

11261

2ej
4-A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

" MANEJO DE PROTEINAS SOLUBLES DE Mycobacterium tuberculosis POR CELULAS FAGOCITICAS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS *Bionética*
(Aca Microbiología).

P R E S E N T A .

VERONICA ALEJANDRA MONDRAGON JAIMES.

ASESORES:

DR. FEDERICO GOODSAY Z.

DRA. ETHEL GARCIA LATORRE DE ORTIGOZA

ABRIL 1988.

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

R E S U M E N .

La relación parasitaria entre *Mycobacterium tuberculosis* y sus huéspedes fagocíticos requiere del procesamiento por parte del fagocito de proteínas provenientes del bacilo, estas proteínas podrían actuar como mediadores moleculares que permitan la ingestión por el huésped, pero que eviten su digestión. Una hipótesis razonable acerca de como estos mediadores ejercen su efecto es que ellos son, de por sí, resistentes a los procesos degradativos del macrófago y que pueden modular la morfología y la fisiología de la célula fagocítica.

Las proteínas de secreción de *M. tuberculosis* representan buenos candidatos para la búsqueda de mediadores moleculares que modulen tanto la forma como el funcionamiento de la célula fagocítica, por su solubilidad, disponibilidad y caracterización en el laboratorio.

Por otra parte, la inmunoelectrotransferencia (IET), es un método eficaz para detectar las proteínas, no sólo en macrófagos en cultivo, sino también en células de pacientes con la enfermedad. En este trabajo se logró analizar al macrófago como un filtro inmunológico que no sólo presenta a los antígenos de la célula invasora, sino que también los selecciona a través de algún mecanismo no conocido. Se analizaron por IET macrófagos de la línea celular J774, que unieron proteínas de secreción de *M. tuberculosis* por 15 min a 4°C con un suero hiperinmune anti-*M. tuberculosis*. Se encontró que dos proteínas (P60.0 y P71.3 Kd) de un total de 50 bandas, se detectaban en la célula inmediatamente después de la incubación con las proteínas de secreción; estas mismas detectadas con menos intensidad en las células al transcurrir el tiempo, y se observan en el medio de cultivo de la línea celular.

P60.0 Kd, a su vez pudo ser detectada en monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar junto con otras proteínas P79.1, P60.0, P55.0, P52.2, P50.1, P36.0, P32.8, P31.6, P30.0 y P24.8.

Así mismo, por medio de microcinematografía, seguimos los cambios morfológicos inducidos por las proteínas de secreción de *M. tuberculosis*, sobre células de la misma línea fagocítica. Mediante la técnica de Nomarski se pudo observar que 250 µg/ml de las proteínas de secreción por una hora inducen cambios morfológicos en las células volviéndolas más uniformes en sus contornos con pocos pseudópodos y con una marcada agregación. En el curso del experimento no se observó alterada la visibilidad.

Con estos resultados se obtiene un cuadro amplio de los efectos de estos productos de *M. tuberculosis*.

A B S T R A C T .

The ability to bind and process mycobacterial antigens is employed by the macrophage to obtain the structural information required for its immunological function. The affinity of an antigen for the macrophage surface, and its stability throughout the degradative processes in the macrophage allow possible roles as a physiological regulator of the macrophage. We have used immunoblotting to study binding and processing of *Mycobacterium tuberculosis* secretion proteins (MtSP) by J774 macrophages. The SDS-PAGE of macrophages which had bound MtSP for 5 and 15 min at 4°C was electrotransferred to nitrocellulose, developed with biotinylated Protein-A-streptavidin-peroxidase, with peroxidase and 4-chloro-naphthol as peroxidase substrate. We find that two (P 60.0 and P71.3 Kd) out of approx. 50 bands can be detected on lanes corresponding to cells immediately after incubation with the MtSP. The two bands vanishes slowly from the cells and can be detected in the macrophage growth media after the first 15 min of endocytosis of the surface bound-protein. The 60.0 Kd antigen can also be detected in monocytes isolated from patients with pulmonary tuberculosis, where this antigens is found with others of 79.1, 60.0, 55.0, 52.2, 50.1, 36.0, 32.8, 31.6, 30.0 and 24.8 Kd. We have also analyzed images from time lapse microcinematography to assess changes in the morphology and dynamics of J774 macrophages induced by *M. tuberculosis* MtSP. We used Nomarski optics to generate images with sufficient morphological information to detect changes in pseudopodia and smaller peripheral structures. We found that exposure to as little as 250 ug/ml of the MtSP for 1 hr induced observable changes in macrophage morphology, resulting in cells with more uniform perimeters, fewer pseudopodia, and greater aggregation than control populations. No detectable effects on cell viability were observed throughout the course of the experiments.

I N T R O D U C C I O N .

Actualmente la tuberculosis es uno de los problemas de mayor importancia en la salud mundial a pesar de la disponibilidad de drogas eficaces. La extensión de la enfermedad se desconoce debido a la existencia de casos no reportados.

En los países desarrollados, el riesgo anual de la infección es de aproximadamente 1 en 3000 (26), pero en los países en desarrollo, el riesgo puede ser superior a los 50 por 1000.

En el control de la tuberculosis se incluye la prevención -por ejemplo la vacunación con *Mycobacterium bovis* BCG-, tratamiento de individuos infectados y otros.

Además de la susceptibilidad de los sujetos inmunodeficientes e inmunocomprometidos, la razón por la cual algunos individuos, que no pertenecen a este grupo, desarrollan la enfermedad esta pobremente definida.

Es importante la dosis y la virulencia de las cepas infectantes, al igual que el estado nutricional y otros factores predisponentes. Los factores predisponentes son aquellos que tienden a interferir con el bienestar fisiológico normal e incluyen condiciones como nutrición inadecuada, principalmente deficiencia proteica; infecciones intrarrecurrentes; clima, alcoholismo y fatiga crónica (7). Sin embargo, el hecho de que el bacilo establezca una lesión dependera del poder que tenga este para crecer intracelularmente y del poder del macrófago alveolar para ingerirlo e impedir su crecimiento.

En la tuberculosis progresiva, la población enferma puede atravesar por una escala inmunológica partiendo de un grupo polar resistente, en el cual la hipersensibilidad esta totalmente activa, hacia un grupo polar opuesto en el que la respuesta de hipersensibilidad se ha perdido. En algunos sujetos, cuando se pierde la hipersensibilidad celular, los niveles de anticuerpos tienden a incrementarse al igual que el número de bacterias en los tejidos (8).

La homeostasis inmune mantenida por el balance entre células T cooperadoras y T supresoras puede alterarse como consecuencia de la tuberculosis (2). El bacilo de la tuberculosis puede afectar directamente el balance normal, inicialmente en una dirección positiva, por ejemplo a través de la inducción de interleucina 1 (IL1) en los macrófagos; por su parte, la IL1 estimula la activación de linfocitos T (10).

El factor de crecimiento de las células T (IL2), una de las linfoquinas, puede promover la proliferación y la madurez de las células T. La producción de IL2 puede depender de la IL1. Se ha demostrado que la infección en ratones por *Mycobacterium lepraemurium*, trae como resultado un incremento en la producción de IL2 (6), por otra parte, en infecciones con *Mycobacterium tuberculosis* se ha demostrado una producción deficiente de IL2 y

una respuesta anormal de linfocitos T ayudadores a esta linfocina, esto puede contribuir a la alteración de la hipersensibilidad que se presenta en la tuberculosis.

La activación de fagocitos mononucleares fue demostrada por Lurie en 1939 (9), quien observo que las células fagocíticas son activadas inespecíficamente, ya que no sólo se volvían más fagocíticas contra micobacterias sino también contra estafilococos y partículas inertes (9). Los macrófagos deben ser activados para poder destruir al bacilo, tal activación puede darse por mediadores biológicamente activos (linfocinas) liberados por los linfocitos. La acumulación local de grandes números de macrófagos y linfocitos, y la activación de muchas de estas células, a menudo restringen el crecimiento del bacilo y por lo tanto arrestan la enfermedad.

Además de esto, también se ha demostrado que bacilos virulentos de la tuberculosis crecen más pródicamente en los macrófagos que bacilos de cepas avirulentas y que la aplicación exógena de linfocinas puede afectar su crecimiento (1,14).

El proceso de la activación no específica en la inflamación trae como resultado un incremento en el metabolismo oxidativo, por lo que se liberan aniones superóxido (-O_2), peróxido (H_2O_2), radicales hidroxilo e hipoclorito (5). Estos compuestos pueden romper las paredes membranales de las bacterias, lo cual aunado a la actividad enzimática lisosomal de los macrófagos pueden destruir a las bacterias.

En el caso de la tuberculosis, la bacteria no muere después de la fagocitosis, por lo que la presencia de la misma puede destruir al fagocito, cuyos productos tóxicos son la causa de su propia destrucción (5) y liberación del organismo para futuras infecciones a otros fagocitos. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el macrófago no sólo sea estimulado por la bacteria que se encuentra en su interior, sino que la bacteria controle la comunicación bioquímica entre el macrófago y otras células. Por otra parte, Hsueh et al han mostrado que las infecciones de macrófagos con BCG causan una supresión de la producción de prostaglandinas en macrófagos activados, lo cual se piensa trae como resultado un incremento en la actividad lisosomal, multiplicación de linfocitos y un mayor poder bactericida.

El bacilo puede poseer varios mecanismos por medio de los cuales puede escapar a la influencia destructiva de los metabolitos de oxígeno. Ciertamente la pared lipídica gruesa de las micobacterias (27) puede protegerla de la acción bactericida establecida por los fagocitos.

Entre los mecanismos de defensa impuestos por la bacteria se encuentra la catalasa (11), liberada como protección contra el peróxido producido por el macrófago. Así mismo se ha evidenciado que los componentes solubles de la tuberculina puede ejercer una influencia inmunosupresora (2).

