



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS B BCR Fc $\gamma$   
ESPECÍFICOS Y ESTUDIO DE SU FUNCIÓN COMO  
CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN  
TUBERCULOSIS.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓLOGO ARANDA URIBE IVAN SAMMIR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. ERASMO MARTINEZ CORDERO

COMITÉ TUTOR: DR. LASCURAIN LEDEZMA RICARDO  
DRA. TORRES ROJAS MARTHA

MÉXICO, D.F. MAYO

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **ARANDA URIBE IVAN SAMMIR** con número de cuenta **300340356**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS B BCR Fc $\gamma$  ESPECÍFICOS Y ESTUDIO DE SU FUNCIÓN COMO CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN TUBERCULOSIS"**, realizada bajo la dirección del: DR. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO

Presidente:	DRA.	MA. ISABEL SOTO CRUZ
Vocal:	DR.	KAREN MANUCHARYAN
Secretario:	DR.	RICARDO LASCURAIN LEDESMA
Suplente:	DRA.	DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN
Suplente:	DRA.	MARTHA TORRES ROJAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
 Cd. Universitaria, D.F., a 24 de abril de 2012

*M<sup>a</sup> del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Tendría que buscar en el Universo a Dios y preguntarle por una nueva palabra para poder expresar mi gratitud al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme vivir un sueño de 2 años.

Gracias al **CONACyT** su beca me permitió tener una hoja y un lápiz con que escribir las notas de mi clase de citometría de flujo, inmunología, biología celular, hematopoyesis, y citogenética. En especial gracias porque con su beca otorgada además de contribuir a mi formación, hizo factible que pudiera pagar la cirugía del trasplante de córnea que espere por 20 años.

A mi tutor, Dr. Erasmo Martínez Cordero por todo **su apoyo y paciencia, sin su guía no comprendería** un poco más este maravilloso universo del sistema inmune.

A los miembros de mi honorable comité tutorial Dra. Martha Torres y Dr. Ricardo Lascurain por **su enorme** paciencia, tolerancia y sobretodo **sus valiosas aportaciones** para la realización de este escrito.

**AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.**

Gracias Dra. Diana Aguilar León por darme un pedacito del Instituto Nacional de Nutrición, **su apoyo y cooperación fue indispensable** para mi formación.

Dra. Genoveva del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por su **valiosa cooperación**.

A todo el personal de Microbiología del INNSZ que nos dio un espacio para poder realizar nuestro trabajo: Narciso y Antonio Alfayo.

Hago extensa mi gratitud al personal del laboratorio de autoinmunidad del INER: Mariana Tellez Araiza por su apoyo para resolver las diversas dudas que tuve durante estos años y darme un tiempo para discutir diversos puntos de vista, igualmente a Juana Arellano por auxiliarme en las dudas que se presentaron.

A la Dra. Verónica y Diana Clemente por su cooperación con los ensayos de inmunoblot.

Gracias a la Dra. Georgina del pabellón 11 y todo el personal que nos apoyó cuando no funcionó nuestro espectrofotómetro. También a la Dra. Isabel Sada Ovalle del laboratorio de Inmunoquímica por prestarnos su espectrofotómetro, de igual forma al laboratorio de Bioquímica y de Cáncer pulmonar, todos del INER.

Gracias a Eduardo Flores y Mago; por indicarme donde estaba el material y otorgármelo cuando fue posible y el carácter era de urgente.

A mis padres por brindarme un techo donde dormir y tener más confianza en mis propósitos. A mi hermana por escucharme y alentarme en todo momento. También agradezco a mis abuelitos; Caritina Bolaños y Margarito Aranda.

A veces hay personas que son clave en tu vida, agradezco a la Dra. Laura Rosío Castañón Olivares por darle a su alumno un voto de confianza cuando muchos lo negaron. Sin su apoyo, hoy ni si quiera tendría la licenciatura.

**Muchas gracias a todos los participantes de este estudio.**

**IDENTIFICACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE \*\*LINFOCITOS B BCR F<sub>cy</sub>-ESPECÍFICOS Y SU ESTUDIO COMO CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN TUBERCULOSIS.**

**INDICE**

ABREVIATURAS	8
RESUMEN/ABSTRACT	9/10
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
Procesamiento y presentación antigénica	11
Presentación cruzada	13
Células presentadoras de antígeno	14
Macrófagos	14
Células Dendríticas	16
Linfocitos B	17
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>V. OBJETIVO</b>	<b>28</b>
<b>VI. MÉTODOS</b>	<b>29</b>
*Grupos de estudio	29
*Aislamiento de linfocitos B	29
*Inmunodetección de la proporción de Células B F <sub>cy</sub> -específico y Células B CD5+CD19+ por citometría de flujo	31
*Obtención de inmunoglobulinas y formación de complejos inmunes	32
*Co-cultivo de células B y células no B en pacientes con TB	34
*Evaluación de los componentes potenciales de los complejos inmunes	36
*Análisis estadístico	38

**\*\*CÉLULAS B F<sub>cy</sub> ESPECÍFICOS**

<b>VII. RESULTADOS</b>	
*Población de estudio	39
*Células B Fc $\gamma$ -específicos en pacientes con TB y grupo control sanos	39
*Células B CD19+CD5+ en pacientes con TB	41
*Correlación entre la población CD19+CD5+ y B Fc $\gamma$ -específicos	43
*Transformación con el EBV	43
*ELISA del suero de pacientes con TB	44
*Co-cultivo de LB (Células B Fc $\gamma$ -específicos y Células no B)	45
*Western Blot	47
*Correlación de reactividad de Abs al ECMtb y reactividad de Abs a HSP65r de suero de pacientes con TB	48
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	49
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	56
<b>X. REFERENCIAS</b>	57
<b>XI. ANEXOS</b>	66
Anexo A. Receptor de la Célula B	66
Anexo B. Tuberculosis	66
Anexo C. Reactivos	69
Anexo D. Uso de muestra de pacientes	69
Anexo I. Identificación de LB transformados con EBV	70
Anexo II. Linfocitos B obtenidos por selección negativa, con reactividad a IgG	73
Anexo III. Cultivo celular	76
Anexo IV. Figura Western Blot	78

**"CUANDO EL ESPIRITU SE DESVANECE APARECE LA FORMA"**

Pensando en Charles Bukowski

**"EL TIEMPO PONE A CADA QUIEN EN SU LUGAR"**

Pensando en Benhur

**"NO EXISTE EL SILENCIO SI NO HAY QUIEN LO ESCUCHE"**

Cuando estuve leyendo algún artículo o realizando un ensayo

**"SI CUALQUIERA PUEDE SER UN GRAN CHEFF,  
CUALQUIERA PUEDE SER UN GRAN INVESTIGADOR"**

Pensando en la película Ratatouille.

**"PARA PERMANECER EN EL MISMO LUGAR DEBES SEGUIR CORRIENDO"**

Pensando en mis clases de Evolución

**TABLA DE ABREVIATURAS:**

8

**AB:** Alamar Blue/rezasurina**APC:** Célula presentadora de antígenos**ATP:** Adenosin Trifosfato**BCR:** Receptor de célula B**Breg:** Células B reguladoras**CD:** Clustering of Differentiation/ grupos de diferenciación**CIC:** Complejos inmunes circulantes**CMN:** Células Mononucleadas**DC:** Célula Dendrítica**EBV:** Epstein Barr Virus**ECMtb:** Extracto Crudo de *Micobacterium tuberculosis*, proveniente del sobrenadante del medio de cultivo**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas**F(ab')<sub>2</sub>:** Factor de unión al antígeno**Fc $\gamma$ :** Factor constante de IgG**Fc $\gamma$ RII:** Receptor del Fc $\gamma$ /CD32**FDC:** Células Dendríticas Foliculares**FITC:** Istocianato de Fluoresceína**GM-CSF:** Factor de crecimiento celular de granulocitos monocitos**HLA:** Antígeno Leucocitario Humano**HSP:** Proteína de choque térmico**ICAM:** Molécula de adhesión intracelular**IFN $\gamma$ :** Interferon gamma**IgG/M/A/E:** Inmunoglobulina G/M/A/E**IL:** Interleucina; IL-10 interleucina 10**ITAM:** Motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina**ITIM:** Motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina**LB:** Linfocito B/célula B**LFA:** Antígeno asociado al linfocito**LT:** Linfocito T/célula T**MACS:** Ensayo de separación celular mediante magneto**M $\phi$ s:** Macrófagos**MHC-I/II:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad I/II**NK:** Linfocitos citolíticos naturales**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos**Pe:** Phicoeritrina**PPR:** Receptores de reconocimiento de patrones**TAP:** Proteína asociada al transporte de antígeno**TB:** Tuberculosis**TCR:** Receptor de célula T**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$ **Th:** Linfocito T cooperador**TLR:** Receptor tipo Toll**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral**VCAM:** Molécula de adhesión celular vascular

## RESUMEN

**ANTECEDENTES.** Los linfocitos B (LB) incluyendo los autorreactivos, tienen la capacidad para capturar y procesar antígenos. Cuando a través de su receptor (BCR) interaccionan con IgG vía Fc $\gamma$  pueden presentar antígenos propios y/o extraños captados en complejos inmunes y participar en la activación y regulación de la respuesta celular. En tuberculosis (TB) se han reportado niveles altos de anticuerpos anti IgG, especialmente en la fase activa, y es frecuente encontrar la presencia de complejos inmunes circulantes constituidos por IgG anti-micobacteria.

En este trabajo se planteo la posibilidad de que en esta enfermedad es factible identificar alteraciones en la proporción de la población B Fc $\gamma$ -específica y evaluar su capacidad como presentadora de antígenos.

**OBJETIVO.** Identificar linfocitos B Fc $\gamma$  específicos en sangre periférica de pacientes con TB, y determinar sí mediante su capacidad para captar y procesar complejos inmunes constituidos por IgG y antígenos micobacterianos; induce una mayor activación de la respuesta celular.

**MÉTODO.** Se estudiaron muestras biológicas de 9 pacientes con TB activa y 7 controles sanos. La frecuencia de LB Fc $\gamma$ -específico se evaluó por citometría de flujo usando LB separados por MACS, a partir sangre periférica. Su capacidad de interaccionar con la porción Fc de IgG a través de su BCR se evaluó usando IgG humana marcada con FITC previo bloqueo de los receptores para su porción Fc (Fc $\gamma$ Rs) con anticuerpos específicos. También se analizó la frecuencia de LB CD5+, una población potencialmente autorreactiva que también puede alterarse en TB.

Adicionalmente en 5 muestras de pacientes con TB se evaluó la capacidad de los LB (incubados con complejos inmunes con y sin bloqueo de Fc $\gamma$ Rs; y control sin incubación de complejos inmunes) para inducir proliferación en células no B autólogas mediante co-cultivo, esto midiendo la reducción de rezasurina (alamar blue; AB).

**RESULTADOS.** Se encontró que los pacientes con TB activa presentaron una disminución significativa ( $p=0.05$  y  $z=-1.958$ ) de los LB Fc $\gamma$ -específicos con una mediana de 3.13% (extremos 0.44%-5.39%) respecto al grupo control que presentó una mediana de 11.4% (extremos 2.01%-15.8%). Respecto a la población de LB CD5+ también encontramos una disminución en TB activa ( $p=0.019$  y  $z=-1.006$ ) de esta subpoblación celular con una mediana de 3.4% (extremos 0.18%-14.9%), mientras que el grupo control presentó una mediana 11.1% (extremos 1.51%-29.6%).

En el co-cultivo no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.347$  y  $z=-0.94$ ) en el porcentaje de proliferación de células no B autólogas usando LB incubados con complejos inmunes con y sin bloqueo previo de los Fc $\gamma$ Rs.

Tampoco hay diferencia en el porcentaje de proliferación cuando hay bloqueo previo de Fc $\gamma$ Rs de los LB y la condición control donde los LB no son incubados con complejos inmunes ( $p=0.075$  y  $z=-1.781$ ).

**CONCLUSIONES.** La disminución en las proporciones en las células B Fc $\gamma$ -específica y en la subpoblación CD5+ en TB activa no han sido descritos. Aunque es difícil proponer una participación fisiopatogénica esto debe ser debido a que los linfocitos

autorreactivos son vitales en la modulación de la respuesta inmune.

**Palabras clave:** Linfocito B autorreactivo, tuberculosis, complejos inmunes circulantes, anticuerpo anti-IgG.

## ABSTRACT

**ANTECEDENTS.** Different B lymphocyte populations may have a relevant antigen presenting function. The appearance of an autoreactive Fc $\gamma$  specific B cell showing the potential to bind IgG and extrinsic antigens, via B cell receptor (BCR) and seems to be relevant in cell mediated regulation, has been described in several immunologically mediated diseases in which circulating immunocomplexes and antibodies to self IgG are frequent. This study, deals with the identification of this B cell subpopulation, and its possible antigen presenting cell activity in tuberculosis (TB) in which a high frequency of antimicrobial antibodies, anti IgG immunoglobulins, and circulating immunocomplexes have been reported.

**OBJECTIVE.** To identify the presence of a B cell Fc $\gamma$  specific in patients with TB, evaluating the characteristics of this lymphocyte, including the ability to bind IgG via BCR, and the capacity to induce cellular activation or have an APC function.

**METHODS.** We studied 9 patients with active TB and 7 healthy individuals. The frequency of B cell Fc $\gamma$  specific was evaluated through flow cytometry using a CD19 staining together with the capacity to recognize human IgG. Since the CD5+ B cell population may also be involved as autoreactive Fc $\gamma$  specific lymphocyte it was also studied. Also, we studied 5 TB samples in order to assess the APC capacity of total

B cells incubated with preformed immune complexes containing IgG and microbial antigens. Autologous cells were used as target lymphocytes and the proliferation was measured using as standard resazurin (Alamar blue) test.

**RESULTS.** The main findings in TB patients were a low percentage in those peripheral blood cells that showed Fc $\gamma$  specificity, and CD5+ phenotype. The median value in the first B cell population in TB was 3.13% (extremes 0.44%-5.39%), and the healthy group showed a median of 11.4% (extremes 2.01%-15.85) ( $p=0.05$ ). There was also a low percentage of CD5+ cells in TB with a median value of 3.4% (extremes 0.18%-14.9%) in this group, and 11.1% (extremes 1.51%-29.6%) in healthy controls ( $p=0.019$ ). In the co-culture system, we did not find any significant difference. Preformed immunocomplexes did not induce APC function in total B cells, and the use of Fc $\gamma$ R (CD64, CD32, and CD 16) specific antibodies did not change the cell proliferation index of autologous non B cells ( $p=0.75$  y  $z=-1.781$ ).

**CONCLUSIONS.** The decrease in the Fc $\gamma$  specific B cell subpopulation and CD5+ cells in active TB patients has not been previously described. Although it is difficult to propose a pathogenic participation this possibility must be considered, since autoreactive lymphocytes are relevant in several processes of immune modulation.

**Keywords:** autorreactive B cell, tuberculosis, immune complexes circulating, anti-IgG.

# I. INTRODUCCIÓN

## PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

Un proceso imprescindible para la respuesta inmune adaptativa es la sinapsis inmunológica en la que existe contacto entre una célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell, APC) y un linfocito T (LT) que permite la generación de mecanismos efectoros o de memoria en un contexto de cooperación y/o citotoxicidad celular [1, 2].

El rol primordial de las APCs es la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, con la participación de los siguientes eventos:

a) Captación de antígeno.

Esto mediante el reconocimiento de receptores como: receptores scavenger (SR), receptores de manosa (MR), receptores del complemento como CR1 (CD21), CR2 (CD35), CR3 (CD11b+CD18) y CR4 (CD11c+CD18); seguido de uno de los distintos procesos que permiten la internalización de un antígeno a la célula como la fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis y/o autofagia [3].

b) Procesamiento de antígenos endógenos y exógenos.

*Los antígenos endógenos*, que generalmente tienen una ubicación intracelular o citosólica como las proteínas tumorales, virales o proteínas bacterianas producidas dentro de células infectadas. Estas proteínas citosólicas sufren una degradación por sistemas proteolíticos dando lugar a pequeños péptidos que están presentes en todas las células. En este proceso la ubiquitina forma un conjugado con la proteína intracelular (antígeno endógeno) y ambos son conducidos a la parte central del proteosoma donde el antígeno es fragmentado por subunidades catalíticas como LMP-7 y LMP-2. Enseguida, mediante un mecanismo dependiente de ATP los fragmentos peptídicos son acarreados por la proteína transportadora TAP (transporter associated with antigen processing, TAP) al retículo endoplásmico rugoso, y en este organelo el segmento peptídico formará un complejo con la molécula MHC-I, y finalmente será expresada en la superficie de la membrana celular y así podrá interactuar con la célula T CD8+ [3-5].

*Los antígenos exógenos* son aquellos que deben ser internalizados por endocitosis o fagocitosis, y son procesados por la vía endocítica. Esta vía involucra tres compartimentos donde gradualmente se incrementa la acidez; el endosoma temprano (pH 6.0-6.5) y el endosoma tardío (pH 5.0-6.0) compartimentos en los cuales el antígeno es degradado en péptidos. Finalmente el antígeno puede ser transportado hasta un compartimento rico en MHC-II; que se denominan MIIC (compartimento de la clase II; propio de macrófagos y linfocitos en humanos). Este compartimento MIIC puede tratarse de un endosoma tardío, lisosoma o bien el fagolisosoma (fusión de lisosoma con un fagosoma) que constan de una menor capacidad proteolítica y de un conjunto de proteínas que intervienen en el acoplamiento del péptido exógeno a el MHC-II, a continuación este proceso se describe brevemente. Este péptido exógeno, consta de diversos epitopes conformacionales o lineales y es mediante un epitope de 13 a 18 residuos de aminoácidos que se acopla al MHC-II. El MHC-II cuenta con la proteína denominada cadena invariante (CD74) que bloquea la unión de antígenos endógenos a la molécula, el CD74 durante el transporte por los diferentes compartimentos es degradado por enzimas proteolíticas como catepsina S. Hasta que solamente se encuentra el fragmento de CD74, denominado CLIP (Class II-associated invariant chain peptide); la cual es intercambiada por el péptido exógeno mediante la molécula HLA-DM. La molécula HLA-DM a su vez acelera la unión del péptido antigénico que podrá ensamblarse en la porción más polimórfica del MHC clase II [3-6].

c) Sinapsis entre la APC y el linfocito T.

Esto ocurre mediante el reconocimiento del complejo MHC-péptido y el receptor de la célula T (T cell receptor, TCR), proceso en el cual se presenta el evento denominado sinapsis de activación supramolecular (supramolecular activation cluster; SMAC), que permiten que los componentes de la membrana celular conocidas como balsas lipídicas (lipid raft) se polaricen alojando en el caso de la célula T- al TCR, CD3, CD154, cadenas  $\zeta$ , y los co-receptores como CD28. En esta región central o SMAC la distancia entre ambas células es de 15nm y es estabilizado por distintas moléculas de adhesión incluyendo algunas integrinas (LFA-1/CD11a-CD18) en LT y sus ligandos de la superfamilia de las

inmunoglobulinas ICAM-1/CD54 en la APCs, mientras que en la región periférica la distancia es de 40nm [3-6].

