

030.62⁵
2 eje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

INTERACION DE LAS PROTEINAS DE
Mycobacterium tuberculosis CON
MACROFAGOS ALVEOLARES

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Investigación
Biomédica Básica presenta:

B.E. Judith González Christen

Tesis Dirigida por el Dr Raúl Mancilla Jiménez

México

1994

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.

INTERACCION DE LAS PROTEINAS DE Mycobacterium tuberculosis
CON MACROFAGOS ALVEOLARES

Judith González Christen

RESUMEN

A pesar de la gran importancia que poseen en el establecimiento de la infección los mecanismos a través de los cuales el bacilo de la tuberculosis, el Mycobacterium tuberculosis, infecta a macrófagos han sido poco estudiados. En años recientes se han realizado varios esfuerzos para tratar de entender estos procesos.

Actualmente se sabe que el agente de la tuberculosis es fagocitado por medio de los receptores para complemento de tipo 1,3 y 4; así como del receptor para manosa, presentes en células fagocíticas. La unión a la célula por estos receptores no requiere necesariamente de la presencia de suero fresco, por lo que se ha propuesto que el bacilo posee en su superficie moléculas que reconocen a estos receptores.

En el Lab del Dr Raúl Mancilla se ha tenido interés en comprender la participación de los componentes micobacterianos en el proceso de fagocitosis, por lo que decidimos estudiar este proceso.

En esta tesis se presentan evidencias de que una proteína de pared del bacilo, con peso molecular de 71 kD y con afinidad por ATP, es reconocida por macrófagos alveolares de rata. También se demuestra que esta proteína soluble es capaz de competir por algún componente membranal del macrófago, e inhibir hasta en un 40% la adhesión de bacilos a macrófagos.

Un aspecto importante de esta tesis es que fue posible caracterizar una proteína como adhesina, utilizando el sistema biotina-estreptavidina para su detección, lo que permite tener un marcaje durable y evitar el uso de material radioactivo.

VoBo

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raúl Mancilla Jiménez', is written over a solid horizontal line.

Dr Raúl Mancilla Jiménez

Dpto de Inmunología

Inst Invest Biomédicas

U N A M

A MI ABUELA Y MIS PADRES

A MIS HERMANOS Y SUS FAMILIAS

Agradezco al Dr Raúl Mancilla su apoyo y asesoramiento durante el desarrollo de esta tesis. Sin la colaboración y el agradable ambiente creado por mis compañeros de laboratorio esta tesis hubiese sido difícil de concluirse, por lo que les agradezco su amistad a : Clara Espitia, Rafaela Espinoza, Rogelio Hernández, Ismael Rodríguez, Martha Elinos, Rafael Saavedra, Rosario Leyva y Germán Bernal.

Quiero agradecer también a los Drs Edmundo Lamoyi y Carlos Arámburu por sus comentarios y su apoyo. A mi jurado de tesis, los Drs Iris Estrada, Edgardo Zenteno, Lino Díaz y Enrique Ortega.

Finalmente quiero expresar mi más sincero agradecimiento a José Luis Montiel y el Dr Guillermo Mendoza por todo el apoyo que me han otorgado en los últimos años.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

I INTRODUCCION

- 1.1 Historia de la tuberculosis
- 1.2 Inmunoprofilaxis y tratamiento de la tuberculosis
- 1.3 Epidemiología
- 1.4 Patogenia de la tuberculosis
- 1.5 Fagocitosis
- 1.6 Estrategias de supervivencia desarrolladas por parásitos de células fagocíticas

2 OBJETIVOS

3 MATERIALES Y METODOS

- 3.1 Bacterias
- 3.2 Obtención de proteínas totales de medio de cultivo
- 3.3 Obtención de suero inmune de conejo
- 3.4 Purificación de una proteína de 71 kD por cromatografía de afinidad a ATP
- 3.5 Marcaje de proteínas con biotina
- 3.6 Animales de experimentación
- 3.7 Obtención de macrófagos alveolares de rata
- 3.8 Ensayos de adhesión de proteínas micobacterianas a macrófagos alveolares
- 3.9 Análisis de proteínas por EGPA-DSS
- 3.10 Transferencia de proteínas a papeles de nitrocelulosa
- 3.11 Adhesión de micobacterias a macrófagos
- 3.12 Efecto de las proteínas micobacterianas en la asociación del bacilo

- 3.13 Estimación de bacterias asociadas a macrófagos
- 3.14 Ensayos de fagocitosis de zimosán
- 3.15 Medición del estallido respiratorio en macrófagos con azul de tetrazolio
- 3.16 Análisis estadístico

4 RESULTADOS

- 4.1 Adhesión de proteínas micobacterianas a macrófagos alveolares de rata
- 4.2 Marcaje de proteínas micobacterianas con biotina
- 4.3 Adherencia de proteínas micobacterianas marcadas con biotina a macrófagos alveolares
- 4.4 Purificación de una proteína de 71 kD por cromatografía de afinidad a ATP
- 4.5 Ensayos de adhesión de p71 a macrófagos alveolares
- 4.6 Adhesión de bacilos a macrófagos alveolares
- 4.7 La preincubación de macrófagos con proteínas micobacterianas inhibe la adherencia del bacilo
- 4.8 La p71 inhibe la adherencia de bacilos a macrófagos

5 DISCUSION

6 CONCLUSIONES

7 BIBLIOGRAFIA

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ASB	Albúmina sérica bovina
ATZ	Azul de tetrazolio
ATP	Adenosín trifosfato
DSS	Dodecil Sulfato de sodio
EGPA- DSS	Electroforesis en geles en placa de acrilamida con dodecil sulfato de sodio
FNT	Factor de necrosis tumoral
INF -	Interferón gama
MA	Macrófagos alveolares
OMS	Organización mundial para la salud
PET	Proteinas de estrés térmico
PMC	Proteinas precipitadas del medio de cultivo de M. tuberculosis
PMC-B	PMC acopladas a biotina
RC	Receptor para complemento, tipo 1,2 etc
RIG	Receptor para inmunoglobulinas de tipo G,M,etc.
RM	Receptor para manosa
SFB	Suero fetal bovino
SIC	Suero inmune de conejo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SISTEMA B-A	sistema biotina avidina
SS	Secretaria de Salud
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos
SSAF-Az	SSAF con 0.02% de azida de sodio
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCION

I ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, un microbio intracelular facultativo, aerobio estricto, que posee la propiedad de ser ácido-alcohol resistente. Además del hombre no se conoce de un hospedero natural para el bacilo, si bien se ha logrado establecer la infección experimentalmente en una variedad de animales como ratones, cobayos, conejos y primates. La enfermedad se desarrolla principalmente en el pulmón, de donde puede, a veces, distribuirse a diversos órganos como son el sistema genitourinario, ganglios linfáticos, pleura, peritoneo y meninges. Las enfermedades extrapulmonares se desarrollan generalmente en niños o en adultos por reactivación de una lesión provocada por una infección anterior.

En fósiles humanos de la edad de piedra y momias egipcias se han encontrado rastros de lesiones tuberculosas (Willet, H., 1992). Aristóteles describió la enfermedad y desde esta época se encuentran referencias sobre su posible origen y tratamiento. El nombre de tuberculosis se le atribuye al médico francés F. Sylvius, quien en 1679, describió las lesiones pulmonares características de la enfermedad, llamándolas tubérculos (Bloom, B., 1992). A principios del siglo XIX R. Laennec estableció la relación entre las lesiones histológicas y el curso de la enfermedad. El carácter infeccioso de la enfermedad fue demostrado por J.A. Villemein en 1865, quien logró

transmitir la enfermedad humana a conejos inoculándoles esputo de pacientes . No fue sino hasta 1882 que R. Koch logró aislar al agente causal, estableciéndose así el origen bacteriano del padecimiento (Grange, J., 1982; Marchal, G., 1993).

1.2 IMUNOPROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

A principios del siglo XX los investigadores G. Calmette y C. Guérin lograron obtener una cepa atenuada del bacilo de la tuberculosis bovina, el *Mycobacterium bovis*, a la que se denominó Bacillus de Calmette - Guérin o BCG, la que probaron con fines profilácticos de 1908 a 1921 (Marchal, G., 1993). A partir de 1924 se extendió el uso del BCG como medio de prevención de la tuberculosis en Europa y en casi todo el mundo.

Los estudios epidemiológicos realizados por la OMS en la década de 1980 muestran que esta vacuna es eficaz en prevenir en un 80% las formas graves de la tuberculosis infantil (meníngea y miliar) y en un 60% la tuberculosis pulmonar (Sundre, P., 1992). Sin embargo la eficacia de esta vacuna para prevenir la tuberculosis pulmonar ha sido muy variable, ya que en algunas regiones se ha alcanzado hasta un 80% de protección, mientras que en otras regiones del mundo es del 0% (Fine, P., 1989). Aún no se ha establecido la causa de estas diferencias, aunque se ha propuesto que pueden ser debidas a interacciones entre la vacuna y otras especies de micobacterias, diferencias regionales del bacilo *M. tuberculosis*, diferencias nutricionales y genéticas entre la población vacunada, etc. Otro problema que presenta la vacunación con BCG está

apareciendo recientemente, al expandirse la epidemia del VIH, , ya que en algunos enfermos de SIDA la vacunación previa ha causado mayores problemas que beneficios (Quinn,T., 1989). Por estos motivos se ha concluido que la vacunación con BCG no previene la infección por otras micobacterias, sino que permite un control más rápido de las infecciones, con menor daño tisular y una disminución en la diseminación hematogena del bacilo (Smith,D., 1989).

En 1948 se empezaron a usar antibióticos para curar las enfermedades infecciosas, incluida la tuberculosis. La estreptomocina permitió un rápido mejoramiento de los pacientes por lo que a partir de estos años se observó un decremento en el número de muertes por tuberculosis a nivel mundial, pero la temprana aparición de cepas resistentes frenó este decremento e hizo necesaria la búsqueda de nuevos antifímicos. Actualmente la OMS recomienda un tratamiento con cuatro antibióticos para eliminar totalmente los bacilos en los pacientes y evitar la propagación de cepas resistentes, así como una reactivación posterior de la infección una vez suspendido el tratamiento (Memoranda WHO,1992).

El éxito de la vacunación como medio de prevención y la eficacia de los antibióticos hizo que de 1950 a 1980 la investigación sobre la tuberculosis se enfocaran más a la búsqueda de antifímicos y de una mejor vacuna, que a la comprensión de la bioquímica del bacilo y de las relaciones huésped-parásito por lo que, a pesar de ser una de las enfermedades más estudiadas, aún se desconocen muchos aspectos importantes del desarrollo de la infección .

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Actualmente la tuberculosis es un problema de salud mundial que no ha podido ser erradicado y, aún en países con buenos servicios sanitarios, la incidencia de la enfermedad aumenta cada año. En 1992 la OMS presentó un estudio con los datos proporcionados por 162 países, en el que se estima que un tercio de la población mundial (1700 millones de personas) es portadora del bacilo (Sundre, P., 1992).

Si bien ninguna región del mundo está libre de este padecimiento, existen grandes diferencias en la patogenicidad y distribución de la enfermedad entre países con una economía desarrollada y el resto del mundo. La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en Africa y el Sureste asiático, en donde es mayor de 260 por 100 000 habitantes, mientras que para Europa, Japón y Norteamérica es menor de 31 por 100 000 habitantes (Sundre, P., 1992, Memoranda WHO, 1992).

En los países no desarrollados la enfermedad se presenta en personas de todas las edades, aunque afecta principalmente a la población de 14 a 40 años de edad (Kochi, P., 1991). En los países desarrollados la distribución de la enfermedad, entre grupos de población de distintas edades, ha cambiado drásticamente desde que se extendió la epidemia por VIH. Un estudio realizado en los Estados Unidos de Norteamérica (Braun, M., 1993) muestra que hasta antes de 1985 la muerte por tuberculosis era mayor en personas de 50 a 79 años de edad, y que a partir de 1990 hubo un notable incremento en la población de 20 a 49 años de edad; este aumento pudo ser

asociado con el aumento en esta población de los casos de SIDA. La asociación entre el VIH y la tuberculosis también es diferente en las distintas regiones del mundo, así para el Africa subsahariana y el Sureste asiático la proporción de enfermos duales es casi del 50%, de los cuales más del 38% muere por tuberculosis; mientras que en Estados Unidos y Europa los enfermos duales son el 11%, y la mortalidad por tuberculosis es del 0.7% (Raviglione, M., 1992).

En 1990 la mortalidad mundial por tuberculosis fue de 2.9 millones de personas, el 90% en países con problemas económicos (Memoranda WHO, 1992). Los países del Sureste asiático y de la zona del Pacífico fueron los más afectados.