La supresión de los mecanismos inmunológicos también ha sido asociada con la presencia de cantidades excesivas de antígenos micobacterianos solubles, siendo las arabinomananas uno de ellos (4).

El resultado final de este proceso infeccioso dependerá de un buen número de factores interactuantes, dentro de los cuales se involucra a la virulencia de la cepa infectante.

Con relación a la virulencia, Mitchinson et al han correlacionado susceptibilidad de la acción letal del peróxido con virulencia de las micobacterias además, se ha demostrado que las proteínas de secreción de una cepa virulenta (H37 Rv) poseen una mayor actividad colagenolítica que la cepa avirulenta (H37 Ra)(28). Esta actividad se ha relacionado con invasividad, diseminación y la formación de cavernas que se presentan en el curso de la enfermedad.

Por mucho tiempo se ha tratado inutilmente de obtener antígenos monoespecíficos del bacilo de la tuberculosis, lo cual sería valioso en inmunodiagnóstico. Daniel et. al. (3), aislaron un antígeno, referido como el antígeno 5, el cual proviene de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, este posee una buena especificidad serológica pero no es específico en pruebas cutáneas (2).

Knicker y Laborde (18) obtuvieron diferentes fracciones al separar los componentes de cultivo de *M. tuberculosis* por cromatografía de intercambio iónico. Estos autores demostraron la presencia de una variedad de antígenos, algunos especie específicos y algunos compartidos por otras especies e incluso por diferentes géneros bacterianos.

En un intento por uniformizar los criterios de clasificación de estos antígenos, Daniel, Affronti y otro grupo de investigación (20) propusieron a la inmunoelectroforesis (IET) como método analítico: enfrentaron preparaciones de *M. tuberculosis* con sueros hiperinmunes de referencia; así clasificaron los antígenos a partir de células bacterianas y de filtrados de cultivo, en II bandas con diferente movilidad electroforética (19).

La IEF utilizando los mismos sueros de referencia, ha sido utilizada en numerosos laboratorios de todo el mundo intentando con ello desarrollar métodos diagnósticos por medio de la detección de antígenos. Se han publicado una gran cantidad de trabajos sobre separación, identificación y aislamiento de antígenos derivados de *M. tuberculosis*. El desarrollo de técnicas con una mayor sensibilidad como es el caso de la electroforesis en una y dos dimensiones (21) y la inmunoelectroforesis en cohetes (Rocket), ha demostrado una gran cantidad de componentes antigenicos en las proteínas de secreción de *M. tuberculosis*.

Las proteínas de secreción de *M. tuberculosis* representan buenos candidatos como reguladores del proceso infeccioso, siendo quizá las señales que produce la bacteria en la batalla

por establecerse, ya que antígenos circulantes en la tuberculosis se han relacionado con un posible efecto como regulador de la respuesta inmune (RI) (23).

May et al (22), al aislar y purificar complejos inmunes circulantes de seis pacientes con tuberculosis pulmonar demostraron la presencia de antígenos micobacterianos. Por otra parte, Samuel y cols (23), demostraron a su vez, la presencia de antígenos micobacterianos al disociar los complejos inmunes. Estos antecedentes apuntan hacia la posible relación de la presencia de antígenos de *M. tuberculosis* en circulación con el desarrollo de esta enfermedad.

Parra et al (24) en un intento por entender el posible papel inmunorregulador de los antígenos del bacilo de la tuberculosis expusieron monocitos humanos a las proteínas de secreción de *M. tuberculosis* y comprobaron que los sobrenadantes de los cultivos de estas células inhibían la estimulación de linfocitos T inducida por diferentes lectinas.

Un paso esencial en la inducción de la respuesta inmune a cualquier proteína antigénica, es la activación de células T ayudadoras; esta activación no es inducida por antígenos libres, sino por antígenos presentados por células accesorias, dentro de las cuales se encuentran los macrófagos, que tienen en su membrana glicoproteínas Clase II del MHC (16).

Existen evidencias que indican que para que un macrófago presente un antígeno en su membrana, este tiende que ser endocitado, procesado en el interior de la célula, reciclado a la superficie y asociado al antígeno Ia (31). Es durante el procesamiento cuando las proteínas antigénicas son catabolizadas a péptidos o aminoácidos.

Sabemos que existen proteínas que pueden ser resistentes a la degradación lisosomal y presentarse en la membrana sin modificación alguna, de hecho se especula ante la posibilidad de que proteínas con ciertas características puedan asociarse directamente al Ia sin internalización previa. Unanue (35) y otro grupo, mencionan que las proteínas que no son alteradas suelen ser alfa hélice, anfipáticas y se caracterizan además por presentar afinidad por el Ia.

Pocos son los estudios que se han realizado con respecto a la identificación de antígenos procesados por células fagocíticas. Existen evidencias que muestran el procesamiento (36,32) en infecciones producidas por *Listeria monocytogenes* (32) y *Bacillus subtilis* (30); la presencia de estos antígenos a nivel de membrana ha sido demostrada además en infecciones con *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* (33,34).

La importancia de la identificación de estos antígenos reside en la función que pueden tener como reguladores en el proceso infeccioso, ya que la exocitosis de estos péptidos procesados

puede conducir directamente a la producción de señales de amplificación del sistema inmune (SI), o ser útiles como posibles indicadores en un inmunodiagnóstico. Se podría sugerir que las PS de *M. tuberculosis* presentan algunas de estas funciones. En este trabajo se trato de encontrar respuesta a tres preguntas relacionadas con el efecto de las proteínas de secreción de *M. tuberculosis* sobre células fagocíticas.

1) La estabilidad de distintas proteínas secretadas por la bacteria en presencia de las enzimas proteolíticas del macrófago. Existen una o varias proteínas resistentes a los procesos degradativos del macrófago? Para contestar esta pregunta se propuso se la estabilidad de estas proteínas de secreción del bacilo caracterizándolas por su peso molecular, dentro de una línea celular fagocítica (J774).

2) Comparar los antígenos seleccionados por células fagocíticas de una línea celular con los antígenos presentes en monocitos de pacientes con tuberculosis. Los monocitos de pacientes con tuberculosis presentan antígenos mycobacterianos en concentraciones suficientes como para ser detectados inmunológicamente? Si es así; Son los antígenos encontrados en estas células comparables con los encontrados en la línea celular? Se retienen algunos con preferencia? Son semejantes los antígenos exocitados en ambas células? La caracterización de estos antígenos podría servir como base para la selección de aquellos que puedan utilizarse con fines diagnósticos.

3) Determinar los efectos de las proteínas de secreción en la morfología del macrófago. Son estas proteínas capaces de inducir cambios morfológicos en las células de tal manera que se vea afectada la capacidad fagocítica de las mismas? Para estudiar este aspecto se registro la morfología de la línea celular J774 en presencia de las PS y comparar sus contornos con un testigo, por medio de la cuantificación de su movimiento. El registro de dichos efectos posiblemente podrían servir como base para el entendimiento de la fagocitosis de *M. tuberculosis*.

Para el desarrollo de los puntos 1 y 2, se penso en una técnica que permitiera la identificación inmunológica por peso molecular de las diferentes proteínas, por lo que se utilizo la inmunolectrotransferencia (IET). La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) permite la identificación de proteínas separándolas en base a su peso molecular. El desarrollo de este método ha permitido analizar cualquier proteína independientemente de su solubilidad; de esta manera ha sido posible disociar proteínas de membrana, componentes proteicos del citoesqueleto, proteínas que forman parte de agregados macromoleculares, etc.

La SDS-PAGE, aunada a la inmunolectrotransferencia (IET), representan un método altamente sensible para la detección de proteínas antigenicas mediante una reacción inmunoenzimática. La IET consiste en la transferencia de las proteínas separadas en

H I P O T E S I S .

Al parecer, uno de los mecanismos a través de los cuales un parásito intracelular puede manejar su estancia exitosa en el interior de su huésped, es por medio de sus productos de secreción. La hipótesis de este trabajo sostiene que el macrófago puede pinocitar y catabolizar una serie de antígenos provenientes de las proteínas de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* quedándose con alguno de ellos, los cuales podrían ser resistentes a los procesos degradativos impuestos por la célula fagocítica y tener capacidad moduladora sobre la fisiología y la morfología de las células fagocíticas.

O B J E T I V O S .

En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos relacionados con el efecto de las proteínas de secreción de *M. tuberculosis*:

- 1) Determinar la estabilidad de distintas proteínas secretadas por la bacteria en presencia de las enzimas proteolíticas del macrófago.
- 2) Comparar los antígenos seleccionados por células fagocíticas de una línea con los antígenos presentes en monocitos de pacientes con tuberculosis.
- 3) Determinar los efectos de las proteínas de secreción (PS) en la morfología del macrófago.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Bacilo de la tuberculosis. - Se cultivo la cepa de referencia H37 Ra obtenida de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. La cepa fue cultivada en el medio de Proskauer Beck y Youmans (PBV) (38), en matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml, de medio y se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron la etapa estacionaria de crecimiento, esto es hasta que la superficie del medio estaba completamente cubierta.

