en el sobrenadante de células adherentes no estimuladas, siempre y cuando el sobrenadante se dialize.

**Tabla 11.- Incremento de la actividad supresora del Sn al eliminar sustancias de bajo peso molecular**

	cpm	% supresión
fondo	418 ± 225	-
PHA	77519 ± 5788	-
SnCtl	78297 ± 4420*	-
SnCtl dializado	65297 ± 5251	15.7
SnSup	46140 ± 4289	40.4
SnSup dializado	31588 ± 2627*	59.2

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; \* P<0.05

**La supresión afecta a la estimulación antígeno específica.-** La actividad supresora del sobrenadante no esta dirigida solamente a células estimuladas con mitógeno sino también a células estimuladas con antígeno (Fig.7). Los resultados sugieren que la actividad supresora sea mediada por un inhibidor de interleucina 1. La actividad supresora fué saturable.

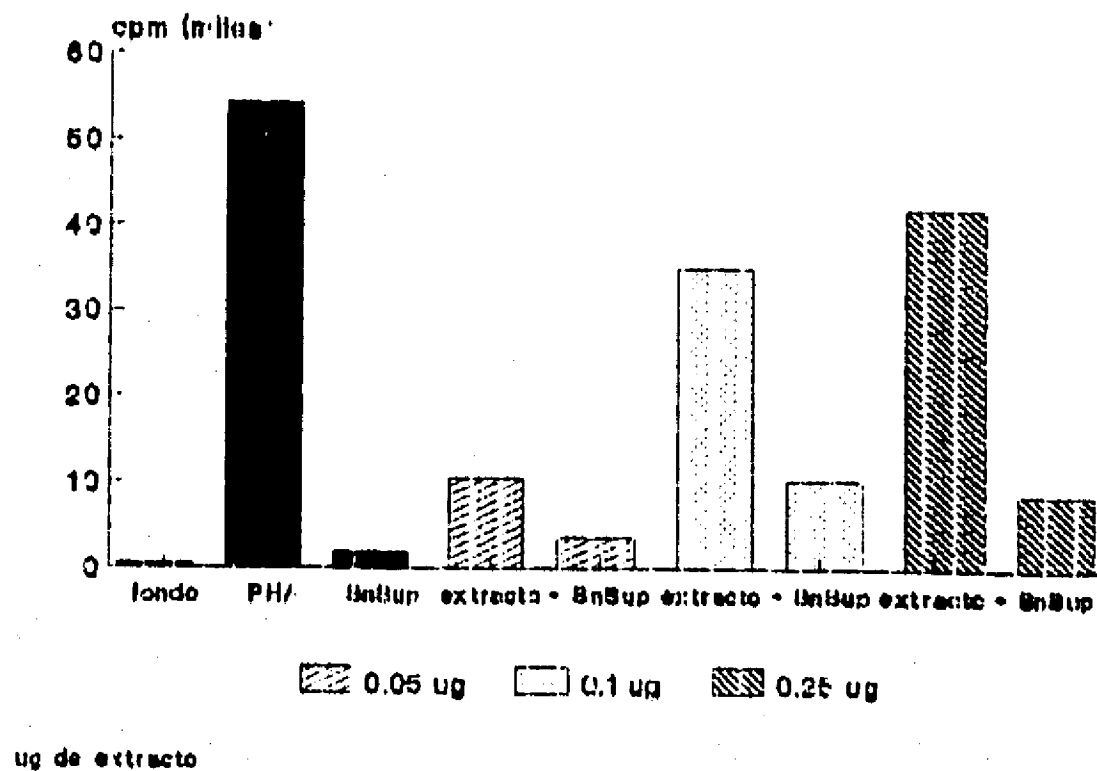


Figura 7.- La proliferación de células estimuladas con un antígeno también se inhibe en presencia del sobrenadante supresor. Se probaron tres diferentes dosis de antígeno.

**La supresión es reversible.-** Para confirmar la hipótesis de que la actividad supresora es secundaria a un inhibidor de interleucina 1 se produjo, con LPS un sobrenadante de J.774 rico en IL-1. Se repitió el ensayo de supresión con y sin el sobrenadante enriquecido, utilizando un sobrenadante dializado para obtener la ma-

xima supresión. La presencia del sobrenadante enriquecido con interleucina 1 disminuyó el efecto de supresión (Tabla 12). Es probable que la reversión no haya sido completa debido a que no había suficiente cantidad de IL-1 ya que como se sabe no solamente se incrementa la secreción de esta interleucina sino también la de otros factores solubles. La presencia de IL-1 en este sobrenadante fue corroborada a través de un ensayo de proliferación de timocitos murinos utilizando dosis submitogénicas de fitohemaglutinina (Montaño y col., manuscrito en preparación).

**Tabla 12.- Reversión del efecto supresor del sobrenadante**

	cpm	% supresión
fondo	1719 ± 389	-
PHA	27618 ± 991	-
SnCtl	31447 ± 1035	-
SnSup dializado	5550 ± 892	79.9
SnSup dial. + Sn J774 enriquecido en IL-1	16513 ± 2209	40.2

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; % supresión se calculó sobre la estimulación obtenida con el mitógeno; SnCtl = sobrenadante control; SnSup = sobrenadante con actividad supresora dializado; Sn de J774 se considera que esta enriquecido con IL-1 debido a que las células fueron estimuladas con LPS.

**La inducción de sobrenadante supresor se inhibe ligeramente en presencia del anticuerpo monoclonal MM-TB1-D.6.-** La incubación de células adherentes murinas con extracto protéico en presencia de suero hiperinmune anti-extracto protéico inhibe totalmente la producción del sobrenadante supresor lo cual quiere decir que el

componente responsable es antigénico.

En un intento por tratar de determinar al responsable de la inducción del sobrenadante supresor se analizó la inducción del sobrenadante supresor en presencia de 50  $\mu$ l de líquido de ascitis del anticuerpo monoclonal MM-TB1-D.6. Este anticuerpo deriva de una clona de crecimiento rápido obtenida de una fusión efectuada con un ratón inmunizado con el extracto protéico, tiene un isotipo IgG1 y reconoce un epitopo presente en una proteína de 65 kDa de peso, la cual al hidrolizarse genera dos fracciones de 31 y 33 kDa que comparten el epitopo que reconoce el anticuerpo. Al parecer estos epitopos son altamente antigénicos ya que la mayoría de los pacientes poseen anticuerpos circulantes contra estas fracciones tal como puede observarse en la figura 8 donde se muestra la reactividad del suero de 6 pacientes tuberculosos los cuales estaban respondiendo de manera adecuada al tratamiento antifímico. El anticuerpo MM-TB1-D.6 bloquea en un 80% la respuesta de células periféricas mononucleares de individuos sanos PPD positivos a el reto antigénico con 1  $\mu$ g de PPD (Tabla 13). Los resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal fué capaz de inhibir, aunque de manera muy leve, la inducción de producción del sobrenadante supresor (Tabla 14).

Debido a que el resultado anterior sugería que son varios los responsables de la inducción del sobrenadante supresor se anali-



zaron los geles de los extractos utilizados para la inducción del sobrenadante supresor y se observo que algunos extractos, induc-

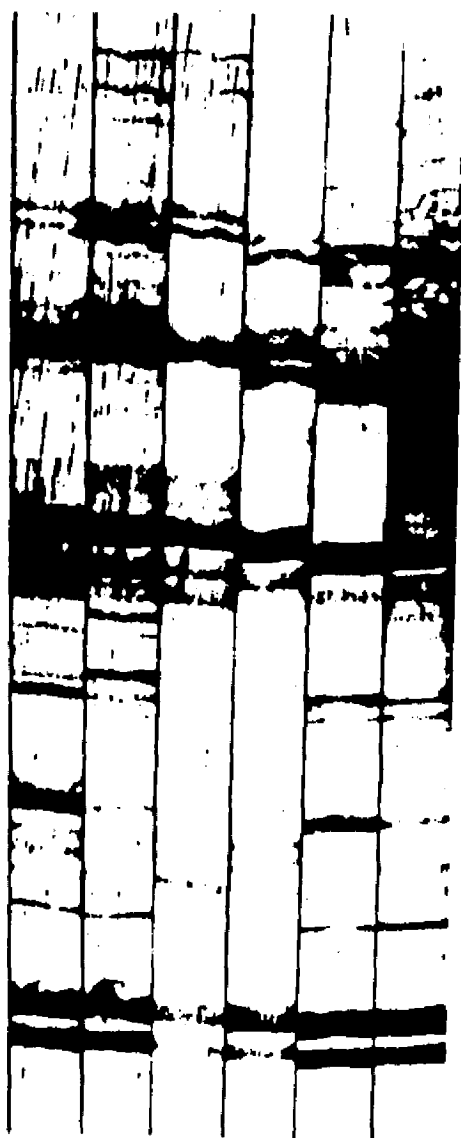


Figura 8.- Reactividad del suero de pacientes tuberculosos contra las proteínas de 65 y 31/33 Kda.