- d) Por último la expresión de moléculas co-estimuladoras, como CD80/CD86, CD40, en APCs y CD2/LFA-2, CD154, CD28, CD58/LFA-3 expresadas en LT. Dichas moléculas son vitales para la activación inmunológica y su presencia puede determinar el éxito de la activación de los linfocitos ya que entre sus funciones están promover sobrevivencia, estabilizar el contacto entre las células, y promover la expresión de otros co-receptores como; el receptor para el factor de necrosis tumoral en Mφs, cambio de isotipo en LB, así como la transducción de señales [3-5].

### **PRESENTACIÓN CRUZADA (Cross-presentation).**

En esta década se han propuesto que las APC profesionales pueden procesar tanto antígenos exógenos y antígenos propios mediante una vía alterna que permite que los péptidos exógenos sean ensamblados al MHC-I y, presentados al linfocito T CD8+ teniendo la capacidad de promover una respuesta celular Th1 [3, 5].

De acuerdo a evidencias recientes y distintos modelos experimentales el proceso ocurre principalmente en DCs. Los mecanismos vacuolares en los que hay una fusión del retículo endoplásmico con el endosoma temprano el cual involucra el intercambio de péptidos y puede ser dependiente o independiente de TAP. También se ha reportado que el tipo de péptido acoplado al MHC puede favorecer el procesamiento cruzado, como las proteínas de choque térmico (heat shock protein HSP) de la familia HSP70. Por ejemplo el HSP70 al co-administrarse con gp33 (péptido proveniente del virus de coriomeningitis linfocítica; LCMV) induce mayor actividad citotóxica en los linfocitos [7, 8, 23].

Por otro lado en Mφs este mecanismo no parece ser recurrente, aunque reportes recientes demuestran que algunas subpoblaciones lo desarrollan e incluso procesos como la autofagia promueven este mecanismo [3, 6, 20]. Mientras que para los LB este tipo procesamiento en condiciones de baja disponibilidad de antígeno se sugiere que puede ser una vía alterna fundamental. Además se ha demostrado que las células B

realizan el procesamiento cruzado vía CD91 cuando son estimulados con una fusión peptídica de ovoalbúmina y HSP70r de *Mycobacterium tuberculosis* [3, 7, 8, 9].

### **CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.**

Estrictamente podemos referir que las APC profesionales son: a) las células dendríticas, b) los macrófagos y, c) los linfocitos B; que tienen como característica común expresar constitutivamente el **MHC-II** y por tanto involucra primordialmente la participación de este tipo de complejo y su unión al péptido para realizar la sinapsis con el LT CD4+, sin embargo cada una de estas células tienen características que dependiendo de las condiciones microambientales, fisiopatológicas, y de las propias interacciones que mantengan con otras APCs y con distintos antígenos dictaran su rol en la homeostasis [2, 10, 12-14]. Aunque todas las células nucleadas tienen la capacidad de presentar el péptido en el contexto del **MHC-I** y es posible que expresen el **MHC-II** principalmente durante la inflamación en periodos más cortos, estrictamente se considera que las células profesionales solamente comprenden las tres células mencionadas. [2-4, 6].

### **MACRÓFAGOS (Mφs).**

Dentro de las cualidades de esta APC, se encuentran su alta capacidad para capturar antígenos, mediante mecanismos como la macropinocitosis, la autofagia y la fagocitosis, propiedad que está íntimamente relacionada con su eficiente maquinaria enzimática que permite procesar rápidamente los antígenos [4, 15-18]. Los Mφs utilizan receptores para captar un gran número de antígenos propios y extraños como: receptor scavenger (Scavenger receptor; SR) que tiende a unirse a lipoproteínas de baja densidad, el receptor de manosa (MR; CD206) y DEC205 (CD205) que pertenecen a la familia de lectinas tipo I, los cuales se unen principalmente a manosa y fucosa; receptores como CD11b/CD18 que capturan partículas recubiertas por proteínas del complemento como C3Bi; receptores que capturan complejos inmunes circulantes (CIC) como FcγRII (CD32); hasta complejos como TLR4-CD14 que captan antígenos de carácter lipídico. Los Mφs se consideran como una de las principales poblaciones cuya actividad como APC es también importante durante el inicio de la respuesta inmune gracias a su gran capacidad de endocitosis [15, 16, 20].

Recientemente se demostró en macrófagos que la autofagia resulta un proceso vital no sólo para la captación de antígenos sino también para el procesamiento cruzado. Mediante macrófagos infectados con el virus herpes simple I (HSV-1) se observó mediante microscopia de fluorescencia la expresión del marcador para autofagia LC3 y la ausencia del mismo en el grupo de células no infectadas demostrando que la autofagia es relevante para realizar la presentación cruzada [18]. Adicionalmente existe una menor proliferación de LT CD8+ respecto a aquellas células que fueron tratadas con brefeldina-A la cual inhibe el transporte de moléculas a través de la ruta biosintética (RE y aparato de Golgi) que es fundamental para la presentación cruzada [18]. Por otra parte, las propias condiciones de un microambiente o nicho inmunológico como el pulmón determinan el “fenotipo” de cualquier población celular APC. Por ejemplo se ha demostrado que los macrófagos alveolares tienen una capacidad menor para procesar antígenos derivados de *Lysteria monocitogenes*, respecto a los macrófagos peritoneales [19].

Por otro lado, el tipo de antígeno que se procesa puede actuar predominantemente sobre alguna APC. Por ejemplo, en ratón usando una técnica donde eliminan selectivamente Mφs mediante diclorometileno difosfonato (Cl<sub>2</sub>MDP), se observó en bazo que al estimular con liposomas que contienen ovoalbúmina no existe incremento en la proliferación de LT citotóxicos, mientras que la estimulación con virosoma promueve la proliferación de estos linfocitos lo que se explica porque las DCs y LB presentan estos péptidos a los LT. En el grupo control en el que no se eliminan previamente los Mφs existe proliferación de LT citotóxicos con ambos estímulos. Por lo tanto los Mφs solamente presentan péptidos provenientes del liposoma cargado con ovoalbúmina induciendo la activación de linfocitos T citotóxicos [16].

### **CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs).**

Se considera que una de las principales APC son las DC, las cuales se encuentran virtualmente distribuidas en todos los tejidos. Convencionalmente su tarea es capturar los antígenos y lo realiza a través de receptores como: receptor Scavenger (SR), receptor de manosa (CD11c), receptor tipo lectina SIGN (DC-SIGN), receptor tipo Toll (TLR), CD32 (FcγRII) y receptor del complemento CR4 (CD11c+CD18). Para realizar su función APC es indispensable su migración a ganglios linfáticos lo que ocurre a la par de su maduración (entre 1 a 3 días) [3, 110]. Otra característica importante es que se han inmunofenotipificado diferentes subgrupos de DCs, existiendo cuando menos las DCs convencionales y las plasmocitoides. Recientemente se ha especulado que las DCs plasmocitoides que se encuentran en mucosas no requieren migrar para lograr madurar sin embargo tienen una menor expresión de moléculas co-estimuladoras. Incluso algunos reportes clasifican a las DCs en al menos 5 subtipos adicionales: CD8+, CD4+, CD4-CD8-, Langerhans, e intersticial, con base en su origen o características de sus células progenitoras, además de la expresión diferencial de los siguientes marcadores: CD11c, CD8, CD4, CD205, CD11b, CD45RA [113, 114, 10, 23]. Aunque seguramente faltan nuevos grupos celulares por identificar, ya que recientemente se ha descrito una DC derivada de piel con perfil migratorio y fenotipo CD103+CD8α+ que es capaz de realizar presentación cruzada al igual que las DC CD8+ [24, 22, 23].

Por otra parte, algunas características en las poblaciones de DCs que comparte con los LB es que cuentan con un menor contenido de la proteasa lisosomal (lamp-1) y parecen tener una mayor capacidad para degradar e internalizar lentamente los antígenos reteniéndolos por mayor tiempo en órganos linfoides, además de que también expresan constitutivamente moléculas MHC-II y co-estimuladoras, aunque a diferencia de las otras APCs tienen una alta densidad de CD86 [21, 3].

**CÉLULA B (linfocito B; LB).**

Se considera que la tarea fundamental del linfocito B es diferenciarse en célula plasmática y producir anticuerpos. Sin embargo, sus funciones están determinadas por las características genéticas intrínsecas de las subpoblaciones que constituyen esta estirpe celular y el microambiente donde se encuentren.

Un ejemplo clásico de la influencia del microambiente en la población de las células B es el efecto de inflamación que ocasiona una disminución de los linfocitos B (LB) en la médula ósea y su desarrollo en el bazo. Esto sugiere que la maduración se realiza en la periferia donde existe una "selección menos estricta" causando el aumento de células autorreactivas, favoreciendo padecimientos autoinmunes. Mientras que en inflamación crónica las vías de señalizaciones celulares y moleculares inducen la formación de tejidos linfoides terciarios [25, 26, 27, 28].

Por otro lado, las poblaciones de células B han sido principalmente descritas en el ratón donde ha sido posible distinguir por fenotipo, topografía y características funcionales dos grupos celulares principales (Tabla I). La población B2 es la clase más grande y es relativamente más heterogénea es generada directamente en la médula ósea y se encuentra recirculando en el bazo y los ganglios linfáticos, aunque es posible también encontrarla en el bazo en la zona marginal. Puede decirse que se encuentran en reposo recirculando en ganglios linfáticos hasta que son activadas tras su encuentro con el antígeno o mediante citocinas (timo-independiente) o bien después del contacto con el LT (timo-dependiente). Por lo tanto los principales marcadores para identificar esta subpoblación son CD19+ que es un pan-linfocito B, CD40+, CD27+, que son propios de células activadas y CD38+ característico de células plasmáticas [29, 49].

En cavidades pleurales y peritoneales hallamos una población enriquecida de clase B1 y son la primeras en formarse en el hígado fetal y cordón umbilical. La mayor proporción de estas células son CD5+, producen anticuerpos con menor afinidad, presentan principalmente una respuesta timo independiente, tienen menor hipermutación, son capaces de auto-renovarse, cuentan con resistencia a la apoptosis vía Fas y se caracterizan por tener un perfil autorreactivo [35, 49].

Estos conceptos por razones bioéticas y metodológicas son más sencillos de realizar en modelos murinos que en el humano, aunque diferentes trabajos han usado los marcadores para identificar a los LB clase B1 en sujetos con padecimientos autoinmunes, e incluso se encuentran de forma natural en individuos sanos [30, 31, 35]. Además estudios recientes han reportado subpoblaciones de células CD5+ que típicamente son descritos como clase B1 y estos parecen confirmar un grupo de linfocitos con función reguladora en sangre periférica al actuar sobre células T reguladoras inhibiendo directamente la proliferación por el contacto célula-célula o mediante la secreción de IL-10 que disminuye la proliferación y activación de LT, DC y Mφs[31, 115].

Estos LB pueden cambiar en términos de número y función en algunas patologías como diabetes mellitus, leucemia y patologías autoinmunes (artritis reumatoide y lupus eritematoso) respecto a los sujetos sanos. Por otra parte, también se ha reportado que el incremento de dicha población celular, está correlacionado con la producción de autoanticuerpos y anticuerpos polirreactivos [30, 31, 32, 33].

**TABLA I. POBLACIONES DE LB EN RATÓN.**

TIPO DE POBLACIÓN CELULAR	B-1		B-2	
	B-1a	B-1b	Zona Marginal	Folicular
<b>FRECUENCIA</b>	2%	<1%	15%	>70%
<b>CDs</b>				
CD5	+	-	-	-
CD19	ALTO	ALTO	MEDIO	MEDIO
CD1d	MEDIO	MEDIO	ALTO	MEDIO
CD21	BAJO	BAJO	ALTO	ALTO
CD23	-	-	-	+
CD43	+	+	-	-
IgM	ALTO	ALTO	ALTO	BAJO
IgD	BAJO	BAJO	BAJO	ALTO
CD32	+	+	+	+
CD54	+	-	?	?
CD44	+	-	?	?
CD43	+	-	?/-	?/-
CD11a	+	¿	?	?
CD9	+	+	-	-

\*Adaptado de referencias 29, 49 y 115.

Respecto a los sujetos sanos la población B-1 se caracteriza por secretar IgA, IL-10 y producir anticuerpos naturales polirreactivos (IgM) los cuales son generados sin la exposición del antígeno, por lo que se considera que provee protección contra agentes

patógenos como parte de una primera barrera en la inmunidad y se acepta que se comporta como parte de la respuesta innata [29, 34, 35].

De acuerdo al perfil que define su producción de citocinas algunos reportes sugieren que podemos dividir a las células B en dos categorías: El de perfil regulador caracterizado por la secreción de IL-10 y TNF- $\alpha$ , y el perfil efector en el que se ha reconocido la producción de citocinas como IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6 (típicamente de poblaciones B2), o IFN $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$  (típicamente de poblaciones B1). Esto es muy interesante, ya que en un inicio se identificó a la IL-10 como un factor de crecimiento de linfocitos B, debido a la capacidad para inducir la proliferación en estas células, y porque actualmente se conoce que dentro de sus principales efectos pleiotrópicos incluyen actuar como anti-inflamatorio e inhibidor de la proliferación de LT, M $\phi$ s y DCs [35, 36, 40].

Las células B de memoria constituyen otra población celular importante, su inmunofenotipo incluye la expresión de las moléculas CD19 y CD27, y se distingue por secretar citocinas proinflamatorias (linfotóxina y TNF- $\alpha$ ), y tener una baja producción de IL-10 respecto a los LB CD19+CD27- (fenotipo de LB naïve). De hecho, el marcador CD27 es el típico perfil de una célula de memoria [28, 37]. En este mismo contexto, se han identificado dos compartimentos, el de las células plasmáticas que son responsables de la fase efectora o producción de anticuerpos y otro correspondiente a los LB de memoria que representan el proceso central que define a los precursores capaces de generar y restablecer las células plasmáticas. La diferenciación de las células naïve en células de memoria ocurre dentro de los centros germinales en los ganglios linfáticos donde proliferan preponderantemente, se presenta hipermutación, cambio de isotipo, así como selección dirigida por el antígeno y finalmente diferenciación a células de memoria y plasmáticas [38, 39].

Una característica muy interesante es que la expresión de CD27 en los LB se incrementa gradualmente; los LB de sangre de cordón umbilical no expresan este marcador mientras que el 40% de los LB de sangre periférica si lo expresan. Además, también se ha reportado una población de LB de memoria CD27-, estos se caracterizan por presentar un menor tamaño con escaso citoplasma y son IgD+. Respecto a las

diferencias funcionales, los CD27+ se activan más rápidamente y pueden producir altos niveles de IgM, IgG, e IgA; después de la estimulación vía CD40 e IL-4, además de que las células CD27+ secretan más IgE respecto a las CD27- [38, 37, 29].

Recientemente en algunos modelos experimentales de procesos patológicos como la encefalomiелitis autoinmune experimental, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide; se han descrito cambios importantes en las células B reguladoras (Breg), una población cuya ontogenia en el humano no ha sido posible esclarecer al presentar marcadores propios de células B1 y B2 (Tabla II) y cuya producción de IL-10 y TGF- $\beta$  parece contribuir en desarrollo de enfermedades autoinmunes [41, 30, 42, 43, 48].

**TABLA II. FENOTIPO DE LINFOCITOS B REGULADORES.**

TIPO DE POBLACIÓN CELULAR	Bregs	
FRECUENCIA	1-2% en células mononucleares	
CDs	CARACTERISTICAS DE B1	CARACTERISTICAS DE B2
CD5	+	+/-
CD19	ALTO	ALTO
CD1d		ALTO/MEDIO
CD21		+/-
CD23	-	-
CD43		ALTO
IgM	ALTO	
IgD	BAJO/MEDIO	

\*Adaptado de referencia 29

Aunque se ha reportado en modelos murinos que en algunos padecimientos autoinmunes la delección de esta población Breg repercute de forma perjudicial. Por ejemplo, al inducir artritis reumatoide por administración de colágena tipo II en la cepa DBA/1-TCR $\beta$  Tg se obtiene un incremento de la población celular que produce IL-10 mediante la estimulación del receptor CD40, y un descenso de la población que produce IFN- $\gamma$ . Sin embargo otros reportes indican que la producción IL-10 por Bregs aparece bajo condiciones inflamatorias y no son detectadas en condiciones normales. Por ejemplo, en el ratón-propenso a lupus eritematoso las Breg al ser activadas vía TLR9, estas producen altos niveles de IL-10 disminuyendo indirectamente la secreción de IL-12 e inhibiendo a las DCs y M $\phi$ s; lo que implica una respuesta anómala en la enfermedad [44, 47]. Una característica interesante de las Breg es que éstas expresan

CD1d que es un receptor que capta antígenos de carácter lipídico y activan células NKT y linfocitos  $T\gamma\delta$ . De hecho las células Breg CD1d<sup>high</sup>CD43<sup>+</sup> utilizan moléculas accesorias como CD40 y CD86 que están presentes en linfocitos B2 pero no en B1, y también secretan IL-10. La producción de IL-10 está bien caracterizada en células B1 CD5<sup>+</sup> del peritoneo, y de forma interesante diversos estudios indican que el fenotipo CD11b-CD5-IgD<sup>+</sup> también secreta IL-10, constituyendo una población de células Bregs similar a la B2 pero no a la B1a [44-48].

Por otro lado, si se revisan las características de los linfocitos B, todas ellas tienen atributos comunes que le permiten funcionar como una APC profesional incluyendo:

- a) Expresión constitutiva de moléculas coestimuladoras y altos niveles de MHC-II, los blastocitos presentan una mayor expresión de MHC-II que las DCs [3].
- b) La presencia de chaperonas de antígenos leucocitarios humanos que regulan el procesamiento antigénico; (HLA)-DM contribuye a cargar el péptido sobre el MHC-II y (HLA)-DO la regula la instalación del péptido sobre el MHC-II. HLA-DO se expresa en células de memoria, siendo menor su expresión en células naïve pero principalmente en células de centros germinales. En células plasmáticas su expresión es nula, todo lo anterior sugiere que esta chaperona es fundamental en el procesamiento antigénico [50, 51].
- c) Capacidad para procesar los antígenos lentamente, por ejemplo los Mφs procesan antígenos de *Lysteria monocytogenes* en 1 hora, mientras que los LB al contar con una menor cantidad de proteínas proteolíticas lo realizan en un periodo óptimo de 6 a 8 horas; lo que favorece la retención del antígeno por largos periodos facilitando el tiempo de exposición del antígeno a la célula T [19, 76, 21].
- d) Reconocimiento y captación de antígenos en su estado nativo en pequeñas concentraciones mediante su receptor (B Cell Receptor; BCR), el cual tiene una alta afinidad ( $K_a$  de  $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ). Por ejemplo, posterior al procesamiento antigénico con una concentración de antígeno soluble de 0.05nM, las células B

son capaces de inducir proliferación en LT CD4+, mientras que el proceso de pinocitosis requiere una concentración 500 veces más alta [52, 53].

- e) Sitios de encuentro. Las principales áreas de contacto con el antígeno son los ganglios linfáticos secundarios y el bazo. Los ganglios están formados por tres regiones la medula, la paracorteza (zona de LT) y los folículos (zona de LB) y en cada una de estas se expresan quimiocinas específicas [54, 55, 56]
- f) Diversas vías de facilitación para la interacción antígeno-célula B.