Obtención de las proteínas de secreción (PS). - Los medios de cultivo se separaron de las masas bacterianas por filtración a través de un filtro Whatman No. 3 (M. and R. Bolston Lim. England) y por filtraciones sucesivas con filtros de 0.45 y 0.22 mm (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Las proteínas de los filtrados se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio (0.42 g/ml de filtrado). Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 4°C por 30 min a 60,000 x g en una centrifuga Beckman (J2-21 USA). El precipitado se resuspendió en 5 ml de solución salina 0.15M amortiguada con fosfatos 0.01 M, pH 7.4 (SSF) y 0.2 mg/ml de fluoruro de fenil metil sulfoxido (PMSF) (Sigma Chemicals, St. Louis Missouri) como inhibidor de proteasas (39). El extracto obtenido se dializó exhaustivamente a 4°C contra SSF. La concentración de las proteínas se determinó por el método de Lowry (40), ajustándose a una concentración de 6 mg/ml y distribuyéndose en fracciones de 0.5 ml; los extractos se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

Obtención de suero hiperinmune anti-*M. tuberculosis*. - Para la obtención del suero se inmunizaron semanalmente conejos hembras de la raza Nueva Zelanda adultas. Por espacio de cinco semanas, los conejos recibieron intramuscularmente, una mezcla copuesta de 3.3 mg de las PS de *M. tuberculosis* H37 Ra, con 5 mg de bacilos de *M. tuberculosis* muertos por calor, en 1 ml de hidróxido de aluminio. Después de la inmunización, los conejos fueron sangrados de las orejas y los sueros obtenidos se probaron por inmunoelectroforesis contra un extracto de *M. tuberculosis* H37 Ra hasta demostrar el máximo de bandas por este método, según Dniel (19).

Los sueros se mantuvieron en fracciones de 1 ml a -70°C hasta su uso.

Endocitosis. - Para este tipo de ensayo se utilizó una línea celular fagocítica, la J774 (29), la cual se cultivo en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, N.Y.), conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, N.Y.), 100 U de penicilina y 0.5 mg/ml de fungizona (Gibco, Grand Island, N.Y.) y se mantuvieron en una estufa de CO₂ al 5% y a 37°C. Para la detección de las proteínas de secreción de *M. tuberculosis* endocitadas y exocitadas, se cultivaron tres millones de células fagocíticas por tiempo de cinética cultivadas en DMEM (Fig. 1). Las células se expusieron a una concentración de 1 mg/ml de las PS del bacilo de la tuberculosis a 4°C por 5 o

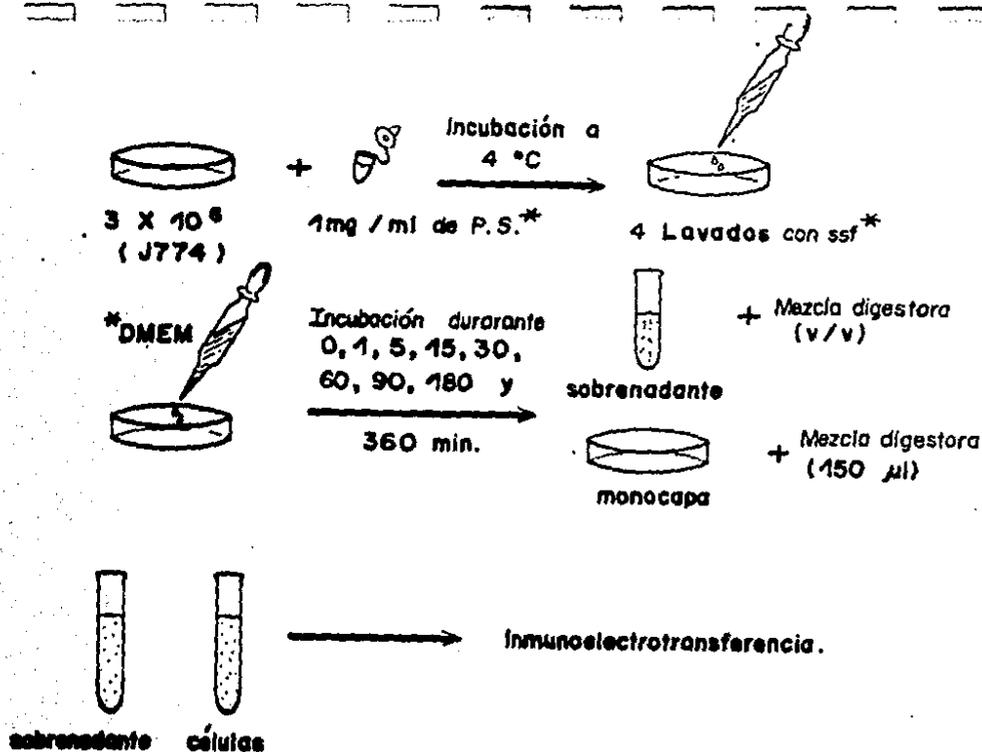


Fig. 1 El siguiente protocolo se siguió para la detección de las proteínas de secreción (PS) de M. tuberculosis, en la línea celular fagocítica J774, por medio de un suero hiperinmune.

SSP= solución salina fisiológica.

DMEM= medio de Eagle modificado de Dulbecco.

Mezcla digestora= contiene B-mercaptoetanol y prepara las muestras para su corrida en electroforesis.

15 min. Despues de este tiempo, la monocapa se lavo 4 veces con SSF, se les adicono DMEM nuevo y se elevo la temperatura a 37°C. Los pocos se sacaron de la estufa a diferentes tiempos: 1, 5, 15, 30, 60 y 90 min despues del lavado, y de cada tiempo se obtuvieron dos muestras; una de ellas conteniendo las celulas y la otra el sobrenadante. A ambas muestras se les adicono una mezcla reductora (0.125M de Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol y 10% de β -mercaptoetanol con azul de bromofenol) v/v y a la muestra celular se le adicono 150 μ l de esta solucion, se hirvieron en un bano de agua por 5 min. La electroforesis se hizo de acuerdo con el metodo de Laemmli (25) en geles de poliacrilamida de 1.5 mm de grueso, al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS). Las muestras se corrieron a 30 mA por gel, en una solucion amortiguadora de Tris-HCl 0.37M pH 8.8 con 0.1% de SDS con un sistema de refrigeracion a 4°C. Al terminar la separacion electroforetica de las proteinas, estas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa.

Inmunolectrotransferencia (IET). - Posterior a la electroforesis en SDS-PAGE, las proteinas se transfirieron a papel de nitrocelulosa (NC) (Scheleicher and Schuell Keen NH, Ba 0.45 μ m), por el metodo de Towbin (15), en una camara de transferencia Bio Rad a 2 A por una hora a 4°C utilizando un amortiguador de Tris-glicina (0.025 M, 0.192M pH 8.3 con 20% de metanol v/v). Una vez transferidas las proteinas, el papel de NC se incubo toda la noche con una solucion bloqueadora de albumina serica bovina (Sigma) al 3% con solucion salina de fosfatos con tween 20 al 0.1% (SSF-T) en agitacion constante y a 4°C. Al dia siguiente el papel de NC se lavo a temperatura ambiente con SSF-T durante 5 min con 4 cambios, para eliminar el exceso de albumina. El papel de NC se incubo despues con un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis en una dilucion 1:50 con SSF-T durante 6 horas a temperatura ambiente y agitacion constante. Despues de lavar nuevamente con la solucion de SSF-T, el papel de NC se incubo con un complejo formado por proteina A acoplada covalentemente con biotina (Amersham) a una dilucion 1:400 por 60 min; despues de transcurrido este tiempo, el papel de NC se lavo nuevamente con SSF-T y se incubo con un complejo formado por estreptavidina-biotina-peroxidasa (Amersham), en una dilucion 1:400 con SSF-T; se lavo nuevamente siendo los ultimos dos lavados con SSF unicamente. La presencia de las PS se revelaron con un sustrato formado por H2O2 al 0.25% en metanol SSF al 20% v/v con 0.5% de 4-cloro-1-naftol (Sigma, St. Louis, Mo.).

Deteccion de Antigenos en monocitos de pacientes. - Se tomaron muestras de 20 ml de sangre heparinizada de pacientes con tuberculosis no tratada en diferentes estadios de la enfermedad y por medio de un gradiente de Ficoll hypaque se aislaron los monocitos. Las celulas se dejaron adherir por espacio de una hora con DMEM y 10% de SFB y antibioticos, despues de permitir su adherencia, la monocapa se lavo y se incubo con DMEM nuevo y sin suero, para evitar alteraciones en la electroforesis, por espacio de 12 horas; despues de transcurrido este tiempo se tomaron dos muestras por separado de cada paciente: la parte celular y el

Sangre heparinizada de pacientes con tuberculosis

↓
gradiente de ficoll hypaque



↓
separación de mononucleares

↓
células adherentes

↓
Incubación con DMEM por 12 horas.

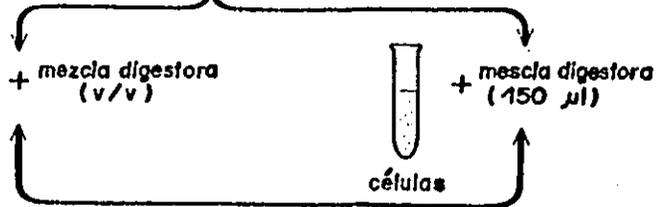
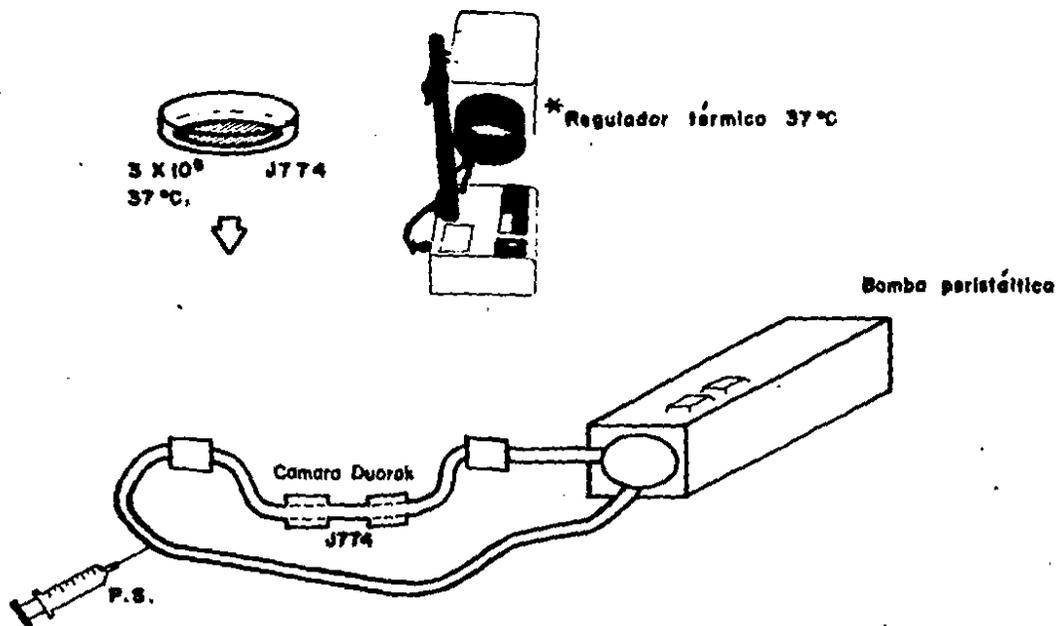


Fig. 2 Para la obtención de células adherentes de paciente con tuberculosis, se siguió el protocolo del esquema. Las células obtenidas se analizaron por inmunoelectrotransferencia (IET), al igual que sus sobrenadantes, y se revelaron con un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis o con suero del mismo paciente.

sobrenadante

células

Inmunoelectrotransferencia



FILMACION CELULAS J774 en presencia de proteínas de secreción (P.S.) de *M. tuberculosis*.

