

109
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION DE LA NATURALEZA Y ESPECIFICIDAD
DEL FACTOR INHIBITORIO PRESENTE EN EL SUERO INMUNE
DE PACIENTES TUBERCULOSOS ANERGICOS QUE ACTUA
SOBRE CELULAS NO ADHERENTES REACTIVAS A PPD"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
LUZ GISELA MARTINEZ GARCIA



MEXICO, D. F.

1993

**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 GENERAL

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Planteamiento del problema.....	8
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	9
Materiales y Métodos.....	10
-Individuos.....	10
-Antígenos.....	10
-Intradermorreacciones.....	10
-Determinación de inmunoglobulinas específicas.....	10
-Adsorción del suero anérgico con Sepharose-proteína A....	11
-Adsorción del suero anérgico con Sepharose-PPD.....	12
-Obtención de células.....	12
-Separación de poblaciones adherentes y no adherentes.....	16
-Determinación de anticuerpos sobre la superficie celular por la técnica de inmunofluorescencia.....	16
Resultados.....	17
-Determinación de anticuerpos sobre la superficie celular.....	18
Discusión.....	26
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30

INDICE DE TABLA Y FIGURAS

Tabla 1- Presencia de inmunoglobulinas sobre la superficie de las células no adherentes determinada por inmunofluorescencia.....	19
Figura 1- Perfil cromatográfico de la calibración de la columna Sepharose-PPD.....	13
Figura 2- Perfil cromatográfico del suero de sujeto sano normal PPD ⁻ tratado en columna Sepharose-PPD.....	14
Figure 3- Perfil cromatográfico del suero de paciente anérgico TBP PPD ⁻ tratado en columna Sepharose-PPD.....	15
Figura 4- Microscopia de fluorescencia de células no adherentes de pacientes TBP PPD ⁺ tratadas con suero anérgico o normal.....	20
Figura 5- Índice de fluorescencia de células no adherentes tratadas con suero de pacientes tuberculosos anérgicos y reveladas con conjugado fluoresceinado anti-IgG.....	21
Figura 6- Índice de fluorescencia de células no adherentes tratadas con fracción no retenida de los sueros sometidos a cromatografía de afinidad en Sepharose-PPD y reveladas con conjugado fluoresceinado anti-IgG.....	22
Figura 7- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las IgG purificadas.....	24
Figura 8- Inmunolectroforesis de las IgG purificadas.....	25

RESUMEN

La caracterización de la naturaleza y especificidad de un factor inhibitorio del suero de pacientes tuberculosos anérgicos y la identificación de la población de las células reactivas al PPD que son el blanco para el factor, constituyen los objetivos del presente trabajo.

Por inmunofluorescencia se determinó que una fracción enriquecida de IgG con actividad anti-PPD, obtenida de suero de pacientes tuberculosos anérgicos por cromatografía en Sepharose-proteína A, interfiere en la respuesta inducida por el antígeno PPD, de células no adherentes de pacientes tuberculosos reactivos, posiblemente adheriéndose a su superficie e inhibiendo su estimulación.

Por cromatografía de afinidad en Sepharose-PPD, a partir de suero anérgico, se separaron fracciones retenida y no retenida en la columna. Se probaron sus actividades inmunes por ELISA utilizando PPD como antígeno. Las fracciones retenidas dieron lecturas altas de absorbancia, indicando su reconocimiento al antígeno PPD, mientras que las lecturas de las fracciones no retenidas se aproximaron a cero. Las fracciones no retenidas desprovistas del factor, así como los sueros anérgicos enriquecidos de éste, además de suero de sujetos sanos PPD⁻, fueron utilizados para incubación con células no adherentes de pacientes reactivos o células de testigos sanos. Después de la incubación, la presencia de factores inmunoglobulínicos sobre las superficies celulares fue determinada por inmunofluorescencia. Los resultados se expresaron en índices de fluorescencia, siendo éstos positivos sólo en las células tratadas con suero total de paciente anérgico y reveladas con el conjugado fluoresceinado anti-IgG humano. Cuando se utilizó la fracción desprovista del factor, por cromatografía en Sepharose-PPD, todos los índices fueron negativos. Los resultados sugieren la naturaleza inmunoglobulínica del factor el cual es una IgG, su especificidad hacia PPD, y su ubicación sobre superficie celular.

INTRODUCCION

La mayoría de las enfermedades infecciosas, causadas por hongos, bacterias y parásitos intra o extracelulares son resueltas satisfactoriamente gracias al desarrollo de la resistencia del hospedero. Al contacto con agentes agresores que con frecuencia son extraños al hospedero, se arman mecanismos inespecíficos y específicos de resistencia; los primeros, actúan como primera línea de defensa y generalmente controlan un gran número de infecciones por patógenos antes de que puedan causar enfermedad; el segundo mecanismo comprende un proceso multifactorial donde concurren diferentes células y moléculas biológicamente activas, con una función muy definida y un carácter de reconocimiento fino (1).

Una vez que el agente ha conseguido romper las barreras naturales de primer nivel, encuentra mecanismos de defensa más elaborados como es la fagocitosis, llevada a cabo por células especializadas con capacidad de ingerir y digerir el agente fagocitado, destacándose entre estas células los fagocitos polimorfonucleares (PMN) y los fagocitos mononucleares (macrófagos). Esta etapa de la infección es crítica, puesto que si no se resuelve rápidamente y si el agresor logra pasar las barreras inespecíficas, entran en acción los elementos organizados propios del mecanismo de resistencia específico, para establecer la expresión de la respuesta inmune. Esta respuesta opera de una forma compleja donde intervienen procesos que contribuyen a preservar la individualidad, la homeostásis del cuerpo, así como iniciar una defensa dirigida a la eliminación del agente agresor. Además, tiene varias características como ser *inducida* por el agente extraño; ser *específica* contra el mismo; tener *memoria* reconociendo al mismo agente en otro encuentro; y ser *transferible* transportando a otro hospedero efectores inmunológicos capaces de reconocer al agente infeccioso (1, 2).

La respuesta inmune se expresa bajo dos formas de acción: la respuesta inmune *humoral* mediada por anticuerpos y la respuesta inmune *celular* mediada por células (1-3). La magnitud de esta respuesta depende de los factores intrínsecos del hospedero y de la inmunogenecidad de los componentes (antígenos) que conforman al agente infeccioso. Cuando éste penetra por primera vez, las clonas celulares específicas contra los diferentes determinantes antigénicos o epítopes que forman parte de la estructura global del agente infeccioso, presentan un número reducido de células capaces de ser estimuladas, respuesta primaria; mientras que en un segundo encuentro, se establece una respuesta secundaria que se caracteriza por el aumento de las clonas específicas que resultan en la elevación rápida y sostenida de la respuesta celular y humoral (4).

La respuesta inmune, se inicia con la participación de las células accesorias presentadoras del antígeno (CPA) que procesan el antígeno en pequeños fragmentos y lo asocian en sus superficies a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) para promover el reconocimiento por receptores de células T, dando origen a la primera fase (aferente) de la respuesta de defensa específica, donde concurren diferentes tipos de interacción y comunicación celular, que conllevan a una óptima expresión tanto de la respuesta celular como de la humoral. Ambas respuestas producen como evento final la eliminación del agente agresor y nuevamente en ésta etapa actúan los macrófagos (fase eferente), como células eliminadoras del parásito.

Sin embargo, y aún contando con todo este gran complejo inmunológico, los agentes infecciosos persisten en el hospedero y con el desarrollo de la enfermedad llegan a causar daño. La persistencia de ellos, se debe a factores importantes tanto del hospedero como del parásito, de los cuales se destacan:

En el hospedero:

- 1.- Factores genéticos que aumentan el riesgo de contraer la enfermedad;
- 2.- Factores posiblemente hormonales que se expresan según el sexo y edad, que pueden predisponer al hospedero a desencadenar una respuesta inmune inadecuada;
- 3.- Factores de "stress" que alteran el comportamiento y resistencia del hospedero;
- 4.- Factores sociales de tipo ocupacional o socio-económico que propician una mayor exposición del hospedero al agente infeccioso, o bien, que alteren el equilibrio inmunológico del hospedero.