Tabla 13.- Inhibición de la respuesta proliferativa de células periféricas mononucleares humanas a PPD por MM-TB1-D.6

	cpm
fondo	597 ± 38
PHA	58443 ± 4521
PPD 1 µg	37380 ± 872
PPD + MM-TB1-D.6	6159 ± 396
EPFC 1 µg	35337 ± 2845
EPFC + MM-TB1-D.6	6686 ± 1733

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; EPFC = extracto protéico de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv; el monoclonal se agregó como liquido de ascítis esterilizado por filtración, se pusieron 50 µl por pozo

**Tabla 14.- Inhibición parcial de la producción de sobrenadante supresor por MM-TB1-D.6**

	cpm	% supresión
fondo	821 ± 236	-
PHA	17180 ± 2570	-
SnSup	4070 ± 914	76.3
Sn # 1	16369 ± 2839	4.7
Sn # 2	12499 ± 1636	27.2

cpm = cuentas por minuto ± error estandar de la media; % supresión se calculó con respecto a la respuesta lograda con el mitógeno; Sn # 1 equivale a un sobrenadante inducido con extracto protéico en presencia de líquido de ascítis obtenido de un ratón Balb/c inmunizado con células Sp2, mientras que el Sn # 2 corresponde a un sobrenadante inducido con extracto protéico en presencia de 250 µl de líquido de ascítis del monoclonal MM-TB1-D.6

tores de sobrenadante supresor, precipitados al 80% mostraban una banda de 18 kDa que no se observa en los extractos precipitados a otras concentraciones, por ello se purificó por electroelución, esta fracción y se corroboró que mantuviera su actividad antigénica (Tabla 15) antes de utilizarla para tratar de inducir la producción del sobrenadante supresor. Los resultados de este último ensayo fueron negativos. La utilización de 5 µg de proteína de 31/33 kDa purificada por electroelución tampoco indujo un sobrenadante con actividad supresora. La utilización de 10 µg de una mezcla protéica que incluyó a los antígenos de 18, 31 y 33 kDa indujo un sobrenadante con un 15% de la actividad supresora observada en el sobrenadante supresor utilizado como control.

**Reversión de la actividad supresora con material enriquecido en IL-1.-** Debido a la posibilidad de que la supresión en este estu-

**Tabla 15.- Antigenicidad de la fracción protéica obtenida por electroelución.**

	1 $\mu\text{g}^a$			0.5 $\mu\text{g}^a$		
	SH	SNC	ST	SH	SNC	ST
1:50	1.88	0.81	1.30	*	0.83	0.87
1:100	*	0.72	0.94	*	0.96	1.00
1:200	1.69	0.55	0.90	2.05	0.77	0.86
1:400	1.63	0.65	0.57	1.65	0.72	0.61
1:800	1.51	-	0.87	1.83	0.54	0.59
1:1600	0.97	0.18	0.40	1.60	0.47	0.42
Ctl 2 anticuerpo	0.08 $\pm$ 0.07			0.02 $\pm$ 0.03		

<sup>a</sup> equivale a la concentración de antígeno fijado a cada pozo; SH = suero hiperinmune anti extracto protéico hecho en conejo; SNC = suero normal de conejo; ST = suero de paciente tuberculoso (corresponde al suero que se muestra en el carril 2 de la figura 8); \* = lectura mayor a la sensibilidad del aparato; Ctl 2 anticuerpo corresponde a la lectura del ensayo en el que se omitió la incubación con suero ya sea de conejo o de paciente. La lectura del ensayo se hizo a 492 nm

dio se deba a un inhibidor de IL-1 se obtuvo una fracción enriquecida de IL-1 a partir de sobrenadantes de células J774 estimuladas con LPS; estos sobrenadantes fueron capaces de revertir parcialmente el efecto supresor (tabla 12). La fracción enriquecida en IL-1 logro revertir la actividad de un sobrenadante supresor en un 70% versus 50%, del sobrenadante enriquecido en interleucina 1 (ver tabla 12).

## DISCUSION

Uno de los más serios problemas de Salud Publica que afronta la humanidad en la actualidad, independientemente del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, es el de la Tuberculosis, enfermedad que se calcula causa 3 millones de muertes por año <sup>88</sup>.

Desafortunadamente todos los avances en el conocimiento y control epidemiológico y terapéutico de la enfermedad <sup>15-18)</sup> no han ido acompañados del mismo grado de entendimiento acerca de como responde el sistema inmune del individuo infectado. Los mecanismos que utiliza el huésped para defenderse del ataque del agente causal, *M. tuberculosis* o alguna de las numerosas micobacterias capaces de producir enfermedad en el humano apenas empiezan a ser entendidos.

Está bien establecido que el sistema inmune del huésped, especialmente la inmunidad mediada por células, participa en la defensa del individuo expuesto a la micobacteria <sup>89,90</sup> logrando que aproximadamente el 90% de los individuos infectados contengan a la micobacteria y dejando como única huella de este evento, a) la presencia del nódulo primario en pulmón, y b) la conversión en la reacción cutánea a la tuberculina; los factores que hacen que el otro 10% de los individuos desarrollen enfermedad no están enteramente entendidos pero está bien establecido que la enfermedad

corresponde a una respuesta exagerada de este mecanismo de defensa <sup>11,14,55,91</sup>.

Una asociación claramente presente en los factores ligados al desarrollo de la enfermedad: infecciones agregadas en el huésped, alteraciones en la homeostasis, edad del huésped, estado nutricional del huésped, patología crónica con capacidad inmunosupresora <sup>92</sup>, es la falla en la cinética y en la homeostasis de la respuesta celular del huésped <sup>72,93-95</sup>.

Las fallas en la respuesta inmune celular que se han descrito en pacientes con tuberculosis incluyen una gama muy amplia en todos los eventos conocidos de esta respuesta. Predominan en términos de respuesta inmune las siguientes alteraciones: activación de linfocitos T supresores <sup>95</sup>, inversión en el índice CD4/CD8 <sup>96</sup>, pérdida en la capacidad de presentación antigénica por los macrófagos <sup>97</sup>, disminución en la producción y respuesta de IL-2 <sup>67</sup>, producción espontánea de IL-1 <sup>54</sup>, disminución en la expresión de receptores para IL-2 en los linfocitos T <sup>57</sup>, bloqueo en la actividad de los interferones <sup>98</sup>, depresión en la respuesta de hipersensibilidad tardía <sup>99</sup>, y finalmente, disminución en la blastogénesis inducida por PPD de las células periféricas mononucleares de pacientes tuberculosos <sup>40,100,101</sup>.

Al analizar las alteraciones que se describen queda claro que la

mayoría de ellas se relacionan con la inhibición de las múltiples líneas de defensa inmune que posee, un individuo. No solo esta relación es clara. La otra, que probablemente es más importante, tiene que ver directamente con el inicio del mecanismo de defensa celular, es decir con la actividad no solamente fagocítica sino también con la habilidad para procesar y presentar antígenos por parte de las células monocíticas. Esta observación se refuerza de manera muy importante por las observaciones efectuadas por Ellner acerca de la característica supresora de los monocitos circulantes de pacientes tuberculosos <sup>40,55,69</sup> los cuales están incrementados. Estos efectos de inhibición es muy probable que sean consecuencia de la presencia de la micobacteria o de alguno de sus componentes. Inclusive, no sería raro pensar en la posibilidad de que el incremento en el número de monocitos con actividad supresora también fuese consecuencia de la presencia de la micobacteria ya que la supresión de estas células adherentes es PPD específica y parece reflejar la directa estimulación de los monocitos por el PPD <sup>70</sup>. Lo que es más, el fenotipo de estas células adherentes parece corresponder a monocitos circulantes inmaduros (ER<sup>-</sup>, OKM-1<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>)<sup>21</sup>, lo cual ha sido plenamente establecido en tuberculosis <sup>38</sup>.