En México el informe presentado en 1992 por la Secretaría de Salud muestra que a partir de 1987 ha habido un aumento en los casos anuales de tuberculosis (S.S.A., 1992). En 1991 se notificaron 8 660 nuevos casos , lo que representa una incidencia del 9.9 por 100 000 habitantes. La mayoría de los enfermos tienen edades entre 15 y 60 años. El 98.3 % de los reportes son de tuberculosis pulmonar. Debido a los sistemas de registro utilizados se estima que hay un 40% de casos no se registrados (S.S.A, 1982).

Los datos anteriores muestran la necesidad urgente de controlar esta enfermedad, pues es la primera causa de muerte mundial provocada por una sola bacteria. Si bien el costo del tratamiento antifímico no es alto tiene el problema de que es difícil aplicarlo a grandes poblaciones y zonas rurales (Sundre, P., 1992), y muchas veces el tratamiento se abandona antes de que la bacteria haya sido erradicada del paciente, por lo que surgen nuevas reinfecciones.

1.4 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS

Diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que tanto la inmunidad protectora, así como las lesiones pulmonares, dependen de la respuesta inmune celular. En este proceso los macrófagos son las células efectoras y los linfocitos T las células mediadoras. Se ha demostrado la importancia que tienen los linfocitos T CD4+ que median la activación de macrófagos por las linfoquinas que producen, principalmente interferón y el factor de necrosis tumoral, (Murphy, S., 1983; Wadee, A., 1987; Berschin, A., 1991; Kaufmann, E., 1993). Recientemente se ha considerado que también es importante la participación de las células T CD8+ (Kaufmann, E., 1988 y 1989), así como otros factores como el calcitreol que potencia los efectos del IFN γ (Denis, M., 1991a y b). La respuesta inmune humoral puede ser muy alta en pacientes con tuberculosis aunque, como en el caso de otras infecciones intracelulares, parece no conferir protección (Reggiardo, Z., 1974).

De acuerdo con Dannenberg (Dannenberg, A., 1989), el proceso que siguen los enfermos desde el momento en que inhalan los bacilos hasta el desenlace final, ya sea el control de la infección o la muerte del paciente, puede ser dividido en cuatro etapas, en las que participan distintos componentes del sistema inmunológico:

- 1) La primera etapa se inicia con la colonización tisular de bacilos inhalados que logran adherirse a las paredes alveolares y son fagocitados por macrófagos. Si los macrófagos que invaden están activados por estímulos anteriores los bacilos son destruidos y la

infección no progresa. En caso de invadir macrófagos no activados el bacilo encuentra un nicho favorable para su desarrollo, replicándose en ellos y provocando, finalmente, la muerte de las células fagocíticas y su liberación hacia el espacio extracelular, donde son ingeridos por nuevos macrófagos. En esta etapa existe un equilibrio entre los bacilos que son destruidos por células competentes y los que logran reproducirse, por lo que no se observa un incremento en el número de bacilos y no hay enfermedad aparente (Dannenberga, 1991; Willet, H., 1992).

2) La segunda etapa se le conoce como fase simbiótica. Es una lucha de los macrófagos alveolares y monocitos sanguíneos por controlar la infección, sin la participación de otros tipos celulares, por lo que no se detectan mediadores de la respuesta inmune celular, como son reacciones de hipersensibilidad retardada ni centros caseosos. Por primera vez se observa un incremento en el número bacilar, que se desarrollan primordialmente en macrófagos, atraídos a las lesiones por factores quimiotácticos liberados por las células muertas. En algunos casos las células que llegan a la lesión se encuentran activadas y son capaces de eliminar al invasor, por lo que la lesión no progresa. En caso de que estas células no limiten la infección comienzan a llegar a la zona de lesión células T y forman granulomas junto con macrófagos activados (Dannenberga, 1991).

3) En esta etapa ya hay un establecimiento de granulomas, formados por células mononucleares y linfocitos T CD4+ y CD8+. Los macrófagos maduros se transforman en células gigantes multinucleadas, las cuales pueden contener a los bacilos de Koch. En

los granulomas predominan los linfocitos T CD4+, los cuales inducen actividades tuberculostáticas en los monocitos por medio del INF τ , probablemente en cooperación con el FNT y la 1,25 dihidroxivitamina D3 (Kaufmann, S., 1993). Los granulomas se encuentran rodeados por linfocitos T CD8+ que, junto con los CD4+, pueden lisar a los macrófagos infectados, lo que provoca una lesión conocida como centro caseoso, que se reconoce por ser una zona amorfa rodeada de macrófagos y linfocitos T. En el interior de esta lesión se encuentran bacilos libres que no pueden reproducirse, pero que permanecen en estado latente durante años. En caso de que la respuesta inmune celular del hospedero se vea disminuida (por envejecimiento, malnutrición, infección por VIH, etc) de estos centros se liberan bacterias que pueden colonizar nuevas regiones pulmonares o nuevos tejidos. En esta etapa es posible detectar respuesta de hipersensibilidad retardada, pues la respuesta inmune celular se encuentra bien establecida.

4) La etapa terminal se presenta cuando el hospedero es incapaz de controlar el crecimiento de los bacilos, y la misma respuesta inmune que ha montado favorece la licuefacción de los centros caseosos convirtiéndose, entonces, en un medio idóneo para el desarrollo de los bacilos por lo que se observa, por primera vez, el crecimiento de bacterias en un medio extracelular. De estas lesiones se liberan bacilos que provocan la destrucción total del pulmón y son capaces de establecer la infección generalizada o miliar.

1.5 FAGOCITOSIS

El estudio de las lesiones tisulares observadas en la tuberculosis, ha permitido establecer la importancia de los macrófagos en el control de la enfermedad, por lo que en este capítulo describiré los mecanismos generales de fagocitosis.

Todas las células son capaces de endocitar, proceso que consiste en la introducción de componentes del medio externo a la célula, por medio de vacuolas. En mamíferos sólo unos cuantos tipos celulares están capacitados para interiorizar partículas mayores de 1µm, proceso llamado fagocitosis; mientras que los otros tipos celulares sólo captan partículas de menor tamaño, o sustancias disueltas en el medio, proceso conocido como pinocitosis. Ambos procesos requieren de un recambio membranal constante y de gasto de energía por la célula.

Las células fagocíticas profesionales pertenecen a dos grupos celulares: Los fagocitos mononucleares (monocitos sanguíneos y macrófagos), y los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Ambos grupos se originan de una célula progenitora en la médula ósea. Los polimorfonucleares emergen de la médula ósea como células maduras, circulan un tiempo corto en sangre y se establecen en diversos tejidos. Los monocitos provienen de monoblastos que son liberados a la circulación sanguínea, posteriormente alguna de estas células se extravasan en diversos tejidos y dan origen a la población de macrófagos tisulares, que, dependiendo del tejido donde residan, tienen distintos nombres (Giraudet, P., 1984; Holtzman, E., 1989). Los distintos tipos de

macrófagos no se distinguen morfológicamente entre sí, pero cada una de ellos presenta diferencias bioquímicas que les permiten mantenerse en cada tejido y realizar funciones diversas.

En el pulmón se reconocen tres tipos de células mononucleares, los monocitos sanguíneos, los macrófagos intersticiales y los macrófagos alveolares, los cuales pueden ser considerados como un mismo tipo celular en tres estadios de maduración, siendo los macrófagos alveolares las células terminales (Blussé van Oud Alblas, A. 1979). Los monocitos sanguíneos se localizan en las estructuras vasculares del pulmón, y están en flujo continuo entre la sangre y el tejido intersticial. Los macrófagos intersticiales se originan de monocitos que colonizan esta región y sufren modificaciones bioquímicas y funcionales para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales de este tejido, en el que existe una mayor tensión de oxígeno y se encuentra en mayor contacto con el exterior corporal (Oren, R., 1963; Bowden, D., 1972), estos cambios son: utilización de la fosforilación oxidativa en lugar de la glucólisis anaeróbica (Murphy, S., 1983), mayor capacidad para responder a estímulos tales como complejos inmunes (Warren, J., 1987), cambio en el número y tipo de receptores de membrana (Daughday, C., 1976) y la aparición de una peroxidasa endógena propia de esta población (De Mendez, I., 1991). Estas células aún son capaces de replicarse, por lo que se les atribuye un papel importante para mantener la población basal de células fagocíticas, aunque parecen no contribuir importantemente en la población de células presentes en las lesiones inflamatorias (Blussé van Oud Alblas, A., 1983). Los fagocitos intersticiales migran al espacio aéreo del pulmón, instalándose en

la pared alveolar, donde finalizan los cambios bioquímicos y dan origen a los macrófagos alveolares, que son células terminales con algunas diferencias respecto a monocitos y otros tipos de macrófagos tisulares, por ejemplo la utilización de la glucólisis oxidativa, mayor cantidad de enzimas lisosomales (Myrvik, Q., 1968; Turina, B., 1988), mayor capacidad de fagocitosis no específica, los eventos fagocíticos parecen ser diferentes (Bisal, C., 1991), así como en el número y tipo de receptores de membrana.

La fagocitosis es un componente principal de la actividad defensiva de los vertebrados, a través de células especializadas, que eliminan moléculas y microorganismos tóxicos para el organismo. Se trata de una forma especial de endocitosis en la cual partículas mayores de 1µm son interiorizadas en vesículas y posteriormente degradadas. Este proceso requiere de la participación del citoesqueleto, es inhibido por citocalasina D o temperaturas menores de 18°C y requiere de gasto energético por la célula (Silverstein, C., 1989; Ravetch, J., 1990).

El proceso fagocítico puede ser descrito como una serie de eventos continuos, detallados a continuación:

- 1) La partícula a fagocitar se adhiere fuertemente a la superficie del fagocito y genera una señal que promueve los mecanismos fagocíticos.

- 2) La membrana del fagocito, junto con el citoplasma inmediato, se extienden alrededor de la partícula formando un pseudópodo que, finalmente, se fusiona en el extremo distal de la partícula, la cual queda englobada en una vacuola, llamada fagosoma (Stossel, T., 1974).

3) Dentro de la célula el fagosoma se desplaza hacia el núcleo, mientras que los lisosomas son dirigidos hacia el fagosoma, para finalmente encontrarse y fusionarse, formando el fagolisosoma. En el interior de esta vesícula se liberan enzimas degradativas, lactoferrina y otros agentes para digerir y destruir el contenido. También se observa un brusco descenso en el pH por la generación de H^+ .

4) El material utilizable es captado por la célula o bien permanece dentro de cuerpos inertes. La membrana celular es reconstituida reincorporando los receptores utilizados en la fagocitosis a la superficie celular.

La unión a la superficie celular es un evento clave en el desarrollo de este proceso, ya que puede existir la adhesión de partículas a fagocitos sin halla interiorización, pero no es posible observar fagocitosis sin unión. La adhesión a la superficie celular puede ser a través de diversos mecanismos, como son:

1) Mecanismos físicoquímicos, que pueden ser del tipo de atracciones de van der Waals, una atracción hidrofóbica o, raramente, una atracción electrostática (van Oss, C., 1986). En soluciones acuosas y en medios que contienen proteínas plasmáticas las partículas más hidrofóbicas son las más fagocitadas, en el primer caso debido a las interacciones de tipo van der Waals, y en el segundo por la adsorción de proteínas que favorecen el reconocimiento por fagocitos.

2) Mediada por receptores presentes en la célula fagocítica, tales como el receptor para inmunoglobulinas (Unkeless, J., 1988), el receptor para moléculas del complemento (Silverstein, C., 1989); o

para azúcares como el receptor para manosa (Sthal, P., 1980). Existen diversos ejemplos de este mecanismo, desde la unión de complejos inmunes hasta la adhesión de organismos complejos como protozoarios y hongos.

3) A través de moléculas que algunos microorganismos han desarrollado para adherirse a estas células, tales como azúcares y lectinas (Sharon, N., 1984), proteínas (Isberg, 1987) y otros componentes más complejos (Russell, D., 1989; Talamás-Rohana, P., 1990).

Las consecuencias metabólicas de la fagocitosis son :

1) Un aumento en el metabolismo oxidativo (Stossel, T., 1974), con la producción de productos reactivos del oxígeno, tales como peróxido de hidrógeno y el singlete de oxígeno (Babior, B., 1984)

2) Liberación de hidrolasas y otros compuestos defensivos como son la producción de óxido nítrico (Stuehr, D., 1989; Adams, L. 1990), metabolitos del ácido araquidónico, defensinas (Lehrer, R., 1993), etc.

3) Generación de segundos mensajeros tales como nucleótidos cíclicos y fosfatidil inositol (Silverstein, C., 1989). Además se incrementa el gasto de ATP (Schmid, S., 1990).