En el agresor:

- 1.- Factores que condicionan la virulencia del parásito;
- 2.- Presencia de cantidades críticas del parásito en contacto con el hospedero;
- 3.- Ubicación ambiental del agente infeccioso en la naturaleza que propicia el encuentro con el hospedero;
- 4.- Presencia de mecanismos de escape a las diversas formas de defensa del hospedero;
- 5.- Factores propios del parásito que alteren la respuesta inmune del hospedero, como por ejemplo, moléculas con actividad inmunosupresora o inmunopotenciadora.

Tanto los factores del hospedero como los del agente infeccioso, están relacionados complejamente en la regulación de la respuesta inmune.

En las enfermedades producidas por parásitos intracelulares la respuesta inmune celular tiene gran importancia. Esta respuesta se inicia por la entrada del parásito al hospedero sea cual sea la vía. Las CPA lo captan, lo procesan y lo presentan a los linfocitos T, promoviendo la activación de éstos con cambios metabólicos que resultan en la secreción de varias citocinas e interleucinas (IL) (1-5).

Existen dos tipos de linfocitos T inductor-cooperador ($CD4^+$). Uno (Th_1) produce o secreta IL-2, IL-6, interferón gamma y factor de necrosis tumoral beta (TNFB), que estimulan a otras células para su proliferación y diferenciación. El otro (Th_2), produce IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 que también estimulan a la diferenciación y proliferación de otras células (1-5).

La IL-2 actúa en la proliferación y diferenciación de linfocitos $CD8^+$ (supresores-citotóxicos), células NK y la activación de células B para secretar inmunoglobulinas.

El factor TNFB y el interferón gamma activan a los macrófagos incrementando su capacidad citocida (5).

Al dispararse la activación del macrófago aumenta su capacidad fagocítica y se potencializan los mecanismos microbicidas que tratan de eliminar al microorganismo invasor. Estos mecanismos pueden ser dependientes e independientes del oxígeno, como el estallido respiratorio que genera radicales tóxicos de oxígeno; como la actividad hidrolítica de algunas enzimas o como la producción de valores bajos de pH intrafagosomal, los cuales contribuyen también a la destrucción del patógeno. Estos mecanismos microbicidas se llevan a cabo en el seno del compartimento intracelular que encierra al microorganismo, o sea, el fagolisosoma, formado a partir de la unión entre lisosomas primarios que contienen enzimas proteolíticas y el fagosoma que contiene al microorganismo (6).

Mediante varias estrategias, la respuesta inmune puede ser evadida por los parásitos, en particular, los intracelulares disponen de medios que les permiten escapar de su destrucción en diferentes etapas del proceso fagocítico, ya sea impidiendo su reconocimiento y adherencia; inhibiendo la fusión fagosoma-lisosoma; creando resistencia a la acción de enzimas hidrolíticas; o a la acción de los metabolitos reactivos de oxígeno; o bien alterando en otros puntos a la respuesta inmune (6).

Frente a estrategias del parásito, la respuesta inmune tiene que ser más eficaz para contrarrestar los mecanismos de agresión de éste. Sin embargo, el fortalecimiento de la respuesta inmune, no debe sobrepasar de límites críticos porque puede conducir a errores de interpretación del hospedero, que llevan a daños en el tejido, provocado por la mala expresión de su propia respuesta inmune. Así en la etiopatogenia de un gran número de infecciones

intracelulares el daño en el hospedero se debe a errores de su respuesta de defensa en afán de combatir al agente agresor (7, 8).

La respuesta inmune esta sujeta a diferentes mecanismos de regulación. Entre ellos se cuentan los equilibrios homeostáticos mediados por el sistema endócrino, el nervioso, etc; además de los mecanismos regulatorios propios de la respuesta inmune, como los mediados por células supresoras con varios circuitos de supresión, los humorales, como los anticuerpos que pueden autoregularse o regular la respuesta celular a diferentes antígenos.

En la actualidad es necesario conocer los efectos regulatorios de los anticuerpos en la respuesta celular generada en los procesos de etiología bacteriana o fúngica. Algunos autores han planteado que los anticuerpos desempeñan una acción moduladora en las infecciones causadas por organismos intracelulares (9-11).

Una de las principales infecciones intracelulares donde suceden los eventos señalados anteriormente es la tuberculosis. El agente etiológico de la tuberculosis humana es el actinomiceto Mycobacterium tuberculosis, el cual tiene la característica de ser un parásito intracelular facultativo y usar como célula hospedera al macrófago del individuo infectado. El primer contacto entre el hospedero y el parásito se lleva a cabo en los alveolos pulmonares. Se considera que los macrófagos proveen un arsenal de ataque contra estas bacterias, y de cierto modo se plantea que la virulencia de este bacilo esta relacionada con su capacidad de multiplicación y sobrevivencia dentro del fagocito (7, 8).

La respuesta inmune a la tuberculosis puede ser determinada por un tipo de hipersensibilidad en piel (hipersensibilidad tardía), prueba que se realiza por la aplicación subcutánea del antígeno microbiano. Inicialmente, se utilizaba bacilos viejos y muertos o el filtrado de cultivo del microorganismo (tuberculina), hoy en día se aplica un derivado proteico purificado obtenido del cultivo del bacilo y conocido con las siglas PPD (purified protein derivative).

En 1945 Chase (12) encontró, que la capacidad de respuesta cutánea a antígeno de Mycobacterium era transferible por células linfoides obtenidas de donadores con hipersensibilidad a la tuberculina. La naturaleza celular de la respuesta inmune antituberculosa fue confirmada por Suter (13) y Mackaness (14), quienes han demostrado que los linfocitos resultantes de una interacción con el microorganismo infectante, son capaces de inducir la activación de los macrófagos, los cuales ejercen una acción más eficiente en la eliminación del parásito.

En la actualidad, para el establecimiento de la inmunidad antituberculosa, la participación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con restricción de clase II y clase I, respectivamente, parece ser una regla (15-20), mientras que la función de la respuesta inmune humoral está relegada a segundo término.

La capacidad de respuesta inmunológica en la tuberculosis, refleja con frecuencia el estado clínico del paciente. Los individuos con tuberculosis que presentan, baja reactividad celular y altos títulos de anticuerpos, tienen mal pronóstico, y aquellos con alta reactividad celular y bajos títulos de anticuerpos presentan buen pronóstico (21-23).

Con base en el espectro clínico e inmunológico, en algunas enfermedades infecciosas, se han elaborado clasificaciones que enmarcan sus posibles estadios (21, 24). Lenzini y Rottoli (21) en el caso de la tuberculosis, lograron establecer una importante relación entre el estado clínico del paciente y la respuesta inmune celular y humoral, clasificando a los pacientes tuberculosos en cuatro grupos: reactivo, reactivo intermedio, no reactivo intermedio y no reactivo. Estos autores plantean que en la tuberculosis humana existen dos formas polares: tuberculosis reactiva y tuberculosis no reactiva. Las formas reactivas manifiestan una evidente capacidad de respuesta mediada por células, con poca o nula producción de anticuerpos; las formas no reactivas se caracterizan por presentar una pobre o ausente respuesta inmune celular y una elevada producción de anticuerpos.

La ausencia de la respuesta celular, en la tuberculosis se ha referido como anergia (21-23). Varios investigadores han descrito la falta de respuesta al antígeno PPD en pruebas cutáneas y en pruebas de transformación linfocítica (21-23, 25, 26).

El fenómeno de anergia ha sido enmarcado en la tuberculosis y en otras enfermedades intracelulares, puesto que no corresponde a lo que se conoce etimológicamente como estado anérgico (ausencia total de respuesta), y en la tuberculosis se explica como la incapacidad de los linfocitos T para responder al antígeno específico (22).

Varios mecanismos son sugeridos para explicar este fenómeno (22, 27-30): a) la reacción inflamatoria puede abatirse debido a un defecto en la producción de linfocinas (27, 28); b) los niveles elevados de anticuerpos específicos pueden bloquear a la inmunidad mediada por células (21, 22); c) los linfocitos circulantes reactivos al PPD pueden ser atrapados en nódulos linfáticos de algunos pacientes tuberculosos anérgicos (29); d) algunos pacientes tuberculosos anérgicos presentan en su circulación, una población de monocitos que puede suprimir la actividad in vitro de linfocitos reactivos al PPD (25, 30). Cuando menos,

uno de estos mecanismos puede estar involucrado en la regulación de la anergia al PPD en pacientes con tuberculosis pulmonar.