Con todos estos antecedentes se podía pensar en la posibilidad de que las células adherentes humanas pudieran, en contacto con la micobacteria o alguno(s) de sus componentes e independientemente

de la presencia de una población inmadura circulante que ejerza una función inmunosupresora, liberar alguna sustancia que interviniera en la regulación inmune del individuo infectado. No podemos olvidar que *Mycobacterium* es un patógeno intracelular <sup>102</sup> y que los efectos sobre la respuesta inmune celular parecen demostrar una alteración en la producción y en la respuesta de factores solubles indispensables en la expansión y en el control de una adecuada respuesta de defensa, no solo por parte de los monocitos infectados o inmaduros, sino también por parte de los linfocitos T cooperadores, T supresores y T de hipersensibilidad tardía. Este bloqueo en la respuesta inmune celular T también se ha descrito en la infección por el parásito intracelular estricto, *Leishmania donovani* <sup>103,104</sup>, y es posible que otros parásitos intracelulares tales como *Toxoplasma gondii*, *Legionella pneumophila* y *Trypanosoma cruzi* sobrevivan debido a la presencia de factores que suprimen la activación de los macrófagos <sup>105</sup>. Este mecanismo de supresión es tan importante que las micobacterias que no inducen una respuesta celular por parte del huésped son inmunosupresoras <sup>53</sup>.

Un antecedente de este estudio se encuentra en el trabajo efectuado por Wade y colaboradores los cuales cocultivaron células mononucleares con una suspensión homogeneizada de *M. tuberculosis* muertas por calor, en la que el componente más importante eran los lípidos de la pared celular, observando que la blastogénesis

inducida por los mitógenos fitohemaglutinina y concanavalina A, era bloqueada de manera muy importante <sup>106</sup>; aún más, estos mis-mos autores observaron que el efecto se debía a la producción de un factor supresor, termoestable por parte de las células adherentes que activa células T supresoras las cuales eran las responsables de la inhibición de la blastogénesis inducida por mitógeno. Es probable que este efecto se haya debido a la producción y liberación al medio externo de prostaglandina E<sub>2</sub>, la cual además de ser termoestable tiene actividad inmunosupresora <sup>107-109</sup> y estimula una población celular supresora la cual responde a PGE<sub>2</sub> y secreta péptidos que suprimen la activación celular <sup>110,111</sup> inducida por el polisacárido D-arabino-D-galactano <sup>109</sup> el cual conforma el 35% de la masa de la pared celular <sup>112</sup>.

El componente liberado por células monocíticas estimuladas con el extracto protéico del filtrado de cultivo de la cepa **M. tuberculosis** H37 Rv ó H37Ra que se describe en esta tesis es diferente. La primera diferencia importante es que en todos los experimentos se utilizó un extracto obtenido del filtrado de cultivos sembrados en un medio que carece de proteínas. Claro está que es posible que a pesar de haber efectuado la precipitación con sulfato de amonio aún quedaran componentes lipídicos propios de la pared en el extracto por lo que para minimizar esta posibilidad se utilizaron extractos delipidizados previamente por extracción secuencial con cloroformo. Estos extractos, los cuales ya no mos-



traban la presencia macroscópica de lípidos después de tres extracciones, también fueron capaces de inducir la producción del componente responsable de la supresión. A la vez, tal y como se observa en la figura 1, la reproducibilidad electroforética y probablemente componencial de los extractos protéicos que se utilizaron, facilitó la producción continua de sobrenadante con una actividad supresora similar en los diferentes lotes producidos. La producción del sobrenadante supresor con el extracto que contenía un inhibidor enzimático no se afectó por lo que se puede concluir razonablemente que el componente responsable de la inducción no es una proteasa que contenga tirosinas <sup>72</sup>.

Aunado a lo anterior hay otras diferencias que vale la pena hacer resaltar. La primera es que la producción del factor responsable de inhibir la blastogénesis es dosis-dependiente lo cual quiere decir que, tal y como sucede en otras situaciones <sup>113-115</sup>, se requiere de la estimulación de receptores para que se pueda generar la señal inicial. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito la presencia, en la superficie de los macrófagos, de un receptor que al ser estimulado de manera específica induzca la producción y secreción de factor inhibidor de la blastogénesis. Lo anterior sugiere que el receptor no es específico para proteínas de *M. tuberculosis*, es más probable que cualquiera que sea la proteína de *M. tuberculosis* responsable(s) de inducir la producción de este factor soluble supresor, se una a los receptores

inespecíficos descritos en la superficie de macrófagos murinos y humanos <sup>116,117</sup> cuya función es la de estabilizar antígenos.

La segunda diferencia que vale la pena recalcar es el hecho de que la producción de este factor es máxima a las 48 horas y se mantiene constante durante casi una semana. A las 12 horas la actividad supresora del sobrenadante es de tan solo un 7%, a las 24 horas esta actividad se incrementa a 12%. Estas cifras contrastan con las de los sobrenadantes de Wadee [38% a las 2 horas y 66% a las 24 horas] <sup>106</sup> las cuales traducen una muy rápida producción y secreción al medio externo del responsable de la supresión. Es posible que la actividad supresora inicial en los sobrenadantes de Wadee se deba a la actividad inmunosupresora del lipoarabino-manano <sup>118,119</sup> el cual es el glucolípido más importante de la micobacteria, aunado a la rápida secreción de PGE<sub>2</sub> por parte de los monocitos. Regularmente la liberación al medio externo de factores solubles inmunoreguladores es detectable hasta cuando menos las 24 horas <sup>120,121</sup>, aunque hay excepciones <sup>122</sup>.

La tercera y última comparación entre el sobrenadante supresor que se describe en este trabajo y el reportado por Wadee estriba en el hecho de que se demostró que el factor responsable de la supresión no es una proteína de la micobacteria, ya que la incubación del sobrenadante con suero hiperinmune no bloqueó la supresión del mismo. La importancia de esta observación es que él o

los componentes del extracto solamente son inductores del factor responsable de la supresión, pero no son componentes moleculares del mismo lo que quiere decir que el factor es producido por la célula adherente después de haber sido estimulada, y que lo más probable es que el responsable sea un componente inmunoregulador propio de los monocitos, que se demostró no corresponde a  $PGE_2$  pues la incubación con indometacina, la cual inhibe la síntesis de esta molécula inmunosupresora <sup>108</sup> y la cual también es capaz de bloquear la proliferación inducida por PHA <sup>123</sup>, no alteró la actividad supresora del sobrenadante.

Para reforzar el punto anterior hay que recordar que la incubación del extracto con suero hiperinmune evito que se produjera y se liberara el factor responsable de la supresión; este experimento demuestra además, que la molécula responsable de la inducción del factor, es antigénica.

Una de las facetas más interesantes del sistema inmune es la red de supresión inmune, ya que la integración de esta información en un solo esquema es una tarea difícil <sup>124-131</sup>. La dificultad en describir un factor de supresión consiste en integrarlo a los ya conocidos antes de asegurar que es diferente a ellos.

Se estableció que la actividad del sobrenadante era directamente proporcional a su concentración, que el factor supresor era ter-

molábil, y que probablemente era una proteína. La actividad supresora no se perdió al dializar con membranas con un poro de corte de 14 kDa lo que hacía suponer que él o los responsables de la actividad tenía un peso mayor de 14 kDa. Además, era claro que la eliminación de los componentes de menor peso molecular favorecía la actividad supresora del sobrenadante. También se sabía que la actividad ya no se observaba en células previamente estimuladas con PHA, la cual se une a los receptores glicoprotéicos CD-2 y CD-3 <sup>132,133</sup> que forman parte del complejo CD-3/TCR <sup>134</sup>, en la superficie de las células T. Este receptor es el encargado de reconocer al antígeno presentando en el contexto de moléculas clase II del CMH por la célula presentadora de antígeno <sup>135,136</sup>.

Sin embargo, la estimulación por PHA al igual que la inducida por anti-CD2 o anti-CD3 <sup>137-139</sup>, fue dependiente de la presencia de células accesorias. La función de la célula accesoria en la estimulación por anti-CD3 es la de entrecruzar los acumulos de CD-3 en la superficie de la célula T por fijación de los anticuerpos a través de los receptores para Fc. Se requiere la presencia de otros mediadores solubles como la IL-1 para que se pueda dar el efecto <sup>140</sup>. La actividad de otra lectina frecuentemente utilizada, Concanavalina-A, también depende de células accesorias <sup>141</sup>.