1.6 ESTRATEGIAS DE SOBREVIVENCIA DESARROLLADOS POR PARASITOS DE CELULAS FAGOCITICAS

Algunos parásitos intracelulares se han adaptado a la vida dentro de las células fagocíticas, evadiendo los mecanismos destructivos con que cuentan estas células. Existen diversas estrategias con las que los parásitos evitan la destrucción intracelular, las más comunes son:

1) Invasión de las células a través de receptores que no estimulen el estallido respiratorio, como es por medio de los receptores para complemento, los cuales, cuando son estimulados, permiten la fagocitosis sin que se observen las consecuencias metabólicas antes descritas (Wright, S., 1983; Yamamoto, K., 1984). Ejemplos de este mecanismo los encontramos en *Leishmania* sp (Russell, D., 1989), *Mycobacterium* (Schlesinger, L., 1990a y 1990 b), *Legionella pneumophila* (Payne, N., 1987), *Listeria monocytogenes* (Drevets, D., 1991), entre otros.

2) Inhibición de la fusión fagolisosomal. Al igual que otros mecanismos diversos organismos han desarrollado esta estrategia, como son *M. tuberculosis* (Armstrong, J., 1975), *M. leprae* (Fréhel, C., 1987), *Chlamydia psittaci* (Friss, R., 1972), *Legionella pneumophila* (Horwitz, M 1983) y *Toxoplasma gondii* (Jones, T., 1972).

3) Resistencia a enzimas lisosomales, en la que los parásitos pueden presentar una superficie resistente a enzimas degradativas, liberación de factores que inhiban a estas enzimas o el aumento del pH que impida la activación de las enzimas lisosomales. Ejemplos de este mecanismo lo encontramos en los miembros del género *Leishmania*, en *Yersinia pestis* y *Salmonella typhimurium* (Moulder, J., 1985). También en esta categoría estarían las adaptaciones que algunas bacterias han desarrollado para sobrevivir al estrés oxidativo de

estas células, como *P. aeruginosa* (Hasset, D., 1989) y micobacterias (Chan, J., 1991).

4) Escape hacia el citoplasma antes de que la fusión con el lisosoma se realice. En este caso tenemos como ejemplo a *T. cruzi* y algunas Riketsias (Moulder, J., 1985). Este mecanismo ha propuesto también para *M. tuberculosis* (Myrvik, Q., 1984).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es el de identificar componentes proteicos del bacilo de la tuberculosis que participen en la adherencia y fagocitosis por macrófagos alveolares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarización de un método no radioactivo para identificar proteínas micobacterianas que interaccionen con macrófagos.
2. Caracterización y purificación de proteínas micobacterianas capaces de unirse a macrófagos alveolares .
3. Analizar la participación de estas proteínas en el proceso de fagocitosis del bacilo por macrófagos alveolares.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 BACTERIAS

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se obtuvo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. El bacilo se cultivó en el medio líquido sintético de Proskauer y Beck modificado por Youmans (Youmans, G., 1946). Las bacterias se cultivaron a 37°C, sin agitación, durante 6 - 8 semanas. La masa bacteriana se separó por decantación y se resuspendió en SSAF con 2% de azida de sodio, se radiaron por 30 min con U.V. y se incubaron una noche con esta solución, con el fin de obtener suspensiones unicelulares las bacterias se lavaron con SSAF, se les agregó 0.01% de Tween 80, se agitaron en vórtex con perlas de vidrio y se lavaron. Los cúmulos bacterianos se digregaron totalmente al a sonicar 80W por tres periodos de 10 seg, dejando 1 min entre cada uno. El número de bacterias por ml se estableció por cuentas en frotis teñidos con Zihels- Neelsen de diluciones de la muestra original.

3.2 OBTENCION DE PROTEINAS TOTALES DEL MEDIO DE CULTIVO

(PMC)

Se cultivaron las bacterias como en el inciso anterior. El medio se filtró a través de un filtro Whatman N°3, después a través de filtros Millipore con poros de 1.2, 0.45 y 0.22 μm . Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 73%, a 4°C, se centrifugó a 10 000g, durante 30 min. El precipitado se resuspendió en SSAF, con

5mM de PMSF. Se dializó exhaustivamente contra SSAF, se almacenó el material en alicuotas a - 20 °C. La concentración proteica se determinó por el método de Lowry (Lowry, D., 1951), usando ASB como patrón. La composición del material precipitado se analizó por electroforesis en geles en placa de poliacrilamida, con dodecil sulfato de sodio y en condiciones desnaturalizantes (EGPA-DSS), según el sistema discontinuo de amortiguadores de Laemmli (Laemmli, U., 1970). Los geles se tiñeron azul Coomasie (Azul Coomasie Brillante, R, 0.03% en metanol 30%, ácido acético 10%).

3.3 OBTENCION DE SUERO INMUNE DE CONEJO CONTRA PMC

Se inyectaron a dos conejos blanco Nueva Zelanda, de 3 meses de edad, cada uno con 6.5 mg de bacilos H37Rv muertos por calor, 3mg de PMC, mezcladas con adyuvante incompleto de Freund, por vía subcutánea, en seis puntos distintos de la espalda . A los quince días y al mes los animales recibieron un refuerzo intramuscular con las bacterias y PMC en SSAF. Se sangraron los animales, se obtuvo el suero y se almacenó en alicuotas a -70°C.

3.4 PURIFICACION DE UNA PROTEINA DE 71KD DEL MEDIO DE CULTIVO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN UNA COLUMNA DE ADENOSIN TRIFOSFATO (ATP).

La obtención de una proteína de peso molecular de 71kD, fue realizada de acuerdo al protocolo usado por Young, por afinidad a ATP, (Young, D., 1989). Las proteínas de medio de cultivo se

dializaron contra un amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 7.5, 20 mM de NaCl, 1mM EDTA.4Na y 15 mM de 2 β -mercaptoetanol (Amortiguador 1). 6mg de estas proteínas se corrieron a través de una columna, de 5ml, de ATP unida por el carbono 8 a 4% de agarosa espaciadora de 6 carbonos (Sigma, Co), equilibrada en el amortiguador 1. Se lavó con 5 volúmenes de este amortiguador, posteriormente se lavó con el mismo amortiguador más 50mM de NaCl. La proteína se eluyó de la columna con el amortiguador 1 más 3 mM de ATP (Sal disódica, Sigma.), se recolectaron 20 ml una vez que se registra la aparición de ATP por absorbancia a 280 nm. Este volumen se dializó contra agua, se concentró por presión negativa en Amicón (Amicon-Diaflo, pm-10), se liofilizó en Speed-Vac Concentrator (Savant, USA). Se cuantificó la concentración de proteína por el microensayo de Bradford, utilizando los reactivos de BioRad. La homogeneidad de la proteína se analizó por EGPA_DSS teñida con azul Coomassie, y por electrotransferencia a papel de nitrocelulosa con el suero inmune de conejo.

3.5 MARCAJE DE PROTEINAS CON BIOTINA

El acoplamiento del éster de biotina (éster biotinil-acido aminocapróico-hidroxisuxinimida) (Sigma) a proteínas se realizó siguiendo el proceso de Anderson (Anderson, L., 1984). Las proteínas se dializaron contra carbonato de sodio 0.1M pH 8.0, toda la noche a 4°C, posteriormente se incubaron con el éster de biotina (disuelto en dimetil sulfóxido 50mg/ml), en una relación de 1:5 p/p de biotina/proteína, en agitación suave, durante 2H a 37°C. La

reacción se detuvo con 0.1M de cloruro de amonio. Se dializó contra agua y posteriormente contra SSAF con 0.2% de azida de sodio. Se almacenaron a 4°C. El análisis del marcaje se realizó por la separación de las proteínas por EGPA-DSS y transferencia a nitrocelulosa, con estreptavidina-peroxidasa (Zimed), 1:1 500. La actividad de peroxidasa se reveló con ortocloronaftol y peróxido de hidrógeno, en SSAF.

3.6 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas machos Wistar de 6 a 8 semanas de edad, con pesos de 250-350g. Dichos animales fueron alimentados y mantenidos bajo condiciones modelo en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Ninguno tuvo lesiones o signos de enfermedad aparentes.

3.7 OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE RATA

Se obtuvieron macrófagos alveolares de rata macho, Wistar de 250-350 g de peso, por lavados bronquiales con SSAF, según la técnica de Brian (Brian, J., 1968 y 1973). Los animales fueron anestesiados con anestésal, se sangraron cortándoles las venas axilares y la cava. La tráquea se canalizó con un catéter conectado a una jeringa de 10 ml. A cada animal se le hicieron 10 lavados de 10 ml cada uno, con SSAF, el tiempo entre la inyección del medio y la recolección en cada lavado fue de 3 min. El lavado se centrifugó a 500 g por 15 minutos, las células se lavaron dos veces con SSAF.

En caso de haber contaminación con eritrocitos, estos se eliminaron por lisis con cloruro de amonio . El número de células y la viabilidad se determinó por la exclusión de azul de tripano al 0.2%, contadas en cámaras de Neubauer. Sólo se utilizaron muestras con viabilidad mayor del 90%. En los primeros ensayos se hicieron tinciones de hematoxilina-eosina para analizar la contaminación con otros tipos celulares.

3.8 ENSAYO DE ADHESION DE PROTEINAS MICOBACTERIANAS A MACROFAGOS ALVEOLARES

Para analizar la posible participación como molécula de adherencia de algún componente proteico de M. tuberculosis, se diseñó un modelo experimental para favorecer la unión de este componente a las células alveolares, sin que hubiese la interiorización y procesamiento de ésta por el macrófago. En la figura 1 presento el protocolo general de estos ensayos.

Las células alveolares de rata en suspensión se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células por ml, y los ensayos se hicieron con 0.5ml de células, a las que se les inhibió la endocitosis al incubarlas a 4°C o al agregárseles 0.02% azida de sodio SSAF(SSAF-Az), posteriormente se adicionaron las proteínas micobacterianas y se ajustó el volumen final a 1 ml. Se incubaron a 37°C con agitación suave, con intercambio libre de gases. Las células se lavaron, al menos 4 veces, con SSAF fría, a 4°C, por centrifugación a 500g. Se determinó la viabilidad y el paquete celular con 500 000 células (aproximadamente 300µg de proteína) se disolvió en 200µl de

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES POR LAVADO BRONQUIAL

(ratas jóvenes Wistar macho)

INHIBICION DE LA ENDOCITOSIS

(a 4 °C o a 37 °C con azida de sodio)

INCUBACION CON PROTEINAS DE M. tuberculosis

(sin marcar o acopladas a biotina)

ANALISIS EN EGPA- DSS

TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA

SIC - Prot A PEROXIDASA

ESTREPTAVIDINA PEROXIDASA

FIGURA 1

amortiguador de Tris-HCl 0.5M, pH 6.8, EDTA 1mM, 1% glicerol, 1% DSS y 15 mM β mercaptoetanol; inmediatamente se hirvieron a baño de María durante 5 min. Esta mezcla fue separada en EGPA-DSS al 10%, y transferida a papeles de nitrocelulosa.

En los ensayos en los cuales las proteínas micobacterianas no fueron marcadas con biotina, después de la incubación de los macrófagos con las proteínas, y de la transferencia a nitrocelulosa, los papeles fueron incubados con suero inmune contra las PTC, el suero se diluyó 1:200, y posteriormente se incubaron con proteína-A peroxidasa (Sigma) diluida 1:1 500. La actividad enzimática se demostró con ortocloronaftol y peróxido de hidrógeno.

Posteriormente se trabajó con las proteínas acopladas a biotina, para lo cual los papeles de nitrocelulosa con las células transferidas, fueron incubados con estreptavidina-peroxidasa (Zymed) 1:1 500. Se utilizó el mismo sistema para revelar la presencia de peroxidasa.

Con el fin de impedir la endocitosis de las células se hicieron los ensayos en baño de hielo, a 4°C, o bien a 37°C pero agregándosele al medio de incubación 0.02% de azida de sodio. Después de la incubación las células fueron lavadas por centrifugación a 500g, con SSAF enfriada a 4°C, por lo menos tres veces.

Los primeros ensayos de incubación se realizaron con solución salina fisiológica (NaCl 0.14M). Posteriormente se probó un medio con mayor capacidad de amortiguamiento de pH, solución salina de Hank (Gibco). Finalmente se trabajó con medio RPMI-1640, suplementado con 0.1 mM L-glutamina, 0.01 mM de aminoácidos no

esenciales y 1% de estreptomocina-penicilina (Todos estos reactivos fueron de GIBCO), en caso de requerirse el medio se suplementó con 10% de suero fetal bovino, con factores del complemento inactivados por calentamiento durante 30 min a 56°C.

También se varió la concentración de proteína por millón de células en la incubación, realizándose ensayos con concentraciones de 0,50, 100, 200 y 400 µg de PTC, ajustándose el volumen final de incubación a 1 ml en SSAF. En otro experimento se investigó la influencia del tiempo de incubación de las proteínas con las células, ensayándose tiempos de 0,15, 30 y 60 min.