En vista de la recuperación del estado anérgico, esto es, la capacidad de volver a manifestar la reacción de hipersensibilidad tardía, en sujetos que responden al tratamiento, es posible que el mecanismo de anergia sea más bien el resultado de la enfermedad que la causa de la misma.

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

Heilman y McFarland (31) demostraron que componentes séricos provenientes de pacientes tuberculosos, inhiben la transformación linfocítica (TL) de células de individuos sanos PPD⁺ estimuladas con el antígeno específico. Proponen que estos componentes son los anticuerpos, sin embargo, no aclaran el papel de éstos, ya que el efecto inhibitorio se obtuvo con la presencia permanente del suero tuberculoso en el cultivo celular. Este hecho permite plantear que la inhibición se puede deber a factores inespecíficos presentes en el suero, o bien, que el anticuerpo neutraliza al antígeno antes de que éste llegue a sus respectivos receptores celulares, paso indispensable para llevar a cabo el reconocimiento del antígeno por las células linfoides reactivas y su subsecuente transformación linfocítica.

En el modelo murino, Colizzi y cols. (32) observaron que las células linfoides de ratones inmunizados con BCG, no transferían la respuesta de hipersensibilidad tardía al PPD a ratones normales, cuando ellas eran tratadas antes de la transferencia, con posibles auto-anticuerpos con actividad anti-receptor para el antígeno.

La presencia de factores que producen la inhibición de la estimulación linfocítica, en suero de pacientes con otros padecimientos, ha sido descrito por varios autores (9, 10, 33-36). Kerr y cols. (9) y Hussein y cols. (10), encontraron que el suero de pacientes con lepra lepromatosa es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos de sangre periférica de sujetos normales, cuando éstos son estimulados por el mitógeno fitohemaglutinina (PHA), siendo este efecto eliminado al tratar el suero con proteína A de Staphylococcus aureus, lo que sugiere que el factor inhibitorio es una Igg. Además, el factor pudo ser absorbido por linfocitos T activados, actuando al parecer en un evento

temprano, que precede a la liberación de interleucina-2 (IL-2).

En el modelo de coccidioidomicosis, Cox y Pope (36) mostraron que es una IgG sérica y no los complejos inmunes, el factor responsable de la inhibición de la transformación linfocítica inducida por el antígeno específico.

Recientemente, Mejia-López y cols. (37), lograron reproducir *in vitro* la anergia celular característica de la tuberculosis pulmonar no reactiva, mediante la incubación de células de pacientes tuberculosos PPD⁺ con suero inmune de pacientes tuberculosos anérgicos. Además, la recuperación de la reactividad antígeno-específica de células de pacientes anérgicos, se obtuvo por incubación con altas concentraciones de PPD, seguida de lavados sucesivos y estimulación final con dosis óptimas del mismo antígeno. Tanto el efecto de inhibición con suero como el de recuperación de la reactividad de células anérgicas al antígeno, parecen ser específicos puesto que no se obtienen con suero normal ni se afectan por la respuesta a la PHA. Por otro lado, el cocultivo de células adherentes y no adherentes de pacientes tuberculosos reactivos, tratadas independientemente con suero de pacientes tuberculosos anérgicos, demostró que el factor inhibitorio del suero anérgico ejerce su efecto sobre la población de células no adherentes (38, 39).

Aunque no se descarta la posibilidad de que los complejos inmunes ejerzan efecto inhibitorio sobre la respuesta celular, al considerar los antecedentes citados existen datos que apoyan el papel de los anticuerpos como posibles moléculas reguladoras en la tuberculosis, actuando éstos independiente del estado de complejo con el antígeno micobacteriano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente estudio, se diseñó para analizar los posibles mecanismos por el cual el factor inhibitorio del suero inmune ejerce su efecto en la respuesta celular al proceso tuberculoso. Asimismo, para tratar de identificar la población de células linfoides que está relacionada con el factor, la naturaleza química de éste y sus características de reactividad inmunológica.

HIPOTESIS

El componente inhibitorio del suero inmune de pacientes tuberculosos anérgicos es una inmunoglobulina que tiene actividad específica anti-PPD y actúa sobre una subpoblación celular, interfiriendo con la Respuesta Inmune Celular de pacientes reactivos al PPD.

OBJETIVOS

1.- Caracterizar la especificidad del componente inhibitorio del suero inmune de pacientes anérgicos, obtenido mediante la cromatografía de afinidad en Sepharose-PPD.

2.- Identificar la unión del factor inhibitorio, por medio de inmunofluorescencia, con la población celular reactiva que es el blanco del factor.

3.- Buscar evidencias que apoyen que los anticuerpos específicos son moléculas reguladoras en la respuesta inmune celular del proceso tuberculoso.

4.- Contribuir a un mejor conocimiento del fenómeno anérgico en la tuberculosis.

MATERIALES Y METODOS

INDIVIDUOS: Se trabajaron muestras sanguíneas de 7 pacientes tuberculosos reactivos y 3 no reactivos o anérgicos, provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México. La secuencia de los procedimientos diagnósticos siguió el camino ordinario: historia clínica, examen físico, radiológico y de laboratorio, incluyendo baciloscopia. Cada paciente fue clasificado como reactivo (TBP PPD^f) o anérgico (TBP PPD⁻), con base en la presencia o ausencia de respuesta intradérmica al PPD. Adultos sanos PPD⁺ o PPD⁻ de ambos sexos fungieron como testigos. Se obtuvo consentimiento de todos los individuos involucrados en este estudio, así como del Comité Etico y Científico del INER.

ANTIGENOS: Para la intradermorreacción se empleó el derivado proteico purificado (PPD), donado por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos, México. Se aplicaron 2 unidades de tuberculina (UT) y/o 4UT de PPD/0.1 ml a los pacientes, con intervalos de 10 días. Para otros ensayos, el PPD fue ajustado a 1 000 µg de proteína/ml, determinada por el método de Lowry y cols. (40). A partir de esta concentración, se obtuvieron las dosis de antígeno empleadas en los ensayos in vitro.

INTRADERMORREACCIONES: Todos los individuos estudiados fueron sometidos a la prueba intradérmica con el antígeno específico (PPD). El resultado de la prueba se leyó a las 24, 48 y 72 h después de su aplicación y se consideró reacción positiva cuando la zona de induración eritematosa fue mayor de 8 mm.

DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS: Se siguió el método de ELISA indirecta, según Voller y cols. (41). Se utilizaron placas (Nunc, Roskilde, Denmark), de fondo plano, conteniendo por pozo, 100 µg de PPD/100 µl de amortiguador de recubrimiento de carbonato-bicarbonato pH 9.6. Se incubó el antígeno PPD a 4°C durante toda la noche. Se hicieron lavados sucesivos con amortiguador salino de fosfatos (ASF)-Tween 20 pH 7.4. Se bloquearon los sitios libres de antígeno con ASF-Tween albúmina al 0.5%. Se incubó y lavó con ASF-Tween. Se adicionó, a cada pozo, 100 µl de cada dilución del suero o fracción problema preparada en ASF/Tween 20 pH 7.4, a partir de una dilución inicial de 1:20. Se incubó por 1 h a 37°C. Se lavó varias veces con ASF-Tween y para revelar la prueba, se utilizó, por cada pozo, 100 µl del conjugado polivalente anti-gammaglobulina humana acoplada a peroxidasa (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) a una dilución 1:1000 en ASF. Después de incubar a 37°C 1 h y de lavados

subsecuentes, se añadió 100 µl de la solución de sustrato orto-fenilenediamina (Sigma) preparado a una concentración de 4 mg/10 ml de amortiguador del sustrato pH 5.0 y adicionado de 4 µl de H₂O₂ al 30% (Sigma). Las placas se leyeron a 492 nm en un lector de micro-ELISA (Dynatech Laboratories Inc. modelo MR-300 Alejandria, VA), expresando los resultados en densidad óptica (D.O.) y relacionando con los títulos de los sueros dados por sus respectivas diluciones. Se corrigieron las lecturas con los valores promedio de los sueros procedentes de sujetos sanos PPD⁻.