Debido a lo anterior fue claro que el efecto supresor se debía a algún componente que bloqueaba la función cooperadora de las cé-

lulas accesorias y que no era PGE<sub>2</sub>. Pensando en estos términos se propuso que el bloqueo podría ser sobre la IL-1, ya que esta citocina es indispensable para lograr la adecuada estimulación de los linfocitos T cuando se efectúan ensayos de proliferación con lectinas mitogénicas <sup>139-143</sup>. La IL-1, ya sea  $\alpha$  ó  $\beta$ , tiene un peso molecular de 17 kDa y se relaciona con un sinfín de funciones inmunes, inflamatorias, hematopoyéticas y neuroendocrinas <sup>144</sup>. Su acción la inicia al acoplarse con un receptor específico <sup>145</sup>. La fuente más importante de IL-1 son los macrófagos activados <sup>146</sup> aunque hay otras células capaces de producirla <sup>144</sup>.

Para corroborar esta posibilidad se efectuaron experimentos en los que se puso a competir el sobrenadante con actividad supresora con un sobrenadante enriquecido en IL-1. Los resultados demostraron una importante disminución en la actividad supresora; para confirmar este resultado se obtuvo, a partir de este sobrenadante, una fracción enriquecida en IL-1, cuya actividad se confirmó en un ensayo de proliferación de timocitos murinos, y se repitieron los ensayos de competencia observándose la disminución en la actividad supresora del sobrenadante. O sea, que el sobrenadante supresor sí tenía la capacidad de inhibir la señal coestimuladora de la IL-1 que es necesaria para iniciar la proliferación celular.

La activación de linfocitos T se debe al incremento en la expre-

sión de genes específicos y requiere de 2 señales, la primera dada por la unión del antígeno con el receptor de linfocitos T, efecto que mimetiza la PHA, y la otra, generada por la unión de la IL-1 a su receptor <sup>147</sup>. Para inducir la expresión del gene para IL-2 debe darse la unión de los factores de transcripción NFAT-1, NFIL-2A y AP-1 con regiones específicas presentes en el promotor del gene <sup>148-150</sup>. NFIL-2A se encuentra en linfocitos T activados y en reposo, mientras que NFAT-1 y AP-1, indispensables para inducir la expresión del gene, solo se encuentran en células T activadas <sup>151</sup>. NFAT-1 se induce cuando se perturba el complejo CD3/TCR <sup>150</sup>, probablemente como consecuencia del aumento en la expresión de RNAm para c-fos. AP-1 se induce por esteroides de forbol <sup>152</sup> y por IL-1 como consecuencia del aumento en la expresión de RNAm para c-jun <sup>153</sup>. Muñoz y cols <sup>154,155</sup> mencionan que la IL-1 solamente estimula a los linfocitos T<sub>h</sub>2 los cuales producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 <sup>156</sup> y al parecer son los únicos que expresan receptor para IL-1 <sup>157</sup>. Las células T<sub>h</sub>2 en ausencia de células presentadoras de antígeno producen solamente IL-4, la cual regula la expresión del receptor para IL-1, pero no proliferan hasta que no haya IL-1 la cual estimula la expresión del receptor para IL-2 y probablemente para IL-4 <sup>158</sup>.

La regulación de la actividad de la IL-1 una vez que sale de la célula es poco conocida. En 1984 Liao describió por primera vez la presencia en orina de un inhibidor de IL-1 <sup>159</sup>. El grupo de

Dayer describió la presencia, en la orina de individuos febriles y en niños con artritis juvenil crónica, de un inhibidor de IL-1<sup>160,161</sup> de aproximadamente 22-25 kDa el cual se une al receptor y bloquea la unión y la actividad biológica de la IL-1  $\alpha$  o  $\beta$ <sup>162-164</sup>.

Los inhibidores de IL-1 descritos hasta la fecha tienen diferencias en el tamaño y en sus propiedades biológicas. El inhibidor descrito por Liao pesa 35-40 kDa, bloquea la proliferación de timocitos pero induce la producción de PGE<sub>2</sub> por fibroblastos, no previene la unión de la IL-1 con su receptor, sin embargo bloquea la activación celular en etapas posteriores, y probablemente corresponde a una DNasa I<sup>159,165-168</sup>. Hay otro inhibidor con un peso molecular de 5-9 kDa producido por monocitos humanos normales y por monocitos de pacientes con esclerodermia, o con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, el cual bloquea la proliferación de timocitos al añadirlo 24 horas después de haberse iniciado el cultivo lo cual demuestra que su efecto lo ejerce en las etapas tardías de la proliferación celular<sup>169-171</sup>. Finalmente, se ha descrito que la uromodulina, proteína que se encuentra en la orina de mujeres embarazadas, se enlaza con la IL-1 $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , evitando la activación de células<sup>172,173</sup>.

En base a lo anterior queda claro que la principal célula productora de inhibidor de IL-1 es el monocito humano. El sobrenadante

con actividad supresora que se describe en este trabajo es producido por monocitos humanos y por una línea celular murina con características de macrófago. El que una línea celular murina produzca inhibidor no es nueva, la línea mielomonocítica humana M20, libera un factor inhibidor de IL-1 de 52 kDa <sup>174</sup>. Las glándulas submaxilares de rata, células epiteliales gingivales, células epidérmicas murinas y neutrofilos humanos no estimulados, son capaces de producir inhibidores de IL-1 de 90, 98, 40 y 45/70 kDa, respectivamente <sup>175-178</sup>. La infección de monocitos humanos por el virus sincicial respiratorio, el virus de Epstein Barr o por el citomegalovirus induce la liberación de un inhibidor de IL-1 de 95 kDa que pudiera corresponder a una metaloproteínasa de membrana que tiene ese peso molecular y que es capaz de inactivar a la IL-1 <sup>179-182</sup>.

Las similitudes entre los inhibidores de IL-1 descritos y la actividad del sobrenadante que se describe en esta tesis, son enormes. La actividad supresora presente en el sobrenadante corresponde a el inhibidor de 22 kDa ya que deriva claramente de macrófagos y además inhibe la proliferación celular en etapas tempranas. La descripción de macrófagos supresores <sup>69,70</sup> señala que bloquean la respuesta proliferativa de linfocitos. Es probable que la actividad supresora de IL-1 no se deba a una subpoblación especializada de macrófagos, sino a la producción por parte de macrófagos expuestos a *M. tuberculosis*, o a sus proteínas, de una



actividad idéntica a la que se describe en este trabajo que pudiera corresponder a un inhibidor de IL-1 que ya se ha descrito en la literatura. Hasta la fecha no se había mencionado que una bacteria fuera capaz de inducir la producción de una actividad similar o idéntica a la que se presenta en esta investigación, lo cual hace que este trabajo sea original.

El que el anticuerpo monoclonal haya bloqueado en un porcentaje importante la inducción de la actividad supresora traduce que el componente inductor posee determinantes antigénicos y que el responsable parcial de la inducción es un compuesto que tiene un peso de 31/33 kDa; sin embargo, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el único antígeno caracterizado biológicamente con este peso molecular corresponde a una familia de genes múltiples que codifica para tres o más proteínas de secreción una de las cuales posee la capacidad de ligar fibronectina<sup>183,184</sup>; esto no quiere decir que una de estas tres proteínas no tenga también la facultad de inducir la producción y secreción, por los macrófagos, de la actividad supresora, sin embargo es posible que haya más de una proteína responsable, ya que el suero hiperinmune que reconoce a más de 30 antígenos presentes en el filtrado del cultivo sí fue capaz de inhibir totalmente la producción del sobrenadante supresor. Esta última observación apoya que la producción de la actividad supresora no es un producto de la activación inespecífica del macrófago, sino que se debe a la unión receptor

ligando específica. Resultados iniciales sugieren que una proteína de *M. tuberculosis* localizada en la región de 31/33 kDa, tiene una actividad biológica similar a un miembro de la familia de las adhesinas <sup>92</sup>, que tiene receptores específicos en los linfocitos T <sup>21</sup>. La micobacteria pudiera secretar una proteína con una actividad biológica similar, o idéntica, a alguna proteína de regulación para la que hubiese un receptor específico.