Encuentro con antígenos solubles en circulación linfática. Estos se encuentran circulando a través de las vasos linfáticos aferentes, y de acuerdo con observaciones realizadas mediante microscopia electrónica se han identificado regiones adjuntas al parénquima donde es posible encontrar poros con un diámetro de 0.1-1.0  $\mu\text{m}$  lo que puede permitir el acceso de pequeños antígenos solubles que pueden ser captados por LB [54, 58].

Captura favorecida por M $\phi$ s. Los M $\phi$ s localizados en el seno subcapsular constituyen una población que se caracteriza por tener una actividad fagocítica limitada al carecer de receptores de manosa, una expresión considerable de moléculas de adhesión, como ICAM1 y VCAM1; y son capaces de retener hasta por 72 horas antígenos intactos sobre su membrana celular o en forma de complejos inmunes circulantes (CIC) mediante su Fc $\gamma$ RII (CD32), a los que tiene acceso el LB [54, 57].

Captura favorecida por DCs. Al igual que los M $\phi$ s las DCs en especial las que se localizan en la paracorteza principalmente en las vénulas del endotelio alto tienen la capacidad de retener los CICs y que estos tengan la posibilidad interaccionar con los LB.

Captura favorecida por FDC. Retención de CICs mediante dos vías, una de ellas a través de CD21 y CD35, que son receptores del complemento que son altamente expresados en esta población celular, y la segunda vía por su capacidad para retener CIC mediante el Fc $\gamma$ RII, aunque cabe señalar que estos FDC no son altamente expresados en los folículos primarios y respecto a la

etapa temprana de la respuesta inmune parecen tener un papel secundario [54].

## II. ANTECEDENTES

En todo este contexto, una de las principales funciones de los LB es actuar como APCs independientemente de sí corresponden a las subpoblaciones B1 o B2.

Entre las diferencias mejor reconocidas está el hecho de que las células de la clase B1 reconocen principalmente patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns; PAMPS) y también cuentan con propiedades autorreactivas, principalmente capacidad polirreactiva respecto a la monorreactiva esto en el contexto de la producción de anticuerpos naturales [59- 62].

En contraste, recientemente se ha reportado que las células B2 pueden tener un perfil autorreactivo y que la síntesis de anticuerpos naturales y anticuerpos anti-IgG puede ser polirreactiva y monorreactiva, respectivamente [34, 59, 65, 60, 61]. En este sentido, la autorreactividad de los anticuerpos naturales comprende dos elementos: la autorreactividad con monorreactividad o monoespecificidad que incluye el reconocimiento de componentes propios, lo cual está relacionado principalmente con enfermedades autoinmunes y la autorreactividad con polirreactividad o poliespecificidad, uno de cuyos orígenes posibles es el reconocimiento inicial de agentes patógenos o antígenos extraños, siendo su principal función la regulación. Estas características son esenciales ya que en diversos reportes se ha observado que la polirreactividad de los anticuerpos naturales desempeña un papel fundamental de la inmunidad innata, y la monorreactividad se relaciona con daño tisular; en consecuencia existen diferentes subpoblaciones de linfocitos B con perfil autorreactivo y todas ellas son parte del repertorio inmunológico normal [60-64].

Respecto a los factores que favorecen la presencia y expansión de linfocitos autorreactivos tanto B1 como B2, es importante señalar que la persistencia prolongada de antígenos como es el caso de la IgG propia [87, 88], o la formación de complejos inmunes circulantes (CIC) constituidos por esta inmunoglobulina, y su unión y depuración mediado por receptores Fc $\gamma$ , como los Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII

(CD16) [15] entre otras condiciones pueden favorecer la generación de distintas subpoblaciones B autorreactivas.

Todo lo anterior ha permitido comprender el papel biológico de los linfocitos B con función APC [3]. Adicionalmente, su relevancia empieza a ser reconocida en distintas condiciones patológicas, no sólo en los padecimientos autoinmunes como: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, sino también e infecciones crónicas en la que están involucrados diferentes microorganismos como en la endocarditis bacteriana, coccidioidomicosis y tuberculosis en las cuales se han descrito auto-anticuerpos y la presencia de CIC en las cuales hay reactividad contra distintos componentes propios como la IgG [42, 119].

Interesantemente, distintas observaciones han sugerido que entre las condiciones fisiopatológicas que favorecen el desarrollo de tuberculosis, están las alteraciones inmunológicas que ocurren en procesos autoinmunes en los que son frecuentes la presencia de anticuerpos anti-IgG, y prueba de ello es que este tipo de infección se incrementa hasta en 3.2 veces en pacientes con artritis reumatoide. Incluso, algunos reportes recientes indican que de los pacientes con tuberculosis el 62% presentan anticuerpos anti-IgG, en contraste solamente el 2.6% de la población clínicamente sana presenta anticuerpos anti-IgG [111, 112].

Los anticuerpos anti-IgG que se incrementan en TB pueden ser monoespecíficos (50%) y poliespecíficos (50%), mientras que en procesos autoinmunes como la artritis reumatoide predomina la monoespecificidad (76%) [67]. Esto sugiere que las células B (B1 y B2) pueden participar en estos casos. Además de la autorreactividad, el grado de afinidad de anticuerpos contra componentes propios puede tener una implicación clave en la fisiopatogenia en procesos patológicos de origen infeccioso como la TB, sin embargo su trascendencia no ha sido estudiada, en particular cuando lo anterior se relaciona con la presencia de complejos inmunes.

En tuberculosis se ha detectado que entre en 56 y 83% de los pacientes presentan CIC, los cuales generalmente están constituidos por IgG y distintos antígenos micobacterianos (ver tabla III) [116-121]. Además, después de 4 a 6 meses del tratamiento anti-tuberculoso hay disminución significativa en la frecuencia de

enfermos que presentan CIC, por ejemplo Singh y cols. reportan que la frecuencia de pacientes con CIC pasa desde el 68% hasta prácticamente desaparecer [121]. Si relacionamos, estas observaciones con el reporte de una alta frecuencia de anticuerpos anti-IgG en la fase activa de pacientes con TB es muy probable que algunos de los CIC puedan estar involucrados en el incremento de las células B reactivas a la IgG propia, debido a que uno de los inductores de este tipo de alteraciones es la presencia de CIC [130].

**Tabla III. Porcentaje de pacientes con TB que presentan CIC.**

Constitución del CIC.	Antígeno estudiado con el que interacciona el CIC.	Porcentaje (%) de pacientes con tuberculosis que presentan CIC.	Porcentaje (%) de sujetos sanos que presentan CIC.	Autores	Año	Método de detección
IgG+IgM+IgA IgG	Antígeno de 16 KDa	83 62	10	Alamelu Raja	2002	ELISA
IgG	Antígeno 5	80	0	V. Radhakrishnan	1992	ELISA
IgG	MPT/81KDa GlcB	68/77	0	Krishna Singh	2003	ELISA
IgG+IgM+C1q	ND	56	0	NMcl Jhonson	1981	Precipitación de PEG y fotometría
ND	ND	66	3.3	Geeta Bajaj	1990	
ND	ND	90	ND	Baldev Raj	1996	

ND: no determinado

En el mismo sentido, otra de las moléculas que frecuentemente puede ser blanco de la respuesta inmune y la formación de CIC en pacientes durante la infección con *M. tuberculosis*, es la proteína de choque térmico, denominada HSP65 (Heat Shock Protein 65). De acuerdo a algunos estudios este antígeno micobacteriano induce una alta frecuencia de anticuerpos circulantes y también ha sido involucrado como posible antígeno causal en pacientes con autoinmunidad, especialmente en el grupo con artritis reumatoide [126]. Esto ha tenido sustento experimental en un modelo de ratas Lewis, en el cual la artritis reumatoide puede ser inducida mediante la inoculación de una cepa inactivada de *M. tuberculosis* H37Ra [94, 95, 122], y en cuya fisiopatogenia se ha involucrado a la HSP65 a través de un mecanismo de mimetismo molecular, ya que esta proteína de choque es altamente conservada y tiene una gran similitud entre el humano y dicho microorganismo [123, 126].

En este contexto, los linfocitos B autorreactivos anti-IgG tanto de tipo B1 como B2, no solo juegan un rol fundamental en la homeostasis del sistema inmunológico debido a

que las inmunoglobulinas que producen cuentan con una capacidad polirreactiva o monorreactiva cuyo efecto incluye la depuración de CIC y sus componentes [3, 65, 67], sino porque parecen ser participantes esenciales en la presentación de antígenos y activación de células T, como lo han señalado Tighle y cols. [125] quienes reportaron que las células B1 y/o B2 con una alta expresión de anti-IgG membranaral no presentan una alta producción de anti-IgG soluble, lo que en conjunto con otros estudios ha indicado que una alta capacidad APC parece distinguir a este tipo de linfocitos autorreactivos [3, 131], lo que puede explicar que entre sus funciones principales se encuentren:

- a) Modular la producción de anticuerpos mediante la co-agregación del BCR y el FcγRIIb [88].
- b) Participar en mecanismos de resistencia/susceptibilidad a infecciones cuando su respuesta polirreactiva involucra el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos [63, 64, 65], y
- c) Realizar el procesamiento y presentación de antígenos propios y/o extrínsecos unidos a anticuerpos naturales y/o complejos inmunes circulantes, promoviendo una respuesta celular eficiente [125]

En este sentido, hemos planteado que el estudio de linfocitos autorreactivos B1 y/o B2 y en particular de la población que denominamos célula B Fcγ específica, permitirá identificar una población APC que contribuye al estado de resistencia o susceptibilidad en enfermedades que presentan CIC [67, 125]. Por lo anterior, este trabajo se inició al considerar que los linfocitos autorreactivos incluyendo las células B Fcγ específico pueden tener un papel esencial en el tipo de respuesta inmune que se genera en TB, en particular porque en esta enfermedad se han reportado anticuerpos anti-HSP y contra el Fc de IgG, así como la formación frecuente de CIC [67, 68, 126].

### III. JUSTIFICACIÓN

Al estudiar el fenotipo y la función APC de los linfocitos B se han logrado identificar distintas subpoblaciones que pueden tener relevancia en procesos patológicos tanto de causa autoinmune, como en infecciones crónicas incluyendo la tuberculosis [44, 60, 63, 64, 115, 67]. Entre estas células, las que muestran autorreactividad y tienen la propiedad de modular tanto la inmunidad natural como la respuesta adquirida, han sido motivo de intenso estudio porque su número y función se pueden alterar especialmente en enfermedades caracterizadas por la formación de CIC [65].

Entre los linfocitos mejor caracterizados, se ha reportado que las células B1 se distinguen por expresar la molécula CD5, ser CD138 negativas y producir anticuerpos que frecuentemente son polirreactivos e involucran antígenos propios, mientras que las células B2 se caracterizan por expresar las moléculas CD27, CD22, CD138 y generar una respuesta de mayor especificidad antigénica que involucra a distintos auto-anticuerpos [29, 49, 115, 127]. Interesantemente, se ha descrito que el potencial autorreactivo de ambas subpoblaciones incluye su capacidad de reconocer IgG o ser Fc $\gamma$  específicas, y tener primordialmente una mayor capacidad como APC [59, 60, 65, 125, 127].

Siendo la tuberculosis una enfermedad en la que se ha descrito la presencia de una respuesta humoral a distintos componentes de *M. tuberculosis*, la formación de CIC, y fenómenos de autorreactividad frecuentes incluyendo anticuerpos anti-IgG con especificidad para la porción Fc [67, 111, 112], esta fisiopatología constituye un excelente modelo para el estudio de linfocitos autorreactivos B1 y/o B2 en particular una población de células B Fc $\gamma$ -específicas que tiene la capacidad para captar antígenos micobacterianos unidos a IgG, y que mediante su función APC puede activar la respuesta inmune celular [67, 115, 125]. Por lo anterior, en este trabajo se planteó la posibilidad de identificar una población autorreactiva de linfocitos B cuyo número y capacidad como APC no han sido previamente estudiadas.

### **III. HIPÓTESIS**

Las células B Fc $\gamma$ -específicas se incrementan en procesos patológicos caracterizados por la formación de CIC y la presencia de anticuerpos anti-IgG como la TB, y debido a su potencial para reconocer IgG unida a antígenos extrínsecos incluyendo los micobacterianos, esta población autorreactiva mediante su función como célula presentadora de antígenos promueve la activación celular.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Identificar linfocitos B Fc $\gamma$  específicos en sangre periférica de pacientes con TB, y determinar si estas células presentan capacidad APC, teniendo la propiedad de procesar CIC constituidos por IgG y antígenos micobacterianos; e inducir la activación de células autólogas.

#### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Estudiar una subpoblación de células B CD19+ cuya capacidad de unirse al Fc $\gamma$  a través de su BCR se identifique mediante la unión IgG humana a este receptor, y establecer su proporción en pacientes con tuberculosis y un grupo control de sujetos sanos.

Comparar la frecuencia de células B Fc $\gamma$ -específica, así como de la subpoblación CD5+ (B1) que también han mostrado ser autorreactivos en pacientes con tuberculosis y un grupo control de sujetos sanos.

Evaluar la capacidad APC de los linfocitos B, mediante un sistema de co-cultivo con células autólogas, usando complejos inmunes constituidos por anticuerpos contra antígenos anti-micobacterianos.

## **V. MÉTODOS**

### **GRUPO DE ESTUDIO**

#### **PACIENTES Y GRUPO CONTROL**

Nuestro estudio incluyó muestras biológicas de 20 pacientes en quienes se realizó el diagnóstico de tuberculosis pulmonar mediante su evaluación clínica, bacteriológica y de cultivo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria (INER). Todos ellos fueron seleccionados mediante los criterios internacionales de clasificación para esta patología [69], y ninguno debió haber recibido tratamiento antimicobacteriano alguno al momento de ser estudiados. Se utilizaron muestras biológicas de 10 voluntarios sanos como controles, los cuales presentaron características demográficas similares al grupo con TB. Las muestras de sangre periférica obtenidas fueron utilizadas para realizar los ensayos de citometría de flujo. Esta investigación fue aprobada por los Comités de Investigación y Ética del INER, y contó con el consentimiento informado de pacientes y controles. También se utilizaron 13 muestras biológicas (plasma) de pacientes con TB activa perteneciente y 23 muestras biológicas de sujetos sanos (plasma) utilizados para la obtención de complejos inmunes.

### **AISLAMIENTO DE CÉLULAS B**

#### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS**

Se obtuvieron 12 mL de sangre periférica por venopunción mediante un sistema de vacutainer (Beckton Dickinson, USA) recolectando las muestras en tubos conteniendo EDTA y la separación de células mononucleadas (CMN) fue realizada a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque ( $1.077 \pm 0.001$  g/ml, (Sigma Co. USA) centrifugando a 1500 r.p.m. por 15 minutos a 4°C. En seguida se procedió a realizar dos lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS) libre de pirógenos endógenos, y la cuantificación celular y evaluación de la viabilidad se realizó en la cámara de Neubauer usando 0.2% de azul tripano [70].

**SEPARACIÓN DE CÉLULAS B Y NO B MEDIANTE UN SISTEMA INMUNOMAGNÉTICO (MAGNETIC ASSAY CELL SORTER, MACS).**

Después de obtener las células mononucleares, se dividió la muestra en dos alícuotas: Una para los ensayos de inmunofenotipificación y de cocultivo celular, y otra destinada para la transformación mediante el virus del Epstein Barr (EBV). Se utilizó un Kit II de aislamiento magnético por selección negativa de células B (130-091-151, Miltenyi Biotec, USA). Para ello se determinó el número celular, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el botón celular y se adicionaron 40  $\mu$ l de amortiguador MACS y enseguida 10  $\mu$ l del cocktail de anticuerpo biotinilado, para  $10^7$  de células totales. Se incubó a 4°C por 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 30  $\mu$ l de amortiguador y 20  $\mu$ l de micro perlas acopladas con anticuerpos anti-biotina, se homogenizó la muestra e incubó por 15 minutos a 4°C y se lavó tres veces a 1500 rpm por 10 minutos. Se preparó el soporte con su magneto instalado y se colocaron tubos colectores para las células no acopladas al contenedor que provee el campo magnético. Estas células que no fueron retenidas por el campo magnético correspondieron a las células B, y las seleccionadas positivamente correspondieron a las células no B. La cuantificación y viabilidad celular se realizó mediante la cámara de Neubauer, usando azul tripano [70].

**TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES CON EL VIRUS DEL EPSTEIN BARR (EBV).**

Con el fin de obtener un mayor número de células de la población de linfocitos B, se utilizó el método de transformación con el virus del Epstein Barr. Se procedió a realizar la transformación de las CMN a partir de  $50 \times 10^3$  células/ml adicionando una alícuota de 500  $\mu$ l del sobrenadante de la línea celular Marmoset B95-8 (American Tissue Cell Culture, ATCC, USA) adicionando 4 horas después 15  $\mu$ l fitohematoglutina (Gibco, USA) (PHA, dilución 1:100). Después de 14 días se observó la presencia de conglomerados celulares que indicarán una transformación exitosa [71]. La proporción de linfocitos B fue estudiada utilizando una doble marca con anticuerpos: anti-CD19-PE/IgG-FITC y anti-CD19-Pe/anti-CD5-FITC (ver anexo I) [72].

### **INMUNODETECCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS B BCR Fc $\gamma$ -ESPECÍFICAS Y LB CD5+CD19+ POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Después de separar por selección negativa mediante el método de MACS, las células B y no B fueron colectadas en un tubo eppendorf adicionándose RPMI completo y homogenizando las células. En seguida se tomó una alícuota para realizar cuantificación y viabilidad mediante el ensayo de exclusión de azul tripano. De acuerdo al número de células totales se realizaron las alícuotas correspondientes para realizar los diferentes ensayos. Para el ensayo de inmunofenotipificación se procedió con el marcaje usando un mínimo  $3 \times 10^5$  células en un volumen final de 100 $\mu$ l, además, se bloquearon los Fc $\gamma$ Rs mediante fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> de anticuerpos anti-CD32 (1.6  $\mu$ g para  $10^6$  células), anti-CD16 y anti-CD64 (1.6 $\mu$ g diluido en PBS 1:40 para  $10^6$  células) (Ansell, USA) por 20 minutos a 4°C y se continuó con 3 lavados a 4°C por 10 minutos a 1500 rpm con PBS albúmina bovina fracción V (Sigma Co, USA) al 1% esterilizado previamente con un filtro de 0.22 $\mu$ m. Estas condiciones de bloqueo de los Fc $\gamma$ Rs previamente fueron óptimas y se corroboraron como se indica en el anexo-II. En seguida se adicionó cada anticuerpo conjugado con el fluorocromo correspondiente (FITC o PE), e incubó por 20 minutos a 4°C seguido de 2 lavados en las condiciones previamente descritas. Finalmente se descartó el sobrenadante y se homogenizó en un volumen final de 100  $\mu$ l de PBS albúmina al 1% con paraformaldehído al 1%. Todas las incubaciones y lavados fueron realizados en campana de flujo laminar en ausencia de luz y a 4°C. Las células fueron adquiridas en un tiempo máximo de 24 horas y previamente fueron aforadas con 500 $\mu$ l de PBS albúmina al 1% y azida de sodio al 0.05%. Todos los ensayos fueron realizados en un citómetro FACS Calibur E5252, y para el análisis utilizamos el software Flow Jo. 7.6.1. [72, 108].