Después de cada ensayo se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano.

3.9 ANALISIS DE PROTEINAS POR ELECTROFORESIS EN GELES EN PLACA DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (EGPA-DSS).

El análisis de las proteínas estudiadas en este trabajo fue realizado en geles de poliacrilamida, tanto para determinar su pureza como para calcular el peso molecular, utilizando siempre condiciones desnaturizantes y reductoras. Se trabajó con el sistema discontinuo de amortiguadores de Laemmli (Laemmli, U, 1970), en geles al 10% de acrilamida para la resolución de proteínas en Tris-HCl 375mM, pH 8.8. El gel concentrador fue preparado con 3% de acrilamida en Tris-HCl 125 mM, pH 6.8. Ambos geles contenían 0.01% DSS y fueron polimerizados con 0.05 % de persulfato de amonio, y 0.005% de TEMED. Las proteínas a analizar fueron diluidas en Tris-

HCl 125mM, pH 6.8, 0.1% DSS, 0.1% glicerol, 0.01% 2-mercaptoetanol y 0.01% de pironina Y. Se calentaron en baño de María por 5 min, antes de aplicar al gel. Se utilizaron geles de dos tamaños, los de 14 cm de largo, con un grosor de 0.75 mm, fueron corridos a 100 V por una hora y a 200 V hasta que el frente estuvo a 1 cm de finalizar el gel (aproximadamente de 2 a 3 h), durante todo este proceso se utilizó un refrigerante con reciclamiento de agua. También se utilizó el sistema de mini geles BioRad II, con tamaños 8 cm de largo y 0.75mm de grosor, se corrieron a 200V durante 50 min. El amortiguador de corrida fue de Tris-Glicina-DSS. Posteriormente los geles fueron teñidos con azul Coomassie, o incubados en amortiguador de transferencia frío.

3.10 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A PAPEL DE NITROCELULOSA

Se utilizó el método descrito por Towbin (Towbin, H., 1979) para la electrotransferencia de proteínas separadas en EGPA-DSS, utilizando una cámara Idea Sci (Corvallis, USA). Como soporte de las proteínas se utilizó papel de nitrocelulosa de poro de 45µ (BioRad). El medio de transferencia fue Tris, Glicina y 20% de metanol. Los geles de 14 cm y 0.75 mm de grosor se transfirieron durante 1 H a 0.95A. Los geles de 8 cm y 0.75cm de grosor se transfirieron por 30 min a 0.95A.

Posteriormente los papeles fueron incubados con 3% de leche descremada (Svelty, Nestlé), en SSAF con 0.3% de Tween 20, durante 16 horas, a 4°C, para bloquear los grupos reactivos de la nitrocelulosa.

3.11 FAGOCITOSIS DE MICOBACTERIAS

Las células de lavado alveolar se ajustaron a 1×10^6 células por ml en SSF, se colocaron 250 μ l en cada pozo de una caja de cultivo de 24 pozos (Costar), que contenían cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro, (Fisher). Se incubó por 30 min a 37°C, con 5% de CO₂, las células no adherentes se lavaron con SSAF, suavemente, y se agregó 0.5ml de medio DMEM con 15% de SFB. Las células se incubaron 36 horas antes de iniciar el ensayo de fagocitosis. Se calculó que 200×10^3 células quedaron adheridas a cada cubreobjetos.

Las bacterias disgregadas se ajustaron a 10×10^7 células por ml en medio DMEM-15% SFB. El medio de las cajas de cultivo se retiró y se adicionó 0.9 ml de medio nuevo, luego se agregó 0.1ml de bacterias, quedando una relación células/bacterias de 1:50, se incubaron por 30 min con agitación suave, periódica. Finalmente se incubaron por 2, 4 y 8 horas a 37°C, con 5% de CO₂ sin agitación. Al final de cada periodo cada pozo se lavó 5 veces con SSAF fría, y los cubreobjetos se procesaron para análisis microscópico.

3.12 EFECTO DE LAS PROTEINAS MICOBACTERIANAS EN LA FAGOCITOSIS DE BACILOS .

Para el análisis del efecto de las proteínas micobacterianas en el fenómeno de fagocitosis, se retiró el medio de los pozos y se colocaron 0.1 ml de las proteínas en SSAF, calculando que la concentración final fuera de 50, 100, 200, 400 y 800 μ g de proteína

por ml, cuando se ensayó el efecto de PMC y de albúmina, y de 10 y 20 µg por ml para p70. Se incubaron las cajas a 37°C, con 5% de CO₂, sin agitación, por 30 min. Se agregó 0.8 ml de medio DMEM-15%SFB y 0.1 ml de bacterias disgregadas, nuevamente se incubaron en las mismas condiciones por 4 h más. Los pozos se lavaron 5 veces con SSAF fría y se procesaron para la determinación de bacterias asociadas a macrófagos.

3.13 ESTIMACION DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS A MACROFAGOS

Los cubreobjetos con las células se lavaron con etanol, se dejaron secar y las células se fijaron con acetona durante 5 min. Se tiñeron con la técnica de Ziehl - Neelsen para la determinación de bacilos ácido-alcohol resistentes. Los cubreobjetos se sumergieron en fucsina fenicada, se calentaron a 65°C durante 30 min, se lavaron con agua, se decoloraron con alcohol-ácido (Etanol al 95%, 3% de ácido clorhídrico), se lavaron con agua, se contratificaron con azul de metileno, se lavaron con agua, etanol 96% y se secaron. Se montaron en portaobjetos con resina Entelan (Merk). De cada cubreobjeto se contaron 100-200 células al azar, con el objetivo de 100X, en inmersión. Se determinó el número de células que tenían asociada al menos una bacteria, así como el número de bacterias en cada célula. La primera determinación fue para saber el porcentaje de células con bacterias asociadas, y el segundo para obtener el promedio de bacterias en células fagocíticas.

3.14 ENSAYOS DE FAGOCITOSIS DE ZIMOSAN

10 mg de zimosán (Sigma) se hirvieron por 30 min en SSAF, se lavaron 3 veces en la misma solución y se resuspendieron en 8 ml de SSAF, se agregaron 2 ml de suero fresco de rata, se incubaron a 37 °C durante 20 min. El zimosán se lavaron dos veces con SSAF y finalmente se resuspendieron en DMEM-15% SFB, se almacenaron en alícuotas a -70 °C. A cada pozo con células se le agregó 0.1 ml de zimosan y 0.9 ml de medio de cultivo . Se permitió la fagocitosis por 4 h, incubando las cajas a 37°C, con 5% de CO₂. Los pozos se lavaron con SSF, las células se fijaron con acetona por 5 min y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se montaron en cubreobjetos con Entelán y se contaron 100-200 células, para determinar el número de células asociadas con zimosán.

3.15 MEDICION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO EN MACROFAGOS CON AZUL DE TETRAZOLIO

Se disolvieron 4 mg de Azul de tetrazolio (Sigma) en 10 ml de SSAF , se filtraron por 0.22 µm y se mezclaron con un volumen igual de zimosán tratado como en el inciso anterior. A cada pozo se le agregó 1 ml de esta mezcla, se incubaron 4 horas, se lavaron con SSAF, se fijaron con acetona y se montaron para contar las células. se consideraron positivas las células teñidas de azul intenso.

En algunos ensayos se preincubaron las células con 50nM de Forbol Miriacetato por 30 min, antes de adicionar la mezcla con azul de Tetrazolio.

Para estudiar el efecto de las proteínas micobacterianas en la fagocitosis de zimósán (Z) y en la producción de estallido respiratorio, las células se preincubaron con las proteínas seleccionadas por media hora, como en el ensayo de fagocitosis de micobacterias, y posteriormente se agregó el zimósán o la mezcla de Z-ATZ. Se procesaron igual que las células anteriores.

3.16 ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar diferencia estadística entre dos tratamientos se utilizó la prueba de dos colas aplicando la t de Student, con probabilidades de 0.05 y 0.01. Cada ensayo de fagocitosis se repitió al menos 3 veces.

En los ensayos para determinar diferencias por la presencia de albúmina o PTC se utilizó la prueba de análisis de varianza, ANOVA con F de 0.05 y 0.01.

4 RESULTADOS

4.1 ADHESION DE PROTEINAS MICOBACTERIANAS A MACROFAGOS ALVEOLARES DE RATA

La primera parte del trabajo se enfocó a encontrar el sistema adecuado para detectar la adhesión de proteínas micobacterianas a macrófagos alveolares, utilizando técnicas que no requiriesen el marcaje con material radioactivo. Inicialmente se trabajó con suero inmune de conejo para detectar las proteínas bacterianas.

4.1.1 INMUNOMICITOQUIMICA

Se realizaron ensayos de localización de proteínas micobacterianas, incubando 1×10^6 macrófagos alveolares de rata con 200 y 400 μg de PTC, después se incubaron con suero inmune de rata acoplado a biotina y con avidina-fluoresceína. El análisis de estas células en el microscopio nos permitió observar claramente la adherencia de estas proteínas a la superficie de los macrófagos, por lo que decidimos 400 μg de proteína era una dosis conveniente para determinar el peso de las proteínas reconocidas en los macrófagos por el suero inmune.

4.1.2 IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS MICOBACTERIANAS ADHERIDAS A MACROFAGOS POR INMUNOBLOT.

Después de la incubación con 400 μg de PMC, por 1 y 2 horas a 4°C , para evitar la endocitosis de estas proteínas, las células solubilizadas en coctel de corrida fueron separadas en geles de poliacrilamida y transferidas a

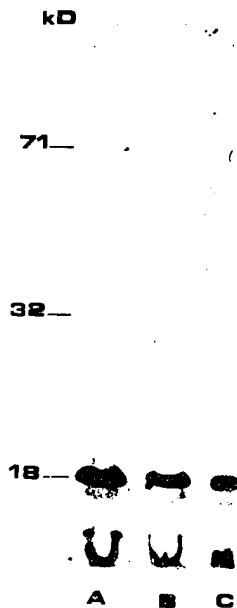


FIGURA 2 Ensayo en el que se demuestra la unión de proteínas de PMC sin marcar, a macrófagos alveolares. Carril A MA incubados por 2 h. Carril B MA incubados 1 h. Carril C MA incubados sin PMC. El sistema de detección fue SIC- Proteína A peroxidasa.

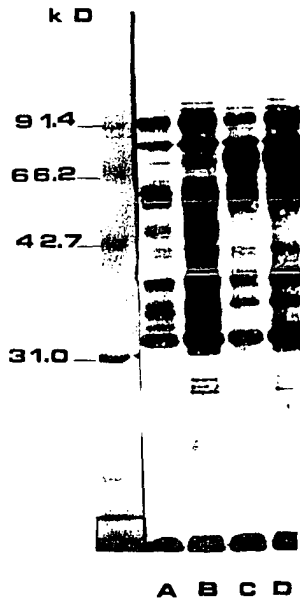


FIGURA 3 Comparación de las PMC detectadas con SIC o marcadas con biotina y detectadas con estreptavidina- peroxidasa. Carril A 15 μ g de PMC. Carril B 30 μ g de PMC. Carril C 20 μ g de PMC-B. Carril D 20 μ g de PMC- B.

nitrocelulosa. Para identificar las proteínas de origen micobacteriano los papeles de nitrocelulosa fueron incubados con suero inmune y proteína A- peroxidasa.

En la figura 2 presentamos el resultado de este ensayo. Se observan claramente tres bandas de 71,31 y 18 kD, que también están representadas en las PMC. Las bandas de 71 y 31 kD se detectaron mejor a las dos horas de incubación. La banda de 18 kD no la consideramos como de origen bacteriano pues también se detectó en células que no habían sido incubadas con PMC.

4.2 MARCAJE DE PROTEINAS MICOBACTERIANAS CON BIOTINA

Debido a que el suero inmune de conejo reaccionaba con proteínas del macrófago se buscó otro método para identificar a las proteínas micobacterianas adheridas a macrófagos alveolares de rata. Se seleccionó el acoplamiento a biotina como sistema de marcaje. El análisis comparativo de las PMC sin marcar (utilizando suero inmune para su detección) y de las acopladas a biotina (utilizando estreptavidina para su detección), mostró un patrón muy semejante con ambas técnicas (Figura 3). Aparentemente la sensibilidad es de casi el doble utilizando las proteínas marcadas con biotina, ya que observamos una reactividad muy semejante con 10 μ g de proteínas acopladas a biotina y con 20 μ g de proteínas sin marcar.