En conclusión hay componentes proteicos de *M. tuberculosis* que tienen la capacidad de inducir la producción y la liberación de una actividad supresora por parte de los macrófagos, que pudiera corresponder a un inhibidor de interleucina 1. Este inhibidor potencial evitaría la proliferación de los linfocitos Th<sub>2</sub> los cuales son los únicos que poseen receptores para IL-1, bloqueándose la secreción de una serie de interleucinas que son vitales para la homeostasis adecuada de la respuesta inmune no solo humoral sino también la celular. Este inhibidor explicaría la falla de los linfocitos T cooperadores, en términos de producción y respuesta a IL-2 la cual se sabe es regulada por la IL-4, que es un producto liberado por las células Th<sub>2</sub>. Es probable que lo que se conoce actualmente como macrófago supresor solamente corresponda a un macrófago con capacidad de producir y secretar moléculas con la actividad supresora que se describe en este trabajo.

## REFERENCIAS

- 1.- Paulsen HJ (1987) Tuberculosis in the native American: indigenous or introduced. *Rev.Infect.Dis.* 9: 1180-1186.
- 2.- Koch R (1882) Die aetiologie der tuberkulose. *Berl.Klin. Wochenschr.* 19: 221-229.
- 3.- Tsukamura M, Mizuno S & Toyama H (1985) Taxonomic studies on the Mycobacterium tuberculosis series. *Microbiol. Immunol.* 29: 285-299.
- 4.- Tsukamura M (1981) A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. *Rev.Infect.Dis.* 3: 841-861.
- 5.- Youmans GP (1975) Disease due to mycobacteria others than Mycobacterium tuberculosis. En: "The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases", Youmans GP, Paterson PY & Sommers HM (eds.), W.B. Saunders and Co., Philadelphia.
- 6.- Joseph SW (1967) Lack of auramine-rhodamine fluorescence of Runyon group IV mycobacteria. *Am.Rev.Respir.Dis.* 95: 114-122.
- 7.- Bates JH (1977) The changing scence in tuberculosis. *N.Engl.J.Med.* 297: 610-612.
- 8.- Mahler HT (1970) Tuberculosis in the world today. *Bull. Int. Union Tuberc.* 43: 19-27.
- 9.- Allen EA (1990) Global view of tuberculosis. *Rev.Inst. Nal.Enf.Resp.Mex.* 3: 51-54.
- 10.- Youmans GP (1979) Tuberculosis. W.B. Saunders and Co., Philadelphia.
- 11.- Dannenberg AM (1991) Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today* 12: 228-233.
- 12.- Grzybowski S, Allen EA, Black WA, Chao CW, Enarson D, Isaac-Renton JL, Peck SHS & Xie HJ (1987) Inner-city survey for tuberculosis: evaluation of diagnostic methods. *Am.Rev.Respir.Dis.* 135: 1311-1315.
- 13.- Cauchie P, Volckaert A, Efira A & Vincken W (1986) Socioeconomic factors in tuberculosis. *Chest* 90: 787.

- 14.- Edwards D & Kirkpatrick CH (1986) The immunology of mycobacterial diseases. Am.Rev.Respir.Dis. 134: 1062-1071.
- 15.- Gryzbowski S (1980) Epidemiology of tuberculosis and the role of BCG. Clinics Chest Med. 1: 175-187.
- 16.- Department of Health and Human Services, Division of Tuberculosis elimination, National Center for Prevention Services (1991).
- 17.- Dirección General de Epidemiología, SSA (1989)
- 18.- Tuberculosis en las Americas, mortalidad y morbilidad (1987) Informe elaborado por el Instituto de Epidemiología "Emilio Coni", Centro Colaborador de la OPS/OMS, Santa Fé, Argentina.
- 19.- Walker RW, Mallmann WL & Brunner JR (1967) Type specific lipids of mycobacteria. Am.Rev.Respir.Dis. 95: 1065-1067.
- 20.- Smith DW, Randall HM, MacLennan AP, Putney RK & Rao S (1960) Detection of specific lipids in mycobacteria by infrared spectroscopy. J.Bacteriol. 79: 217-229.
- 21.- Roitt IM, Brostoff J & Male DK (1989) Immunology, C.V. Mosby Company, St. Louis, USA.
- 22.- Chase MW (1945) The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 59: 134-135.
- 23.- Lurie MB (1942) Studies on the mechanisms of immunity in tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived of normal and immunized animals. J.Exp.Med. 75: 247-267.
- 24.- MacKannes GB (1964) The immunological basis of acquired cellular resistance. J.Exp.Med. 120: 105-120.
- 25.- Collins FM, Congdon CC & Morrison NE (1975) Growth of Mycobacterium bovis (BCG) in T-lymphocyte depleted mice. Infect.Immun. 11: 57-64.
- 26.- Lefford MJ (1975) Transfer of adoptive immunity to tuberculosis in mice. Infect.Immun. 11: 1175-1181.
- 27.- Lester CF & Atwell RJ (1958) The tuberculin skin reactive in active pulmonary tuberculosis. Am.Rev.Tuberc. 78: 399-402.

- 28.- Trnka L & Skvor J (1979) Direct migration inhibition test with leukocytes as indicators of mycobacterial antigens in the human body. *Tubercle* 60: 49-53.
- 29.- Lenzini L, Rottoli P & Rottoli L (1977) The spectrum of human tuberculosis. *Clin.Exp.Immunol.* 27: 230-237.
- 30.- Rook GAW, Champion BR, Steele J, Varey AM & Stanford JL (1985) I-A restricted activation by T cell lines of anti-tuberculosis activity in murine macrophages. *Clin.Exp. Immunol.* 59: 414-420.
- 31.- Kaufmann SHE (1988) CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today* 9: 168-174.
- 32.- De Libero G, Flesh I & Kaufmann SHE (1988) Mycobacterium reactive Lyt-2<sup>+</sup> cells. *Eur.J.Immunol.* 18: 59-66.
- 33.- Kumararatne DS, Pithie AS, Drysdale P, Gaston JSH, Kiesling R, Iles PB, Ellis CJ, Innes J & Wise R (1990) Specific lysis of mycobacterial antigen bearing macrophages by class II MHC-restricted T cell lines in healthy donors or patients with tuberculosis. *Clin.Exp.Immunol.* 80: 314-323.
- 34.- Sprent J & Schaefer M (1989) Antigen-presenting cells for unprimed T cells. *Immunology Today* 10: 17-23.
- 35.- Schwartz RH (1985) T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu.Rev.Immunol.* 3: 237-261.
- 36.- Germain RN (1986) The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322: 687-689.
- 37.- Mueller DL, Jenkins MK & Schwartz RH (1989) Clonal expansion versus functional clonal inactivation. A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu.Rev.Immunol.* 7: 445-480.
- 38.- Schmitt E, Meuret G & Stix L (1977) Monocyte recruitment in tuberculosis and sarcoidosis. *Brit.J.Haematol.* 35: 11-17.
- 39.- Tweardy DJ, Schacter BZ & Ellner JJ (1984) Association of altered dynamics of monocyte surface expression of human leukocyte antigen DR with immunosuppression in tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 149: 31-37.

- 40.- Fujiwara H, Kleinhenz ME, Wallis RS & Ellner JJ (1986) Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 73-77.
- 41.- Dannenberg AM, Ando M, Shima K & Tsuda T (1975) Macrophage turnover and activation in tuberculous granuloma. En: "Mononuclear phagocytes in immunity, infection, and pathology", Furth R (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp: 959-973.
- 42.- Karnovsky ML & Lazdins JK (1978) Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immunol.* 121: 809-813.
- 43.- Cohn ZA (1978) The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J. Immunol.* 121: 813-816.
- 44.- Kitahara M, Eyre HJ & Hill HR (1979) Monocyte functional and metabolic activity in malignant and inflammatory diseases. *J. Lab. Clin. Med.* 93: 472-479.
- 45.- Magliulo E, De-Feo V, Stripe A, Riva C & Scevola D (1973) Enhanced in vitro phagocytic power of macrophages from PPD-stimulated skin sites in human subjects hypersensitive to PPD. *Clin. Exp. Immunol.* 14: 371-376.
- 46.- Cruchaud A, Girard J & Hitoglou S (1977) The functions of human monocytes in normal subjects and in disorders associated with immune deficiency. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 54: 529-537.
- 47.- Armstrong JA & Hart PD (1971) Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* with observation on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 134: 713-724.
- 48.- Frehel C, De Chastellier C, Lang T & Rastogi N (1986) Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and pre-lysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 52: 252-262.
- 49.- Leake ES, Myrvik QN & Wright MJ (1984) Phagosomal membranes of *Mycobacterium bovis* BCG-immune alveolar macrophages are resistant to disruption by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect. Immun.* 45: 443-446.