ADSORCION DEL SUERO ANERGICO CON SEPHAROSE-PROTEINA A: A una columna de Sepharose-proteína A CL-4B (Sigma), equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 8.0, se aplicaron 2.5 ml del suero de paciente anérgico o de testigo sano, adicionado de 2 ml del mismo amortiguador, según el método de Ey y cols. (42). El material retenido por la columna fue eluido con amortiguador de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.6. Se ajustó el pH a 7.0 con TRIS-base 0.2 M, pH 9.0, y se almacenó a -20°C, previa concentración por Amicon (Amicon Colerington, MASS) con una membrana PM 10 (Amicon). Antes de su utilización se determinó la actividad anti-PPD tanto a la fracción enriquecida de IgG recuperada en el material retenido a la columna y eluida con TRIS-HCl, como en la fracción no retenida, empleando el método de ELISA indirecta (41). Las IgG obtenidas fueron caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (43) e inmunolectroforesis (IEF) (44). El método de PAGE-SDS se realizó en un aparato Phast-System (Pharmacia LKB Biotechnology S-751 82 Uppsala, Sweden) empleando geles de poliacrilamida (phast-geles) con un gradiente de densidad lineal de 8-25%, tiras de amortiguador-SDS y reactivos complementarios de Pharmacia LKB. Las muestras se utilizaron a una concentración de 1-3 mg de proteínas y se prepararon en amortiguador conteniendo 0.01% de azul de bromofenol, 2.5% de SDS y 5% de 2-mercaptoetanol. El aparato fue programado a 250 V durante 30 min. Se utilizó como referencia una IgG humana purificada, gentilmente proporcionada por el Departamento de Biología Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Se utilizaron marcadores de pesos moleculares en el rango de 66 a 14.2 kDa (Sigma). Los geles fueron teñidos con 0.1% de azul de Coomassie 250R. En la IEF se utilizaron placas de agarosa al 1% en amortiguador de barbital pH 8.4. La electroforesis de una muestra de IgG y de suero total como testigo se realizó en una cámara de electroforesis a 3-5 V por placa, durante 3 h. En seguida, se procedió a la difusión, a 4°C por 24 h, de una anti-gammaglobulina polivalente humana como revelador. Las placas fueron teñidas con azul de Coomassie, y el exceso de colorante fue removido con ácido acético al 7%.

ADSORCION DEL SUERO ANERGICO CON SEPHAROSE-PPD: Sueros de pacientes tuberculosos anérgicos así como de testigos normales fueron aplicados a una columna de Sepharose activada (Sigma) unida a PPD, preparada por gentileza del Dr. Edgar Zenteno del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, y según el procedimiento descrito por Colizzi y cols. (32): Se equilibró la columna con ASF 0.1 M, pH 8.2. Se aplicó a la columna 2.5 ml del suero total de paciente anérgico o de testigo normal. Se incubó 30 min a 4°C. Después de pasar el suero por la columna 3 veces, se colectó las fracciones no retenidas (FNR) mediante un cromatógrafo Gilson Modelo 11B FC 203 (Gilson International Medical Electronics Inc., Middleton, WO). Se guardó cada fracción en congelación a -20°C, previa concentración de proteínas. Se lavó la columna con el mismo amortiguador hasta obtener una D.O. de cero. Se colectó la fracción retenida (FR) por la columna, eluyéndola con amortiguador de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.6. Se ajustaron los pH a 7.0 a cada una de las fracciones, con TRIS-base 0.1 M, pH 9.0, y se guardaron éstas en congelación a -20°C previa concentración por Amicon (Amicon Colerington, MASS) utilizando una membrana PM 10. Antes de su utilización, se determinó a las fracciones, la concentración de proteínas y la actividad inmunoespecífica utilizando el método de ELISA indirecta (41). Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los sueros adsorbidos a la columna: 1) la calibración de la columna obtenida por las lecturas a 280 nm con solución de ASF pH 8.2 (Fig. 1) muestra que los valores de D.O. no presentan picos, encontrándose las lecturas en el rango de 0.13-0.11; 2) el perfil del suero de sujeto sano PPD⁻, el cual se obtuvo por las lecturas a 280 nm e incluye la fracción no retenida (FNRN) que no ha sido adsorbida y que muestra una caída rápida hasta una D.O. de 0.203, valor aproximado al de la solución calibradora (ASF), y la fracción retenida de sujeto normal (FRN) la cual alcanza una D.O. de 1.963 siendo también rápidamente eluida hasta 0.520 de D.O. (Fig. 2); 3) el perfil del suero total de paciente anérgico TBP PPD⁻ que bajo las mismas condiciones, muestra las fracciones no retenida anérgica (FNRA) que de modo similar a las anteriores presentan una caída rápida de D.O., mientras que la fracción retenida anérgica (FRA) es eluida paulatinamente de la columna, con una D.O. inicial de 0.530 a una D.O. de 0.131, indicando esta caída lenta y la amplitud del pico de adsorción una mejor retención a la columna (Fig. 3).

OBTENCION DE CELULAS: Se realizó a partir de 15 a 20 ml de sangre periférica tanto de pacientes como de testigos, cosechada estérilmente en tubos Vacutainer heparinizados (Becton Dickinson, México). Se mezcló la sangre con el anticoagulante y se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml estéril con tapón (Nunc), que contenía el mismo volumen de gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma) y se

CURVA DE CALIBRACION

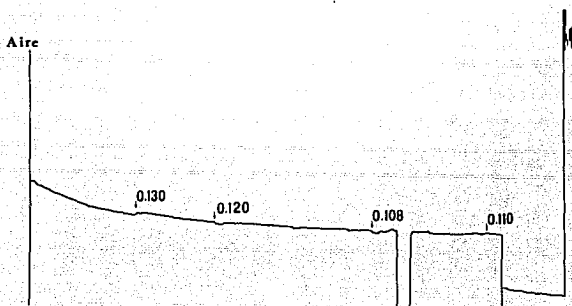


Fig. 1. Perfil cromatográfico de la calibración de la columna Sepharose-PPD. Se utilizó ASF como solución amortiguadora, pH 8.2. Las lecturas se leyeron a 280 nm.

SUERO SUJETO SANO

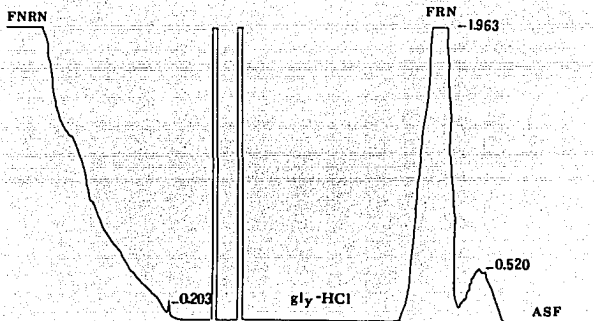


Fig. 2. Perfil cromatográfico del suero de sujeto sano normal PPD⁻ tratado en columna Sepharose-PPD. La calibración y elución del material retenido en la columna se realizaron con ASF pH 8.2 y glicina-HCl pH 2.6, respectivamente. Las lecturas se realizaron a 280 nm. 1) Fracción No Retenida Normal (FNRN); 2) Fracción Retenida Normal (FRN).

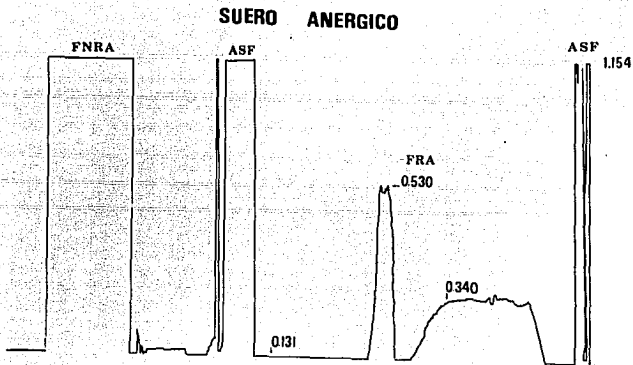


Fig. 3. Perfil cromatográfico del suero de paciente anérgico (TBP PPD⁻) tratado en la columna Sepharose-PPD. La calibración y elución se realizaron según la figura anterior. 1) Fracción No Retenida Anérgica (FNRA); 2) Fracción Retenida Anérgica (FRA).

centrifugó por 45 min a 400 g. Se separó el paquete de células blancas, a las cuales, después de lavar 3 veces con RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY), se les determinó la viabilidad usando el método de exclusión con azul de tripano. Finalmente, las células se ajustaron a 1×10^6 /ml, manteniéndolas en RPMI-1640 con 20 mM de amortiguador HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico) (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina y piruvato (Gibco) y 50 μ g/ml de gentamicina (Scheramex, México). Las células obtenidas fueron separadas en poblaciones adherentes y no adherentes y sometidas a diferentes tratamientos.