No todas las proteínas se acoplan igual a la biotina, lo que depende principalmente del contenido de lisinas de la proteína a marcar (Bayer, E., 1990). En nuestros ensayos las proteínas con pesos entre 45 y 36 kD no son tan bien detectadas como con el suero

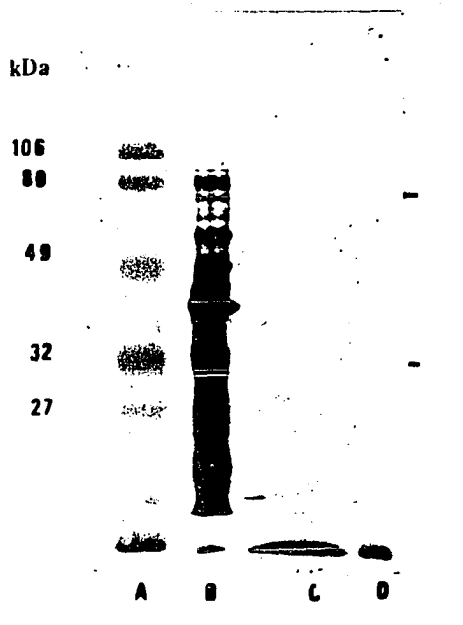


FIGURA 4 Ensayo para demostrar la unión de PMC-B a macrófagos alveolares de rata. Carril A marcadores moleculares. Carril B 20µg de PMC-B. Carril C MA sin PMC-B. Carril D MA incubados con PMC-B.

inmune, mientras que las proteínas de 95 y 68 kD son mejor visualizadas con el sistema biotina -estreptavidina.

4.3 ADHERENCIA DE PROTEINAS MICOBACTERIANAS MARCADAS CON BIOTINA A MACROFAGOS ALVEOLARES.

Los ensayos de incubación de los macrófagos alveolares con las PMC-B se realizaron en las mismas condiciones descritas en el inciso 4.1, excepto que como el sistema de biotina es más sensible, se utilizó una cantidad menor de proteína en la incubación (200 µg por ml) Al igual que con los ensayos utilizando PMC sin marcar, se observó la adherencia de una proteína de 71 kD a los macrófagos alveolares (Figuras 2 y 4). En estos ensayos se detectó también la adhesión de una proteína de 31-32 kD, sin embargo la definición de este doblete fue menor que la observada utilizando proteínas no marcadas, esto a pesar de que el doblete de 31-32 está bien representado en las PMC-B. En otros ensayos, utilizando otros lotes de PMC-B, se observó una gran variabilidad en la adhesión de este doblete.

En estos ensayos no se demostró la adhesión de la proteína de 18 kD, que se observó en los ensayos en los que utilizamos suero inmune de conejo (Figura 2), lo que confirma que se trata de una proteína del macrófago alveolar. Tampoco se observó reactividad de la estreptavidina con algún componente del macrófago alveolar.

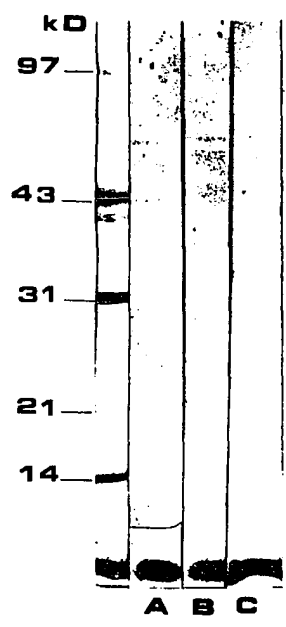


FIGURA 5 Ensayo de incubación de macrófagos alveolares con PMC-B a distintas temperaturas. Carril A MA incubados con PMC-B a 4 °C. Carril B MA incubados con PMC-B a 37 °C. Carril C MA sin incubar.

4.3.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ADHESION DE LAS PROTEINAS MICOBACTERIANAS MARCADAS CON BIOTINA

En algunos casos la adherencia y fagocitosis de partículas son dependientes de temperatura (Wright, S., 1986), por lo que decidimos realizar los experimentos de adhesión a 37 °C. En estas pruebas se utilizó 0.02% de azida de sodio para inhibir la actividad metabólica, disminuyendo así la endocitosis de estas células. La presencia de este inhibidor no influyó de manera determinante sobre la viabilidad celular, la cual fue sólo un 5-8 % menor a la observada en los ensayos realizados a 4°C.

En la figura 5 se muestran los resultados de un ensayo de adherencia llevado a cabo a 37°C, y otro simultáneo a 4 °C. En ambos se observa la adhesión de una proteína de 71 kD. En el ensayo a 4°C también se observa, con poca detectabilidad, el doblete de 31-32 kD. Por estos resultados todas las incubaciones posteriores se realizaron a 37°C y con azida de sodio.

4.3.2 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION

Los procesos de reconocimiento y adhesión entre moléculas pueden variar con el tiempo de incubación. La unión de moléculas y parásitos a macrófagos es un proceso rápido que se observa a partir de los 15 min y que continua por tiempos variables. Para conocer el efecto de esta variable en la adhesión de las proteínas a macrófagos se hicieron incubaciones de 15, 30 y 60 min. En la figura 6 se puede observar que desde los 15 min es posible detectar a la proteína de 71 kD.

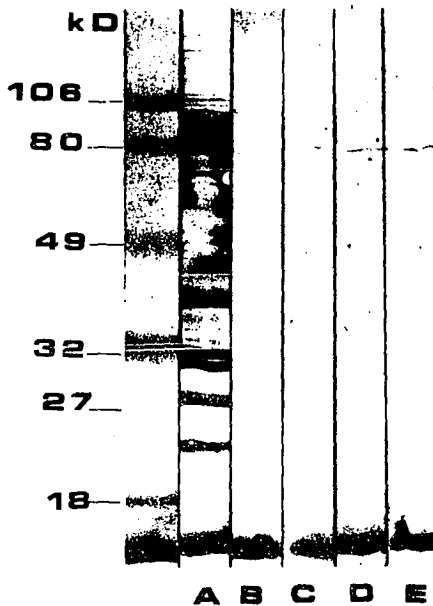


FIGURA 6 Ensayo de incubación de macrófagos alveolares con PMC-B a distintos tiempos. Carril A 15 μ g de PMC-B. Carril B MA sin incubar con PMC. Carril C MA incubados con PMC-B por 15 min. Carril D MA incubados con PMC-B por 30 min. Carril E MA incubados con PMC-B por 60 min.

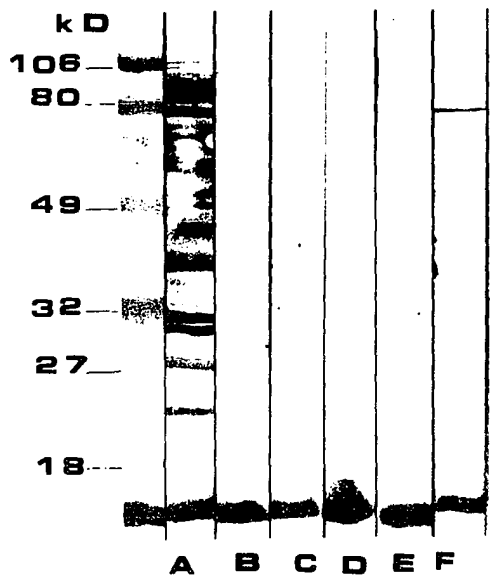


FIGURA 7 Ensayo de incubación de macrófagos alveolares incubados con diferentes concentraciones de PMC-B. Carril A 15µg de PMC-B. Carril B MA sin incubar con PMC-B. Carril C MA incubados con 50 µg de PMC-B Carril D MA incubados con 100 µg de PMC-B. Carril E MA incubados con 200 µg de PMC-B. Carril F MA incubados con 400 µg de PMC-B

y que su detectabilidad aumenta conforme se incrementa el tiempo de incubación.

4.3.3 VARIACION EN LA CONCENTRACION DE PROTEINA

Para determinar si el proceso de adhesión es saturable decidimos variar la concentración de proteína en el medio de incubación, manteniendo constante el número de células por ml. En la figura 7 puede observarse que conforme se incrementa la concentración de proteína aumenta la detectabilidad de la proteína de 71 kD. Si se utilizan 50 µg de proteína no se observa ninguna proteína, quizás porque la sensibilidad no es suficiente con este sistema. Con 100 y 200 µg de proteína se demuestra la adhesión de la proteína de 71 kD, e incrementando la concentración a 400 µg aparecen otras bandas de tamaño menor, que pudiesen ser productos de degradación de la p71.

4.3.4 VARIACIONES EN LA CAPACIDAD DE AMORTIGUAMIENTO DE LAS SOLUCIONES DE INCUBACION.

Tratando de optimizar nuestros resultados además de solución salina se hicieron ensayos utilizando otros medios de incubación. Se utilizó solución salina de Hank, que contiene elementos nutricionales no esenciales y con capacidad de amortiguamiento mayor que la solución salina. Como se puede ver en la figura 8, no hay diferencias en el patrón de proteínas detectadas, siendo la p71 la única demostrable en ambos ensayos.

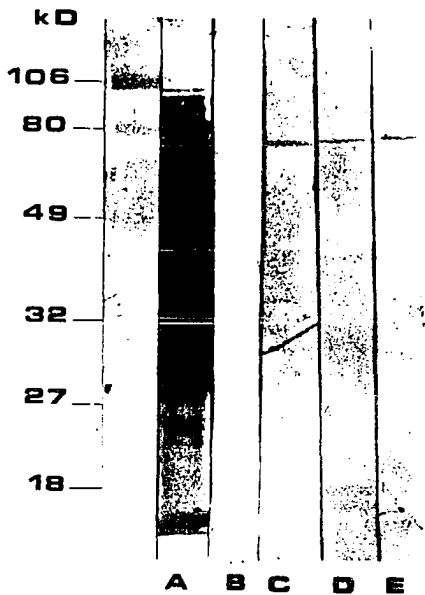


FIGURA 8 Ensayo de incubación de MA con PMC-B, en distintos medios de incubación. Carril A 20 μ g de PMC-B. Carril B MA sin incubar con PMC-B. Carril C MA incubados con PMC-B en NaCl 0.85%. Carril D MA incubados con PMC-B en solución de Hank. Carril E MA incubados con PMC-B en RPMI-1640, con 10% de SFB

La selección del medio de cultivo es importante para permitir el mantenimiento y crecimiento celular por lo que decidimos utilizar uno de los medios reportados para mantener a las células alveolares en cultivo, el medio RPMI-1640, tanto en presencia de 10% de SFB, como sin él. En ambos casos sólo se observó la proteína de 71 kD. En la figura 8 se presenta el resultado del ensayo en medio RPMI 1640 con 10% de SFB.

4.4 PURIFICACION DE p70 POR AFINIDAD A ATP

Se ha reportado que *M. tuberculosis* posee una proteína de 71kD, que corresponde al peso estimado de la proteína que se une a los macrófagos alveolares de rata. Esta proteína ha sido descrita como una proteína de estrés con afinidad por ATP (Young, D., 1989 y 1991), por lo que decidimos utilizar una matriz de ATP-agarosa para purificarla e investigar si es capaz de adherirse a macrófagos. Se utilizó una columna de 5 ml de ATP-agarosa, lográndose purificar 200 µg de proteína a partir de 6 mg de PMC. El primer lote de proteína no fue liofilizado, sino que se almacenó a -20 °C, en SSAF, pero el análisis posterior de este lote mostró que rápidamente se degrada, aún en presencia de inhibidores de proteasas durante su purificación y almacenamiento, por lo que se optó por liofilizarla. En la figura 9 se observa la proteína purificada por este proceso. Ocasionalmente se observó una banda de 68 kD que representa, probablemente, un producto de degradación.

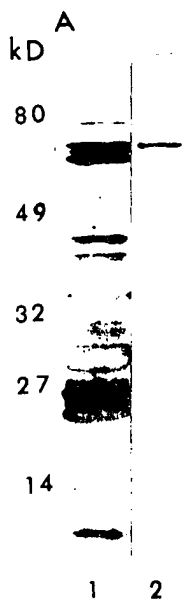


FIGURA 9 Se muestra la proteína purificada a partir de PMC sin marcar, por cromatografía de afinidad a ATP. Carril 1 20 µg de PMC Carril 2 5µg de p71 sin marcar .