## **OBTENCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS Y FORMACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES.**

### **SELECCIÓN DE ANTICUERPOS PROVENIENTES DEL SUERO DE PACIENTES CON TB ACTIVA CON REACTIVIDAD A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Para la formación del CIC utilizados en los ensayos de co-cultivo se procedió a seleccionar plasma de nuestro banco de muestras biológicas que presentaron anticuerpos a *Mycobacterium tuberculosis* mediante ELISA. Para ello se utilizó una placa de poliestireno de 96 pozos (Costar, USA), cada pozo fue incubado por 2 horas a 37°C con el extracto crudo del medio de cultivo de la cepa H37Rv de referencia (ECMtb) usando una concentración de 0.8 µg del ECMtb en un volumen final de 100µl de amortiguador de carbonatos 0.05 M, pH 9.6. Se realizaron 4 lavados de 3 minutos en agitación con PBS-Tween-20 0.05% pH 7.2 (PBS-T) a temperatura ambiente. Posteriormente se bloqueó por 2 horas con PBS-T albúmina bovina fracción V al 5% a 37°C y se procedió a realizar el lavado como se describió anteriormente.

En esta fase del estudio se contó con plasma de 23 pacientes con TB de los cuales 13 pertenecían a nuestro banco de biológicos y el resto fueron pacientes pertenecientes al grupo de este estudio. Se usaron muestras de 23 sujetos sanos pertenecientes a nuestro banco de biológicos (grupo control) por duplicado, se usó una dilución de 1:100 en PBS-T albúmina al 5% mediante la incubación por 2 horas a 37°C; en seguida se realizaron 4 lavados y se adicionó el anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> IgG anti-humano (Jackson ImmunoResearch) utilizando una dilución 1:10,000 en PBS-T albúmina 5%, y colocándose un volumen de 100 µl en cada pozo. La incubación duró 2 horas a 37°C y se realizaron 5 lavados, enseguida se adicionaron 100µl del revelador conteniendo 4 mg de ortofenildiamina en un volumen de 10 ml de buffer de citratos 0.1M pH 5 y 10µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La reacción se detuvo en un rango de 7 a 10 minutos con 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. La lectura se realizó a 492nm en un lector para placa de ELISAS (Labsystem Multiskan). El ELISA se realizó en condiciones libres de pirógenos endógenos; todo el material de cristalería fue horneado a 200°C y esterilizado, además cada buffer fue esterilizado y posteriormente filtrado con una membrana de 0.22µm [73]. Una vez obtenidos los resultados, seleccionamos 20 muestras de pacientes con TB quienes presentaron niveles altos de anticuerpos anti-micobacteria y se continuó la obtención de IgG realizando los siguientes pasos:

#### **PRECIPITACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.**

En condiciones libres de pirógeno endógeno, se tomó un volumen de 300µl de cada uno de los sueros seleccionados y se procedió a la precipitación secuencial con 45 y 33 % de sulfato de amonio saturado, adicionándose en tres ciclos de forma manual y en agitación constante a 4°C. Después de haber adicionado el sulfato de amonio se dejó toda la noche en agitación a 4°C, se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con un volumen de 300µl de sulfato de amonio saturado y 600µl de PBS libre de pirógenos endógenos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y cada muestra se llevó a un volumen final de 400 µl con PBS. Simultáneamente, se tomaron 20 µl de cada muestra para hacer un homogenizado de los 20 sueros estudiados y proceder con la precipitación de gammaglobulinas [74].

Las inmunoglobulinas precipitadas mediante la técnica de sulfato de amonio fueron cuantificadas por el método de Bradford (Bio Rad AssayProtein), usando albúmina humana 1mg/ml como indicador de la curva de concentración de proteína conocida. La lectura se realizó en una absorbancia de 600nm en un espectrofotómetro de luz visible (Multiskan Labsystem).

#### **FORMACIÓN DE COMPLEJOS INMUNES**

Con el fin de hacer reproducible el sistema de formación *in vitro* de complejos inmunes, se usaron 100µg del ECMtb (antígeno micobacteriano) y 100 µg de la mezcla de inmunoglobulinas de los pacientes con TB que presentaron niveles elevados de anticuerpos anti-*M. tuberculosis*. La obtención de los complejos inmunes se realizó mediante la precipitación con polietilenglicol 6000 (PEG 6000) [75]. El preparado de inmunoglobulinas y antígeno se incubó por 12 horas a 37°C en suero fetal bovino descomplementado. Posteriormente por cada volumen de suero se adicionó un volumen de PEG 6000 al 7% en PBS libre de pirógenos endógenos y se incubó a 4°C por una hora. Enseguida se lavó el precipitado de los complejos inmunes dos veces con un volumen de PBS y un volumen de PEG al 7% a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se aforó usando medio de cultivo RPMI 1640 hasta obtener una preparación de 200µl.

## COCULTIVO DE CÉLULAS B Y CÉLULAS NO B DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS

En esta fase del estudio se lograron incluir 5 muestras de pacientes con TB, en las cuales obtuvimos suficiente número de células B totales enriquecidas mediante MACS y las células no B autólogas para poder realizar el co-cultivo. Debido al problema para contar con células B transformadas con el virus de Epstein Barr (EBV) apropiadas para proceder con su evaluación como APC (ver anexo I y tabla de esta sección). Fue necesario modificar algunos de los ensayos considerados originalmente en este trabajo, en los que utilizaríamos los LB transformados con el EBV para realizar el ensayo de co-cultivo con células no B autólogas y la identificación de las subpoblaciones por citometría de flujo. Además, debido a que en los LB se favoreció la vía del BCR para la captura de los complejos inmunes y que el antígeno micobacteriano fue reconocido por IgG en los anticuerpos de pacientes con TB decidimos explorar la posibilidad de obtener actividad celular en nuestro ensayo de co-cultivo [77, 81].

La evaluación de la respuesta celular al usar como APC a los LB fue mediante espectrofotometría usando resazurina al 10% (Alamar blue; AB) como indicador de la actividad metabólica de células no B autólogas [78].

Inicialmente, se establecieron las condiciones óptimas para determinar que no hubo inhibición por contacto y para ello se sembraron 100 mil células no B a fin de establecer su estado de actividad metabólica basal (proliferación) (Anexo III-A). Además, se estableció mediante curvas preliminares de co-cultivo el tiempo óptimo para adicionar el AB a partir del inicio del co-cultivo (véase Anexo III-B) el cual se realizó por duplicado en cajas de poliestireno de 96 pozos (Nunc, USA) usando un volumen de 100µl/pozo donde se sembraron LB y no B, bajo la siguiente relación 2:1, 1:1 y 1:2 respectivamente [77, 79]. En el co-cultivo se evaluaron las condiciones que se muestran en la tabla IV, bajo el siguiente procedimiento:

- 1) **LB con bloqueo de los FcγRs.** Antes de sembrar las células B en las relaciones 2:1, 1:1 y 1: 2 con las células no B en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 2mM, 1X de estreptomina (*medio completo*), se procedió a incubar las primeras con fracciones F(ab)'2 de anticuerpos anti-CD32 (1.6µg para 10<sup>6</sup> de células), anti-CD16 y anti-CD64 (dilución 1:40 de 1.6µg

para  $10^6$  de células) por 20 minutos, se lavó 2 veces con 200  $\mu$ l de medio incompleto a 800 rpm por 15 minutos. En seguida se incubó con 1.0  $\mu$ g de complejos inmunes por 4 horas; que de acuerdo a la literatura es el tiempo suficiente para que el LB APC pueda procesar y expresar el péptido en el contexto del MHC-II [76, 80]. Luego se realizaron dos lavados y se fijaron las células con medio completo y paraformaldehído al 1% por 1 hora, se realizaron dos lavados y se adicionaron las células no B autólogas. A continuación se adicionó rezasurina al 10% (Alamar Blue), para evaluar el índice de proliferación durante 10 días. El co-cultivo se mantuvo a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa [82, 80, 81].

- 2) **LB sin bloqueo del Fc $\gamma$ Rs.** Los LB enriquecidos mediante MACS fueron cultivados con medio RPMI1640 completo, enseguida se incubó por 4 horas con 1.0  $\mu$ g de complejos inmunes sin incubación previa de anticuerpos anti-CD32, anti-CD16 y anti-CD64; se realizaron dos lavados y se fijaron las células con paraformaldehído al 1% por 1 hora, se realizaron dos lavados y se adicionaron las células no B autólogas en las mismas proporciones que el ensayo anterior. Finalmente, se adicionó AB al 10% para evaluar la proliferación de las células no B [80].
- 3) **LB sin complejos inmunes (control).** Se sembraron los LB incubándose por 20 minutos con el anticuerpo anti-CD32, anti-CD64 y anti-CD16; enseguida se realizaron los lavados con medio completo y se fijaron las células por 1 hora sin estímulo previo con complejos inmunes enseguida se realizaron dos lavados y finalmente se adicionan las células no B autólogas en la relación establecidas como óptimas.
- 4) **Controles.** Se usó por triplicado un volumen de 100  $\mu$ l en cada pozo un control con *medio completo* (RPMI1640; *sin AB*), un control con el *medio completo al 10% de AB*, y un control de *células no B autólogas en medio completo con 10% de AB*. Todos estos requerimientos a fin de realizar la evaluación de proliferación celular por porcentaje de reducción (*control con medio al 10% de*

AB) y porcentaje de viabilidad respecto a un grupo control (*células no B autólogas en medio al 10% de AB*) como se indica en el anexo III (82).

**TABLA IV. CONDICIONES DEL COCULTIVO.**

CONDICIONES CON LAS QUE FUERON TRATADOS LOS LB		CONDICIÓN
INCUBACIÓN CON ANTI-CD32, ANTI-CD16 y ANTI-CD64	INCUBACIÓN CON COMPLEJOS INMUNES	
+	X	<b>LB sin estímulo complejo inmune (CONTROL).</b> Control de LB sin contacto con complejo inmune, nula activación y proliferación celular.
+	+	<b>LB con Bloqueo del FcγR (CONDICIÓN 1).</b> Los LB con función APC que capten al complejo inmune mediante su BCR y no el FcγR, inducirán activación celular a las células no B autólogas. Reflejándose en un aumento de la proliferación.
X	+	<b>LB sin bloqueo del FcγR (CONDICIÓN 2).</b> Los LB mediante su BCR y FcγR capturan al complejo inmune, permitiendo comparar la capacidad para inducir activación celular.

### **EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES POTENCIALES DE LOS CIC**

Al observar que existió una respuesta celular usando células B previamente incubadas con complejos inmunes preformados. Se decidió estudiar HSP60 como uno de los posibles antígenos que constituyen los complejos inmunes, ya que este antígeno se ha identificado frecuentemente en pacientes infectados con *M. tuberculosis* y en padecimientos donde hay prevalencia de anticuerpos anti-IgG. Por ello, se determinó si se presentaba una reactividad predominante contra HSP60 mediante Western blot y ELISA.

#### **WESTERN BLOT**

Para estudiar la inmunoespecificidad individual y del homogenizado de sueros (pool) de los pacientes con anticuerpos anti-micobacterianos, se separaron 80µg de ECMtb mediante SDS-PAGE al 12% y se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa en condiciones semihúmedas, los blots fueron teñidos con rojo de Ponceau 2% (en ácido acético al 1%) en agitación durante 5 minutos, la membrana fue desteñida con NaOH 0.1N durante 15 minutos seguido de un lavado de 3 minutos con

H<sub>2</sub>O mili-Q. Se realizó un lavado con PBS-T y enseguida se colocaron 20ml de PBS-Tritón 1% sobre la membrana en agitación durante 15 minutos. Se bloqueó toda la noche en agitación suave con PBS-T leche descremada al 3% a 4°C en ausencia de luz y se lavó la membrana. Luego se incubó a 4°C durante toda la noche usando una dilución 1:100 de los sueros individuales de los pacientes con TB con niveles altos de anticuerpos contra *M. tuberculosis* por ELISA y la mezcla de los sueros de todos estos casos. Se realizó el lavado correspondiente y se procedió a incubar por 2 horas con el anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG humano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:10,000 y finalmente se realizaron los lavados correspondientes y se procedió a revelar el blot mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Reactive, Amersham Pharmacia Biotech, USA ) y exposición de las membranas usando película para radiografía (Kodak T-MAT TMG-1, USA) [83].

#### **ELISAs SENSIBILIZANDO CON HSP65 RECOMBINANTE (HSP65r) Y ECMtb.**

Al detectar que la mayoría de los sueros con niveles altos de anticuerpos contra *M. tuberculosis* presentaron una banda de reconocimiento correspondiente a un peso molecular de 65 kDa (ver adelante), se decidió establecer si el HSP65 el cual ha sido involucrado en la presentación cruzada de antígenos en modelos experimentales de TB [8] podría estar involucrado en la activación celular inducida por linfocitos B con capacidad APC. Para ello, la mitad de la placa de poliestireno de 96 pozos (Costar, USA) se sensibilizó con ECMtb en las mismas condiciones de la ELISA previamente descrita, mientras que en el resto de la placa se utilizó HSP65r (*Mycobacterium bovis*) con una concentración de 0.8 µg en un volumen final de 100µl de amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6 para cada pozo. El tiempo de incubación fue de 2 horas para ambas condiciones y se lavó 5 veces por 3 minutos en agitación con PBS-T albumina. Posteriormente la placa se bloqueó con PBS-T albumina, enseguida se incubó por 2 horas a 37°C con las inmunoglobulinas previamente precipitadas en una dilución 1:100 de PBS-T albumina. Enseguida se realizaron los lavados como se indicó para cada condición correspondiente y se incubó con el anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> anti- IgG humano (Jackson ImmunoResearch) en una dilución 1:10,000 en PBS-T albumina para cada condición respectivamente. Se realizaron los lavados correspondientes y se

adicionaron 100µl/pozo del revelador consistente en 4 mg de ortofenildiamina en 10 ml de amortiguador de citratos 0.1M pH 5 y 10µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se detuvo la reacción a los 7 minutos adicionando a cada pozo 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N para finalmente realizar la lectura con una absorbancia de 492nm en el espectrofotómetro (Multiskan Labsystem) [73].

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se compararon las variables del grupo de pacientes con TB y el grupo control mediante la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney). También se determinó mediante el coeficiente de Pearson la asociación entre las variables de interés de cada grupo. Para el análisis de los datos se utilizó el programa PASW<sup>®</sup>™ Statistics 18 considerándose como valor estadístico significativo una  $p \leq 0.05$  y se presentaron mediante los parámetros de punto máximo, punto mínimo (extremos) y mediana para variables no paramétricas. Las variables paramétricas se reportaron con la media ( $\bar{x}$ ), el error típico de la media (error estándar) y desviación estándar ( $\sigma$ ).

## **VI. RESULTADOS**

### **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se estudiaron 20 pacientes con TB activa todos del sexo masculino, cuya edad promedio y desviación estándar fue de  $48.7 \pm 14.8$  años respectivamente, con extremos entre 18 y 75 años. Ninguno de ellos presentó al momento del estudio otras condiciones, que podrían haber afectado los resultados de nuestro estudio, como inmunosupresión: VIH, trasplante, o tratamiento con corticosteroides, y solo en 5 casos (25%) se diagnóstico Diabetes Mellitus tipo II. De las 20 muestras de sangre periférica obtenidas, 9 fueron utilizadas para realizar el ensayo de citometría de flujo, 5 muestras se emplearon para realizar el ensayo de co-cultivo celular, y los complejos inmunes se prepararon a partir de 10 muestras de suero (ver figura anexo D), si bien 12 muestras fueron utilizadas para realizar la transformación con el EBV, estas células no fueron incluidas en los resultados definitivos (ver I anexo).

### **CÉLULAS B BCR Fc $\gamma$ -ESPECÍFICOS EN PACIENTES CON TB Y GRUPO CONTROL SANOS**

El estudio de las células B BCR Fc $\gamma$ -específicas (Células B Fc $\gamma$ -específicas) mediante citometría de flujo usando linfocitos B totales obtenidos por selección inmunomagnética negativa, reveló que su proporción fue menor en TB respecto al grupo control. De acuerdo a nuestra estrategia de evaluación, la población de interés fue detectada porque además de presentar el marcador CD19; presento la capacidad para unir IgG humana purificada y marcada con FITC después del bloqueo de los Fc $\gamma$ R con anticuerpos específicos anti-CD64, 32 y 16, además de confirmarlo mediante un ensayo usando fragmentos Fc de IgG (anexo II). Los resultados, se muestran en las figuras 1A y 1B en las que se presentan los hallazgos representativos en términos de la distribución (dot plots) de las células CD19+IgG-FITC+, y los porcentajes de estos linfocitos en cada grupo de estudio. En los 9 casos con TB el porcentaje de la población doble positiva correspondiente a las células Fc $\gamma$  específicas fue menor al 6%, mientras que en 5 de los 7 sujetos del grupo control se encontró que la proporción de células B con el fenotipo CD19+IgG-FITC+ fue mayor al 7%.

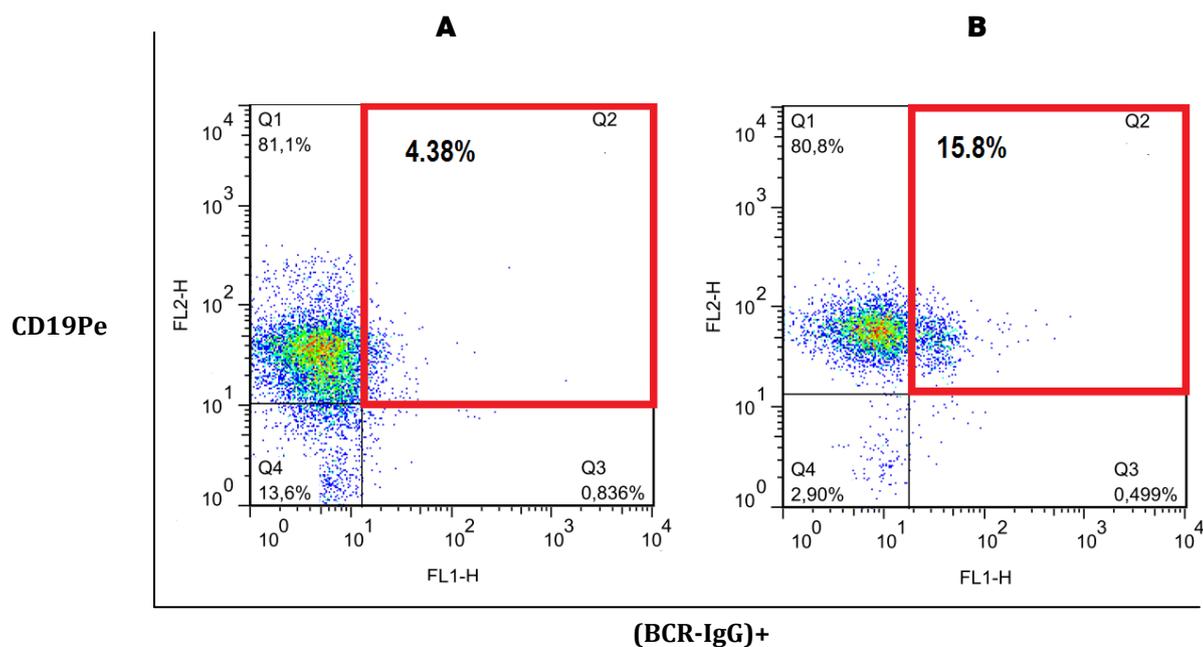


FIGURA 1A. DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS, MOSTRANDO LA POBLACIÓN CD19+(BCR-IgG)+, DE PACIENTE CON TB (A) Y SUJETO CONTROL (B).