- 50.- Campbell PB (1979) Defective leukotaxis in monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 139: 409-417.
- 51.- Nielsen H, Bennedsen J, Larsen SO, Rhodes JM & Viskum K (1982) Defective monocyte chemotaxis in pulmonary tuberculosis. *Eur.J.Respir.Dis.* 63: 122-129.
- 52.- Steinhoff U, Golecki JR, Kazda J & Kaufmann SHE (1989) Evidence for phagosome-lysosome fusion in *Mycobacterium leprae* infected murine Schwann cells. *Infect.Immun.* 57: 1008-1010.
- 53.- Pimsler M, Sponsler TA & Meyers WM (1988) Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. *J.Infect.Dis.* 157: 577-580.
- 54.- Chensue SW, Davey MP, Remick DG & Kunkel SL (1986) Release of interleukin-1 by peripheral blood mononuclear cells in patients with tuberculosis and active inflammation. *Infect.Immun.* 52: 341-343.
- 55.- Ellner JJ (1986) Immune dysregulation in human tuberculosis. *J.Lab.Clin.Med.* 108: 142-149.
- 56.- Toossi Z, Lapurga JP, Ondash RJ, Sedor JR & Ellner JJ (1990) Expression of functional IL-2 receptors by peripheral blood monocytes from patients with active pulmonary tuberculosis. *J.Clin.Invest.*
- 57.- Toossi Z, Kleinhenz ME & Ellner JJ (1986) Defective interleukin-2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J.Exp.Med.* 163: 1162-1172.
- 58.- Tweardy DJ, Schacter BZ & Ellner JJ (1984) Association of altered dynamics of monocyte surface expression of human leukocyte antigen DR with immunosuppression in tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 149: 31-38.
- 59.- Davis JE, Rich RR, Van M, Le HV, Pollack MS & Cook RG (1987) Defective antigen presentation and novel structural properties of DR1 from an HLA haplotype associated with 21-hydroxylase deficiency. *J.Clin.Invest.* 80: 998-1008.
- 60.- Cox RA, Downs M, Neimes RE, Ognibene AJ, Yamashita TS, Ellner JJ (1988) Immunogenetic analysis of human tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 158: 1302-1308.

- 61.- Pawelec G, Schneider EM, Muller C & Wernet P (1985) HLA-Dr,MB- and novel DC-related determinants restrict purified protein derivative of tuberculin (PPD)-stimulated human T cell proliferation. *Eur.J.Immunol.* 15: 12-17.
- 62.- Van Eden W, Elferink BG, Hermans J, De Vries RRP & van Rood JJ (1984) Role of HLA class II products in proliferative T-lymphocyte responses to PPD. *Scand.J.Immunol.* 20: 503-510.
- 63.- Berle EJ & Thorsby E (1982) Both DR and MT class II HLA molecules may restrict proliferative T lymphocyte responses to antigen. *Scand.J.Immunol.* 16: 543-547.
- 64.- Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, De Bruyn J & Strober S (1989) Isolation of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> mycobacteria reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339: 226-229.
- 65.- O'Brien RL, Happ MP, Dallas AM, Palmer E, Kubo R & Born WK (1989) Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma/delta by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 57: 667-674.
- 66.- Janis EM, Kaufmann HE, Schwartz RH & Pardoll DM (1989) Activation of T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 244: 713-716.
- 67.- Montaña LF, Aburto A, Masso F, Rayon I & Parra C (1988) Producción y respuesta a interleucina 2 por células periféricas mononucleares de pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev.Lat-amer.Microbiol.* 30: 125-131.
- 68.- Ainslie GM, Bateman ED & Solomon JA (1986) Variation in T lymphocyte numbers and subsets in different forms and stages of pulmonary tuberculosis (abstract). *Am.Rev.Respir.Dis.* 133: 39A.
- 69.- Ellner JJ (1978) Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J.Immunol.* 121: 2573-2578.
- 70.- Ellner JJ, Boom WH, Edmonds KL, Rich EA, Toossi Z & Wallis RS (1990) Regulation of the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. En: "Microbial Determinants of Virulence and Host Response", Ayoub E.M. (ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC, USA. pp: 77-91.



- 71.- Youmans GP (1946) A method for the determination of the culture cycle and the growth rate of virulent human type tubercle bacilli. *J.Bacteriol.* 51: 703-710.
- 72.- Gold AM & Fahrney DE (1963) The mechanism of reactivation of phenylmethanesulfonyl- $\alpha$ -chymotrypsin. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 10: 55-59.
- 73.- Segel IH (1976) *Biochemical Calculations*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- 74.- Stryer L (1988) *Biochemistry*, 3th edition. W.H. Freeman & Co., New York, USA.
- 75.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 26: 326-350.
- 76.- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 77.- Klaus CGB (1987) *Lymphocytes. A practical approach*. IRL Press, Oxford, UK.
- 78.- Mishel BB & Shiigi SM (1980) *Selected methods in cellular immunology*. W.H. Freeman & Co, San Francisco, USA.
- 79.- American Type Culture Collection, *Catalogue of Cell Lines & Hybridomas*, 6th edition, 1988.
- 80.- Blanchard DK & Djeu JY (1988) Protection of cultured human monocytes from lymphokine-activated killer-mediated lysis by IFN-gamma. *J.Immunol.* 141: 4067-4071.
- 81.- Bhardwaj N, Lau LL, Friedman SM, Crow MD & Steinman RM (1989) Interleukin-1 production during accessory cell-dependent mitogenesis of T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 169: 1121-1128.
- 82.- Koide S & Steinman RM (1987) Induction of murine interleukin 1: stimuli and responsive primary cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 84: 3802-3805.
- 83.- Hudson L & Hay FC (1989) *Practical Immunology*, 3th edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- 84.- Kohler G & Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cell producing antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

- 85.- Sikora K & Smedley HM (1984) Monoclonal antibodies. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- 86.- Poulter LW, Seymour GJ, Duke O, Janossy G & Panayi G (1982) Immunohistochemical analysis of delayed type hypersensitivity in man. *Cell.Immunol.* 74: 358-369.
- 87.- Towbin H, Staehelin T & Gordon L (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc.Natl. Acad.Sci.(USA)* 76: 4350-4354.
- 88.- Grzybowski S (1983) Tuberculosis: a look at the world situation. *Chest* 84: 75-79.
- 89.- Collins FM (1982) The immunology of tuberculosis. *Am.Rev. Respir. Dis.* 125: 42-49.
- 90.- Daniel TM (1980) The immunology of tuberculosis. *Clin.Chest Med.* 18: 189-201.
- 91.- Dannenberg AM (1986) Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature, and associated macrophage enzymes. *Bacteriol.Rev.* 32: 85-102.
- 92.- Montaña LF, Estrada I, Masso F & Zenteno E (1991) Mycobacterium tuberculosis y linfocitos T. Evasión inmune por bloqueo de la molécula de membrana designada como Cluster 2. *Rev.Inst.Nal. Enf.Resp.Mex.* 4: 3-8.
- 93.- Orme I (1987) The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis. *J.Immunol.* 138: 293-301.
- 94.- North RJ (1974) T cell dependence of macrophage activation and mobilization during infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect.Immun.* 10: 66-73.
- 95.- Modlin RL, Kato H, Mehra V, Nelson EE, Xue-Dong F, Rea TH, Pattengale PK & Bloom BR (1986) Genetically restricted suppressor T cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. *Nature* 322: 459-461.
- 96.- Singhal M, Banavalikar JN, Sharma S & Saha K (1989) Peripheral blood T lymphocyte subpopulations in patients with tuberculosis and the effect of chemotherapy. *Tubercle* 70: 171-178.