SEPARACION DE POBLACIONES ADHERENTES Y NO ADHERENTES: Se procedió a la separación de las células en poblaciones adherentes y no adherentes, mediante la incubación en botellas de cultivo (Nunc), durante 24 h de 40×10^6 células/10 ml de RPMI suplementado. Se separó el sobrenadante enriquecido de células no adherentes y las que permanecieron adheridas se lavaron y se despegaron de las botellas con tripsina (Gibco) a una concentración de 0.25% P/V en amortiguador salino de fosfatos pH 8.0, incubando 3-5 min a 37°C. Ambas poblaciones fueron lavadas por separado, varias veces, con RPMI suplementado. Se determinó la viabilidad por exclusión con azul de tripano. Se utilizó la prueba de esterasa inespecífica (45) empleando el estuche comercial nº 91 para esterazas (Sigma). Se cuantificó el número de células esterasa positivas por cada 100 y se determinó el total de monocitos en cada población. La población de células adherentes de la mayoría de los individuos estudiados presentó un promedio de 83% de células esterasa positivas, mientras que en las no adherentes, el índice promedio fue de 24%.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR POR LA TECNICA DE INMUNOFUORESCENCIA: Se procesaron para la inmunofluorescencia (46) dos ensayos distintos. 1: Se utilizaron poblaciones enriquecidas de células no adherentes previamente incubadas con suero anérgico o con suero normal, o bien, con IgG purificadas por Sepharose-proteína A. Se tomaron muestras de 20 μ l conteniendo 2×10^4 células y se colocaron en laminillas excavadas. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con acetona al 100% durante 3 min. A cada muestra se agregó, por separado, 20 μ l del conjugado anti-IgG o anti-IgM humana acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma), diluido 1:30 P/V en amortiguador salino de fosfatos-azul de Evans. Se incubaron las muestras en cámara húmeda a 37°C durante 45 min y se lavaron 2 veces con amortiguador salino de fosfatos pH 7.2, en agitación constante. Se secaron las laminillas a temperatura ambiente y se montaron con una solución de amortiguador de fosfatos-glicerina a pH 7.8. Se procesaron

testigos de células sin tratamiento, para determinar la fluorescencia inespecífica. Las laminillas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia y los resultados expresan el porcentaje de cuatro campos ópticos de lectura. Se obtuvieron fotografías de las células fluorescentes, empleando películas Ektachrome 400 Asa (Eastman Kodak Co. Rochester, NY), a un tiempo de exposición de 4 a 6 min con filtro azul. 2: Se incubaron células no adherentes de pacientes TBP PPD⁺ y de individuos sanos PPD⁺ con suero enriquecido de factor inhibitorio, con suero normal de sujeto sano PPD⁻ o con fracciones no retenidas en Sepharose-PPD obtenidas de los sueros anérgicos o normales. Se siguieron las condiciones de incubación antes referidas utilizando en estos experimentos el conjugado fluoresceinado anti-IgG humana. Los resultados se expresaron por el índice de fluorescencia (IF) de cada experimento, corrigiendo las lecturas de las células de los pacientes TBP PPD⁺ y de los sanos PPD⁺ tratadas con factor inhibitorio o con una fracción del suero anérgico obtenida de Sepharose-PPD, de las lecturas de las mismas células al ser tratadas por sus respectivos testigos a partir de suero normal. Estas lecturas se relacionaron con las obtenidas por células de sujetos sanos PPD⁻ tratadas con el factor, a través de la fórmula siguiente:

$$IF = \frac{A - B}{C};$$

siendo A el número de células fluorescentes de paciente TBP PPD⁺ tratadas con suero anérgico o con fracción no retenida de este suero en Sepharose-PPD; B el número de células fluorescentes de paciente TBP PPD⁺ tratadas con suero normal de sujetos sanos PPD⁻ o con fracción no retenida de este suero en Sepharose-PPD; y C el número de células fluorescentes de sujeto sano PPD⁻ tratadas con suero anérgico, fuente del factor inhibitorio. Las células fueron contadas considerando cuatro campos ópticos de lectura.

RESULTADOS

El estudio de los pacientes se complementó con los hallazgos de laboratorio y con la respuesta al tratamiento antifímico. Los pacientes TBP PPD⁺ presentaron en su mayoría escasos bacilos y evolución favorable al tratamiento, mientras que en los pacientes TBP PPD⁻ la baciloscopía fue abundante, no hubo mejoría clínica, desarrollaron una respuesta pobre a los antifímicos y una evolución crítica del padecimiento, hecho que se considera propio del estado anérgico.

La respuesta celular de los individuos estudiados fue determinada in vivo por la intradermorreacción al PPD. Los pacientes TBP PPD⁺ desarrollaron reacción cutánea positiva, con zonas de induración eritematosa entre 10 y 30 mm, mientras que los pacientes TBP PPD⁻ se caracterizaron por la ausencia de respuesta cutánea en repetidos desafíos.

Los sueros inmunes de pacientes anérgicos, fueron utilizados en los diferentes experimentos como muestra total de factor inhibitorio o como fuente para los procedimientos cromatográficos para separar la fracción inhibitoria.

La determinación de anticuerpos específicos por el método de ELISA, de un concentrado de sueros anérgicos alcanzó lecturas promedio de densidad óptica (D.O.) desde 1.92 a 0.78, correspondiendo a las diluciones de 1:20 y 1:640 respectivamente; mientras que las lecturas del concentrado de muestras séricas de pacientes TBP PPD⁺, a las mismas diluciones, no sobrepasaron a los valores de 0.38 a 0.16 D.O., siendo que en los sueros de sujetos normales donadores sanos, las lecturas promedio fueron de 0.018 D.O., confirmando la baja reactividad y negatividad de los dos últimos tipos de sueros probados.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS SOBRE LA SUPERFICIE CELULAR:

La inmunofluorescencia fue utilizada para demostrar la presencia de inmunoglobulinas sobre la superficie de poblaciones celulares. Células no adherentes de pacientes TBP PPD⁺ incubadas con suero anérgico o con suero normal, con IgG purificadas de suero anérgico o de suero normal, o bien con fracciones no retenidas a la columna de Sepharose-PPD separadas de ambos sueros, fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando anti-IgG o anti-IgM humana conjugadas con fluoresceína. Células de los pacientes sin los respectivos tratamientos, así como células de individuos sanos PPD⁺ y PPD⁻, funcionaron como testigos en los diferentes experimentos. La secuencia de los resultados de inmunofluorescencia se observan en la tabla 1 y figuras 4, 5 y 6.

Cuando se observaron células de pacientes TBP PPD⁺, sólo se encontró la presencia de inmunoglobulinas en las células no adherentes que fueron incubadas con suero anérgico (Fig. 4 A). Las células que fueron tratadas con suero normal, no presentaron fluorescencia (Fig. 4 B).

Para expresar los resultados de modo cuantitativo, se calcularon los porcentajes de fluorescencia (Tabla 1) o los índices de fluorescencia (Figs. 5 y 6).

En los resultados de la tabla 1, se incluyen los obtenidos con células no adherentes de pacientes reactivos,

TABLA 1. PRESENCIA DE INMUNOGLOBULINAS SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS CELULAS NO ADHERENTES DETERMINADA POR INMUNOFUORESCENCIA

INDIVIDUOS	TRATAMIENTO CON IgG o SUERO	% DE FLUORESCENCIA ANTI-IgG FITC	ANTI-IgM FITC
TBP PPD ⁺	IgG ESPECIFICA*	49	2
	IgG NORMAL**	5	2
	ANERGICO	18	9.5
	NORMAL	9.5	0
TBP PPD ⁺	IgG ESPECIFICA	20	ND
	IgG NORMAL	2	ND
	ANERGICO	30	ND
	NORMAL	10	ND
TBP PPD ⁺	IgG ESPECIFICA	20	ND
	IgG NORMAL	0	ND
	ANERGICO	50	ND
	NORMAL	0	ND
SANO PPD ⁺	IgG ESPECIFICA	20	2
	ANERGICO	7	0
	NORMAL	ND	0
SANO PPD ⁺	IgG ESPECIFICA	5	ND
	IgG NORMAL	2.5	ND
	ANERGICO	5	ND
	NORMAL	2	ND
SANO PPD ⁻	IgG ESPECIFICA	2	0
	ANERGICO	1	ND
	NORMAL	0	0
SANO PPD ⁻	IgG ESPECIFICA	0	ND
	ANERGICO	0	0
	NORMAL	0	ND

Se trabajó 2×10^4 células/20 μ l ASF, pH 7.2.