Fig. 3 Circuito utilizado para la filmación de la línea celular J774 en presencia de las proteínas de secreción (PS) de *M. tuberculosis* mediante la técnica de Nomarski.

sobrenadante, ambas muestras fueron reducidas con la muestra ya referida para correrse por electroforesis y detectar los antígenos presentes en la monocapa después de la transferencia, con el suero hiperinmune (Fig. 2).

Efecto de las PS sobre la capacidad de adherencia. - Cuando se ponía la monocapa de la línea celular J774 en presencia de las PS se podía apreciar que después de 30 min, las células se desprendían del sustrato de manera proporcional al tiempo, por lo que se registró la capacidad de las mismas para permanecer adheridas al plástico variando el tiempo de exposición y concentración de las PS. Además, se cuantificó la viabilidad por azul tripano (Gibco, Grand Island, N.Y.), para descartar un posible efecto tóxico. Para saber si el daño ocasionado en las células era irreversible, se sembraron las células después de haber estado en presencia de las PS, tanto las que permanecieron adheridas como las que se soltaron, 24 horas después de la resiembra, se cuantificó la viabilidad de las mismas y la capacidad de adherencia.

Filmación de los efectos de las PS en la línea celular J774. - La línea celular se creció en lentes de vidrio de 0.17 mm de grueso a una densidad de 3 millones de células por lente. La lente se colocó en la cámara de Dvorjak como lo marca el esquema (Fig. 3, 4), y se mantuvieron con DMEM amortiguado con 4mM de bicarbonato y 10 mM de hepes, ya que la filmación se llevó a cabo fuera de la estufa de CO₂. La monocapa se mantuvo con medio fresco durante la filmación con una bomba peristáltica que bombeaba las células de medio nuevo. La temperatura se mantuvo a 37°C por medio de un radiador controlable (ASI 400 Air Stream. Nicholson Prec. Instr. Inc. Gaithersburg, MD), y la filmación se realizó en intervalos de 5 segundos durante una hora con la técnica de Nomarski. Primeramente se filmó un testigo consistente en el registro del movimiento de las células en medio en ausencia de las PS. Después de 30 min de filmación, se agregó una concentración de 250 µg/ml de las PS y se registró su movimiento y morfología por 60 min. A una lente diferente, se le adicionó una concentración mayor (500 µg/ml) de las PS y se filmó también por 60 min.

De la filmación obtenida, se contó el número de pseudópodos formados (P) y pseudópodos "abortados" (Pa), por célula para los tres registros. Los pseudópodos abortados se definieron como pseudópodos de una elongación menor al testigo, semejando una vesícula. Con estos datos se obtuvo el índice morfológico, el cual fue calculado dividiendo el número de pseudópodos entre el número de pseudópodos abortados; también se calculó el porcentaje de los mismos.

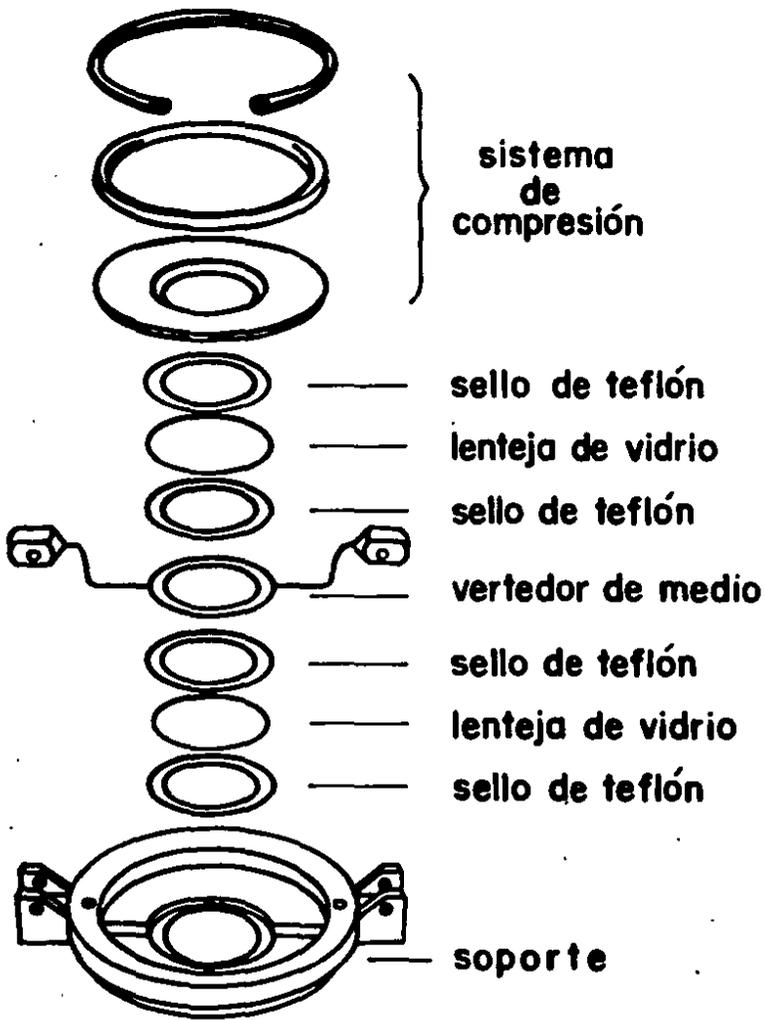


Fig 4. Partes de las que consta la cámara Dvorak, utilizada en la filmación.

Dvorak-Stloter-Culture-Chamber, Nicholson Precision Instruments Inc. Gaithersburg, MD.

R E S U L T A D O S .

Detección de las PS en la línea celular J774.- Al incubar la línea celular con las PS de *M. tuberculosis* por 5 min a 4°C se detecto por IET la presencia de dos proteínas de 71.3 y 60 Kd respectivamente, estas permanecieron en las células inclusive hasta los 360 min después del lavado (Fig. 5).

El sobrenadante obtenido de la incubación de estas células, muestra a su vez P71.3 y P60.0 Kd (Fig. 6). Estos resultados indican la selección de estas dos proteínas, de un total de 50, por la célula fagocítica y la resistencia de las mismas a la degradación lisosomal.

Es probable que el efecto observado en las Figuras 5 y 6 sea debido a que el periodo de incubación fue corto, y que al incrementar el tiempo podamos observar un mayor número de proteínas de secreción en los fagocitos. Las Figuras 7 y 8 muestran que al aumentar el tiempo a 15 min de incubación, de la línea celular con las PS, se detectan un mayor número de proteínas, siendo P71.3, P60.0 y P55.0 proteínas que son exocitadas al medio.

Detección de antígenos en monocitos de pacientes.- En los monocitos aislados de sangre periférica de pacientes con tuberculosis incubados con DMEM, se detecto la presencia de antígenos provenientes del bacilo, de diferentes pesos moleculares, siendo frecuente P60.0 Kd.

Los sobrenadantes de estas células indican que existen antígenos que son retenidos intracelularmente y otros que son exocitados con preferencia (Fig. 9, 10, 11). Es probable que los monocitos de pacientes estén afectados a tal grado que les sea imposible procesar antígenos de nuevo reto. Para resolver esta interrogante, los monocitos de pacientes fueron incubados por 15 min a 37°C con las PS, lavados incubados con DMEM nuevo a 37°C por 30 y 60 min. La Figura 12 presentan los resultados de este experimento, donde se puede observar que inclusive hasta los 60 min después de internalizadas las PS no se observa una degradación de las mismas. Con esta técnica se puede apreciar P63.0 y P32.0 en el sobrenadante después de 60 min de incubación.

Efecto de las PS sobre la capacidad de adherencia.- Al exponer la línea J774 con las PS de *M. tuberculosis*, la viabilidad no se afecto, ya que en el experimental se registro una viabilidad del 85% en comparación del 93% registrado en el testigo.

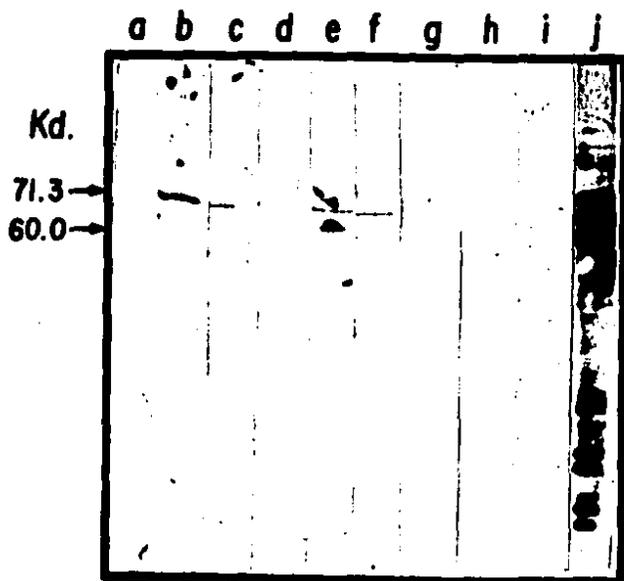


Fig 5 . La línea celular J774 se incubó por 5 min a 4°C con las PS de M. tuberculosis. Posteriormente fueron lavadas con SSF e incubadas con medio nuevo DMEM a 37°C.