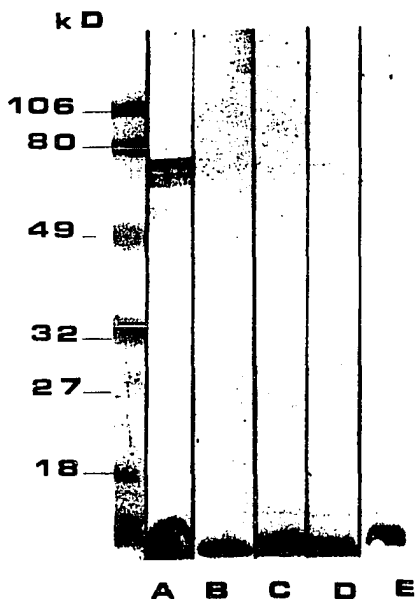


FIGURA 10 Ensayo en que se muestra la unión a macrófagos alveolares de la p71 purificada por afinidad a ATP. Carril A 5 μ g p71-biotina Carril B MA sin incubar con p71-B. Carril C MA incubados con 5 μ g de p71-B . Carril D MA incubados con 10 μ g de p71-B . Carril E MA incubados con 20 μ g de p71-B

4.5 ENSAYOS DE ADHESION DE p71 A MA.

Para estos ensayos se utilizaron 1×10^6 macrófagos alveolares y cantidades variables de p71. Las incubaciones se hicieron en RPMI-1640, con 0.02% de azida de sodio durante 1 h, a 37°C. La proteína purificada retuvo su capacidad de unión a macrófagos alveolares, como se observa en la figura 10. Con 5µg de proteína no se demostró adhesión, mientras que con 10 y 20 µg su detección es bastante definida, aunque en ningún caso se observó la misma reactividad que cuando se utilizan PMC. Entre 10 y 20 µg no observamos un incremento en la detectabilidad, por lo que no se ensayaron concentraciones mayores.

Este resultado se repitió, aún cuando se utilizó un lote con la proteína purificada degradada. Con este lote sólo se observó la unión de la proteína de 71 kD y de una menor de 68 kD, que también es purificada por ATP, por lo que suponemos que es producto de degradación de la primera.

4.7 ADHESION de M. tuberculosis A Macrófagos Alveolares

Al iniciar estos estudios no había antecedentes de ensayos de fagocitosis de M. tuberculosis por macrófagos alveolares por lo que fue necesario estandarizar las condiciones experimentales. Lo primero fue establecer el tiempo óptimo de incubación. En la figura 11 puede verse que con 2 h de incubación el número de macrófagos con bacterias asociadas es muy bajo. A las 4 h de incubación este porcentaje casi se duplica, y on 8 h no se observaron diferencias

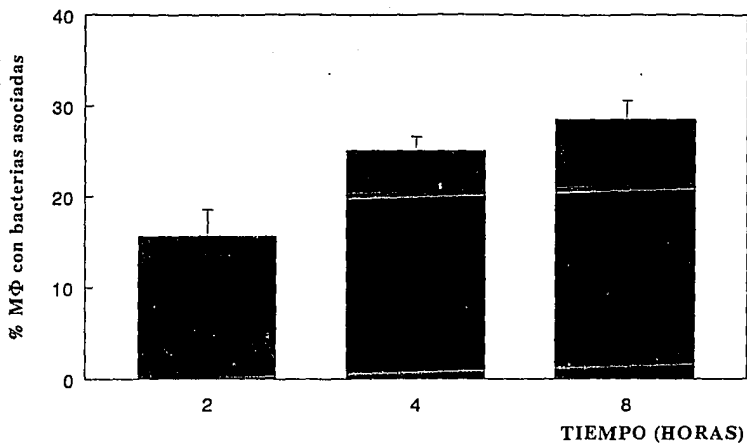


FIGURA 11 Porcentaje de macrófagos alveolares que tienen asociada al menos una bacteria, después de varias horas de incubación.

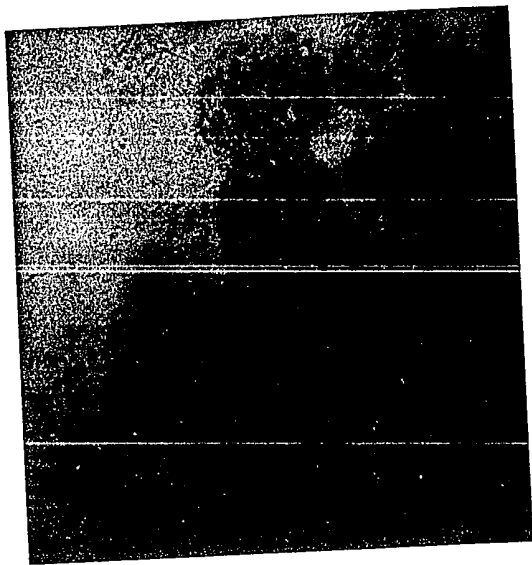


FIGURA 12 Macrófagos alveolares teñidos con Ziehl-Neelsen. Algunos presentas bacterias señaladas con una flecha.

significativas, por lo que se decidió que 4 h era el tiempo adecuado de incubación.

En estos experimentos confirmamos que la tinción de Ziehl-Neelsen era adecuada para determinar el número de bacterias asociadas a macrófagos. En la Figura 12 se observa un macrófago alveolar que ha fagocitado bacilos, teñidos de rojo con esta técnica.

4.8 LA PREINCUBACION DE MACROFAGOS CON PMC INHIBE LA ADHESION DE M. tuberculosis

En estos ensayos los macrófagos alveolares fueron preincubados *in vitro*, durante 30 min, con PMC. En seguida se adicionaron las bacterias incubándose durante 4 h a 37 °C. En la Figura 13 presentamos los resultados de estos ensayos. Se observa que la preincubación con PMC disminuye la fagocitosis de los bacilos por macrófagos alveolares (Tabla I).

Tabla I Efecto de PMC en el % de células con al menos una bacteria asociada

Tratamiento	% de células con bacterias	% de inhibición
NaCl	22.38 ± 2.1	0
200 µg/ml PMC	18.22 ± 1.5	18.6
400 µg/ml PMC	12.47 ± 1.3	44.3
800 µg/ml PMC	10.81 ± 1.6	48.3

A partir de 200 μg se observó una inhibición significativa en el índice de fagocitosis (20%). La inhibición aumenta marcadamente (35-45%) cuando los macrófagos se preincubaban con 400 μg de PMC. Con una concentración de 800 μg de proteína la inhibición es cercana al 50%. La disminución en el número de bacterias asociadas a una célula es muy semejante a la disminución en el porcentaje de macrófagos

Tabla II. Efecto de PMC en el No. de bacterias asociadas por macrófago

Tratamiento	No. de bacterias/Mø	% de inhibición
NaCl	2.39 ± 0.43	0
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMC	1.75 ± 0.07	26.8
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMC	1.23 ± 0.23	48.5

que han fagocitado (Tabla II). Como un control para descartar la posibilidad de que las PMC inhiban la fagocitosis uniéndose inespecíficamente a la superficie del macrófago, se realizaron experimentos preincubando macrófagos con ASB. En la tabla III puede verse que la ASB no inhibió la fagocitosis de bacilos aun utilizando concentraciones muy altas de la proteína.

Tabla III Efecto de ASB en el % de células con al menos una bacteria asociada

Tratamiento	% Células con bacterias
NaCl	24.55 ± 3.07
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASB	22.25 ± 2.17
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASB	23.90 ± 2.09
800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASB	20.91 ± 2.30

A partir de 200 μg se observó una inhibición significativa en el índice de fagocitosis (20%). La inhibición aumenta marcadamente (35-45%) cuando los macrófagos se preincuban con 400 μg de PMC. Con una concentración de 800 μg de proteína la inhibición es cercana al 50%. La disminución en el número de bacterias asociadas a una célula es muy semejante a la disminución en el porcentaje de macrófagos

Tabla II. Efecto de PMC en el No. de bacterias asociadas por macrófago

Tratamiento	No. de bacterias/M ϕ	% de inhibición
NaCl	2.39 \pm 0.43	0
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMC	1.75 \pm 0.07	26.8
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMC	1.23 \pm 0.23	48.5

que han fagocitado (Tabla II). Como un control para descartar la posibilidad de que las PMC inhiban la fagocitosis uniéndose inespecíficamente a la superficie del macrófago, se realizaron experimentos preincubando macrófagos con ASB. En la tabla III puede verse que la ASB no inhibió la fagocitosis de bacilos aun utilizando concentraciones muy altas de la proteína.

Tabla III Efecto de ASB en el % de células con al menos una bacteria asociada

Tratamiento	% Células con bacterias
NaCl	24.55 \pm 3.07
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASB	22.25 \pm 2.17
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASB	23.90 \pm 2.09
800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASB	20.91 \pm 2.30

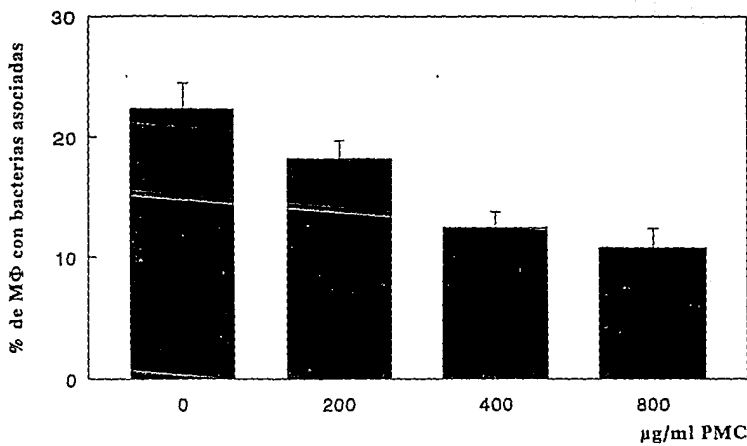


FIGURA 13 Efecto de la preincubación de macrófagos alveolares con PMC en la fagocitosis de *M. tuberculosis*.

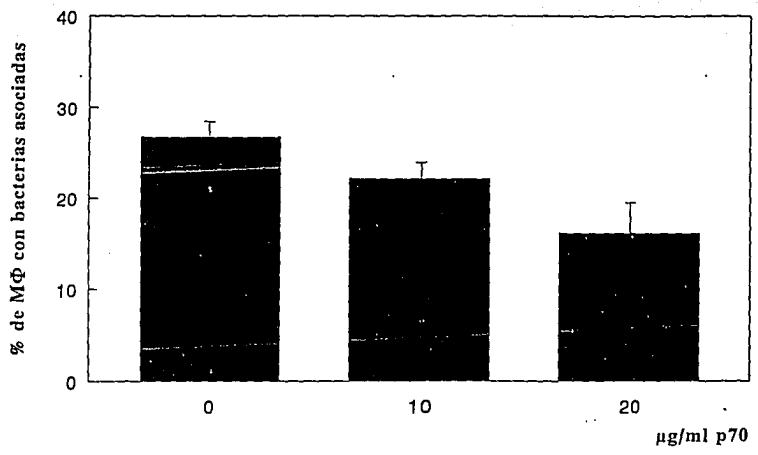


FIGURA 14 Efecto de la preincubación de macrófagos alveolares con p71 en la fagocitosis de *M. tuberculosis*.

TABLA IV Efecto de PMC o p71 en la asociación de zimosán a macrófagos.

Tratamiento	% Células con partículas
NaCl	65.2 ± 3.16
400 µg/ml PMC	62.9 ± 8.10
20 µg/ml p71	66.7 ± 2.00

Como controles, y con el propósito de evaluar el estado metabólico general del macrófago, se realizaron ensayos de fagocitosis de zimosán y del estallido respiratorio consecutivo. En la tabla IV podemos observar que aproximadamente el 65 % de los macrófagos alveolares son capaces de fagocitar zimosán, y que también responden a estímulos para producir el estallido respiratorio (Tabla V).

Tabla V Efecto de PMC o p71 en la respuesta oxidativa de macrófagos

Tratamiento	% Células con Formasán
NaCl	70.32 ± 4.2
400 µg/ml PMC	75.35 ± 8.8
20 µg/ml p71	72.85 ± 3.5

La preincubación con 400 µg de PMC no alteró ninguna de estas dos funciones, por lo que la inhibición de la fagocitosis de los

bacilos no puede atribuirse a efectos tóxicos provocados por las PMC por la p71

4.9 LA p71 INHIBE LA FAGOCITOSIS DE *M. tuberculosis*

Una vez demostrado que las PMC disminuyen el porcentaje de células que fagocitan bacilos, decidimos investigar si p71 purificada inhibía también la fagocitosis de estas bacterias. Se observó que la preincubación con 10 ó 20 μg de proteína disminuyen el porcentaje de células con bacilos asociados. Con 10 μg la inhibición fue del 17% y con 20 μg del 40%. El número de bacilos asociados a una sola célula también se disminuyó. (Tabla VI). Estos resultados fueron estadísticamente significativos.

TABLA VI Efecto de p71 en el % de células con al menos una bacteria asociada

Tratamiento	% Células con bacterias	% de Inhibición
NaCl	26.78 \pm 1.7	0
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ p71	22.13 \pm 1.8	17.21
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ p71	16.07 \pm 3.4	40.14

La preincubación de los macrófagos alveolares con p71 no afectó la capacidad para fagocitar zimosán, ni la de desarrollar el estallido respiratorio, por lo que se puede inferir que esta proteína no provoca efectos tóxicos sobre los macrófagos que lateren estas dos funciones (Tablas IV y V).

TABLA VII Efecto de p71 en el No de bacterias asociadas a macrófagos.