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

** = IgG normal purificada a partir de suero de sujeto sano PPD⁻.

Las IgG fueron obtenidas por cromatografía de afinidad en Sepharose-proteína A.

ND = No determinado.

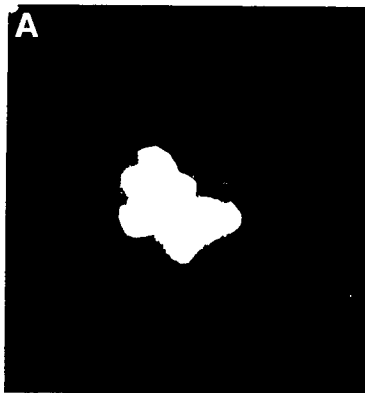


Fig. 4 (A, B). Microscopia de fluorescencia de células no adherentes de pacientes TBP PPD⁺ tratadas con suero anérgico o normal. Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia, empleando conjugado de anti-gammaglobulinas humanas acopladas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ver detalles en Materiales y Métodos). A) Células tratadas con suero anérgico y reveladas con anti-IgG-FITC; 700 X. B) Células tratadas con suero normal y reveladas con anti-IgG-FITC; 1750 X. Se utilizó película Ektachrome 400 Asa.

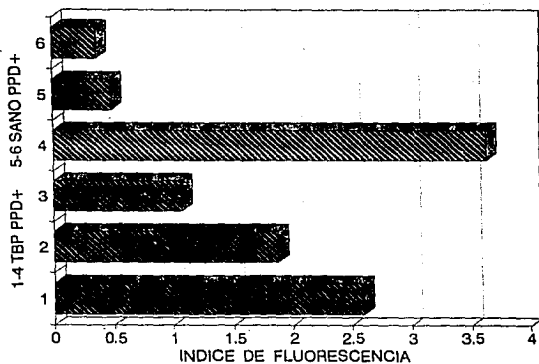


Fig. 5. Índice de fluorescencia de células no adherentes tratadas con suero de pacientes tuberculosos anérgicos y reveladas con conjugado fluoresceinado anti-IgG. Se utilizaron células de pacientes TBP PPD⁺ y células de sujetos sanos PPD⁺. Después de la separación por Ficoll-Hypaque, seguido de adherencia en placa, las células fueron cosechadas e incubadas con suero anérgico como fuente de factor inhibitorio, o con suero testigo normal de sujeto sanos PPD⁻. Cada lote de células fue tratado con el conjugado fluoresceinado anti-IgG humano. Después de la incubación y lavados sucesivos, se procedió a la lectura en microscopio de fluorescencia. Los resultados se expresan en índices de fluorescencia, corrigiendo las lecturas de las células de los pacientes TBP PPD⁺ y de los sanos PPD⁺ tratadas con factor inhibitorio según como se indica en Materiales y Métodos.

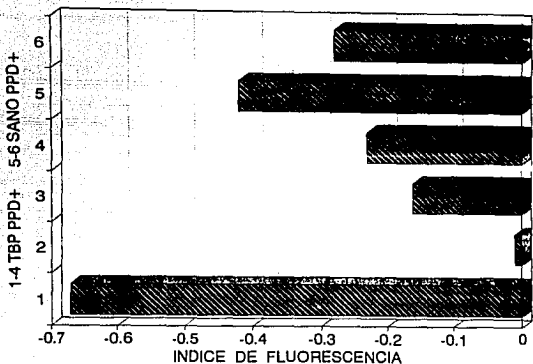


Fig. 6. Indice de fluorescencia de células no adherentes tratadas con fracción no retenida de los sueros sometidos a cromatografía de afinidad en Sepharose-PPD y reveladas con conjugado fluoresceinado anti-IgG. Se utilizaron células de pacientes TBP PPD⁺ y células de sujetos sanos PPD⁺. Después de la separación por Ficoll-Hypaque, seguido de adherencia en placa, las células fueron cosechadas e incubadas con la fracción no retenida del suero anérgico o del suero normal después de la cromatografía en Sepharose-PPD. Cada lote de células fue tratado con conjugado fluoresceinado anti-IgG humano. Después de la incubación y lavados sucesivos, se procedió a la lectura en microscopio de fluorescencia. Los resultados se expresan en índices de fluorescencia, corrigiendo las lecturas de las células de los pacientes TBP PPD⁺ y de los sanos PPD⁺ tratadas con las diferentes fracciones según como se indica en Materiales y Métodos.

así como de testigos sanos PPD⁺ y PPD⁻ en condiciones de tratamiento con sueros anérgicos, normales, e IgG purificadas. Se encontraron los más altos porcentos de fluorescencia cuando se utilizó suero anérgico sobre las células de pacientes TBP PPD⁺ (18, 30 y 50%) o con IgG específica sobre las mismas células (49, 20 y 20%); mientras que las células de estos pacientes TBP PPD⁺ tratadas con suero normal, dieron valores de 9.5, 10 y 0% y valores de 5, 2 y 0% cuando fueron tratadas con IgG purificada de suero normal. Por otro lado, las células de testigos sanos PPD⁺ también dieron valores positivos que variaron de 5-20%, mientras que, las células de los testigos sanos PPD⁻ presentaron los más bajos porcentos de fluorescencia que variaron de 0-2%.

En las figuras 5 y 6 se observan que los índices de fluorescencia, calculados con la fórmula referida en Materiales y Métodos, sólo dieron valores positivos cuando se utilizaron células de pacientes TBP PPD⁺ o de sujetos sanos PPD⁺ incubadas con suero anérgico, alcanzando valores positivos máximos y mínimos de 3.6 y 1.08, respectivamente (Fig. 5). Por otro lado, los índices obtenidos con las fracciones no retenidas a la columna de Sepharose-PPD fueron negativos (Fig. 6).

Es importante mencionar que, en el procesamiento tanto del suero de sujetos sanos PPD⁻ así como de los pacientes TBP PPD⁻ se obtuvo un volumen pequeño de la fracción retenida en la columna, por lo que en los subsecuentes experimentos no se pudo contar con suficiente cantidad para utilizarlas como fuente de factor inhibitorio, y por lo tanto, algunos experimentos fueron diseñados para comprobar la ausencia del factor inhibitorio en la fracción no retenida en columna de los sueros referidos, en comparación con el suero total anérgico utilizado como fuente del mismo.

Previa a su utilización en los experimentos de inmunofluorescencia, se determinó la reactividad a PPD y la pureza de las IgG obtenidas.

Los resultados de ELISA mostraron que la IgG purificada de suero anérgico presenta una alta actividad antígeno-específica, dando una D.O. de 0.56 correspondiendo esta lectura a la dilución 1:160 mientras que para la IgG separada de suero normal la D.O. promedio para todas las diluciones fue de 0.016.

Las IgG fueron además analizadas en PAGE-SDS (Fig. 7) y en IEF (Fig. 8). La separación de dos bandas correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas, procesadas en condiciones de reducción, y el comportamiento similar de una IgG testigo sugieren una buena purificación (Fig. 7); como corolario de esta purificación se observa por IEF que una anti-IgG humana revela la IgG anérgica con su desplazamiento típico al polo catódico (Fig. 8).

Por último, se determinó por ELISA la actividad antígeno-específica de los sueros previa cromatografía en



Fig. 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las IgG purificadas. Las condiciones del PAGE-SDS se detallan en Materiales y Métodos. 1) Patrón de pesos moleculares; 2) IgG de suero inmune; 3) IgG de suero normal; 4) IgG testigo.

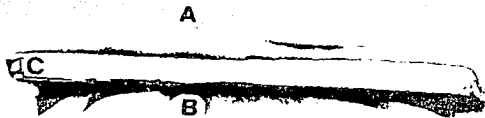


Fig. 8. Inmunoelectroforesis de las IgG purificadas. Las condiciones de la IEF se detallan en Materiales y Métodos. A) IgG de suero inmune; B) Suero de sujeto sano PPD⁻; C) Anti-gammaglobulina polivalente humana.