- (a) Testigo: células incubadas únicamente con DMEM.
- (b) 1 min después del proceso, a 37°C.
- (c) 5 min después del tratamiento a 37°C.
- (d) 15 min
- (e) 30 min
- (f) 60 min
- (g) 90 min
- (h) 180 min
- (i) 360 min
- (j) PS

Las muestras se trataron para IET, y se revelaron con un suero hiperimmune anti-M. tuberculosis.

PS= proteínas de secreción de M. tuberculosis.

SSF= solución salina fisiológica.

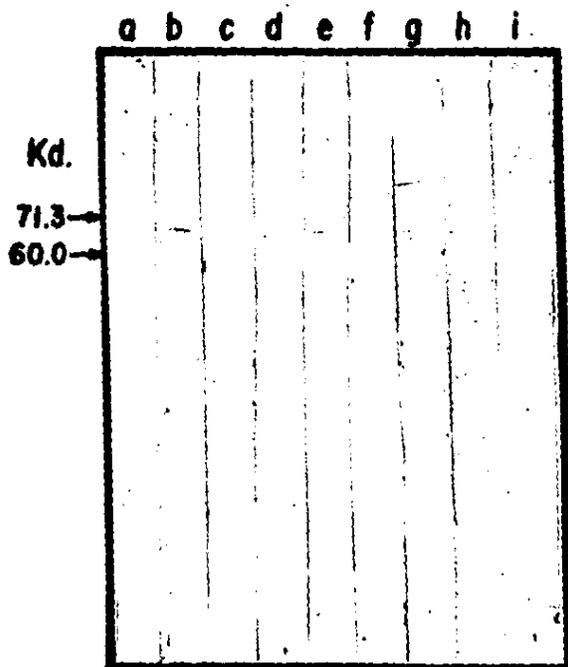


Fig. 6 Sobrenadante de las células incubadas 5 min a 4°C con las PS DE M. tuberculosis. Las muestras fueron procesadas por IET para posteriormente revelarse con un suero hiperinmune anti-M. tuberculosis. (a) testigo; sobrenadante de las células incubadas únicamente con DMEM. (b) 1 min después del tratamiento, a 37°C. (c) 5 min (d) 15 min. (e) 30 min. (f) 60 min. (g) 90 min. (h) 180 min. (i) 360 min. (j) PS.

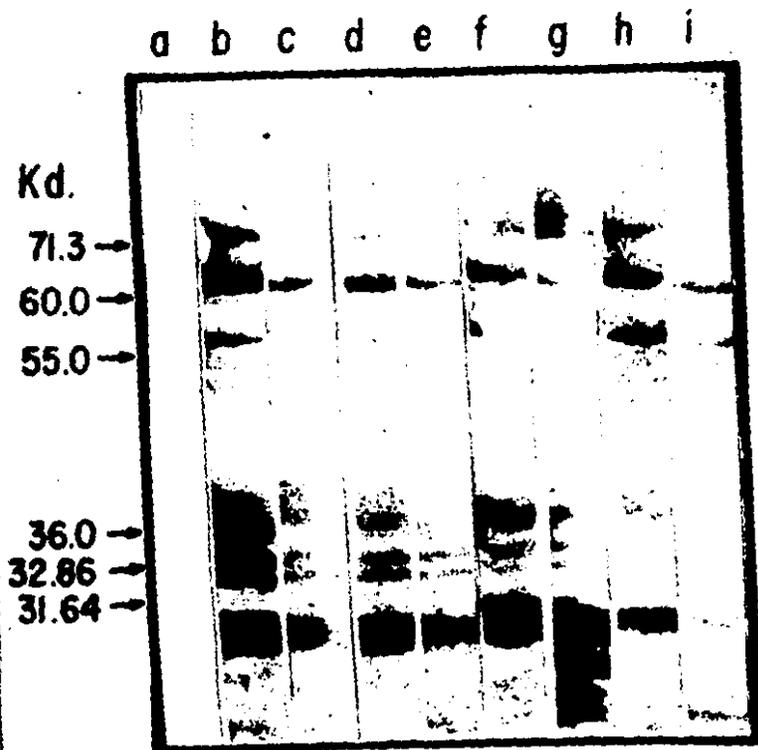


Fig 7 Células de la línea J774 incubadas por 15 min a 4°C con las proteínas de secreción (PS) de M. tuberculosis. Posteriormente, las células fueron lavadas con SSF, incubadas con DMEM nuevo y llevadas a 37°C por diferentes tiempos. Después de hacer la IET, las muestras fueron reveladas con un suero hiperinmune anti- M. tuberculosis. (a) testigo: células incubadas únicamente con DMEM. (b) 1 min (c) 5 min. (d) 15 min (e) 30 min. (f) 60 min. (g) 90 min. (h) 180 min. (i) 360 min.

a b c d e f g h i

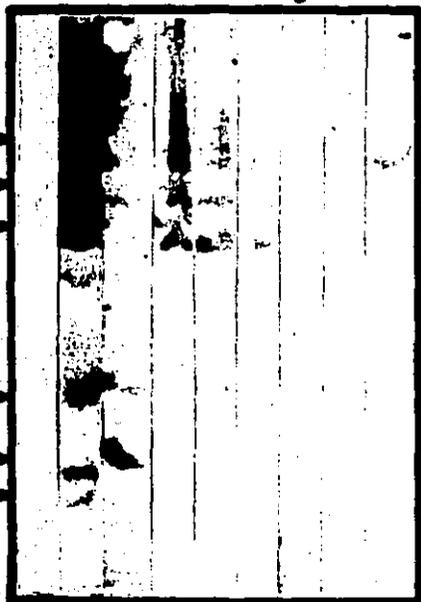


Fig 8 Sobrenadante de la línea celular J774 incubadas por 15 min a 4°C con PS de M. tuberculosis. (a) Testigo: sobrenadante de las células que no fueron expuestas a las PS. (b) 1 min (c) 5 min. (d) 15 min. (e) 30 min. (f) 60 min. (g) 90 min. (h) 180 min. (i) 360 min.

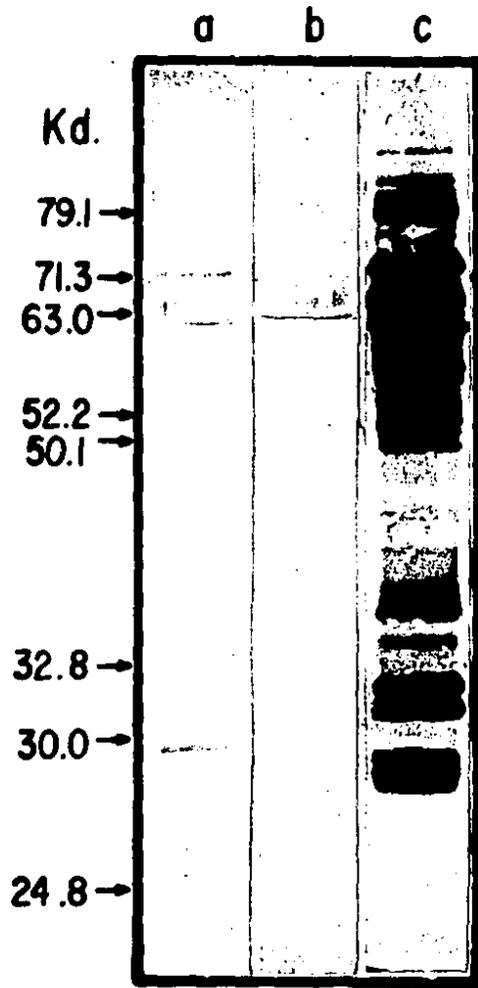


Fig. 9 IET de monocitos de paciente con tuberculosis aislados con Ficoll hypaque, incubados con DMEM por 12 horas. Revelados con suero hiperinmune anti-M. tuberculosis.

- (a) Células adherentes de paciente.
- (b) Sobrenadante de las células adherentes.
- (c) Proteínas de secreción.

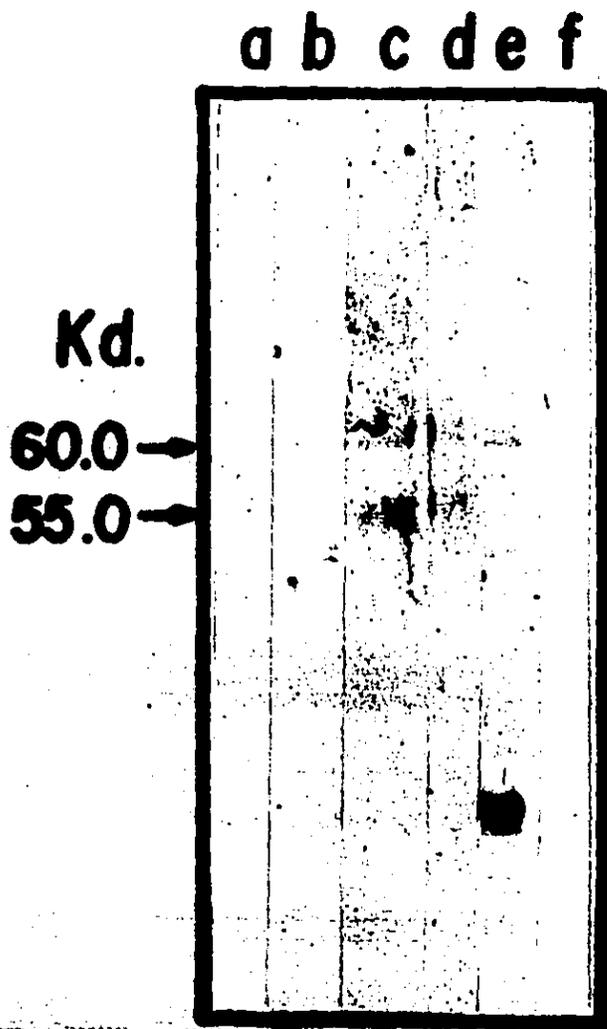


Fig 10 Antígenos detectados en monocitos de pacientes con tuberculosis por IET. y revelados con suero proveniente del mismo paciente. Las células fueron aisladas por medio de un gradiente de ficoll hypaque como lo marca el protocolo. (a) células testigo; sujeto no enfermo. (b) sobrenadante testigo. (c) células paciente 1 (d) sobrenadante paciente 1. (e) células paciente 2. (f) sobrenadante paciente 2.