Tratamiento	No bacterias/Mo	% Inhibición
NaCl	2.7 ± 0.35	0
10 $\mu\text{g/ml}$ p71	2.0 ± 0.20	26
20 $\mu\text{g/ml}$ p71	1.7 ± 0.20	37

5 DISCUSION

A pesar de la gran importancia que poseen en el establecimiento de la infección, los mecanismos a través de los cuales el bacilo de la tuberculosis, el *Mycobacterium tuberculosis*, infecta al macrófago han sido poco estudiados. En años recientes se han realizado varios esfuerzos para tratar de entender estos procesos. A las especies que más atención se les ha prestado son *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium* y *M. bovis*, por ser patógenas al hombre. Actualmente se sabe que estas especies micobacterianas poseen mecanismos de invasión comunes entre sí y, además, específicos de cada una de ellas.

Las interacciones iniciales de las micobacterias con monocitos y macrófagos pueden ser clasificadas en dos categorías, no necesariamente excluyentes, que son: mecanismos de adherencia mediados por opsoninas o independientes de ellas.

La fagocitosis mediada por opsoninas, para las cuatro especies antes mencionadas, requiere de la participación de la molécula del complemento C3, en particular el componente C3b, que se deposita en la superficie de las micobacterias y permite su adhesión a fagocitos a través de los receptores RC1 y RC3 (Swartz, R., 1988; Schlesinger, L., 1990a y b; Schlesinger, L., 1993; Bermudez, L., 1991; Lanuoi, P., 1992; Hirsch, C., 1994). Los datos que han permitido establecer la importancia de esta molécula son: 1) este fenómeno es dependiente de suero, observándose un mayor índice fagocítico en presencia de 20% de suero fresco en el medio de ensayo, 2) el porcentaje de infección disminuye en casi un 70% al calentar el suero, 3) se puede reestablecer la actividad opsónica del suero

inactivado por calor al agregar C3 fresco, 4) el proceso es inhibido por anticuerpos contra los receptores RC1 y RC3 y, 5) en las especies leprae y tuberculosis se ha demostrado el depósito de C3 en los bacilos por medio de ELISA.

Recientemente se ha observado que la unión de *M. tuberculosis* a macrófagos alveolares puede ser diferente que a monocitos, ya que en este caso es más importante el receptor RC4 que RC1 o RC3 (Hirsch, C., 1994), pero para ambos receptores la molécula ligando es la misma, esto es la molécula C3 es la opsonina. En la fagocitosis de *M. avium* se ha sugerido que también la fibronectina participa como opsonina (Bermudez, L., 1991). La participación de esta molécula no se ha demostrado experimentalmente para otras especies de micobacterias patógenas, si bien todas ellas poseen proteínas con afinidad por fibronectina (Abou-Zeid, C., 1988; Ratliff, T., 1993).

Los estudios realizados hasta ahora indican que ninguna de las especies patógenas utiliza alguno de los receptores para IgG, y se sugiere que ningún receptor para otro tipo de inmunoglobulina participa en el proceso. (Schlesinger, L., 1990a y b, Bermudez, L., 1991). De hecho la opsonización con anticuerpos antes de la fagocitosis puede tener efectos deletereos para el bacilo, haciéndolo más susceptible a la degradación por macrófagos (Fréhel, C., 1987).

La fagocitosis independiente de opsoninas se demostró porque las especies tuberculosis, leprae y avium, pueden ser fagocitadas en ausencia de suero, pero la invasión puede ser inhibida hasta en un 60% si se bloquean los receptores RC1 y RC3. Se han propuesto dos explicaciones a este fenómeno: una es que las células fagocíticas en cultivo liberen moléculas de C3, capaces de opsonizar in situ a las

bacterias, o bien que las micobacterias posean moléculas propias que les permitan unirse directamente a estos receptores (Schlesinger, L., 1990a,b,1993).

Otro mecanismo de adherencia independiente de opsoninas es la entrada a través del receptor para manosa, presente en macrófagos. El trabajo de Schlesinger, (Schlesinger, L., 1993), demostró que la ingestión de cepas virulentas de la especie *M. tuberculosis* (Edelman y Rv), pero no de la avirulenta (Ra), es disminuída si se bloquean los receptores para manosa. También para *M. avium* se ha sugerido la participación del receptor para manosa en su fagocitosis (Roeklin, J., 1992). En estos trabajos se sugiere que las moléculas que son reconocidas por el RM son el lipoarabinomanan o el glucolípidio fenólico, pero también existe la posibilidad de que se trate de algunas de las glucoproteínas que se ha sugerido se encuentran en micobacterias (Espitia, C., y Mancilla, R., 1989; Garbe, T., 1992)

En este trabajo hemos mostrado que de las proteínas del medio de cultivo de *M. tuberculosis*, cepa H37 Rv, el macrófago alveolar de rata selecciona una proteína, que en geles de poliacrilamida migra en 71 kD. La reproducibilidad de estas observaciones es muy alta, ya que esta proteína fue detectada aún cuando utilizamos diferentes condiciones de incubación, lotes de extracto proteico y métodos de detección.

En cuanto a la identidad de la proteína de 71 kD de *M. tuberculosis*, desde hace algunos años se sabe que esta micobacteria posee una proteína de peso molecular de 71 kD con afinidad por ATP, la cual pertenece a la familia de las proteínas de estrés, homóloga

a la DNA-K de *E. coli* (Young, D., 1991). Cuando analizamos *in vitro* la proteína purificada por cromatografía de afinidad por ATP, pudimos demostrar que esta proteína se une a macrófagos alveolares.

Los hallazgos más sobresalientes de nuestros estudios provienen de los ensayos de fagocitosis, ya que demostramos que la preincubación de los macrófagos tanto con proteínas de medio de cultivo, como con la proteína de 71 kD purificada, provocó una inhibición significativa de la fagocitosis del bacilo. Es necesario analizar un espectro mayor de concentración proteica en estos ensayos, para estudiar si el fenómeno es saturable, lo cual no nos fue posible determinar por no contar con la cantidad suficiente proteína purificada.

Nuestras observaciones de que la p71 puede tener función de adhesina son de mucho interés, ya que no se ha demostrado una función semejante en la familia de las proteínas de estrés de 70 kD, en eucariotes. Sin embargo Ensgraber y su grupo (Ensgraber, M., 1992), ha demostrado que en otro procariote, *Salmonella thypimurum*, utiliza a un posible miembro de esta familia, lo que puede sugerir una función particular de esta familia de proteínas en procariotes. La proteína de 71 kD de *Mycobacterium tuberculosis* ha sido localizada en la pared del bacilo, con un suero que reconoce a la p71 purificada. (Andersen, A., 1986; Hernández-Pando, R., comunicación personal), lo que favorece su función de adhesina.

En el momento actual desconocemos la naturaleza de la interacción de la p71 con macrófagos alveolares. Sin embargo hay datos que sugieren que se trata de una interacción con algún componente membranal. Se observó la adhesión de la p71 en

condiciones en las cuales la endocitosis está inhibida, lo que permite descartar que halla sido interiorizada junto con el medio de cultivo, utilizando dos métodos de inhibición de pinocitosis distintos. Así también la detectabilidad de la proteína fue mejor conforme se incrementó la concentración proteica durante la incubación. Aunque ninguno de estos datos son concluyentes para hablar de una interacción ligando- receptor.

Muy recientemente Arruda y su grupo (Arruda, S., 1993) presentó un trabajo que apoya la hipótesis de la existencia de adhesinas en *M. tuberculosis*. En este trabajo logró, por ingeniería genética, aislar un fragmento de ADN del bacilo de la tuberculosis que, al ser insertado en una cepa no invasiva de *E. coli*, le confiere la capacidad de invasión y de sobrevivencia en macrófagos. En este trabajo también logró aislar una proteína de 56 kD, a la que se le atribuye la capacidad invasiva.

En nuestros ensayos sólo utilizamos macrófagos alveolares, ya que son estas células las que tienen un papel primordial en el control de la infección. Los resultados de Schlesinger y de Hirsch (Schlesinger, L., 1993; Hirsch, C., 1994), en los que observan diferencias entre la fagocitosis por monocitos y macrófagos, apoyan esta decisión. En realidad no es sorprendente que la interacción de micobacterias con macrófagos sea más compleja que con monocitos, puesto que la primera es una célula mucho más madura que posee mayor cantidad y variedad de receptores en su superficie (Speert, ,1985).

Nuestras observaciones no descartan la posibilidad de que exista más de una adhesina en el bacilo de Koch, sino por el contrario, la apoyan, ya que en algunos ensayos observamos la unión

de una proteina de 31-32 kD a macrófagos, si bien se requieren de ensayos con la proteina pura para saber si realmente esta proteina está participando en la adherencia. Esta posibilidad es muy interesante porque una proteina de 31-32 kD, del medio de cultivo posee afinidad por fibronectina, y también está presente en la superficie del bacilo, propiedades que le pueden permitir unirse al macrófago a través del receptor para fibronectina.

Un aspecto importante de esta tesis es que fue posible caracterizar una proteina como adhesina, utilizando al sistema de biotina- avidina para su detección, lo que permite tener un marcaje durable y evitar el uso de material radioactivo. Se seleccionó el acoplamiento a la biotina pues el proceso de marcaje es muy suave y no altera la estructura de las proteinas, además se pueden marcar específicamente proteinas, carbohidratos o ácidos nucleicos, lo que permite conocer la naturaleza de la molécula adherida (Wilchek, M., 1990). En la forma en que diseñamos los experimentos los resultados no fueron cuantitativos, pero haciendo algunas modificaciones se puede lograr que esta técnica lo sea, ya sea usando estreptavidina acoplada a fluoresceína y con lectores electrónicos, o bien en blots con lectores densitométricos, pero habrá que estandarizar estas técnicas. Un defecto que tiene el uso de la biotina como molécula marcadora es que la unión de ésta a proteinas es a través de las lisinas de la proteina, por lo que algunas proteinas no acoplan bien y no son detectadas.

Para establecer si la unión de la proteina con el macrófago es de tipo ligando- receptor es necesario cambiar el sistema de marcaje, por uno que nos permita determinar la relación de moléculas

que se adhieren al macrófago, establecer si existe saturación en esta unión y otras mediciones más exactas, por lo que se ha pensado en sustituir a la biotina con algún marcador radioactivo. Si estos ensayos apoyan la hipótesis de una interacción de este tipo, posteriormente se tratará de caracterizar al receptor en los macrófagos. Con esta técnica también podremos observar si otras proteínas se adhieren a los macrófagos, ya que el sistema es mucho más sensible que el de biotina-avidina.

También es necesario afinar los ensayos de inhibición de la fagocitosis con la proteína pura. Otra forma en que puede estudiarse la participación de esta proteína en la interiorización del bacilo, es con el uso de anticuerpos contra ella. Este tipo de ensayo ya se está planeando, y esperamos realizarlo muy pronto.

Otro aspecto importante que aún tenemos que estudiar es si la adherencia de la p71 se observa también en macrófagos alveolares de humano, pues se sabe que hay diferencias entre macrófagos de distintas especies. Así mismo, también será necesario analizar otros tipos de células fagocíticas, principalmente monocitos sanguíneos, pues estas células favorecen la diseminación del bacilo.

VI CONCLUSIONES

1 El marcaje con biotina de mezclas complejas de proteínas es un método sensible para identificar adhesinas, y puede sustituir a métodos de marcaje radioactivo.

2 Una proteína de 71 kD, de entre la gran variedad de proteínas que presenta el bacilo *M. tuberculosis*, se une a la superficie del macrófago alveolar de rata.

3 La p71 de *M. tuberculosis* tiene la capacidad de inhibir la adherencia del bacilo por el macrófago, siendo la inhibición dosis dependiente.

4 La p71 pudo ser purificada por cromatografía de afinidad a ATP, por lo que puede pertenecer a la familia de proteínas de estrés.