Al comparar la mediana de ambos grupos de estudio, se observó que los enfermos con TB tuvieron un valor de 3.13% (extremos 0.44%-5.39%), mientras que en los individuos clínicamente sanos fue 11.4% (extremos 2.01%-15.8%), y el análisis estadístico mostro diferencias significativas, U de Mann-Whitney ( $p=0.05$  y  $z=-1.958$ ).

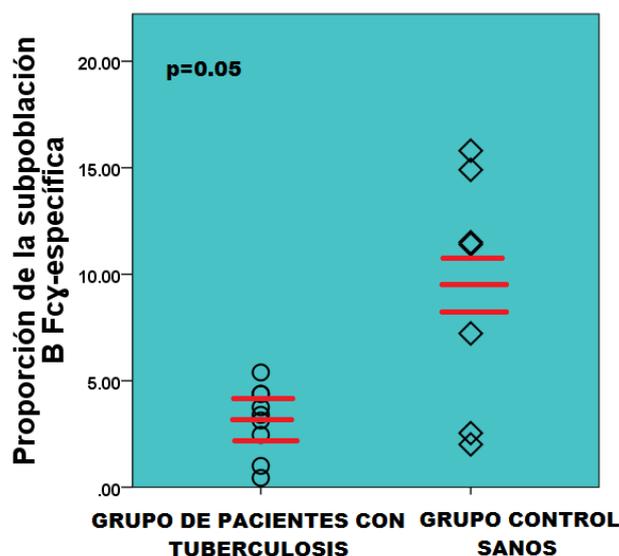


FIGURA 1B. DISTRIBUCIÓN DE LAS PROPORCIONES DE LA POBLACIÓN CD19+(BCR-IgG)+ EN PACIENTES CON TB Y GRUPO CONTROL. SE MUESTRA LA MEDIA Y LA MEDIA  $\pm$  ERROR TÍPICO DE LA MEDIA.

Los resultados anteriores no fueron influidos por alguna alteración en la población de linfocitos B que fue nuestro punto de partida para detectar la población de células Fc $\gamma$  específicas, como lo indican las proporciones similares de linfocitos CD19+ en los grupos de estudio (grupo de pacientes con TB activa y grupo control de sujetos sanos) cuya comparación en términos estadísticos no mostraron diferencias significativas ( $p=0.315$  y  $z=-1.006$ ; prueba de U de Mann-Whitney).

De acuerdo al coeficiente de Pearson ( $r=0.701$  y  $p=0.036$ ) existe una asociación significativa y moderada entre el porcentaje de células B totales (LB CD19+) y la subpoblación B Fc $\gamma$ -específica (CD19+IgG+) en el grupo de pacientes con TB. En contraste, en el grupo control este mismo método estadístico de correlación ( $r=0.580$  y  $p=0.172$ ) indicó que no existió una asociación entre la población de células B totales y la subpoblación B Fc $\gamma$ -específica.

#### CÉLULAS B CD5+ EN PACIENTES CON TB.

Al analizar la subpoblación CD5+, encontramos como se observa en la figura 2A que la mediana en el grupo de enfermos fue de 3.4% (extremos 0.18%-14.9%) mientras que el grupo control presentó una mediana de 11.1% (extremos 1.51%-29.6%), de acuerdo

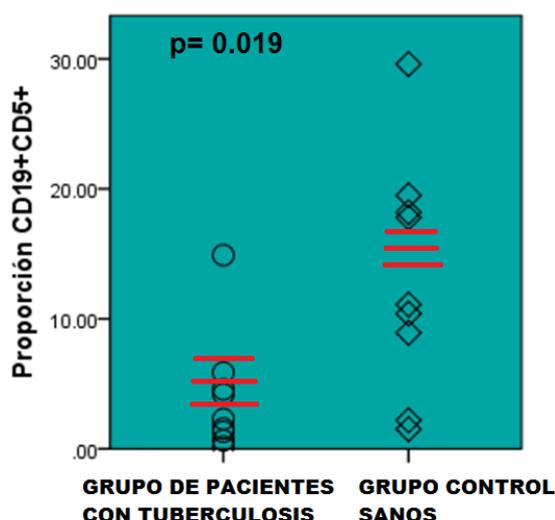


FIGURA 2A. DISTRIBUCIÓN DE LAS PROPORCIONES DE LB CD19+CD5+ EN EL GRUPO CONTROL DE SUJETOS SANOS Y EL GRUPO CON TB. SE MUESTRA LA MEDIA Y LA MEDIA $\pm$ ERROR TÍPICO DE LA MEDIA.

a la prueba de U de Mann-Whitney existe una diferencia significativa entre el grupo control y los pacientes con TB con un valor de  $p=0.019$  ( $z=-2.34$ ) siendo menor esta subpoblación de células B en el grupo de pacientes con TB.

En la figura 2B se muestran dot-plots representativos de un paciente con TB y un sujeto sano.

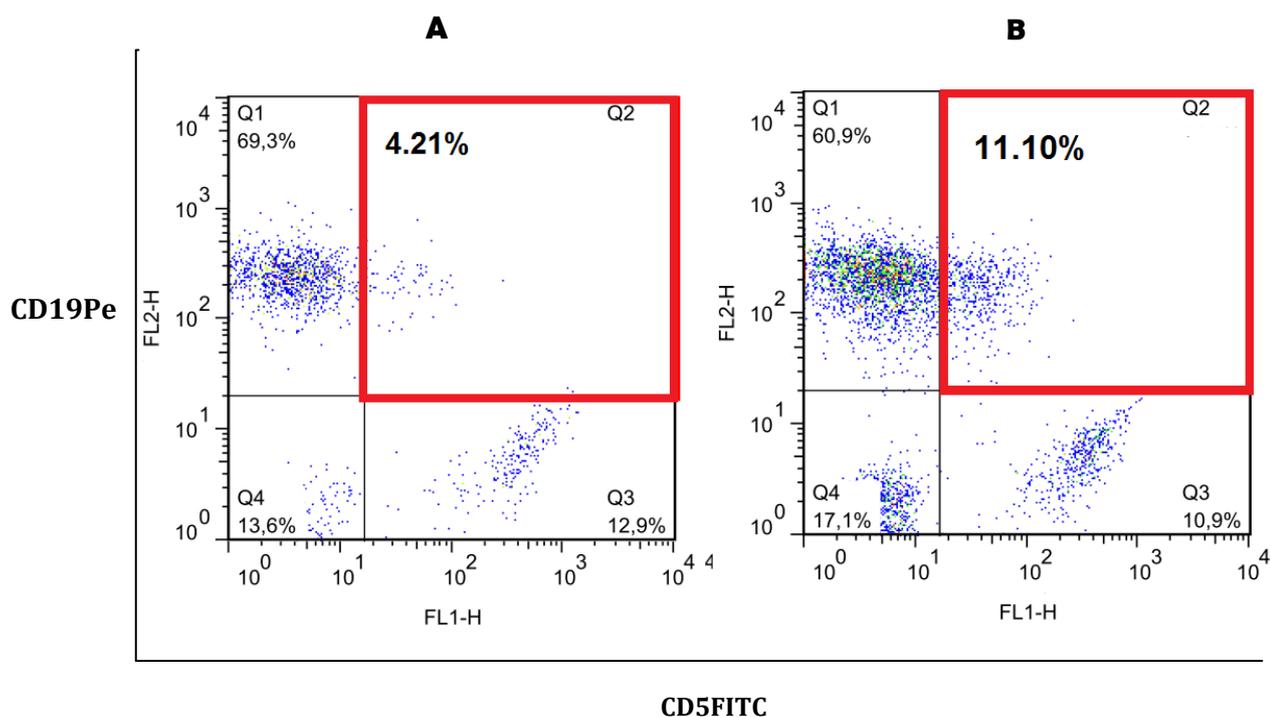


FIGURA 2B. DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS MOSTRANDO LA POBLACIÓN CD19+CD5+ EN PACIENTE CON TB (A) Y SUJETO CONTROL (B).

Por otra parte, se logró apreciar que a diferencia de la población B Fc $\gamma$  específica los linfocitos CD5+ en TB disminuyeron en la medida que cambio el número de células B totales a partir de las cuales se identificaron la subpoblación CD5, y si bien lo mismo ocurrió en los controles, la diferencia entre ambos grupos no dependió de diferencias en los porcentajes de linfocitos B a partir de los cuales se detectó la molécula CD5, ya que no encontramos diferencias significativas al comparar los valores de células CD19. Se encontró mediante el coeficiente de Pearson que existió una asociación moderada entre la población de LB CD19+ y la subpoblación CD5+ ( $r=0.762$ ,  $p=0.017$ ) cuyo porcentaje aumentó proporcionalmente con la población de células B totales. Para el

grupo de sujetos sanos también se encontró una asociación moderada entre la población de LB totales y la subpoblación CD5+ con una  $p=0.02$  ( $r=0.749$ ).

#### **CORRELACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES B CD5+ y Fcγ-ESPECÍFICAS.**

En los pacientes con TB en los que se evaluó si las proporciones de las células B Fcγ-específicas cambiaron respecto a la población B CD5+, se encontraron evidencias que indican que las alteraciones en ambos tipo de linfocitos son independientes. Al utilizar una prueba de correlación, el coeficiente de Pearson mostró un valor de  $p=0.497$  ( $r=0.35$ ) lo cual no es estadísticamente significativo. Un resultado esperado, fue que lo mismo ocurrió para el grupo control en el cual no se encontró asociación entre la proporción de la subpoblación B Fcγ-específico y las células CD5+. En estos controles sanos, el valor de correlación no fue estadísticamente significativo ( $r=-0.349$ ,  $p=0.498$ ).

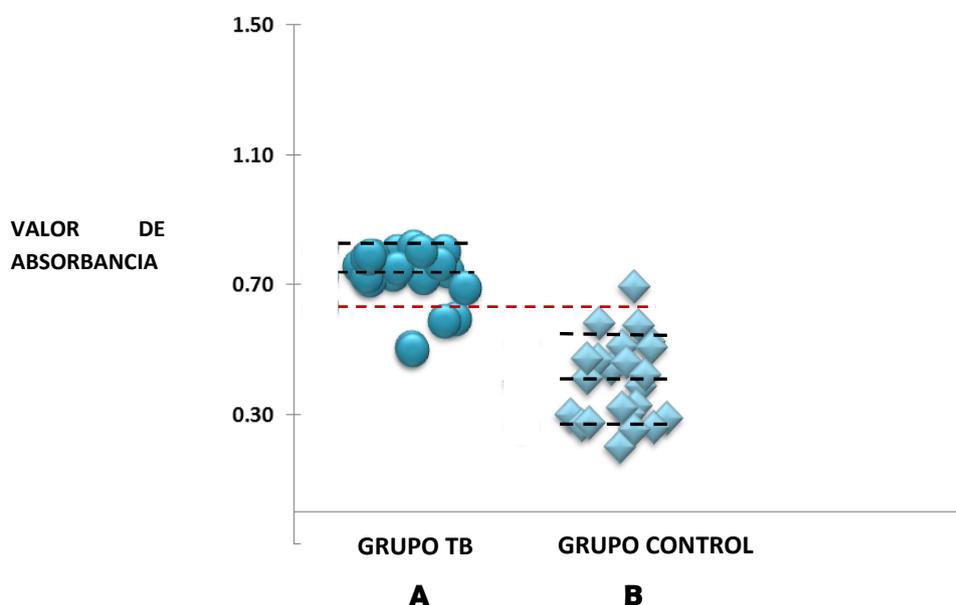
#### **TRANSFORMACIÓN CON EL EBV.**

Como se señaló en la metodología, uno de los objetivos de trabajo fue obtener un mayor número de células B mediante su transformación con el virus de Epstein Barr, y estar en posibilidades de estudiar la población B Fcγ-específica contando con una técnica de expansión de linfocitos B totales, y también contar con una mayor cantidad de células APC para su uso potencial en el co-cultivo, sin embargo, se decidió proceder en ambos estudios con células totales separadas mediante el sistema de MACS, por lo siguiente: después de 5 semanas en cultivo encontramos, al inspeccionar las células en el microscopio óptico, que solamente 8 de 12 muestras de pacientes con TB que fueron procesadas para transformarlas con el EBV presentaron conglomerados celulares consistentes con la obtención de células B transformadas. Adicionalmente, en la figura A (anexo-I) se muestra un dot-plot representativo de tamaño *versus* complejidad celular (FSC vs SSC) donde se aprecia que existe una amplia distribución de los eventos cuya causa principal parece ser que el Epstein Barr induce una transformación celular no sincronizada lo que se manifiesta en células con gran diversidad en tamaño y granularidad y que las células están activadas [84, 85]. Por lo anterior, en al menos 3 casos era difícil tener la certeza de que los cambios en las poblaciones celulares estudiadas se debían a la influencia o un sesgo por el procedimiento de transformación con el EBV, además de que encontramos reportes

sobre un mayor éxito en la transformación de células CD21, y CD23 [71, 84, 85] (ver anexo-I y tabla de ésta sección). Por estos inconvenientes decidimos trabajar con células B previo enriquecimiento mediante el método MACS.

### **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIMICOBACTERIANOS EN SUERO DE PACIENTES CON TB MEDIANTE ELISA.**

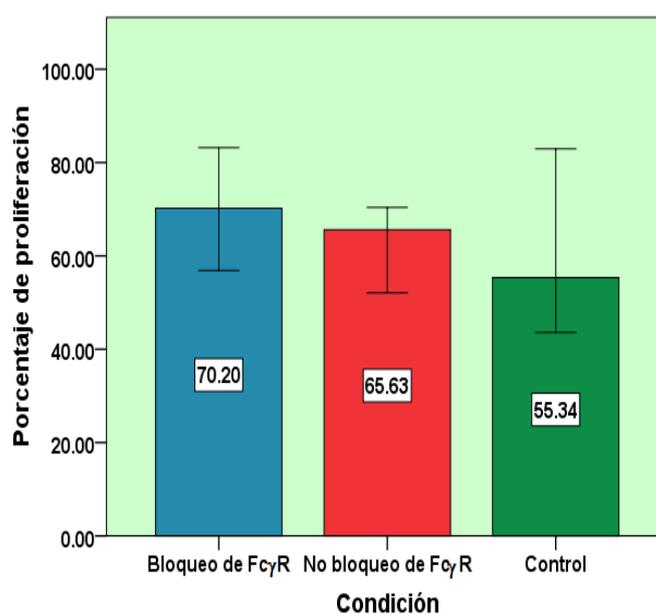
Para identificar y seleccionar los sueros de los pacientes con TB que permitieron preparar los complejos inmunes para el ensayo de co-cultivo, se realizó una detección de los anticuerpos contra antígenos micobacterianos mediante pruebas de ELISA, como se describe en material y métodos. Los resultados revelaron que el promedio del valor de absorbancia del grupo de pacientes con TB fue de  $0.723 \pm 0.0917$  y el promedio del grupo control fue de  $0.475 \pm 0.128$ . Al establecer como punto de corte la media + 2 DE de los controles sanos, encontramos que el 87% (20 de 23 sueros; ver método pp. 32) de las muestras de pacientes con TB fueron positivas a los antígenos micobacterianos provenientes del ECMtb y por tanto estos sueros se seleccionaron para formar los complejos inmunes utilizados en co-cultivo (ver figura 3).



**FIGURA 3. REACTIVIDAD DE INMUNOGLOBULINAS DE PACIENTES CON TB (A) Y GRUPO CONTROL (B) A UNA MEZCLA ANTÍGENOS DE MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS (ECMtb). SE MUESTRA PUNTO DE CORTE, MEDIA Y MEDIA $\pm$ 2D.E PARA CADA GRUPO.**

## COCULTIVO DE CÉLULAS B Y CÉLULAS NO B AUTOLÓGAS.

El ensayo de co-cultivo celular que usamos en este trabajo permitió evaluar si 5 de las muestras de pacientes con TB contenían células B con potencial APCs y tuvieron la capacidad de inducir la activación de células no B autólogas. En 2 condiciones diferentes: condición 1 bloqueo de los FcγRs y condición 2, sin bloqueo de los FcγRs. Se encontró de acuerdo a la prueba de U de Mann-Whitney que no existió diferencia estadística significativa entre el control y la condición donde bloqueamos los FcγRs de co-cultivo con un valor de  $p=0.075$  ( $z=-1.781$ ). Igualmente en la condición 1 y 2 esta misma prueba indicó con un valor de  $p=0.347$  ( $z=-0.94$ ) que no existe diferencia significativa.



Barras de error: 95,% IC

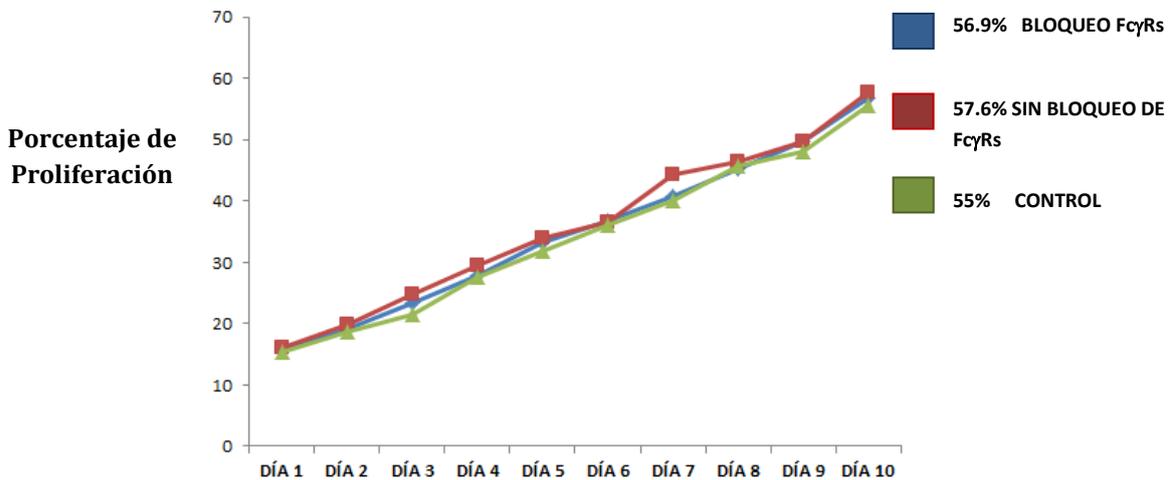
CONDICIONES DE TRATAMIENTO DE LOS LB	BLOQUEO DE FcγRs	NO BLOQUEO DE FcγRs	CONTROL
	CONDICIÓN 1	CONDICIÓN 2	
INCUBACIÓN CON ANTI-CD32, ANTI-CD16 y ANTI-CD64	+	X	+
INCUBACIÓN CON COMPLEJOS INMUNES	+	+	X

FIGURA 4A. PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NO B DE 5 MUESTRAS PACIENTES CON TB EN 3 CONDICIONES DE COCULTIVO. NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE CONDICIÓN DE BLOQUEO DE FcγRs Y CONTROL  $P=0.075$  ( $Z=-1.781$ ). TAMPOCO ENTRE CONDICIÓN DE BLOQUEO DE FcγRs Y NO BLOQUEO DE FcγRs  $P=0.347$  ( $Z=-0.94$ )

En conjunto las muestras de pacientes con TB mostraron una proliferación cuya mediana fue de 70.2% (extremos 57%-83.2%) cuando se bloquearon los FcγRs, siendo

superior por 4.6% respecto a la condición donde la captura de los complejos inmunes se realizó sin bloquear los FcγRs presentando una proliferación con una mediana del 65.6% (extremos 52%-70.4%). En el control la activación celular tuvo una mediana del 55.6% (extremos 55.34%-83%) (ver figura 4A). Aunque, como hemos señalado estas diferencias no tienen significancia estadística.