- 97.- Bhardwaj V & Colston MJ (1988) The processing and presentation of mycobacterial antigens by human monocytes. *Eur.J. Immunol.* 18: 691-696.
- 98.- Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ & Krahenbuhl JL (1988) Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect.Immun.* 56: 1232-1236.
- 99.- Daniel TM, Oxtoby MJ, Pinto E & Moreno S (1981) The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis. *Am.Rev. Respir.Dis.* 123: 556-559.
- 100.- Toossi Z, Edmonds KE, Tomford WJ, Ellner JJ (1989) Suppression of PPD-induced IL-2 production by interaction of CD16 lymphocytes and adherent mononuclear cells in tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 159: 352-356.
- 101.- Kleinhenz ME & Ellner JJ (1987) Antigen responsiveness during tuberculosis: regulatory interaction of T-cell subpopulations and adherent cells. *J.Lab.Clin.Med.* 110: 31-40.
- 102.- Chapman PT. Tuberculosis. En: *Communicable and Infectious Diseases, Seventh edition*, Franklin H. Top & Paul F. Wehrle (Eds.), C.V. Mosby Company, Saint Louis, USA. pp: 694-742.
- 103.- Reiner NE, Ng W, Ma T & McMaster WR (1988) Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in Leishmania-infected macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 85: 4330-4335.
- 104.- Crawford GD, Wyler DJ & Dinarello CA (1985) Parasite-macrophage interactions in human leishmaniasis: production of interleukin-1 in vitro. *J.Infect.Dis.* 152: 315-319.
- 105.- Engelhorn S, Bruckner A & Remold HG (1990) A soluble factor produced by inoculation of human monocytes with Leishmania donovani promastigotes suppresses IFN-gamma-dependent macrophage activation. *J.Immunol.* 145: 2662-2668.
- 106.- Wadee AA, Sher R & Rabson AR (1980) Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with mycobacteria. *J.Immunol.* 125: 1380-1386.
- 107.- Goodwin JS, Messner RP & Peake GT (1978) Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro: changes with mitogen dose and preincubation. *J.Clin.Invest.* 62: 753-760.

- 108.- Awara W, Hillier K & Jones D (1986) Kinetics of prostaglandin E2 and thromboxane A2 synthesis and suppression of PHA-stimulated peripheral blood mononuclear leucocytes. *Immunology* 59: 557-562.
- 109.- Kleinhenz ME, Ellner JJ, Spagnuolo PJ & Daniel TM (1981) Suppression of lymphocyte responses by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan: monocyte dependent and indomethacin reversibility. *J.Clin.Invest.* 68: 153-159.
- 110.- Webb DR & Nowowiejski I (1978) Mitogen-induced changes in lymphocyte prostaglandin levels: a signal for the induction of suppressor cell activity. *Cell.Immunol.* 41: 72-76.
- 111.- Fischer A, Durandy A & Griscelli C (1981) Role of prostaglandin E2 in the induction of nonspecific T lymphocyte suppressor activity. *J.Immunol.* 126: 1452-1458.
- 112.- Brennan PJ (1989) Structures of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev.Infect.Dis.* 11s: 420-430.
- 113.- Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM & Kunkel SL (1990) Stimulation of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J.Immunol.* 145: 1430-1434.
- 114.- Welscher HD & Cruchaud A (1978) Conditions for maximal synthesis of cyclic AMP by mouse macrophages in response to beta adrenergic stimulation. *Eur.J.Immunol.* 8: 180-186.
- 115.- Lavis VR, Strada SJ, Ross CP, Hersh EM & Thompson WJ (1980) Comparison of the response of freshly isolated and cultured human monocytes and P388D1 cells to agents affecting cyclic AMP metabolism. *J.Lab.Clin.Med.* 96: 551-559.
- 116.- Betancourt SV, Solvay MJ, Irani DN, Thomas DW & Nairn R (1987) Heterogeneity in cellular antigen retention structures. *J.Immunol.* 139: 3725-3729.
- 117.- Sharon N (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunology Today* 5: 143-147.
- 118.- Hunter SW, Gaylord H & Brennan PJ (1986) Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J.Biol.Chem.* 261: 12345-12351.
- 119.- Ellner JJ & Daniel TM (1979) Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. *Clin.Exp.Immunol.* 35: 250-257.

- 120.- Alvarez JM, Silva A & De Landazuri MO (1979) Human T cell growth factor. I. Optimal conditions for its production. J. Immunol. 123: 977-983.
- 121.- Mizel SB & Mizel D (1981) Purification to apparent homogeneity of murine interleukin 1. J. Immunol. 126: 834-837.
- 122.- Cayphas S, Van Damme J, Vink A, Simpson RJ, Billiau A & Vansnick J (1987) Identification of an interleukin HP1-like plasmacytoma growth factor produced by L cells in response to viral infection. J. Immunol. 139: 2965-2969.
- 123.- Minskuchi R, Wacholtz MC, Davis LS & Lipsky PE (1990) Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE<sub>2</sub>. J. Immunol. 145: 2616-2625.
- 124.- Kitamura K, Kiyono H, Fujihashi K, Eldridge JH, Green DR & McGhee JR (1987) Contrasuppressor cells that break oral tolerance are antigen-specific T cells distinct from T helper (L3T4+), T suppressor (Lyt-2+), and B cells. J. Immunol. 139: 3251-3259.
- 125.- Gulwani B, Majo M, Imberti L, Melamede RJ & Ferrone S (1987) Immunosuppressive activity of T cell clones generated from Human T cells stimulated with autologous T cells. J. Immunol. 139: 2130-2136.
- 126.- Kalland T (1987) Physiology of natural killer cells. In vivo regulation of progenitors by interleukin 3. J. Immunol. 139: 3671-3675.
- 127.- Knudsen PJ, Dinarello CA & Strom TB (1987) Glucocorticoids inhibit transcriptional and posttranscriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. J. Immunol. 139: 4129-4134.
- 128.- Weaver CT & Unanue ER (1990) The costimulatory function of antigen-presenting cells. Immunology Today 11: 49-55.
- 129.- Batchelor JR, Lombardi G & Lechler RI (1989) Speculations on the specificity of suppression. Immunology Today 10: 37-40.
- 130.- Benacerraf B & Unanue ER (1984) Textbook of Immunology, 2th edition, Williams & Wilkins, Baltimore.
- 131.- Nakayama T, Kubo M, Gomi H, Asano Y & Tada T (1987) Major histocompatibility complex-restricted augmenting T cells induced by in vitro cultivation of antigen primed T cells. A new parallelism between suppressor and augmenting circuits. J. Immunol. 139: 3935-3941.

- 132.- O'Flynn K, Krensky AM, Beverley PCL, Burakoff SJ & Linch DC (1985) Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor. *Nature* 313: 686-689.
- 133.- Valentine MA, Tsoukas CD, Rhodes G, Vaughn JH & Carson DA (1985) Phytohemagglutinin binds to the 20-Kd molecule of the T3 complex. *Eur.J.Immunol.* 15: 851-857.
- 134.- Kanellopoulos JM, De Petris S, Leca G & Crumpton MJ (1985) The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *Eur.J. Immunol.* 15: 479-485.
- 135.- Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA & Klein J (1978) On the thymus in the differentiation of H-2 self recognition by T cells: evidence for dual recognition. *J.Exp.Med.* 147: 882-896.
- 136.- Fairchild RL, Kubo RT & Moorhead JW (1990) DNP-specific class I MHC-restricted suppressor molecules bear determinants of the T cell receptor alpha and beta chains. The V8+ chain dictates restriction to either K or D. *J.Immunol.* 145: 2001-2009.
- 137.- Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald KA, Hodgson JC, Protentis JP, Schlossman SF & Reinherz EL (1984) An alternative pathway of T cell activation: a functional role for the 50 Kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36: 897-903.
- 138.- Tentori L, Pardoll DM, Zuniga JC, Hu-Li J, Paul WE, Bluestone JA & Kruisbeek AM (1988) Proliferation and production of IL-2 and B cell stimulatory factor 1/IL-4 in early fetal thymocytes by activation through Thy-1 and CD3. *J.Immunol.* 140: 1089-1094.
- 139.- Mizel SB (1990) Cyclic AMP and interleukin 1 signal transduction. *Immunol. Today* 11: 390-391.
- 140.- Krutmann J, Kirnbauer R, Kock A, Schwarz T, Schopf E, May LT, Seghal PB & Luger TA (1990) Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation. *J.Immunol.* 145: 1337-1342.
- 141.- Hoffmann MK, Chun M & Hirst JA (1986) Conditional requirement for accessory cells in the response of T cells to Con A. *Lymphokine Res.* 5: 1-9.
- 142.- Alexander DR & Cantrell DA (1989) Kinases and phosphatases in T-cell activation. *Immunol. Today* 10: 200-205.