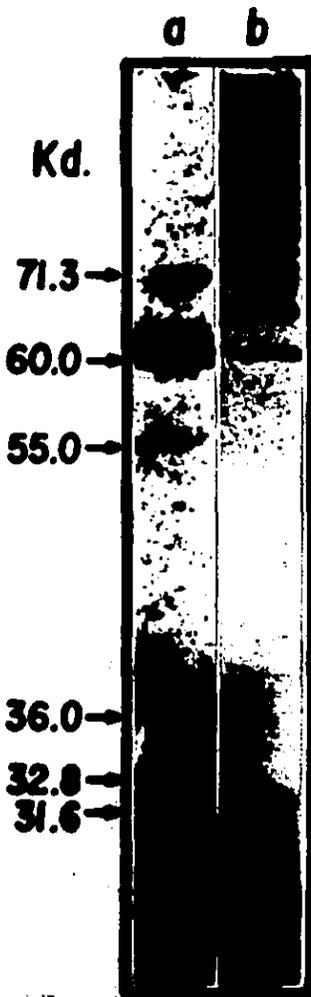


Fig 11 Monocitos aislados por medio de un gradiente de ficoll hy-paque, de pacientes con tuberculosis. Las células fueron aisladas como lo marca el protocolo, e incubadas por 12 horas con DMEM. Posteriormente, se tomaron dos muestras (células) (sobrenadante), después de la IET, se revelaron con un suero hiperinmune anti- M. tuberculosis. (a) células. (b) sobrenadante.

DMEM= Medio de Eagle modificado de Dulbecco.

IET= inmunoelectrotransferencia.

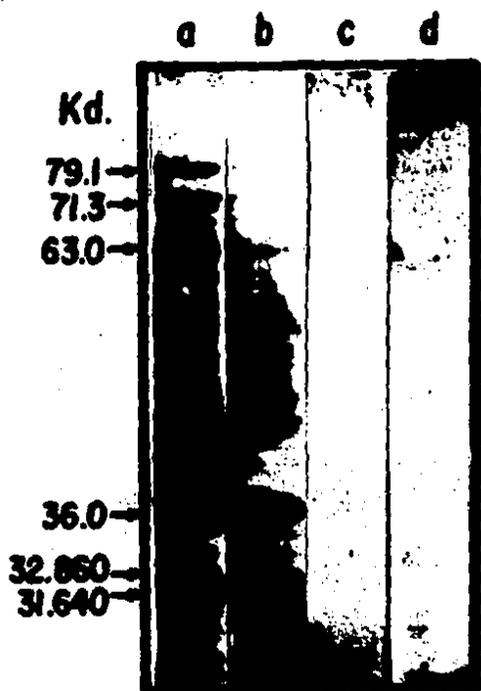


Fig 12 Monocitos de pacientes con tuberculosis aislados por medio de un gradiente de ficoll hypaque, incubados con PS de M. tuberculosis por 15 min a 37°C, lavados e incubados con medio nuevo de DMEM.

(a) células de paciente 60 min después de la incubación.

(b) células de paciente 90 min después de la incubación

(c) sobrenadante de las células expuestas, 60 min después de la incubación.

(d) sobrenadante de las células expuestas, 90 min después de la incubación.

En la Tabla 1 se puede observar que el efecto de las PS sobre la línea celular es irreversible, observándose que las células aun después de transcurridas 24 horas, no se vuelven a adherir a su vez, puede apreciarse que el porcentaje de células adheridas dependió del tiempo que permanecieron en contacto con las PS.

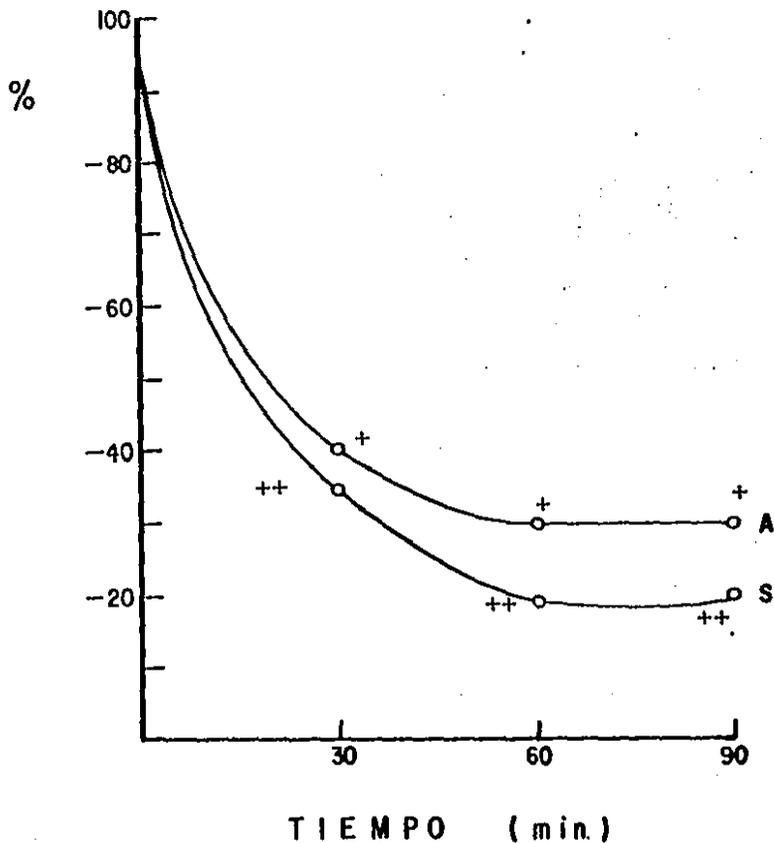
La Figura 13 indica que las células que se expusieron a los antígenos de secreción a diferentes tiempos y permanecieron adheridas, 24 horas después mostraron también pérdida de su capacidad de adherencia, siendo las más afectadas las células que permanecieron adheridas de 60 a 90 min en contacto con el antígeno, ya que a las 24 horas sólo un 30 % de estas logra adherirse. Un 10% menos de esta capacidad de adhesión se registró a las 24 horas en las células que se registraron el día del experimento.

La Figura 14 muestra el porcentaje de las células adheridas al plástico después de haber estado en presencia de las PS a diferentes tiempos y a diferentes concentraciones, en esta gráfica se observa que la capacidad de adherencia se pierde de manera proporcional tanto a la concentración como al tiempo.

Eliminación de los efectos de las PS en la línea celular 3774. - De la película obtenida, se contó el número de pseudópodos, y de pseudópodos abortados por cada célula. En la Tabla 2 se puede apreciar el efecto de las PS sobre la capacidad de movimiento de la célula, en cuanto a número de pseudópodos y pseudópodos "abortados". El índice morfológico permite relacionar ambos números, lo que quizá este relacionado con la capacidad fagocítica exitosa (Fig. 15). Además del cambio observado en cuanto al contorno, la línea celular presenta una tendencia a la agregación en presencia de las PS. Esto último es difícil de observar en la película, ya que tal efecto logra verse después de 60 min de exposición a los antígenos micobacterinos.

PORCENTAJE DE CELULAS J774 ADHERIDAS AL PLASTICO 24 HORAS DESPUES DE HABER ESTADO EN PRESENCIA DE P.S. DE M. tuberculosis

Fig. 13 Las células que se expusieron a los antígenos de secreción a diferentes tiempos (30, 60, 90 min) y permanecieron adheridas, 24 horas después mostraron también pérdida de su capacidad de adherencia. Los datos graficados provienen de la tabla 1.