De forma individual tenemos que en 3 de las 5 muestras la diferencia entre las condiciones estudiadas y el control es mínimo, como se puede observar en una muestra representativa en la figura 4B. Siendo 7.5% la mayor diferencia entre el control y la condición de bloqueo de los FcγRs, mientras que la mínima fue de 0.3%.



**FIGURA 4B. CURVA REPRESENTATIVA DEL PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NO B EN TRES CONDICIONES DE CO-CULTIVO EN UN PACIENTE CON TB. LA CONDICIÓN 2 DESARROLLA MAYOR PROLIFERACIÓN, AUNQUE LA DIFERENCIA ENTRE CONDICIONES ES MÍNIMA.**

## ANTICUERPOS ANTIMICOBACTERIANOS Y ANTI-HSP 65 EN TB

### WESTERN BLOT.

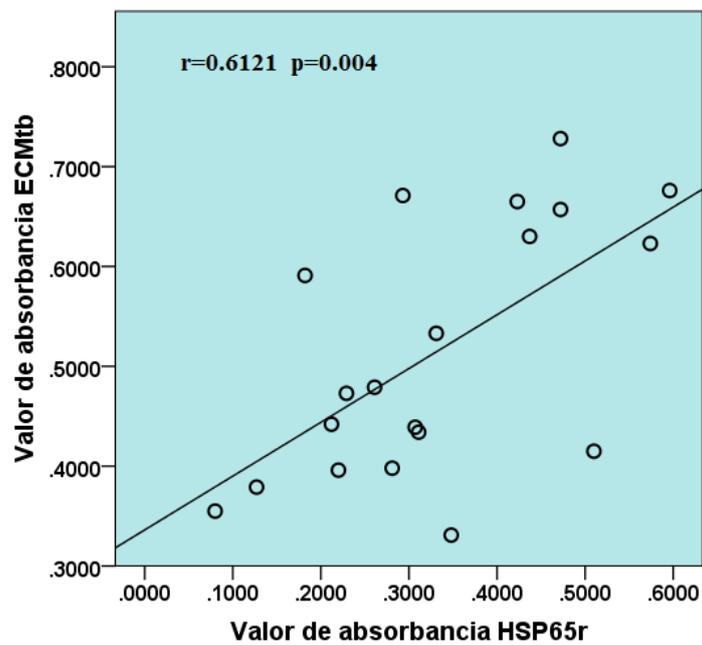
Mediante el inmunoblot se identificó que tanto los sueros individuales seleccionados y el acumulo de sueros para obtener gammaglobulinas para formar complejos inmunes, y aplicarlas en el ensayo de co-cultivo presentaron anticuerpos contra diversas proteínas micobacterianas. Interesantemente, una de las más frecuentes fue una banda de 65 kDa, consistente con el posible reconocimiento de HSP65 de *M. tuberculosis*, lo cual fue confirmado mediante ELISA (87 %) al usar una proteína recombinante HSP65r (*M. bovis*) que tiene un alto grado de similitud antigénica (97 %) con la HSP de *M. tuberculosis*. En la figura 5 y el anexo IV se presentan los resultados individuales de sueros representativos con este tipo de reactividad inmunológica por inmunoblot, observándose que el reconocimiento de anticuerpos involucraba a la proteínas con diversos pesos moleculares del ECMtb. Esta observación fue relevante, puesto que los complejos inmunes preparados a partir de los muestras de pacientes con TB y usados—en el ensayo de co-cultivo estuvieron conformados por anticuerpos que reconocen diversos antígenos micobacterianos.



**FIGURA 5. INMUNOBLOT. RECONOCIMIENTO DE ANTICUERPOS A PROTEÍNAS CON DIVERSOS PESOS MOLECULARES DEL ECMtb. EL CUADRO ROJO INDICA LAS BANDAS POSITIVAS CONSIDERANDO EL MARCADOR DE PESO DE REFERENCIA (60 KDA). LA PRIMER BANDA CORRESPONDE A UNA MEZCLA DE SUEROS. LAS ÚLTIMAS 5 BANDAS DE LADO IZQUIERDO CORRESPONDEN AL SUERO DE 5 PACIENTES CON TB.**

**CORRELACIÓN DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS AL ECMtb Y REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS A LA PROTEÍNA HSP65r DE SUERO DE PACIENTES CON TB.**

Otro hallazgo interesante cuyo significado será tratado en la discusión, fue que al comparar las ELISAs en las que se uso el ECMtb y la proteína recombinante HSP65 se apreció una relación significativa. Mediante el coeficiente de Pearson se encontró que existe una asociación ( $r=0.6121$ ,  $p= 0.004$ ), entre los valores de absorbancia de las ELISAs realizadas en forma paralela, una de la cuales fue incubada con un extracto total de antígenos de *M. tuberculosis* y la otra con HSP65r (*M. bovis*); (ver figura 6).



**FIGURA6. RELACIÓN DE LOS VALORES DE ABSORBANCIA DE ANTICUERPOS POSITIVOS A LA PROTEÍNA HSP65r Y A ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS (ECMtb).**

## VII. DISCUSIÓN

Desde la descripción de las dos poblaciones de células B denominadas B1 y B2, está claro que su participación es predominante en la inmunidad natural y adquirida respectivamente [49, 59, 62, 28]. Las primeras evidencias que sustentaron las dos clases celulares son la expresión de la molécula CD5 y una menor capacidad para generar rearrreglos cromosómicos en el ensamble del BCR para el grupo B1 [49]. Posteriormente, se han explorado otros marcadores de superficie como: CD23, CD138, CD27, CD38 y CD35 que parecen definir poblaciones de memoria que actúan principalmente en la respuesta inmune adaptativa, y desde hace 6 años la expresión y síntesis de IL-10 en las células Breg [37, 41, 85, 45]. Por lo que actualmente se acepta que los linfocitos B pueden estar constituidos por diversas subpoblaciones celulares y estas se pueden identificar por su fenotipo, su función e incluso el perfil de producción de citocinas puede diferenciar algunos tipos particulares de estas células [36, 41].

Por lo anterior, el concepto de que la tarea fundamental de la célula B es la producción de anticuerpos ha cambiado gradualmente ya que diversos trabajos han dejado claro que existen subpoblaciones de células B fungiendo con roles tan diversos como: la regulación y establecimiento de la morfología de ganglios linfáticos, el mantenimiento de un microambiente regulador mediante la secreción de citocinas, en la respuesta adaptativa con poblaciones de memoria que actúan eficazmente ante una segunda exposición del agente patógeno y en la inmunidad innata con células autorreactivas que contienen con agresores extraños mediante su polirreactividad [35, 36].

Generalmente se considera que las poblaciones autorreactivas tienen un rol patogénico en padecimientos con procesos autoinmunes, sin embargo en algunos modelos murinos ha sido posible proponer que el aumento o disminución de alguna población autorreactiva o sus cambios funcionales se traducen en la generación de algunos mecanismos fisiopatogénicos que explican la presencia de alguna enfermedad [42, 43, 45-47].

En sujetos sanos las células B autorreactivas se caracterizan por secretar anticuerpos naturales antinucleares y antifosfolípido, los cuales presentan reactividad para

antígenos propios que son eliminados mediante su depuración en el sistema fagocítico mononuclear o bien contra antígenos tumorales y bacterianos. Es por ello que también se conocen como anticuerpos polirreactivos ya que en el caso de componentes extraños participan como una barrera de protección eficiente [60-62].

En consecuencia, la ausencia de poblaciones de células B autorreactivas induce susceptibilidad a padecimientos ocasionados por agentes patógenos, por lo que los anticuerpos naturales actúan en forma similar a los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PPR). Al ser el LB una de las APC profesionales se abre la posibilidad de que una subpoblación autorreactiva pueda participar en la captación de anticuerpos polirreactivos y CICs, e incluso puede existir dentro de esta población APC autorreactiva una subpoblación que posea la capacidad de procesar y presentar patrones moleculares asociados a patógenos [60- 62, 65, 34]. En este sentido, Tighe (1993) previamente reportó al generar un ratón transgénico que expresa anticuerpo anti-IgG humano, que estas células B son eficientes como APCs aún en concentraciones bajas de CIC; los monocitos y Mφs necesitan concentraciones 1000 veces mayores para fungir como APC [125]. Incluso este tipo de linfocito a pesar de tener una alta expresión de anti-IgG de membrana no presenta la misma capacidad de secreción de anti-IgG. Presentándose la secreción de anti-IgG en mayor medida cuando se estimula con altas concentraciones de LPS y de anti-IgM humano [125].

Por otro lado, en la TB se ha descrito la formación de CIC, anticuerpos naturales polirreactivos y monorreactivos, estos últimos dirigidos entre otros componentes a la IgG. Esto ha sido descrito en especial durante la fase activa de esta enfermedad infecciosa y tales condiciones hacen factible que la población de LB que tiene la capacidad de interaccionar con la IgG unida a antígenos micobacterianos modifique características elementales como su proporción y función como posibles APCs [66- 68].

Nuestra propuesta original fue identificar células B que no han sido descritas previamente en TB, pero cuya presencia puede ocurrir sobre la base de la producción de anticuerpos anti-IgG que deben provenir de linfocitos con un BCR Fcγ-específico. Interesantemente se han descrito subpoblaciones de perfil autorreactivo en sangre periférica de sujetos sanos con fenotipo CD19+IgG+CD27- en un porcentaje del

2.4%±1.2%, diferente al que nosotros encontramos en células B Fcγ-específicas (9.3%±5.5%). Aunque, en un modelo de rata AB8 transgénica se encontró que la proporción de células B anti-IgG en bazo es del 15% (extremos del 13-16%) una proporción parecida a la subpoblación que estudiamos [59, 125]. Respecto a la población autorreactiva CD20+CD5+ se ha demostrado que en sujetos sanos la proporción es del 18±4.7% (extremos del 9.2-24.4%) [132]. Esto sustenta nuestra hipótesis original sobre que en algunas enfermedades donde existe una persistencia de antígenos y de CIC como en la TB se puede alterar el número y función de las células B autorreactivas como lo indica de forma indirecta el trabajo de Djavad [67].

Por ello evaluamos estas condiciones en el contexto de este padecimiento crónico y nuestro trabajo tuvo el objetivo primordial de identificar una población de células B Fcγ específicas mediante citometría de flujo al explotar su especificidad para interactuar con IgG purificada. Interesantemente, encontramos que existe una proporción significativamente menor de los linfocitos B Fcγ-específicos [CD19+(BCR-IgG)+] en los pacientes con tuberculosis, respecto a un grupo control, y al mismo tiempo se documentó una incapacidad de las células B totales para activar células no B autólogas.

Además de la disminución de la población B Fcγ específica, encontramos un descenso de las células con fenotipo CD5+ el cual es propio de células autorreactivas B1 que se caracterizan por su función APC, secretar anticuerpos naturales e interactuar con IgG propia [29]. Por tanto, es viable que se trate de la misma subpoblación celular, sin embargo no hubo una asociación significativa entre la frecuencia de la subpoblación de células B Fcγ-específica y la subpoblación CD5+ que estudiamos.

Aunque, al ser ambas subpoblaciones celulares autorreactivas es factible que las células B Fcγ específico tengan la misma función que se ha descrito en algunos modelos experimentales para el fenotipo CD5+; contribuyendo en la homeostasis de la inmunidad natural al sintetizar principalmente anticuerpos polirreactivos y secretar IL-10 [29, 35]. Esto último en procesos de autorreactividad en las que se ha observado que la deleción de la población de células B, cursan con un daño tisular mayor. Además, debemos aceptar que los cambios que encontramos pueden ser el resultado

de distintas alteraciones que afectan el número y función de este tipo de linfocitos, y cuya complejidad supera el alcance de nuestro trabajo [41, 45, 46].

A pesar de lo anterior, consideramos que la disminución de las subpoblaciones estudiadas refleja uno de los efectos en el mecanismo fisiopatogénico que ocurre en infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, o ser consecuencia de procesos inmunológicos complejos los cuales sugerimos a continuación:

- A) La compartimentalización de este tipo de células B en pulmón [86], que en el caso de TB afecta principalmente este órgano, podría explicar su descenso en sangre periférica; lo cual implicaría que la función APC o algunas de las características en estas células pueda limitarse a ciertos entornos tisulares, como la baja expresión de moléculas MHC y menor producción basal de IL-1 en macrófagos alveolares, descritas previamente [77].
- B) Además es posible que se genere un microambiente pulmonar que disminuya a la población de LB que estudiamos en sangre periférica debido a que su presencia es vital en la formación de tejidos linfoides terciarios como parte de una “segunda” respuesta; en un intento de contener al agente patógeno. De hecho se ha descrito que el knock-out de LB produce un mayor desarrollo de la patología pulmonar en el ratón C57BL/6 infectado con *M. tuberculosis* encontrando incremento del área de lesiones tisulares en pulmón, así como de CXCL13 (característico del microambiente de centros germinales), y de IL-10, probablemente como un intento fallido de quimioatracción de LB hacia la zona de la infección [26, 27, 86].
- C) Al tratarse de una población B con potencial autorreactivo, puede ocurrir una selección negativa en la periferia mediante varios procesos como: la inactivación funcional, apoptosis, y “edición genética” [87, 97].
- D) Se ha descrito en sujetos sanos que con el transcurso del tiempo una población de linfocitos que se mantiene constante son los LB asociados con la longevidad (age associated B cells; ABCs), una subpoblación autorreactiva que se

caracteriza por secretar una alta cantidad de anticuerpos, favorecer un ambiente propicio para células Th17, así como por su alta producción de IL-10 e IL-4 y funcionar como APCs captando antígenos vía BCR, TLR9 y TLR7. Por otro lado, uno de los mecanismos de patogenia por infección de *M. tuberculosis* es la inhibición del procesamiento antigénico a través de la disminución de la expresión de moléculas MHC-II mediante una prolongada señalización vía TLR, y en este sentido cabe la posibilidad de que la evasión del procesamiento antigénico por parte *Mycobacterium* también afecte a estas subpoblaciones de LB autorreactivos con función APC y en consecuencia exista una disminución de su presencia en sangre periférica [86, 89, 90].

- E) Finalmente, al existir una persistencia de CICs y antígenos es posible que se activen mecanismos de inhibición que conducen a la apoptosis vía el Fc $\gamma$ RIIB [87, 88].

Respecto a la población de LB CD19+, trabajos previos han reportado su disminución en pacientes con tuberculosis; aunque debemos tener presente que la tendencia de una menor proporción en las células B en nuestro trabajo no mostró una diferencia significativa al evaluar las poblaciones de linfocitos B CD19+ totales en el grupo de pacientes con TB y el grupo control [91, 92].

En la población total de LB CD19+ también se ha reportado su disminución gradual durante la tercera década de vida, manteniéndose constante hasta la séptima década cuando nuevamente se presenta un descenso, sin embargo se ha descrito que la proporción de este tipo de subpoblaciones autorreactivas se mantiene constante. Por lo anterior, debe considerarse que la función reguladora de estas células B durante estas etapas de la vida puede tener un rol más relevante al que se contempla [93, 86].

En relación al co-cultivo celular encontramos que cuando se favorece la captura del CIC constituido por IgG purificada a partir de anticuerpos contra antígeno micobacteriano total usando linfocitos B totales, y se aplica una condición de bloqueo del Fc $\gamma$ RIIB

(condición 1) existe un incremento en la proliferación de la población respondedora (14.6 %), respecto al control. Sin embargo, no hubo una diferencia estadística significativa, por lo que la capacidad de inducir una respuesta celular mediante el procesamiento antigénico a células no B autólogas es deficiente, lo que puede ser efecto de mecanismos patogénicos y de evasión de la respuesta inmune.

Aunque la captura mediante el BCR-Fc $\gamma$ -específico (condición 1) mostró un descenso en el procesamiento y presentación antigénica reflejándose en una respuesta casi nula de poblaciones de células T, se debe considerar la naturaleza de estas últimas, incluyendo el fenotipo, perfil de producción de citocinas, y otras funciones que deberán ser estudiadas en detalle.

Adicionalmente, al estandarizar y optimizar nuestros ensayos de cultivo en TB, en la condición en la que se omitió el bloqueo de CD32 (condición 2) hubo un incremento (5.6%) de proliferación respecto al control, sin embargo tampoco hubo una diferencia estadística significativa.

A pesar de lo anterior, esto abre la posibilidad de explorar, si alguna subpoblación B incluyendo la BCR Fc $\gamma$  específica puede participar en mecanismos de regulación alternativas de la respuesta inmune frente a antígenos micobacterianos.

Por otro lado convencionalmente la función del Fc $\gamma$ RIIB es la modulación de la respuesta inmune mediante los siguientes sistemas:

- a) Eliminación de los CIC en el sistema circulatorio.
- b) Supresión de la sinapsis inmunológica a través del dominio ITIM que implica la inhibición de la activación temprana de la célula B
- c) Desfosforilación del correceptor CD19
- d) Inducción de apoptosis, la cual ha sido descrita en monocitos pero principalmente en células B autorreactivas, e
- e) Inhibición de la fagocitosis [87, 88].

Por lo anterior, al observar principalmente una deficiencia en la proliferación en la condición sin bloqueo del Fc $\gamma$ RIIB (condición 2) donde se favorece la captura del CIC a

través de la porción del antígeno. Se puede considerar la posible participación de otras moléculas como los TLRs y CD1, ya que los complejos inmunes estaban constituidos de un antígeno micobacteriano total (ECMtb) y anticuerpos con reactividad anti-HSP como lo demostramos por ELISA e inmunoblot. La presencia de los antígenos inmunodominantes de la familia HSP60 y HSP70 son algunos de los principales blancos de células B en TB los cuales actúan sobre TLR-2, TLR-4 y CD91 en poblaciones con función APC. En el caso de los TLR pueden producir inhibición de la actividad celular en condiciones de persistencia de estos antígenos inmunodominantes [90, 94, 95].