Sepharose-PPD, y de las fracciones no retenidas y retenidas en la columna, aunque éstas últimas una vez concentradas fueron recuperadas a muy pequeño volumen. Las lecturas del suero anérgico y su respectiva fracción retenida en columna dieron los valores más altos de D.O. de 0.54 y 0.65, correspondientes a las diluciones iniciales de 1:40 y sus lecturas fueron positivas hasta la dilución 1:1280, aún considerando las correcciones con los valores del suero testigo de sujetos sanos PPD⁻. Las fracciones no retenidas procedentes de los diferentes sueros anérgicos o normales fueron invariablemente negativas, con D.O. cercanas a cero.

DISCUSION

En los padecimientos intracelulares como la histoplasmosis, la lepra y la tuberculosis, entre otros, cuando se desarrollan formas diseminadas graves, se presentan diferentes alteraciones inmunológicas (21-24, 27-30, 47, 48). En tales circunstancias, estas enfermedades comparten características de baja o ausente reactividad celular, hecho que es conocido como anergia (22) y que coincide con niveles elevados de anticuerpos. Normalmente, la existencia de este estado es simultáneo a la persistencia del microorganismo intracelularmente.

Aunque existen diferentes estudios sobre la interacción entre respuesta humoral y celular en el padecimiento tuberculoso, los realizados por Mejía-López y cols. (37) sugieren que los anticuerpos presentes en el suero inmune de pacientes tuberculosos anérgicos, son los posibles responsables de la inhibición de la respuesta celular, determinada por la prueba de transformación linfocítica (37). La inhibición fue obtenida solamente con suero inmune que contenía altos títulos de anticuerpos anti-PPD, lo que apoya un reconocimiento específico por anticuerpos, y descarta la participación de otros componentes séricos como C3, proteína C-reactiva y α 1-anti-tripsina que no tienen un comportamiento específico pero que han sido comprometidos en la regulación de la respuesta celular. Los mismos autores (37, 38) demuestran que el suero inmune anérgico no actúa sobre la respuesta mitogénica inducida por la PHA, confirman el efecto específico de la inhibición por suero y sugieren que los receptores celulares para el mitógeno PHA no fueron bloqueados (37). Por otro lado, sus datos publicados sugieren además, que el componente inhibitorio del suero se encuentra probablemente unido a la superficie de las células no adherentes originarias de los pacientes anérgicos (37, 38). Este hecho fue confirmado por el trabajo de Mejía-López (39), que encuentra que las células de pacientes TBP PPD⁻ estaban cubiertas de IgG desde su origen, puesto que son

reveladas con el conjugado fluoresceinado anti-IgG. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se investigó la población celular capaz de ser afectada en presencia del suero anti-tuberculoso anérgico, y además, se caracterizó el componente sérico responsable del efecto de inhibición, así como, su naturaleza y reactividad específica.

Los sueros utilizados en los diferentes experimentos fueron sometidos a la determinación de anticuerpos específicos anti-PPD, confirmándose la alta respuesta de los sueros provenientes de pacientes anérgicos, los cuales dieron las más altas lecturas de densidad óptica (D.O.), comparadas con los sueros de sujetos normales, donadores sanos, cuyas lecturas se aproximaron a una D.O. de cero.

La presencia de anticuerpos de la clase IgG sobre la superficie de células no adherentes, de pacientes TBP PPD⁺ y de sujetos sanos PPD⁺, tratadas con suero anérgico o con IgG específica, fue confirmada por inmunofluorescencia indirecta (Tabla 1 y Figs. 4-6). La eliminación del factor por cromatografía de afinidad en Sepharose-PPD, comprueba el carácter específico de éste y la necesidad de su presencia para que se manifieste fluorescencia en las células reactivas a PPD tratadas con anti-IgG conjugada a FITC. En un modelo infeccioso similar, Bullock y Fasal (49) identificaron a una IgG como responsable de la inhibición de la respuesta celular en la lepra lepromatosa, la cual se encuentra aumentada en estos pacientes, lo que concuerda con la información presente para el modelo tuberculoso. Finalmente Bjune y cols. (50), demostraron que el factor inhibitorio en lepra es capaz de atravesar placenta, lo que apoya su posible naturaleza inmunoglobulínica sugiriendo que es un anticuerpo de clase IgG.

Nuestros hallazgos apoyan el carácter específico del factor inhibitorio del suero anérgico puesto que sólo se encuentra en sueros inmunes con altos títulos de anticuerpos para Mycobacterium y es eliminado por la adsorción en Sepharose-PPD. Además, se sabe que no interfiere en la estimulación inducida por la PHA según se demostró en trabajos previos (37, 38). Nuestros resultados sugieren además que el factor inhibitorio podría ser un anticuerpo de clase IgG porque se encuentra enriquecido en la fracción obtenida por cromatografía de Sepharose-proteína A y es revelado en fluorescencia por una anti-IgG FITC.

En este contexto, el factor actúa uniéndose a un componente de la superficie celular, posiblemente sobre el receptor para el antígeno. Este efecto podría ser de tipo anti-receptor, quizás por un reconocimiento a través de autoanticuerpos anti-idiotipo o bien de anticuerpos anti-Mycobacterium tuberculosis con actividad anti-idiotípica cruzada. Este planteamiento está apoyado por el trabajo de Colizzi y cols. (32) quienes sugieren la existencia de esta

acción anti-receptor. En las enfermedades crónicas hay producción de auto-anticuerpos. En el caso particular de las micobacterias, se ha reportado que existe mimetismo molecular, provocando reactividad cruzada entre varios determinantes de las micobacterias y componentes del hospedero, induciéndose así condiciones de autoinmunidad en individuos susceptibles (51). Los experimentos realizados en el presente estudio, no fueron orientados a la determinación del efecto anti-receptor, sin embargo, esto será motivo de investigaciones futuras.

Se han descrito anticuerpos con actividad anti-linfocito en el suero de pacientes con lepra (52), así como también se han demostrado anticuerpos de clase IgM e IgG anti-timocito (53), aunque, no se ha encontrado correlación entre los niveles de estos anticuerpos y una depresión en la proliferación de linfocitos en respuesta a antígenos micobacterianos.

Es importante destacar que los resultados de la inmunofluorescencia, confirman que la población no adherente es la que está comprometida con el fenómeno de inhibición, y que el efecto es específico. Nuestros datos demuestran que es el suero inmune anérgico, particularmente la IgG específica, el componente sérico que actúa posiblemente uniéndose a la superficie de células no adherentes e impidiendo la estimulación de éstas por el antígeno PPD. Será motivo de investigaciones futuras, caracterizar con anticuerpos monoclonales la subpoblación celular que interacciona con el factor, y probar en un modelo experimental un tratamiento modulador de la respuesta inmune que revierta in vivo las condiciones de anergia celular en la tuberculosis.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

1.- El factor inhibitorio presente en suero de pacientes anérgicos se adhiere a la superficie de células no adherentes de pacientes o sujetos sanos PPD⁺.

2.- El factor inhibitorio es de naturaleza inmunoglobulínica de isotipo IgG.

3.- El factor inhibitorio parece ser específico y tiene una actividad anti-PPD.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Barret, J.T. 1988. Textbook of Immunology. An Introduction to Immunochemistry and Immunobiology. 5th. ed. C.V. Mosby Co., Toronto.
- 2.- Carpenter, P.L. 1982. Inmunología y Serología. 2a. ed. La Prensa Médica Mexicana, México.
- 3.- Rose, N.R., Milgrom, F., y van Oss, C.J.. 1983. Principios de Inmunología. C.E.C.S.A., México.
- 4.- Ortiz-Ortiz, L. 1987. Inmunología. Interamericana, México.
- 5.- Bach, J.F. 1984. Inmunología. Limusa, México.
- 6.- Duarte-Escalante, E., León-Islas, M.E. y Taylor, M.L. 1990. Metabolismo oxidativo y aspectos fisiológicos importantes del proceso fagocítico. Rev. Fac. Med. 31: 6.
- 7.- Dannenberg, A.M. 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Immunol. Today 12: 228.
- 8.- Dannenberg, A.M. 1989. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev. Infect. Dis. II: 369.
- 9.- Kerr, M.A., Hussein, Y.M., Potts, R.C., Swanson-Beck, J. and Sheriff, M.M. 1987. Characterization of a factor in leprosy serum that inhibits the growth of mitogen stimulated normal human lymphocytes. Immunology 61: 117.
- 10.- Hussein, Y.M., Kerr, M.A. and Swanson-Beck, J. 1987. The mechanisms of action of the factor in leprosy serum that inhibits the growth of mitogen stimulated normal human lymphocytes. Immunology 61: 125.
- 11.- Taylor, M.L., Mejía-Lopez, H., Rubio-Monteverde, H., Vaca-García, O., Reyes-Montes, M.R., Villalba-Caloca, J., Cruz-Chávez, A. y Cristerna-Aguirre, J.M. 1984. Inmunorregulación de infecciones intracelulares: Papel de los anticuerpos en los modelos tuberculosis e histoplasmosis. Neumol. Cir. Tórax Méx. 45: 32.
- 12.- Chase, M.W. 1945. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59: 134.