- 143.- Sims JE, March CJ, Cosman D, Wilder MB, Robson MacDonald H, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, Friend D, Alpert AR, Gillis S, Urdal DL & Dower SK (1988) cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241: 585-589.
- 144.- DiGiovine FS & Duff GW (1990) Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol. Today* 11: 14-20.
- 145.- Dinarello CA, Clark BD, Puren AJ, Savage N & Rosoff PM (1989) The interleukin 1 receptor. *Immunol. Today* 10: 49-51.
- 146.- Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Wolff SM & Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81: 7907-7911.
- 147.- Dinarello CA (1984) Interleukin 1. *Rev.Infect.Dis.* 6: 51-79.
- 148.- Durand DB, Bush MR, Morgan JG, Weiss A & Crabtree GR (1987) A 275 base pair fragment at the 5' end of the interleukin-2 gene enhances expression from a heterologous promoter in response to signals from the T cell antigen receptor. *J. Exp.Med.* 165: 395-407.
- 149.- Serfling E, Barthelmas R, Pfeuffer I, Schenk B, Zarius S, Swoboda R, Mercurio F & Karin M (1989) Ubiquitous and lymphocyte specific factors involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J.* 8: 465-473.
- 150.- Crabtree GR (1989) Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243: 355-361.
- 151.- Yamada A, Nikaido T, Nojima Y, Scholssman SF & Morimoto C (1991) Activation of human CD4 T lymphocytes. Interaction with VLA-5 receptor on CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J.Immunol.* 146: 53-56.
- 152.- Lee W, Mitchell P & Tjian R (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49: 741-752.
- 153.- Muegge J, Williams TM, Kant J, Karin M, Chiu R, Schmidt A, Siebenlist U, Young HA & Durum SK (1989) Interleukin 1 costimulatory activity on the interleukin 2 promoter via AP-1. *Science* 246: 249-251.

- 154.- Muñoz E, Beutner U, Zubiaga A & Huber BT (1990) IL-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells. *J.Immunol.* 144: 964-969.
- 155.- Muñoz E, Zubiaga AM, Sims JE & Huber BT (1991) IL-1 signal transduction pathways.I. Two functional IL-1 receptors are expressed in T cells. *J.Immunol.* 146: 136-143.
- 156.- Mosmann TR & Coffman RL (1987) Two types of murine T helper T cell clones. Implications for immune regulation. *Immunol. Today* 8: 223-227.
- 157.- Greenbaum LA, Horowitz JB, Woods A, Pasqualini T, Reich EP & Bottomly K (1988) Autocrine growth of CD4+ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J.Immunol.* 140: 1555-1561.
- 158.- Male D, Champion B, Cooke A & Owen M (1991) *Advanced Immunology*. 2th edition, J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
- 159.- Liao Z, Grimshaw RS & Rosenstreich DL (1984) Identification of a specific interleukin 1 inhibitor in the urine of febrile patients. *J.Exp.Med.* 159: 126-136.
- 160.- Balavoine JF, De Rochemonteix B, Williamson K, Seckinger P, Cruchaud A & Dayer JM (1986) Prostaglandin E2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitors. *J.Clin.Invest.* 78: 1120-1124.
- 161.- Prieur AM, Kaufmann MT, Griscelli C & Dayer JM (1987) Specific interleukin-1 inhibitor in serum and urine of children with systemic juvenile chronic arthritis. *Lancet* 2: 1240-1242.
- 162.- Seckinger P, Lowenthal JW, Williamson K, Dayer JM & Mac Donald HR (1987) A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *J.Immunol.* 139: 1546-1549.
- 163.- Seckinger P, Williamson K, Balavoine JF, Mach G, Mazzei G, Shaw A & Dayer JM (1987) A urine inhibitor of interleukin 1 activity affects both interleukin 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  but not tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J.Immunol.* 139: 1541-1545.
- 164.- Mazzei GJ, Seckinger PL, Dayer JM & Shaw AR (1990) Purification and characterization of a 26-kDa competitive inhibitor of interleukin-1. *Eur.J.Immunol.* 20: 683-688.



- 165.- Liao Z, Haimovitz A, Chen Y, Chan J & Rosenstreich DL (1985) Characterization of a human interleukin 1 inhibitor. *J.Immunol.* 134: 3882-3886.
- 166.- Korn JH, Brown KM, Downie E, Liao ZH & Rosenstreich DL (1987) Augmentation of IL-1 induced fibroblast PGE2 production by a urine-derived IL-1 inhibitor. *J.Immunol.* 138: 3290-3294.
- 167.- Brown KM & Rosenstreich DL (1987) Mechanism of action of a human interleukin 1 inhibitor. *Cell.Immunol.* 105: 45-53.
- 168.- Rosenstreich DL, Tu JH, Kinkade PR, Maurer-Fogy I, Kahn J, Barton RW & Farina PR (1988) A human urine-derived interleukin-1 inhibitor. Homology with deoxyribonuclease I. *J. Exp.Med.* 168: 1767-1779.
- 169.- Berman MA, Sandborg CI, Calabria BS, Andrews BS & Friou GJ (1986) Studies on an interleukin 1 inhibitor: characterization and clinical significance. *Clin.Exp.Immunol.* 64: 136-145.
- 170.- Sandborg CI, Berman MA, Andrews BS, Mirick GR & Friou GJ (1986) Increased production of an interleukin 1 (IL-1) inhibitor with fibroblast stimulating activity by mononuclear cells from patients with scleroderma. *Clin.Exp.Immunol.* 66: 312-319.
- 171.- Locksley RM, Crowe S, Sadick MD, Heinzl FP, Gardner KD, McGrath MS & Mills J (1988) Release of interleukin 1 inhibitory activity (contra-IL-1) by human monocyte-derived macrophages infected with human immunodeficiency virus in vitro and in vivo. *J.Clin.Invest.* 82: 2097-2105.
- 172.- Brown KM, Muchmore AV & Rosenstreich DL (1986) Uromodulin, an immunosuppressive protein derived from pregnancy urine, is an inhibitor of interleukin 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 8191-8195.
- 173.- Hession C, Decker JM, Sherblom AP, Kumar S, Yue CC, Mattaliano RJ, Tizard R, Kawashima E, Schmeissner U, Heletky S, Chow EP, Burne CA, Shaw A. & Muchmore AV (1987) Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines. *Science* 237: 1479-1484.
- 174.- Barak V, Treves AJ, Yanai P, Halperin M, Wasserman D, Biran S & Braun S (1986) Interleukin 1 inhibitory activity secreted by a human myelomonocytic cell line (m20). *Eur.J. Immunol.* 16: 1449-1452.

- 175.- Kemp A, Mellow L & Sabbadini E (1986) Inhibition of interleukin 1 activity by a factor in submandibular glands of rats. *J.Immunol.* 137: 2245-2251.
- 176.- Walsh LJ, Lander PE, Seymour GJ & Powell RN (1987) Isolation and purification of ILS, an interleukin 1 inhibitor produced by human gingival epithelial cells. *Clin.Exp. Immunol.* 68: 366-374.
- 177.- Schwarz T, Urbanska A, Gschnait F & Luger TA (1987) UV-irradiated epidermal cells produce a specific inhibitor of interleukin-1 activity. *J.Immunol.* 138: 1457-1463.
- 178.- Tiku K, Tiku ML, Liu S & Skosey JL (1986) Normal human neutrophils are a source of a specific interleukin-1 inhibitor. *J.Immunol.* 136: 3686-3692.
- 179.- Roberts NJ, Prill AH & Mann TN (1986) Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus. Respiratory syncytial virus is a potent inducer of inhibitory activity. *J. Exp. Med.* 163: 511-519.
- 180.- Scala G, Kuang YD, Hall RE, Muchmore AV & Oppenheim JJ (1984) Accessory cell function of human B cells. I. Production of both interleukin 1-like activity and an interleukin 1 inhibitory factor by an EBV-transformed human B cell line. *J.Exp.Med.* 159: 1637-1652.
- 181.- Rodgers BC, Scott DM, Mundin J & Sissons JGP (1985) Monocyte-derived inhibitor of interleukin 1 induced by human cytomegalovirus. *J.Virol.* 55: 527-532.
- 182.- Pierart ME, Najdovski T, Appelboom TE & Deschodt-Lanckman MM (1988) Effect of human endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") on IL-1-induced thymocyte proliferation activity. *J.Immunol.* 140: 3808-3811.
- 183.- Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J & Rook GAW (1988) Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect.Immun.* 56: 3046-3051.
- 184.- Barnes PF, Mehra V, Hirschfield GR, Fong SJ, Abou-Zeid C, Rook GAW, Hunter SW, Brennan PJ & Modlin RL (1989) Characterization of T cell antigens associated with the cell wall protein-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immunol.* 143: 2656-2662.