7 BIBLIOGRAFIA

Abou-zeid, C., Ratliff, T.L., Wiker, H.G., Harboe, M., Bennedsen, J., Rook, G.A.W., (1988) Characterization of fibronectin-binding antigens released by *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG. *Infect Immunol* 56(12): 3046

Adams, L.B., Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Krahenbuhl, J.L., (1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 144(7): 2725

Aderem, A.A., Wright, S.D., Silverstein, S.C., Cohn, Z.A., (1985) Ligated complement receptor do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J Exp Med* 161: 617

Andersen, A.B., Yuan, Z., (1986) Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *M. tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay *J Clin Microbiol* 23(1):446

Anderson, L.J., Coombs, R.A., Tsou, C., Hierholzer, J.C., (1984) Use of biotin-avidin system to study specificity of antibodies against respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* 19(6):934

Armstrong, J.A., Hart, P.D., (1975) Phagosome-lysosome interaction on cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *J Exp Med* 142:1

Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., Riley, L.W., (1993) Cloning of a *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Sci (USA)* 261:1454

Babior, B.M., (1984) The respiratory burst of phagocytes *J Clin Invest* 73: 599

Bayer, E.A., Wilchek, M., (1990) Protein Biotinylation. *Meth Enzymol* 184: 138

Berchin, A., Brijs, L., De Baetselier, P., Cocito, C., (1991) Mycobacterial proliferation in macrophages is prevented by incubation with lymphocytes activated in vitro with a mycobacterial antigen complex. *Eur J Immunol* 21: 793

Bermudez, L.E., Young, L.S., Enkel, H., (1991) Interaction of *M. avium* complex with human macrophages: Roles of membrane receptors and serum proteins *Inf Imm* 59(5):1697

Bizal, C.L., Butler, J.P., Feldman, H.A., Valberg, A.P., (1991) Kinetics of phagocytosis and phagosome-lysosome fusion in hamster lung and peritoneal macrophages. *J Leuk Biol* 50: 229

Blussé van Oud Alblas, A., van Furth, R., (1979) Origen, kinetics and characterization of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med* 149: 1504

Blussé van Oud Alblas, A., van der Linden-Scherever, van Furth, R., (1983) Origin and kinetics of pulmonary macrophages during an inflammatory reaction induced by intra-alveolar administration of aerosolized heat-killed BCG. *Am Rev Resp Dis* 128(2): 276-281

Bloom, B.R., Murray, J.L.C., (1992) Tuberculosis commentary on a reemergent killer. *Sci(USA)* 257: 1055

Bowden, D.H., Adamson, I.Y.R., (1972) The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of alveolar macrophages. *Am J Pathol* 78: 521

Braun, M.M., Coté, T.R., Rabkin, C.S., (1993) Trends in death with tuberculosis during the AIDS era. *JAMA* 269(22): 2865

Brian, J.D., Frank, R.N., (1968) Recovery of free cells from rat lung by repeated washings. *J Appl Phys* 23(1): 63

Brian, J.D., Frank, R.N., (1973) Alveolar macrophages adhesion: Wash electrolyte composition and free cell yield. *J Appl Phys* 34(1): 75

Chang, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S., Sibile, S., Snapper, J.C., Aisen, M.P., Bloom, B.R., (1989) Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci* 86: 2453

Chang, J., Fan, X.D., Hunter, S.W., Brennan, P., Bloom, B.R., (1991) Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *M. tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 59: 1755

Dannenberg, A.M., (1989) Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infec Dis* 11(s2): s-369

Dannenberg, A.M., (1991) Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 12(7): 228

Daughaday, C.C., Douglas, S.D., (1976) Membrane receptors on rabbit and human pulmonary alveolar macrophages. *J Reticul Soc* 19(1): 37

DeMendez, I., Young, K.R., Bignon, J., Lambré, C.R., (1991) Biochemical characterization of alveolar macrophages-specific peroxidase activities in the rat. *Arch Biochem Biophys* 289 (2): 319

Denis, M., (1991) Killing of *M. tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* 84: 200

Denis, M., (1991b) Growth of *M. avium* in human monocytes: identification of cytokines which reduce and enhance intracellular microbial growth. *Eur J Immunol* 21: 391

Drevets, D.A.; Campbell, P.A.; (1991) Roles of complement receptor type 3 in phagocytosis of *Leisteria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 59(8): 2645

Ensgraber, M., Loos, M., (1992) A 66kD Heat Shock Protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus *Infect Immun* 60(8): 3072

Espitia, C., Mancilla, R., (1989) Identification, isolation and partial characterization of *M. tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 77:378

Fine, E.M.P., (1989) The BCG story: Lessons from the past and implications for the future *Rev Infect Dis* 11(s-2): 6353

Frehél, C., de Chastellier, C., Lang, T., Rastogi, N., (1986) Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *M. avium*. *Infect Immun* 52(1):252

Frehél, C., Rastogi, N., (1987) Mycobacterium *Leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect Immun* 55(12): 2916

Frehél, C., deChastellier, C., Offrendo, C., Berche, P., (1991) Intramacrophage growth of *M. avium* during infection in mice. *Infect Immun* 59(6): 2207

Friss, R.R., (1972) Interaction of L cells and *C. psittaci*: entry of the parasite and host response to its development *J Bacteriol* 180: 706

Garbe, T., Harris, D., Vordemeier, M., Lathriga, R., Ivanyi, J., Young, D., (1993) Expression of the *M. tuberculosis* 19 kD antigen in *M. smegmatis*: Immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect Immun* 61: 260

Giraudet, P., Faure, A., Frot, J.C. La réaction inflammatoire. Physiologie et exploration clinique. Vigot. France 1984

Grange, J.M., Bishop, P.J., (1982) 'Über tuberkulose' A tribute to Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Tubercle* 63:3

Griffin, F.M., Griffin, J.A., Leider, J.E., Silverstein, S.C., (1975) Studies on the mechanism of phagocytosis. *J Exp Med* 142: 1263

Hassett, D.J., Cohen, M.S., (1989) Bacterial adaptations to oxydative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J* 3: 2575

Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Rusell, G.D., Rich, E.A., (1994) Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha mediated

growth inhibition of *M. tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 152:743

Holtzman, E., *Lysosomes*. Plenum Press, N.York (USA), 1989.

Horwitz, M.A., (1983) The legionnaire's disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158:2108

Isberg, R.R., Voorhis, D.L., Falkow, S., (1987) Identification of invasins: A protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50:769

Jones, G.S., Amirault, H.J., Andersen, B.R. (1990) Killing of *M. tuberculosis* by neutrophils: a non oxidative process. *J Infect Dis* 162: 700

Jones, T.C., Hirsch, J.G., (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. *J Exp Med* 136:1173

Kaufmann, S.H.E., (1988) CD8+T lymphocytes in intracellular microbial infections *Immunol Today* 9(6): 168

Kaufmann, S.H.E., (1989) In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. *Rev Inf Dis* 11(5-2): 5448

Kaufmann, H.E.S., (1993) Immunity to intracellular bacteria. *Ann Rev Immunol* 11:29

Kochi, A., (1991) The global tuberculosis situation and the new control strategy of the WHO. *Tubercle* 72:1

Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680

Launois, P., Niang, M., Dieye, A., Sarthou, J.L., Rivier, F., Millan, J., (1992) Human phagocyte respiratory burst by *M. bovis* BCG and *M. leprae*: functional activation by BCG is mediated by complement and its receptor on monocytes. *Int J Lepr* 60(2): 225

Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., Ganz, T., (1993) Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Ann Rev Immunol* 11: 105

Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem* 193:265

Marchal, G., (1993) Le réveil de la tuberculose. *La Recherche* 253(24):380

Memoranda WHO (1992) Tuberculosis control and research strategies from the 1990: memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 70(1): 17

Moulder, J.W., (1985) Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 49(3): 298

Munro, S., Pelham, R.E.H., (1986) An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78kD glucose-regulates protein and Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46: 291

Murphy, S.A., Root, R.K., Schreiber, A.D., (1979) The Role of antibody and complement in phagocytosis by rabbit alveolar macrophages. *J Infect Dis* 140(6): 896

Murphy, S., Florman, A.L., (1983) Lung Defenses against infection: a clinical correlation. *Pediatrics* 72(1): 1

Myrvik, Q.N., Leake, E.S., Farris, B., (1968), Lysozyme content of alveolar and peritoneal macrophages from the rabbit. *J Immunol* 86: 133

Myrvik, Q.N., Leake, E.S., Wright, M.J., (1984) Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *M. tuberculosis*. *Am Rev Resp Dis* 129: 322

Nguyen, B.Y.T., Peterson, P.K., Verbrugh, H.A., Quie, P.G., Hoidal, J.R., (1982) Differences in phagocytosis and killing by alveolar macrophages by human, rabbits, rats and hamsters. *Infect Immun* 36(2): 504

Oren, R., Farnham, A.E., Saito, K., Milosfsky, E., Karnovsky, M.L., (1963) Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J Cell Biol* 17: 487

Payne, N.R., Horwitz, M.A., (1987) Phagocytosis of *L. pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 166: 1377

Quinn, T.C., (1989) Interactions of the human immunodeficiency virus and tuberculosis and the implications for BCG vaccination. *Rev Infect Dis* 11(s-2): S 379

Rabinovich, M., (1967) The dissociation of attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. *Exp Cell Res* 46: 19

Rajiswamy, (1990) Macrophage functions in tuberculosis. *Trop Med Parasitol* 41: 327

Rao, S., Gehlsen, K.R., Catanzaro, A., Identification of a beta 1 integrin on *M. avium*- *M. intracellulare*. *Infect Immun* 60(9) :3653

Ratliff, T.L., McCarthy, R., Telle, B.W., Brown, E.J., (1993) Purification of mycobacterial adhesin for fibronectin *Inf Immun* 61(5): 1889

Raviglione, M.C., Narain, J.P., Kochi, A., (1992) HIV-associated tuberculosis in developing countries: clinical features, diagnosis, and treatment. Bull WHO 70(4):515

Reggiardo, Z., Middlebrook, G., (1974) Failure of passive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in rabbits. Proc Exp Biol Med 145(1): 173

Roecklin, J.A., Swartz, R.P., Yeager, H., (1992) Nonopsonic uptake of *M. avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages. J Lab Clin Med 119:772

Russell, D.G., Talamas-Rohana, P., (1989) Leishmania and the macrophage: a marriage of inconvenience Immunol Today 10 (10): 328

S.S.A. (1982) Bol Mens Epidem S.N.S 3: 37

S.S.A. (1992) Bol Mens Epidem S.N.S. 7(5): 92

Schmid, S.L., Carter, L.L., (1990) ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. J Cell Biol 111(6 pte 1): 2307

Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A., (1990a) Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptor CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. J Clin Invest 85:1304

Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N., Horwitz, M.A., (1990b) Phagocytosis of *M. tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3 J Immuno 144(7): 2771

Schlesinger, L.S., (1993) Macrophage Phagocytosis of virulent but not attenuated strain of *M. tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. J Immunol 150(7): 2920

Sharon, N., (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. Immunol Today 5(5): 143

Smith, D.W., Wiegshaus, E.H., (1989) What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. Rev Infec Dis 11(s-2): S385

Stuehr, D.J., Gross, S.S., Sakuma, I., Levi, R., Nathan, C.E., (1989) Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium - derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. J Exp Med 169: 1011

Sundre, P., Ten Dam, G., Kochi, A., (1992) Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull WHO 70(2):149

Swartz,R.P., Naai,D., Vogel,C., Yeager,H., (1988) Differences in uptake of Mycobacteria by human monocyte: a role for complement. *Infec Immun* 56(9): 2223

Talamás-Rohana,P., Wright,S.D., Lennartz,M., Russell, D.G., (1990) Lipophosphoglycan from *L. mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA Family of leukocyte integrins. *J Immunol* 144(12):4817

Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J.,(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci* 76(9):4350

Turyna,B.,Szuba,K.,(1988) The comparisson of lysosomal enzymes activities in alveolar and peritoneal macrophages of the rat. *Biochem Int* 17:433

Van Oss,C.J.,(1986) Phagocytosis: an overvieww *Meth enzymol* 132: 3

Wadee,A.A., Cohen,J.D., Rabson,A.R., (1987) Gamma interferon reverses inhibition of leukocyte bactericidal activity by a 25 kD fraction from *M. tuberculosis* *Inf. Immun* 55(11):2777

Wilchek,M.,Bayer,E.A., (1990) Introduction to avidin-biotin technology. *Meth Enzymol* 184: 5

Willet,H.P., (1992) *Mycobacteria in Zinsser Microbiology*. Joecklik,W.R., et al., editors. 20 th ed. Appleton & Lange USA

Wilson,C.B., Tsai,V., Remigton, J.S., (1980) Failure to tigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. *J Exp Med* 151:328

Wright,S.D.,Craigmyle,L.S.,Silverstein,S.C.,(1983a) Fibronectin and serum amyloid P Component stimulate c3b and c3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* 158: 1338

Wright,S.D., Silverstein,S.C.,(1983) Receptor for C3b and C3bi promote phagocytosis but not release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* 158:2016

Wright,S.D., Jong,M.T.,(1986) Adhesion- promoting receptors on human macrophages recognizes *E. coli* *J Exp Med* 164: 1876.

Yamamoto,K., Johnston,R.B.,(1983) Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burts in macrophages. *J Exp Med* 159: 405

Youmans,G.P.,(1946) A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent type tubercle bacilli *J Bact* 51:703

Young, D.B., Mehlert, A., (1989) Biochemical and antigenic characterization of the M. tuberculosis 71kD antigen, a member of the 70kD Heat Shock Protein Family. Mol Microb 3(2): 125

Young, D.B., Garbe, T.R., (1991) Heat Shock Proteins and antigens of M. tuberculosis. Infec Immun 59(9): 3086