Debido a la complejidad que implica definir de manera puntual el involucro de cada uno de los elementos que tiene un papel potencial en un proceso tan complejo de regulación, nuestro trabajo no abordó las posibilidades anteriores. Además, es posible que otros factores inmunogenéticos puedan intervenir en la regulación inmune, ya que se ha reportado que la isoforma Fc $\gamma$ RIIB-2 internaliza el antígeno (no así la isoforma Fc $\gamma$ RIIB-1), y se ha demostrado que la delección de Fc $\gamma$ RII en ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* está ligada a una mayor activación de las APCs [87, 88] y a un mejor curso de la enfermedad al disminuir la inmunopatología, debido a la promoción de la respuesta Th1 durante la fase aguda de la enfermedad [96]. Aunque cabe la posibilidad de que células B de perfil autorreactivo estén involucradas mediante en el reconocimiento de agentes patógenos por medio de anticuerpos anti-IgG polirreactivos o células B Fc $\gamma$ -específicos cuyo BCR presenta poliespecificidad [65, 67, 125].

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que:

- a) Existe una menor proporción de la subpoblación celular B Fcγ-específica en pacientes con TB respecto a controles sanos.
- b) En el sistema de co-cultivo que promueve la captura de complejos inmunes (constituidos por antígenos micobacterianos y anticuerpos anti-micobacteria) vía BCR los LB promueven proliferación celular. Sin embargo, no hay diferencia significativa con el grupo control.
- c) En pacientes con TB las proporciones de las subpoblaciones de células B Fcγ-específicas y CD19+CD5+ fueron menores respecto a controles sanos.
- d) Los cambios cuantitativos en la subpoblación autorreactiva B Fcγ-específica y en las células CD19+CD5+ en TB sugieren su participación en fenómenos de modulación de la respuesta celular que deberán ser estudiados.

La disminución en las proporciones en las células B Fcγ-específica y en la subpoblación CD5+ en TB activa no han sido descritos. Aunque es difícil proponer una participación fisiopatogenica esto debe ser debido a que los linfocitos autorreactivos son importantes en la modulación de la respuesta inmune.

## IX. REFERENCIAS

1. Davis DM. Intrigue at the immune synapse. *Scientific American*. Feb 294(2):48-55(2006).
2. Luis Graca. The Immune synapse as a novel target for therapy.
3. Trombetta E. & Mellman I. Cell Biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology* 23 975-1028 (2005)
4. Vyas, J.M., Van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology* 8, 607-18(2008).
5. Jensen, P.E. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nature immunology* 8, 1041-8(2007).
6. <http://epidemiologiamolecular.com/01/06/2009/mecanismo-de-presentacion-antigenica/>.
7. Heath, W.R. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 9-26(2004).
8. Tobian, A. a R., Harding, C.V. & Canaday, D.H. Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950)174, 5209-14(2005).
9. Hon, H., Oran, A., Brocker, T. & Jacob, J. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 174, 5233-42 (2005).
10. Villadangos, J. a & Young, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352-61(2008).
11. Wong, S.-C. et al. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *European journal of immunology* 40, 2296-307 (2010).
12. Harvey, B.P., Gee, R.J., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J. & Mamula, M.J. Antigen presentation and transfer between B cells and macrophages. *European journal of immunology* 37, 1739-51 (2007).
13. Carrasco, Y.R. & Batista, F.D. B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160-71 (2007).
14. Thomson, A.W. & Knolle, P. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nature reviews. Immunology* 10, 753-66 (2010).
15. Aderem, & Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17, 593-623(1999).

16. Wijburg, O.L. et al. The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. *European Journal of immunology* 28, 479-87(1998).
17. Norbury, C.C. et al. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3, 783-91(1995).
18. English, L. et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nature Immunology* 10, 480-7(2009).
19. Weinberg, S. & Unanue, E.R. Antigen-presenting function of alveolar macrophages: uptake and presentation of listeria monocytogenes. *Both macrophage p o p.* 794-799 (1981).
20. Barral, P. et al. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. *Nature immunology* 11, 303-12(2010).
21. Delamarre, L. et al. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (New York, N.Y.)* 307, 1630-4(2005).
22. Bedoui, S. et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology* 10, 488-95(2009).
23. Heath, W.R. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 9-26(2004).
24. Itano, A. et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19, 47-57(2003).
25. Welner, R.S., Kincade, P.W. & Pelayo, R. Linfopoyesis temprana en médula ósea adulta. *Advances in Immunology* 26, 135-144 (2007).
26. Cain D., Kondo M., Chen H. & Kelsoe G. Effects of acute and chronic inflammation on B cell development and differentiation. *Journal Investigation Dermatology* 129, 266-277 (2009).
27. Nches, S.I., Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H. & Ruddle, N.H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology* 7, 344-353 (2006).
28. Schmidlin, H., Diehl, S. & Blom, B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends in immunology* 30, 277-85 (2009).
29. Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Publishing Group* 11, 34-46 (2010).
30. Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H. & Dorshkind, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nature immunology* 7, 293-301 (2006).
31. Noh, J., Choi, W.S., Noh, G. & Lee, J.H. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune network* 10, 247-9 (2010).
32. Sekiguchi, Y. et al. CD5-Positive Follicular Lymphoma: A Case Report and Literature Review. *Internal Medicine* 50, 899-904 (2011).

33. Muñoz A., Usan J., Barcelo O., Gallart T & Gomis R. Análisis de la producción de anticuerpos antiinsulina y antiisote pancreático en la diabetes tipo 1 por células B CD5+ y B CD5-. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología.
34. Koelsch, K. et al. Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. 117, (2007).
35. Youinou, P. et al. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 5, 215-21 (2006).
36. Lund, F.E. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Current opinion in immunology* 20, 332-8 (2008).
37. Duddy, M. et al. Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* (2007).
38. Agematsu, K., Nagumo, H. & Komiyama, A. CD27 : a memory B-cell marker. *Immunology today* 5699, 204-206.
39. Wei, C., Lee, F.E.-hyung & Anolik, J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology* 20, 67-82 (2008).
40. Bancos, S. & Phipps, R.P. Memory B cells from older people express normal levels of cyclooxygenase-2 and produce higher levels of IL-6 and IL-10 upon in vitro activation. *Cellular Immunology* 266, 90-97 (2010).
41. Mizoguchi A. & Bhan A. A Case for Regulatory B Cells 1. *The Journal of Immunology* 176 705-710 (2006).
42. Martin, F., Chan, A.C. & Way, O.D.N.A. Pathogenic Roles of B Cells in Human Autoimmunity : Insights from the Clinic The pathogenic roles of B cells in human autoimmune. *Health (San Francisco)* 20, 517-527 (2004).
43. Shlomchik, M.J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* 28, 18-28 (2008).
44. Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P. & Jamin, C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173, 260-7 (2009).
45. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S. & Bhan, A.K. Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Cell* 16, 219-230 (2002).
46. Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F.I. & Bhan, A.K. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Immunology* 12, 597-605 (2000).
47. Mauri, C., Gray, D., Mushtaq, N. & Londei, M. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *Journal of Experimental Medicine* 197, 489-501 (2003).

48. Jamin, C. et al. Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis and rheumatism* 58, 1900-6 (2008).
49. Martin, F. & Kearney, J.F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 195-201 (2001).
50. Chalouni, C. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *International Immunology* 15, 457-466 (2003).
51. Ham, B.M.V. et al. Modulation of the Major Histocompatibility Complex Class II – associated Peptide Repertoire by Human Histocompatibility Leukocyte Antigen ( HLA ) -DO. *Cell* 191, (2000).
52. Rodríguez-Pinto, D. B cells as antigen presenting cells. *Cellular immunology* 238, 67-75 (2005).
53. Rivera, A., Chen, C.-chi, Ron, N. & Dougherty, J. P. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited : antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Immunology* 13, 1583-1593 (2001).
54. Batista, F.D. & Harwood, N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature reviews. Immunology* 9, 15-27 (2009).
55. Pereira, J.P., Kelly, L.M. & Cyster, J.G. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *International immunology* 22, 413-9 (2010).
56. Victora, G.D. et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592-605 (2010).
57. Phan, T.G., Gray, E.E. & Cyster, J.G. The microanatomy of B cell activation. *Current opinion in immunology* 21, 258-65 (2009).
58. Pape, K. a, Catron, D.M., Itano, A. a & Jenkins, M.K. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491-502 (2007).
59. Fecteau, J.F. & Ne, S. A New Memory CD27 IgG B Cell Population in Peripheral Blood Expressing V H Genes with Low Frequency of Somatic Mutation 1. *J. of Immunology* 177, 3728-3736 (2010).
60. Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., Tedder, T.F. & Carolina, N. B-1a and B-1b Cells Exhibit Distinct Developmental Requirements and Have Unique Functional Roles in Innate and Adaptive Immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7-18 (2005).
61. Zhou, Z.-H. et al. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell host & microbe* 1, 51-61 (2007).

62. Jayasekera, J.P. et al. Natural Antibody and Complement Mediate Neutralization of Influenza Virus in the Absence of Prior Immunity. *Society* (2007).doi:10.1128/JVI.02128-06
63. Boes, B.M., Prodeus, A.P., Schmidt, T., Carroll, M.C. & Chen, J. A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense Against Systemic Bacterial Infection. *J. Exp. Med.* 188, 2381-2386 (1998).
64. Baumgarth, B.N. et al. B-1 and B-2 Cell – derived Immunoglobulin M Antibodies Are Nonredundant Components of the Protective Response to Influenza Virus Infection. *J. Exp. Med.* 192, (2000).
65. Tiller, T. et al. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 26, 205-13 (2007).
66. Araiza MT, Aguilar León DE, Novelo VR & Martínez-Cordero E. 2007. IgM, IgG and IgA rheumatoid factors in pigeon hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Lab Anal.*21:315-21.
67. Djavad, N. et al. Comparison of rheumatoid factors of rheumatoid arthritis patients, of individuals with mycobacterial infections and of normal controls: evidence for maturation in the absence of an autoimmune response. *European journal of immunology* 26, 2480-6 (1996).
68. Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L. & Gray, D. Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176, 3498-506 (2006).
69. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine* 2000; 161:1376-95.
70. Burns R. Chapter 21. Zborowski M. & Chalmers J. *Magnetic Cell Sorting* pp 291. *Immunochemical Protocols*. Pp 317. 2005 Human Press. Totowa, New Jersey.
71. De Angelis, B. et al. Generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Blood* 114, 4784-91 (2009).
72. Stewart C. & Stewart S. *Current Protocols in Cytometry*. 1997. Phenotypic Analysis 6.2.1-6.2.18. John Wiley & Sons, Inc.
73. Crowther J. Chapter 2 Basic Principles of ELISA. *ELISA: Theory and Practice*. 1995 Human Press. 142 218.
74. Cooper, H.M. & Paterson, Y. Purification of immunoglobulin G fraction from antiserum, ascites fluid, or hybridoma supernatant. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] Chapter 11, Unit11.14* (2001).
75. Mathsson, L., Lampa, J., Mullazehi, M. & Rönnelid, J. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce FcγRIIIa dependent and rheumatoid factor

correlated production of tumour necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis research & therapy* 8, R64 (2006).

76. Lakey, E.K., Casten, A., Niebling, W.L., Margoliash, E. & Pierce, S.K. time dependence of B cell processing and presentation of peptide and native protein antigens. (1988).

77. Harding C. Chapter 16. Antigen Processing and Presentation. *Currents Protocols in Immunology*. 1997. Wiley & Johns. 16.1.1-16.1.14

78. Alley M., Scudiero D., Monks A., Hursey M., Czerwinski M., Fine D., Abbot B., Mayo J., Shoemaker R. & Boyd M. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research*. 48 589-601 (1988).

79. Pauly J., Sokal J. & Han T. Whole-blood culture technique for functional studies of lymphocyte reactivity to mitogens, antigens, and homologous lymphocytes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 82 500-512 (1973)

80. Pauly J. & Han Tin. Whole blood microculture assay of human lymphocyte function. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 88 864-872 (1976).

81. Bloemena E., Ross M., Van Heijst J., Vossen J. & Schellekens P. Whole-blood lymphocyte cultures. *Journal of Immunological Methods* 122 161-167 (1989).

82. Datasheet, T. alamarBlue™ Technical Datasheet. 44, 1-25 (2004).

83. Burns R. Chapter 17. Magi B. & Liberatori S. Immunoblotting Techniques pp. 227. *Immunochemical Protocols*. Pp 317. 2005 Human Press. Totowa, New Jersey.

84. Kaplan D, Smith D., Meyerson H., Pecora N & Lewandowska K. CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-Barr virus transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98 13850-13853 (2001).

85. Wroblewski, J.M., Copple, A., Batson, L.P., Landers, C.D. & Yannelli, J.R. Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *Journal of immunological methods* 264, 19-28 (2002).

86. Maglione, P.J., Xu, J. & Chan, J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 178, 7222-34 (2007).

87. Smith, K.G.C. & Clatworthy, M.R. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature reviews. Immunology* 10, 328-43 (2010).

88. Takai, T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* 2, 580-92 (2002).

89. Hao, Y., O'Neill, P.J., Naradikian, M.S., Scholz, J.L. & Cancro, M.P. A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood* 1294-1304 (2011).doi:10.1182/blood-2011-01-330530

90. Harding, C.V. & Boom, W.H. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nature reviews. Microbiology* 8, 296-307 (2010).
91. Hernandez, J. et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological investigations* 39, 197-205 (2010).
92. Corominas, M. et al. B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 8, 98-105 (2004).
93. Utsyama M., Hirokawa K., Kurashima C., Fukayama M., Inamatsu T., Suzuki K., Hashimoto W. & Sato K. Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29 T cell subsets in human peripheral blood. *Mechanisms of Ageing and development*, 63 57-68 (1992).
94. Handley, H.H. et al. Autoantibodies to human heat shock protein (hsp)60 may be induced by *Escherichia coli* groEL. *Clinical and experimental immunology* 103, 429-35 (1996).
95. Karopoulos, C., Rowley, M.J., Handley, C.J. & Strugnell, R. a Antibody reactivity to mycobacterial 65 kDa heat shock protein: relevance to autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 8, 235-48 (1995).
96. Maglione, P.J. et al. during *Mycobacterium tuberculosis* Infection 1. *The Journal of Immunology* (2011).
97. Zouali, M. & Sarmay, G. B lymphocyte signaling pathways in systemic autoimmunity: implications for pathogenesis and treatment. *Arthritis and rheumatism* 50, 2730-41 (2004).
98. Vascotto, F. et al. Antigen presentation by B lymphocytes : how receptor signaling directs membrane trafficking. *Current Opinion in Immunology* 93-98 (2007).doi:10.1016/j.coi.2006.11.011.
99. Carolina, N. B Cell Antigen Receptor Endocytosis and Antigen Presentation to T Cells Require Vav and Dynamin. *Journal of Biological Chemistry* 284, 24088 -24097 (2009).
100. Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R. & Gordon, S.V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature reviews. Microbiology* 7, 537-44 (2009).
101. Walzl, G., Ronacher, K., Hanekom, W., Scriba, T.J. & Zumla, A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nature reviews. Immunology* 11, 343-354 (2011).
102. Regional, R. *Tuberculosis en las Américas*. (2008).
103. Sundaramurthy, V. & Pieters, J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9, 1671-9 (2007).
104. Korbil, D.S., Schneider, B.E. & Schaible, U.E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10, 995-1004 (2008).

105. Pathak, S.K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nature immunology* 8, 610-8 (2007).
106. Geijtenbeek, T.B.H. et al. *Mycobacteria* Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *Journal of Experimental Medicine* 197, 7-17 (2002).
107. van Eden, W., van der Zee, R. & Prakken, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nature reviews. Immunology* 5, 318-30 (2005).
108. Stevens, E.J. & Peakman, M. Enhanced T cell proliferation and increased responder frequency following delivery of antigen to the antigen-presenting cell; B cell dependency and use in detection of autoreactive T cells. *Journal of immunological methods* 215, 59-70 (1998).
109. Bothamley, G.H., Rudd, R., Festenstein, F. & Ivanyi, J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 47, 270-5 (1992).
110. Kerrigan, A.M. & Brown, G.D. Immunobiology. *Immunobiology* 214, 562-575 (2009).
111. Elkayam, O., Segal, R., Lidgi, M. & Caspi, D. Positive anti-cyclic citrullinated proteins and rheumatoid factor during active lung tuberculosis. *Annals of the rheumatic diseases* 65, 1110-2 (2006).
112. Yamada, T. et al. Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis in Japan. *Annals of the rheumatic diseases* 65, 1661-3 (2006).
113. Hoeffel, G. et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-92 (2007).
114. Villadangos, J. a & Young, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352-61 (2008).
115. Sun, C.-M., Deriaud, E., Leclerc, C. & Lo-Man, R. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 22, 467-77 (2005).
116. Bajaj, G., Rattan, a & Ahmad, P. Circulating immune complexes in tuberculosis--an indicator of activity. *Indian journal of pediatrics* 57, 203-7 (1990).
117. Radhakrishnan, V.V., Mathai, a & Sundaram, P. Diagnostic significance of circulating immune complexes in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of medical microbiology* 36, 128-31 (1992).
118. Raja, A. et al. Immunoglobulin G , A , and M Responses in Serum and Circulating Immune Complexes Elicited by the 16-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 9, 308-312 (2002).
119. Baldev, R., Saini, A., Gupta, K., Yadav, R. & Arora, K. Circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis. *Lung India* 14, 69-71 (1996).

120. Jhonson, Nm., McNicol, M., Burton-Kee, E. & Mowbray, J. Circulating immune complexes in tuberculosis. *Thorax* 36, 610-617 (1981).
121. Singh, K.K. et al. Combined use of serum and urinary antibody for diagnosis of tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 188, 371-7 (2003).
122. Durai, M., Huang, M.-N. & Moudgil, K.D. Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis. *Journal of autoimmunity* 33, 208-13 (2009).
123. Multhoff, G. Heat shock proteins in immunity. *Handbook of experimental pharmacology* 279-304 (2006).at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610364>
124. Albani, S. & Carson, D. a A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunology today* 17, 466-70 (1996).
125. Helen Tighe, Poje P. , Tucker R., Kipps T., Roudier J., Jirik F. & Carson D. Function of B Cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid autoantibody in transgenic mice. *Journal of Experimental Medicine* 177, 109-118 (1993).
126. Dubaniewicz, A., Kämpfer, S. & Singh, M. Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 86, 60-7 (2006).
127. Griffin, D.O., Holodick, N.E. & Rothstein, T.L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 67-80 (2011).
128. Peinado M., Conesa A., Dávila L., Bautista de Sanctis J., D.L.& T.F. & Sanc, D. Expresión de los receptores para el Fc de la IgG en leucocitos de sangre periférica de pacientes con hepatitis C crónica . *Investigación Clínica* 48, 175 - 185 (2007).
129. Tighe, H. et al. Peripheral deletion of rheumatoid factor B cells after abortive activation by IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 646-51 (1997).
130. Nordström, E., Möller, E. & Abedi-Valugerdi, M. Induction of IgG rheumatoid factor (RF) production by antibody-antibody (RF-like) immune complexes: the role of T cells, complement and Fc gamma receptors. *Journal of autoimmunity* 11, 131-40 (1998).
131. Rock, B.Y.K.L., Benacerraf, B. & Abbas, A.K. ANTIGEN PRESENTATION BY Hapten-Specific B LYMPHOCYTES. 160, 1102-1113 (1984).
132. Burastero, S.E., Casali, P., Wilder, R.L. & Notkins, A.L. Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are with rheumatoid arthritis produced by CD5 + B cells from patients the CD5. *Journal of Experimental Medicine* 168, 1979-1992 (1988).