**PORCENTAJE DE CELULAS ADHERIDAS AL PLASTICO
EN PRESENCIA DE PROTEINAS DE SECRECION DE
M. tuberculosis**

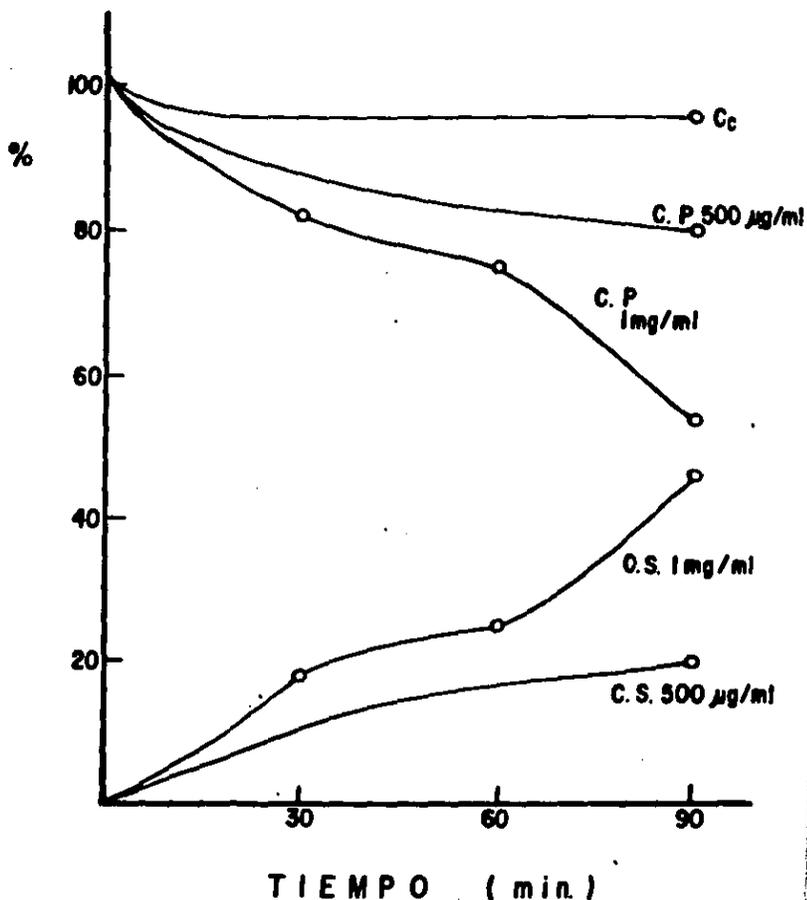


Fig. 14. Porcentaje de células adheridas al plástico en presencia de las Proteínas de Secreción de M. tuberculosis, a diferentes concentraciones: 500 ug, 1 ug/ml. Cc= células control, en ausencia de PS adheridas al sustrato. CP= células adheridas. CS= células sueltas.

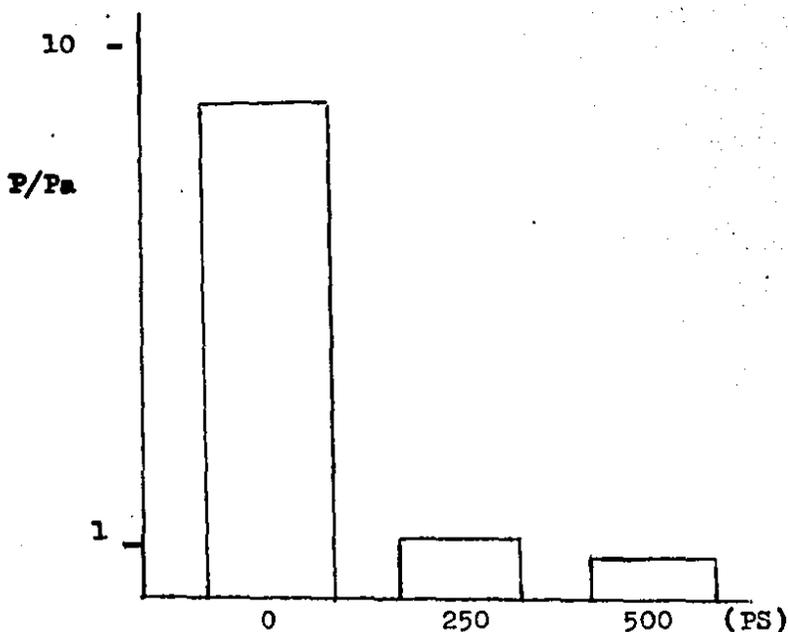


Fig.15 INDICE PREDICTIVO DE EXITO FAGOCITICO. La línea celular J774 fue expuesta a 250 y 500 μg de PS de M. tuberculosis y registrado su movimiento por cinematografía. La gráfica presenta el índice predictivo de éxito fagocítico, que se obtiene de la razón del número de pseudópodos en pseudópodos abortados, para los tres casos incluyendo el testigo (0).

Tabla 1.- Porcentaje de células afectadas en su capacidad de adherencia después de haber estado en contacto con las proteínas de secreción (PS) de M. tuberculosis.

| Tiempo de exposición a PS (min) | Resultado de la incubación con PS. (%) | Resultado a las 24 horas después de la resiembra. (%) | |
|---------------------------------|--|---|------------|
| | | Adheridas | Sueltas |
| Testigo (s/PS) | Sueltas --- Adheridas-93% | 93% | 7% |
| 30 | Sueltas --19% Adheridas-82% | 34% ++ 40% + | 66% 60% |
| 60 | Sueltas--26% Adheridas-82% | 19% ++ 29% + | 81% 71% |
| 90 | Sueltas--46% Adheridas-65% | 20% ++ 30% + | 80% 70% |

Tabla 2.- Número de estructuras involucradas en el movimiento celular de la línea J774, en presencia de las Proteínas de Secreción de Myco-bacterium tuberculosis (PS).

| Tratamiento (g/ml) | P/célula | Pa/célula | P/Pa |
|------------------------|----------|-----------|-------|
| Testigo (s/PS) | 9.26 | 1.11 | 8.33 |
| 250 | 2.409 | 2.409 | 1 |
| 500 | 1.44 | 2.00 | 0.722 |

P= número de pseudópodos emitidos por célula durante la película

Pa= número de pseudópodos abortados

P/Pa= índice predictivo de éxito fagoc-ítico.

D I S C U S I O N

Los macrofagos se caracterizan por manejar varios antigenos sin reestraccion y por su participacion en una respuesta inflamatoria característica de los procesos inmunes. Los antigenos ingeridos por el macrofago son mas efectivos que los antigenos solubles; de hecho los macrofagos parecen jugar un papel importante en inmunidad, en parte debido a su capacidad de tomar y manipular antigenos y por lo tanto de regular la magnitud del estimulo inmunogenico (35,41).

El presente estudio se llevo a cabo como parte de un esfuerzo por entender a *posteriori* las funciones inmunorreguladoras del macrofago.

Como ya se menciona con anterioridad, la hipotesis en la que se basa este trabajo sostiene que el macrofago puede pinocitar y catabolizar una serie de antigenos provenientes de las PS de *Mycobacterium tuberculosis* quedandose con algunos de ellos, los cuales podrian dirigir al macrofago tanto fisiologica como morfologicamente.

Para probar esta hipotesis, se construyo un modelo con la linea celular J774, que se eligio por sus características macrofagicas (29).

Este y otros experimentos (35,37) muestran que las celulas fagociticas en contacto con antigenos solubles son capaces de catabolizar a los mismos y liberar productos al medio. Sin embargo, una pequena cantidad puede ser retenida en el interior de la celula sin cambio (35). En este trabajo se puede observar que de un total de 50 proteinas, producto de secrecion de *M. tuberculosis*, solamente dos tienen preferencia a unirse a membrana, bajo las presentes condiciones experimentales, siendo estas mismas resistentes a degradacion, ya que aun despues de 60 min logran verse sin cambio (Fig. 5). La resistencia a la digestion de estas proteinas podria estar relacionada con inmunogenicidad, esto coincido con lo reportado por Unanue (42) quien ha demostrado que los productos catabolizados no son inmunogenicos y las moleculas que permanecen en la celula sin cambios si lo son (36,42). Ademas se ha visto que la inmunogenicidad de la hemocianina en celulas fagociticas se asocia con la persistencia de una pequena fraccion de antigeno (35, 42).

Otros antigenos quizas son liberados de la membrana en los primeros minutos y logran detectarse en el sobrenadante (1, 5 min), aunque parte de estos mismos permanecen en las celulas y su degradacion puede registrarse al transcurrir el tiempo (P36.0, P32.86 y P31.64). Es probable que los antigenos no degradados se encuentren unidos a ciertas regiones de la membrana que no participan en la endocitosis, reteniendo de esta manera su estructura original y por lo tanto la respuesta humoral contra antigenos unidos a membrana de macrofagos puede dirigirse a determinantes conformacionales del antigeno nativo. Sin embargo, existen evidencias que indican que la presentacion antigenica,

tanto para linfocitos T como para B, requieren de la internalización y procesamiento del mismo en un compartimento ácido (32,44).

Se ha mencionado que los antígenos liberados por las células fagocíticas son preferentemente los no digeribles (43) y que es posible que estos estén relacionados con el mantenimiento de tolerancia. Cruhaud (43) ha visualizado esta liberación como una posible ruta por la cual el material de peso molecular elevado puede ser liberado para el reconocimiento de linfocitos. Es posible que esta pérdida pueda tener diferente significado biológico dependiendo del antígeno en cuestión. La liberación de antígenos por parte de células fagocíticas puede tener también un papel importante en inmunorregulación, por ejemplo ser tomado por una célula Ia+ con capacidad fagocítica limitada como lo es el linfocito B. Sin embargo, pueden ser totalmente irrelevantes.

En virtud del efecto que se tiene sobre el antígeno, el macrófago puede ser considerado como el primer regulador de la respuesta inmune, debido a que puede determinar la magnitud del estímulo inmunogénico (36).

Respecto a los antígenos encontrados en monocitos de pacientes, estos no se presentan con un patrón característico lo que quizá este relacionado con el grado de evolución de la enfermedad o manipulación antigénica por parte del microorganismo. A pesar del pequeño grupo de pacientes estudiados (5), estas observaciones indican que existe una heterogeneidad considerable en la respuesta de un paciente a otro, tanto en el número como en la intensidad de las bandas. Sin embargo, se logra ver una tendencia por parte de los monocitos a retener antígenos de peso molecular bajo, dentro de los cuales se encuentra P55.0 y

P60.0 Kd, estos llaman la atención por el hecho de que fueron reconocidos tanto por el suero hiperinmune como por el suero autólogo, esto podría estar indicando la presencia de un antígeno importante inmunogénicamente. De hecho, en las Fig. 9, 10 y 11 se observa que existen antígenos que son mantenidos intracelularmente y otros que son exocitados con preferencia. Una de las proteínas que es retenida P55.0 ha sido detectada por Ranadive (45) como un antígeno que despierta la respuesta humoral en pacientes.