- 13.- Suter, E. 1954. Multiplication of tubercle bacilli within mononuclear phagocytes in tissues cultures derived from normal animals and animals vaccinated with BCG. *J. Exp. Med.* 20: 94.
- 14.- Mackaness, G.B. 1954. The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits. *Am. Rev. Tuberc.* 69: 495.
- 15.- Leveton, C., Barnass, S.S., Lucas, B.S., de Souza, B., Nicol, M., Banerjee, D. and Rook, G.A.W.. 1989. T-cell-mediated protection of mice against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immune.* 57: 390.
- 16.- Orme, I.M. and Collins, F.M. 1984. Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell. Immunol.* 84: 113.
- 17.- Orme, I.M. 1987. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with M. tuberculosis. *J. Immunol.* 138: 293.
- 18.- Boom, W.H., Husson, R.N., Young, R.A., David, J.R. and Piessens, W.F. 1987. In vivo and in vitro characterization of murine T-cell clones reactive to Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immunity.* 55: 2223.
- 19.- Muller, I., Cobbold, S.P., Waldmann, H. and Kaufmann, S.H. 1987. Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cell. *Infect. Immun.* 55: 2037.
- 20.- Lowrie, D.B. 1990. Is macrophage death on the field of battle essential to victory, or a tactical weakness in immunity against tuberculosis? *Clin. exp. Immunol.* 80: 301.
- 21.- Lenzini, L., Rottoli, P. and Rottoli, L. 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. exp. Immunol.* 27: 230.
- 22.- Gatner, E.M.S. and Anderson, R. 1982. Immune response and immunostimulation in tuberculosis therapy. *S. Afr. Med. J.* 61: 707.
- 23.- Ellner, J.J. and Wallis, R.S. 1989. Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 11: S455.

- 24.- Ridley, D.S. and Jopling, W.H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Leprosy* 34: 255.
- 25.- Ellner, J.J. 1978. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J. Immunol.* 121: 2573.
- 26.- Youmans, G.P. 1982. Tuberculosis. In: Youmans, G.P., Paterson, P.Y. and Sommers, H.M. (eds.). *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*. 3th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 27.- Waxman, J. and Lockshin, M. 1973. *In vitro* and *in vivo* cellular immunity in anergic military tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 107: 661.
- 28.- Shiratsuchi, H., Okuda, Y. and Tzuyuguchi, I. 1987. Recombinant human interleukin-2 reverses *in vitro*-deficient cell-mediated immune responses to tuberculin purified protein derivative by lymphocytes of tuberculous patients. *Infect. Immun.* 55: 212.
- 29.- Rook, G.A.W., Carswell, J.W. and Stanford, J.L. 1976. Preliminary evidence for the trapping of antigen-specific lymphocytes in the lymphoid tissue of "anergic" tuberculosis patients. *Clin. exp. Immunol.* 26: 129.
- 30.- Ellner, J.J. 1978. Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. *Ann. Int. Med.* 89: 932.
- 31.- Heilman, D.H. and McFarland, W. 1966. Inhibition of tuberculin-induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. *Int. Arch. Allergy* 30: 58.
- 32.- Colizzi, V., Giuntini, M., Garzelli, C., Campa, M. and Falcone, G. 1983. Auto-anti-idiotypic antibodies inhibit T-cell-mediated hypersensitivity in BCG-infected mice. *Cell. Immunol.* 80: 205.
- 33.- Nelson, D.S. 1972. Mouse serum factor depressing lymphocyte transformation. *Experientia* 28: 1227.
- 34.- Ford, W.H., Caspary, E.A. and Shenton, B. 1973. Purification and properties of a lymphocyte inhibition factor from human serum. *Clin. exp. Immunol.* 15: 169.
- 35.- Mortensen, R.F., Osmand, A.P. and Gewurz, H. 1975. Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-dependent lymphocytes and alteration of their functions. *J. Exp. Med.* 141: 821.

- 36.- Cox., R.A. and Pope, R.M. 1987. Serum-mediated suppression of lymphocyte transformation responses in coccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **55**: 1058.
- 37.- Mejia-López, H., Vaca-García, O., Cristerna-Aguirre, J.M., Cruz-Chávez, A., Selman-Lama, M. and Taylor, M.L. 1990. Tuberculous anergic sera or purified protein derivative treatment induces modification in lymphocyte transformation of cells from patients with tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 344.
- 38.- Mejia-López, H., Selman-Lama, M., Cristerna-Aguirre, J.M., Cruz-Chávez, A., Rubio-Monteverde, H. y Taylor, M.L. 1990. Efecto inhibitor del suero inmune sobre diferentes poblaciones celulares de pacientes con tuberculosis pulmonar. *Rev. Inst. Nal. Enf. Res. Mex.* **2**: 133.
- 39.-Mejia-López, H. 1990. Papel de los anticuerpos en la regulación del proceso tuberculoso. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. División de Estudios Superiores, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.
- 40.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- 41.- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe Laboratories Inc., London.
- 42.- Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. 1978. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* **15**: 429.
- 43.- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680.
- 44.- Stanworth, D.R. and Turner, M.W. 1978. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their sub-units. In: Weir, D.M. (ed.). *Handbook of Experimental Immunology*. 3th ed. Blackwell Scientific Publication. pp. 6.1., Oxford.
- 45.- Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H. 1971. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Amer. J. Clin. Pathol.* **55**: 283.
- 46.- Wick, G., Baudner, S. and Herzog, F. 1978. Immunofluorescence: Contributions to the theory and

practice of immunofluorescence. Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn.

- 47.- Taylor, M.L., Díaz, S, González, P.A., Sosa, A.C. and Toriello, C. 1984. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: a hypothetical approach. Rev. Infect. Dis. 6: 775.
- 48.- Taylor, M.L., Mejia-López, H, Rubio-Monterverde, H. Vaca-Garcia, O., Reyes-Montes, M.R., Villalba-Caloca, J., Cruz-Chávez, A. y Cristerna-Aguirre, J.M. 1984. Inmunorregulación de infecciones intracelulares: Papel de los anticuerpos en los modelos tuberculosis e histoplasmosis. Neumol. Cir. Tórax Méx. 45: 32.
- 49.- Bullock, W.E. and Fasal, P. 1971. Studies of immune mechanisms in leprosy. III. The role of cellular and humoral factors in impairment of the in vitro immune response. J. Immunol. 106: 888.
- 50.- Bjune, G., Duncan, E., Barnetson, R.S. and Melson, R. 1978. In vitro modulation of lymphocyte response to phytohaemagglutinin by plasma in mother and baby at the time of birth. Increase lymphocyte responses in babies of mothers with lepromatous leprosy. Clin. exp. Immunol. 32: 517.
- 51.- Shoenfeld, Y. and Isenberg, D.A. 1988. Mycobacteria and autoimmunity. Immunol. Today 9: 178.
- 52.- Kreisler, J.M., Arnaiz, A., Pérez, B. and Bootello, A. 1975. Lymphocytotoxins in leprosy. Int. J. Leprosy 43: 91.
- 53.- Bahr, G.M., Rook, G.A.W., Moreno, E., Lydyard, P.M., Modabber, F.Z. and Stanford, J.L. 1980. Use of the ELISA to screen for anti-thymocyte and anti- β_2 microglobulin antibodies in leprosy and SLE. Immunology 41: 865.