Además, la Fig. 12 nos indica que la maquinaria de monocitos relacionada con el procesamiento antigénico está deteriorada, ya que estas células no procesan ni exocitan antígeno de nuevo reto en los primeros 60 min, esto podría estar relacionado con la hipersensibilidad retardada que se observa en la tuberculosis. La probabilidad de que monocitos humanos tomen más tiempo para el procesamiento antigénico que la línea celular, no se puede descartar.

Otro de los efectos que podríamos adjudicar a las PS es su capacidad para afectar la morfología de los fagocitos y su adherencia. Al parecer, las PS permanecen 24 horas en la línea celular (Tabla 1) y de esta manera los fagocitos afectados podrían pasar parte de estos antígenos a las células hijas, los cuales seguirían ejerciendo su efecto sobre la capacidad de

adherencia. No se puede saber si las PS están ejerciendo su efecto directamente sobre el citoesqueleto afectando la capacidad de adherencia y por lo tanto su capacidad fagocítica, esto no fue probado en este trabajo pero es una posibilidad que no se puede descartar, ya que quizá sea este uno de los mecanismos de los que se valga el bacilo de la tuberculosis para evitar una sobrepoblación intracelular y asegurar su estancia exitosa.

La agregación de macrófagos ha sido demostrada después de la sensibilización por infección con *M. tuberculosis* por Nelson et al. Preston et al (46), mencionan también una agregación de macrófagos cuando se ponen en contacto con linfocitos sensibilizados con PPD. Los resultados de esta investigación indican que la agregación de la monocapa se puede llevar a cabo de manera directa, y a diferencia de Preston, en este trabajo, la línea celular no pierde su viabilidad aun con 1 mg/ml de las PS y en cambio retiene su capacidad de replicación, aunque si pierde su capacidad de adherencia. No existe la posibilidad de ausencia de fibronectina que pudiera afectar la adherencia, ya que la línea fue incubada con SFB después de haber agregado las PS.

REFERENCIAS.

- 1) Crowle, A.J., and M. May. 1981. Preliminary demonstration of human tuberculoimmunity in vitro. *Infect. Immun.* 31: 453-464.
- 2) Chaparas, S.D. 1984. *Microbiology*. American Society of Microbiology. Washington, D.C.
- 3) Daniel, T.M., E.A. Balestrino, O. C. balestrino, P.T. Davidson, S.M. Debanne, S. Katoria, Y.P. Dataria, and J.B. Scoccozza. 1982. The tuberculin specificity in human of Mycobacterium tuberculosis antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:600-606.
- 4) Ellner., J.J., and T.M. Daniel. 1979. Immunosuppression by micobacterial arabinomannan. *Clin. Exp. Immunol.* 35: 250-257.
- 5) Hoffer, J.T., Z. Metzger, and J.J. Oppenheim. 1982. Oxygen-derived metabolites as suppressors of immune responses in vitro. *Lymphokines.* 2:63-86.
- 6) Hoffenbach, A., P.H. LaGrange, and M.A. Bach. 1983. Deficit of interleukin 2 production associated with impaired T-cell proliferative response in Mycobacterium lepraemurium infection. *Infect. Immun.* 39: 109-116.
- 7) Report 1974. Tuberculosis in a rural population of South India: a five year epidemiological study. *Bull. World. Heth. Org.* 51: 473-488.
- 8) Lenzini, L., P. Rottoli, and L. Rottoli. 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 27: 230-237.
- 9) Lurie, M.B. 1939. The mobilization of mononuclear in normal immunized animals and their relative capacities for division and phagocytosis. *J. Exp. Med.* 69: 579-606.
- 10) Lieger, T.A. and J.J. Oppenheim. 1981. Characteristics of Interleukin I and epidermal cell derived thymocyte activation factor. *Adv. Inflammation Res.* 5: 1-25.
- 11) Katoch, V.M., L. G. Wayne and G. Diaz. 1982. Serological approaches for the characterization of catalase in tissue derived myco bacteria. *Ann. Microbiol.* 133B:407-414.
- 12) Nielsen, H., J. Bennedsen, S.O, Larsen, J.M. Rhoades, and K. Viskum. 1982. Defective monocyte chemotaxis in pulmonary tuberculosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 63: 122-129.
- 13) Watson, J., H.B. Frank, D. Mochizuki, and S. Yillis. 1982.

The biochemistry of Biology of Interleukin 2. Lymphokines. 6: 95-116.

14) Zlotnik, A., and A.J. Crowle. 1982. Lymphokine induced mycobacteriostatic in mouse pleural macrophages. Infect. Immun. 37: 786-793.

15) Towbin H., Stenelin T. and Gordon J. 1970. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4350-4354.

16) Benacerraf, B. 1981. Role of the MHC gene products in immune regulation. Science. 212:1229.

17) Allen P., Beller D., Braun J., Unanue E., 1984. The handling of Listeria monocytogenes by macrophages: the search for an immunogenic molecule in antigen presentation. Jour. Immunol. 132(1): 323-331

18) Kniker W.T. and La Borde J.B. 1964. The separation of micobacterial antigens by ion-exchange chromatography. Am. Rev. Res. Dis. 89: 29-40.

19) Daniel T.M., Good R.C. and Janicki B.W. 1975. Immunoelectrophoresis of Mycobacterium tuberculosis antigens. Comparative analysis of cell extract and culture filtrate antigens. Am. Rev. Res. Dis. 112:639-644-

20) Anonymous. An evaluation of a reference system for antigens of Mycobacterium tuberculosis. Am. Rev. Resp. Dis. 106:142-147. 1972.

21) Daniel, T.M. and Janicki B.W. 1978. Mycobacterial antigens: A review of their isolation, chemistry and immunological properties Microbiol. Rev. 42: 84-113.

22) May, L.J., Katelus, J., Henson P. and Dreisen R. 1983. The purification of circulating immune complexes in tuberculosis. Am. Rev. Res. Dis. 128:920-925.

23) Samuel A., Ashtekar M. and Gamatra R.D. 1984. Significance of circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis. Clin. Exp. Immunol. 58: 317-324.

24) Parra C., Montañó L.F., Huesca M., Rayón I., Willms K., and Goodasaid F. 1986. Inhibition of mitogenesis induced by phytohemagglutinin and Lens culinaris in adherent-cell supernatants treated with protein extract of Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 52 (1) 309-313.

25) Laemmli, V.K. 1970. Leavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. Nature (London)227:680-685.

- 26) Youmans G.P. Tuberculosis. W.B. Saunders Company. 1979.
- 27) Lederer, E., et. al. 1975. Cells walls of Mycobacterium and related organisms: chemistry and immunostimulant properties
- 28) Felipe Massó. Memorias Reunión de alumnos de Maestría y Doctorado. Facultad de MEDICINA. UNAM. 1985.
- 29) Ralph Van Furth, Marianne Van Schadewijk-Nieuwstad, Ine Elzenga-Classen, Cornelis Cornelisse, and Peter Nibbering. 1985. Morphological, Cytochemical, Functional, and Proliferative Characteristics of four Macrophage-like cell lines. *Celular Immunol.* 90: 339-357.
- 30) Mary W. Vermeulen and Gary R. Gray. 1984. Processing of Bacillus subtilis peptidoglycan by a Mouse macrophage cell line. *Infect. Immun.* 46(2) 476-483.
- 31) Emil R. Unanue, David I. Beller, Christopher Y. Lu, and Paul M. Allen. 1984. *Jour Immun.* 132(1). 1-5.
- 32) Paul M. Allen. David I. Beller. Jonathan Braun, and Emil R. Unanue. 1984. The handling of Listeria monocitogenes by macrophages The search for a immunogenic molecule in antigen presentation. *Jour. Immunol.* 132(1). 323-331.
- 33) J.D. Berman & D.M. Dwyer. 1981. Expression of Leishmania antigen on the surface membrane of infected human macrophages in vitro. *Clin. Exp. Med.* 44:342-348.
- 34) I.A. Abrahamsohn and J.K. Kloetzel. 1980. Presence of Trypanosoma cruzi antigen on the surface of both infected and uninfected cells in tissue culture. *Parasitology.* 80. Part. 1.147-152.
- 35) Emil R. Unanue and Paul M. Allen. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551-557
- 36) Emil R. Unanue M.D. and Jean Charles Cerottini M.D. 1970. The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *J. Exp. Med.* 131:711-725.
- 37) Jesús Calderón and Emil R. Unanue. 1974. The release of antigen molecule from macrophages: characterization of the phenomena. *J. Immunol.* 112 (5). 1804-1814.
- 38) Ratledge C. and Standford J. 1982. The biology of microbacteria. Physiology, identification and classification. Vol. 1. Academic Press Inc. (London) LTD.
- 39) Gold A.M. and Fahrney. 1963. The mechanism of reactivation of phenylmethane-sulfonyl-a-chemotrypsin. *Biochem. Biophys.*

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Res. Commun. 10:55-59.

40) Lowry, O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem 193: 265-275.

41) Unanue, E.R. et. al. 1972. Ad. Immunol. 15:95.

42) Unanue, E.R., B.A. Askonas. 1968. Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages. J. Exp. Med. 127: 915.

43) Cruchaud, A. and Unanue, E.R. 1971. J. Immunol. 107: 1329

44) Ziegler, K., and Emil R. Unanue. 1982. Decrease in macrophage antigen catabolism by ammonia and cloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. Proc. Natl. Acad. 79: :175.

45) S.N. Ranadive, Sudha Bhattacharya, M.K. Kale & A. 1986. Humoral immune response in tuberculosis: initial characterization by immunoprecipitation of ¹²⁵Iodine labelled antigens and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Clin. Exp. Immunol. 64 (2) 277-284.

46) Patricia M. Preston, P. D'Arcy Hart & I.N. Brown. 1977. Immunologically mediated macrophage aggregation in monolayers of peritoneal cells from BCG-sensitized mice.