## **ANEXOS.**

### **ANEXO A. RECEPTOR DE LA CÉLULA B (B Cell Receptor; BCR).**

El BCR tiene *un papel dual* al actuar como una molécula de señalización para la activación del LB o bien como un receptor para propiciar el procesamiento antigénico, el receptor está conformado por una inmunoglobulina de membrana que esta acoplado a un módulo de señalización formado por un dímero  $Ig\alpha-Ig\beta$ . La unión del antígeno causa que el BCR se localice con la clatrina y la cascada de señalización inicia con la activación de tirosina cinasa de la familia src, especialmente Lyn, el cual fosforila el motivo ITAM siguiendo con el reclutamiento y la activación de Syk tirosina cinasa. Induciéndose la translocación dentro de los lipids rafts, a la vez que se induce la fosforilación de clatrina por activación de la Src cinasa. La fosforilación no es necesaria para capturar el antígeno, pero la estabilidad del complejo es requerida para la apropiada internalización. Las colas citosolicas del dímero contienen motivos que cooperan y sinérgicamente interactúan para optimizar el tráfico y mantenimiento de los complejos BCR-Ag en los endosomas tardíos [98, 99].

El BCR induce la reorganización dinámica del citoesqueleto de actina, que es dependiente de Btk; el cual incluye una rápida despolimerización, seguida de una fase de polarización y despolarización. También es dependiente de la reorganización de los microdominios de la membrana.

### **ANEXO B. TUBERCULOSIS.**

El género *Mycobacterium* comprende microorganismos saprofitos y sólo algunos se han adaptado a un tipo de vida patogénico como: *Mycobacterium africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii* y *M. tuberculosis*. Este último es el principal agente patógeno cuya infección produce Tuberculosis por inhalación de aerosol, basta con una gota cargada con diez microorganismos para infectar al hospedero. Esto se traduce en un problema de salud global ya que se reportan 10 millones de nuevos casos y 1.7 millones de defunciones por año [100, 101]. De acuerdo al informe de la Organización Panamericana de la Salud, dentro de los principales problemas de salud pública/epidemiológicos para erradicar este padecimiento están las discrepancias

entre los reportes de casos; como la brecha entre la incidencia reportada y la incidencia estimada, el flujo migratorio, hacinamiento, surgimiento de padecimientos que inducen inmunosupresión como VIH, Diabetes Mellitus, falta de una prueba diagnóstica que permita discernir las diferentes fases del padecimiento, la síntesis de una vacuna que sea eficaz en adultos [102].

Otro tópico importante está determinado por los factores de virulencia con los que cuenta *Mycobacterium spp.*, que se encargan de evadir la respuesta inmune, como el sistema para escapar del fagolisosoma, expresión de antígenos que pueden inducir mimetismo molecular, latencia mediante la formación de estructuras caseosas (conglomerados de granulomas). Siendo este segundo tópico el que nos compete nos enfocaremos en describir brevemente la interacción que mantienen el sistema inmune y el agente patógeno [103].

El sistema inmune innato es el principal mecanismo que actúa contra este agente patógeno. Las células fagocíticas como los granulocitos captan el agente patógeno mediante receptores como; CD16, CD32, CD64; en el citoplasma se encuentran granulos que contienen  $\alpha$ -defensinas, proteasas, moléculas con alta afinidad por el Fe (como lactoferrina), y lipocalina. Además de que se secretan quimiocinas como IL-10, MCP-1, MIP-1a/b y citosinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Otro elemento importante son los receptores de reconocimiento de patrones como: el receptor del complemento CR3, receptores de unión a manosa, proteína surfactante A y D (Sp-A, Sp-D), receptor de manosa de unión a la membrana del macrófago (DC-specific intercelular-adhesion-molecule-3 grabbing non-integrin; DC-SIGN o CD209), receptores tipo Toll (TollLike Receptor; TLR) y probablemente Dectin-1[104, 105].

Sin embargo las interacciones que mantiene el agente patógeno con el hospedero son muy complejas y aún se continúan develando los procesos de la respuesta inmune durante la infección, aunque está claro que el principal mecanismo de patogenicidad es el escape del fagolisosoma. Mediante microscopia electrónica de macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* se estableció que esta yace en un compartimento con características aberrantes a las que realiza el organelo convencionalmente, ya que presenta un pH de 6.2, pocas ATPasas vacuolares y la

perdida de marcadores del endosoma tardío y del lisosoma, tales como Rab7 o LAMP1. Además, el “fagosoma-micobacteriano” es un organelo que tráfico receptores de transferrina, consecuentemente *M. tuberculosis* puede acceder al hierro. Respecto al proceso para evitar la formación del fagolisosoma sea demostrado que el antígeno temprano de endosoma (early endosomal antigen; EEA1), que es uno de los principales efectores de Rab5, está ausente. La función de EEA1 radica en su función sobre el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), el cual es elemento primordial del tráfico membranal del sistema endolisosomal. Además PI3P es generado por efecto de Rab5. El bloqueo de la generación de PIP3 en el endosoma temprano es una de las estrategias utilizadas por el agente patógeno para inducir el arresto para su liberación al lisosoma [103].

Respecto a las DCs mediante DC-SIGN capturan e internalizan *M. tuberculosis* a través del componente de la pared celular ManLAM. La molécula está implicada como un factor de virulencia, ya que previene la maduración de DCs. En este contexto se ha demostrado que *M. tuberculosis* modula las funciones alterando su diferenciación, monocitos que se diferencian mediante GM-CSF e IL-4 se desarrollan como DCs que pierden la expresión de CD1 y son capaces de producir IL-10 pero no IL-12. Lo que significa una menor capacidad para presentar antígenos y producir citosinas que polarizan células T naïve con un perfil de células incapaces de producir IFN- $\gamma$  o IL-4. Otro proceso patogénico frecuentemente reportado es que los monocitos circulantes pueden representar un mecanismo de escape del agente patógeno [106].

Otros factores de virulencia importantes son las diversas moléculas que son expuestas como algunas proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein; HSP) bien pueden inducir mimetismo molecular favoreciendo el desencadenamiento de condiciones autoinmunes adversas (HSP60) o bien condiciones favorables para una respuesta celular mediante células que realicen presentación cruzada (HSP 70). Interesantemente, al considerar la presencia de anticuerpos contra antígenos micobacterianos, esta familia de HSPs es uno de los blanco más comunes, y se ha descrito niveles elevados de IgG frecuentemente [107]. En proteínas de filtrado celular como ESAT6, se ha demostrado que mediante su unión al TLR-2, resulta en una incapacidad de la respuesta inmune al alterar la producción de la cadena p40 de la IL-12. Otro factor de virulencia interesante es la lipoproteína de 19 kDa que induce la

expresión y secreción de péptidos antimicrobianos al interactuar con receptores tipo Toll (TollLike Receptor; TLR), aunque, la propia activación de la lipoproteína por tiempo prolongado induce patogenicidad al disminuir la expresión del MHC-II. De hecho ESAT6 al actuar sobre el TLR2, también inhibe la actividad de la presentación antigénica en DCs y Mφs [105, 109].

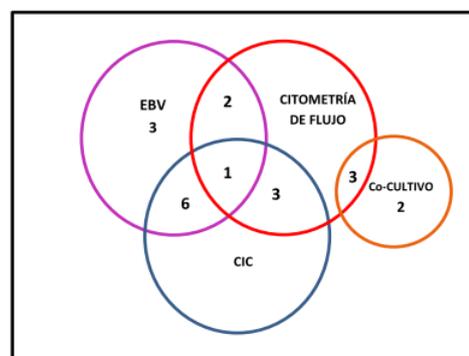
Los receptores DC-SIGN (de DCs y Mφs) y MMR (en Mφ) pueden promover señales para la producción de IL-10. Este mecanismo se ha sugerido que contrarresta la inflamación mediada por células TH1, la cual es asociada con protección y favorece la sobrevivencia y crecimiento del organismo patógeno. En contraste, la respuesta en la que intervienen los TLRs, promueven la translocación del núcleo de NF-κB y la expresión de mediadores proinflamatorios en Mφ y DC, lo que resulta en la secreción de IL-12, IL-18, TNF-α y quimiocinas como MCP-1 MIP1a. Lo que se traduce en un ambiente con IFN-γ lo que implica la participación de células NK, TH1 y CD8+ promoviendo la activación de Mφs y restricción del crecimiento bacteriano [104].

### ANEXO C. REACTIVOS

**ANTICUERPOS.** Para realizar la inmunofenotipificación se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: se usó anti-CD19-Pe (ABCam), anti-CD19-Pe/anti-CD5-FITC (ABCam), anti-CD32, anti-CD16, anti-CD64 (Ancell), anti-CD3-FITC/anti-CD8-Pe/anti-CD45-PerCP/anti-CD4-APC (Beckton Dickson), IgG-FITC (anticuerpo conjugado al FITC en nuestro laboratorio), Fc de IgG human (ICN Biomedicals) y control de isotipo IgG1κ-Pe **EXTRACTO CRUDO DE *Micobacterium tuberculosis*** (ECMtb; constituido por el sobrenadante del medio de cultivo de la cepa Rv37) **HSP65 Rv0440 de *Micobacterium bovis*** (cpn60.1) (Lionex GmbH).

**ANEXO D. USO DE MUESTRA DE PACIENTES.** De las 20 muestras de pacientes con TB: 12 fueron utilizadas para realizar la transformación con EBV, igualmente 9 muestras se utilizaron para realizar la fenotipificación por citometría de flujo, en 5 se realizó el co-cultivo y en 10 muestras se utilizó el plasma para la obtención de CIC.

Total=20 EBV=12 CITOMETRÍA=9 CIC=10  
CO-CULTIVO=5



## ANEXO I. IDENTIFICACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE LB TRANSFORMADOS CON EBV EN PACIENTES CON TB.

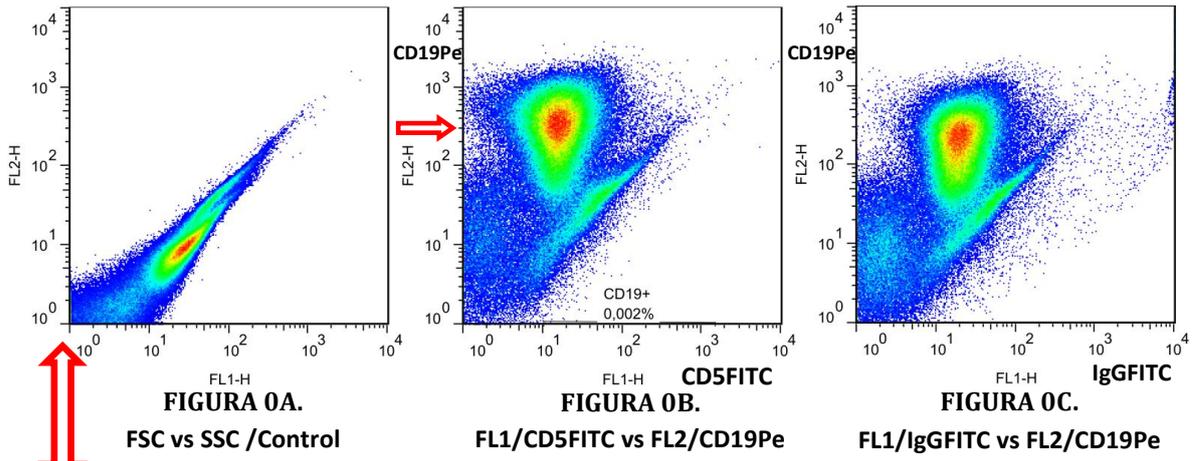
De 12 muestras de células mononucleares provenientes de sangre periférica de pacientes con TB, después de 5 semanas en cultivo sólo 8 mostraron conglomerados celulares, mientras que en las 4 muestras restantes no hubo evidencia de proliferación celular. Mediante la estrategia que se muestra en la figura I ANEXO-I, se identificó la proporción de las dos subpoblaciones de interés, en la tabla I de esta sección se compara la media de las proporciones de la población de células B después del enriquecimiento por MACS y las células B transformadas con el EBV.

**TABLA I ANEXO. COMPARACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS CD19+CD5+ Y B Fc $\gamma$ -ESPECÍFICO OBTENIDAS PREVIO ENRIQUECIMIENTO MEDIANTE MACS Y TRANSFORMADAS CON EL EBV.**

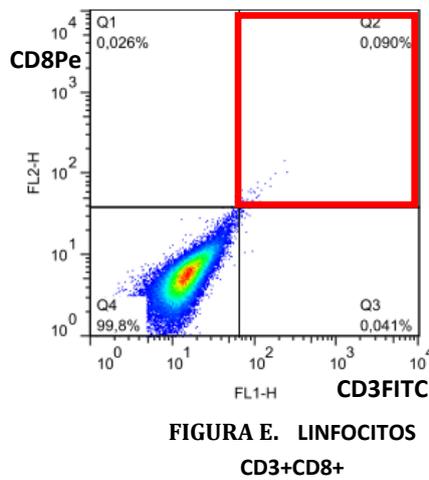
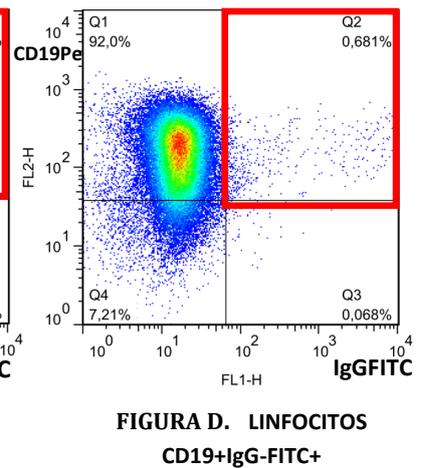
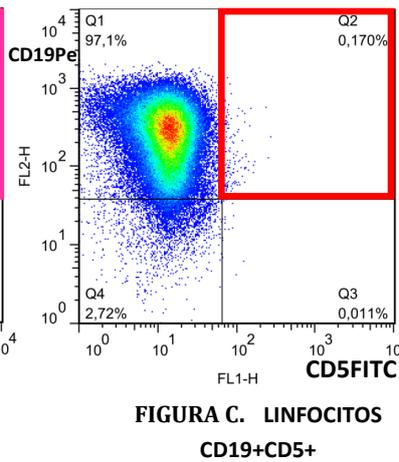
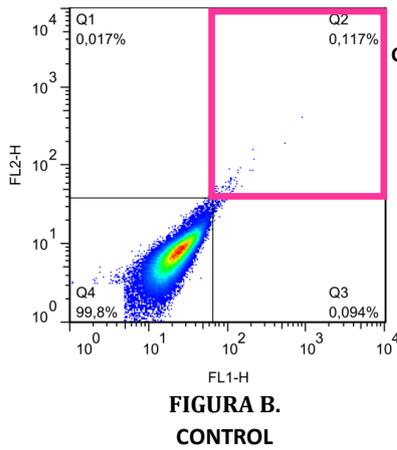
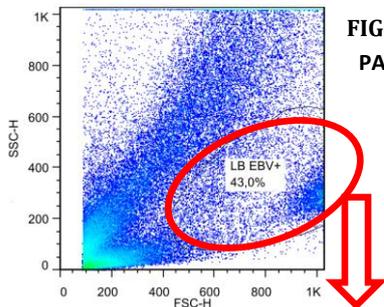
PARAMETRO	SUBPOBLACIÓN CELULAR							
	CD19+CD5+				B Fc $\gamma$ -específico			
	LB TRANSFORMADOS CON EBV		LB PREVIO ENRIQUECIMIENTO		LB TRANSFORMADOS CON EBV		LB PREVIO ENRIQUECIMIENTO	
	CONTROL	TB	CONTROL	TB	CONTROL	TB	CONTROL	TB
MEDIA $\pm$ D.V	0.705 $\pm$ 0.45	1.915 $\pm$ 2.4	13.2 $\pm$ 8.9	4.072 $\pm$ 4.5	1.37 $\pm$ 0.96	1.38 $\pm$ 0.98	9.3 $\pm$ 5.5	3.02 $\pm$ 1.6
E.T. MEDIA	0.264	1.745	2.988	1.500	0.558	0.699	2.104	0.546
MEDIANA	0.905	1.915	11.1	3.4	0.958	1.38	11.4	3.13

Como se puede observar tanto en el grupo de pacientes con TB y el grupo control presentan una menor proporción de las dos subpoblaciones celulares después de la transformación con el EBV respecto a la identificación previo enriquecimiento mediante MACS. Esto puede deberse a la precisión de la estrategia utilizada para realizar la adquisición mediante el citómetro de flujo, como se observa en la figura A tenemos una amplia distribución de células transformadas con el EBV y no podemos aseverar que esta sea la mejor estrategia, como se puede apreciar en la figura B en nuestro control de isotipo queda claro que no hay una compensación adecuada. Lo que puede ser un efecto determinado porque la activación y crecimiento celular después de la transformación con EBV en los linfocitos no está sincronizado, siendo la complejidad celular y el tamaño características no uniformes en todas los linfocitos.

Además el tiempo en cultivo puede favorecer que las células presentes sean principalmente plasmáticas (CD38+CD138+). Incluso la propia transformación con el EBV puede modificar el fenotipo de las células B, disminuyendo la expresión de CD5, en este sentido algunos reportes señalan que el fenotipo de los LB cambia de acuerdo a la línea celular a la que pertenezcan. De hecho el éxito de una transformación exitosa también depende de la línea celular que se usa [71, 84, 85]. Después de realizar varios análisis mediante el Flow Jo 7.6.1 seleccionamos el gate e identificamos la proporción de la subpoblación CD19+CD5+ y CD19+(IgG-FITC)+ los datos de la tabla I de esta sección muestran las proporciones encontradas y se puede observar que mediante esta estrategia identificamos una menor proporción de esta población, por todo esto decidimos realizar el análisis mediante el enriquecimiento previo en células frescas. Respecto a la alta proporción de células negativas para CD19 en particular el día 35 de cultivo es posible que la mayor parte de la población corresponda a células plasmáticas CD19-, además de que la propia transformación con el EBV puede modificar el fenotipo celular [71, 84, 85].



**FIGURA 0. DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS. LB TRANSFORMADOS CON EBV DE UN PACIENTE CON TB DE IZQUIERDA A DERECHA EN NO GATE.**



**FIGURA I. ANEXO-I. DOT PLOTS REPRESENTATIVOS. LB TRANSFORMADOS CON EL EBV DE UN PACIENTE CON TB**

## ANEXO II. LINFOCITOS B OBTENIDOS POR SELECCIÓN NEGATIVA, CON REACTIVIDAD A IgG.

Se estudiaron los LB mediante citometría de flujo, se trabajó con el sistema de selección con un campo magnético (MACS) para LB. Primero se identificó la proporción de células que reconocen a la IgG humana que fue conjugada con FITC. Encontramos que la proporción de linfocitos positivos seleccionados por MACS fue del 91.8% como se puede observar en el histograma de la figura II ANEXOS-II. Respecto a el control tenemos que existe unión inespecífica del 0.26%, por lo tanto la proporción de linfocitos seleccionados por MACS que reconocen la IgG humana es del 91.5%.

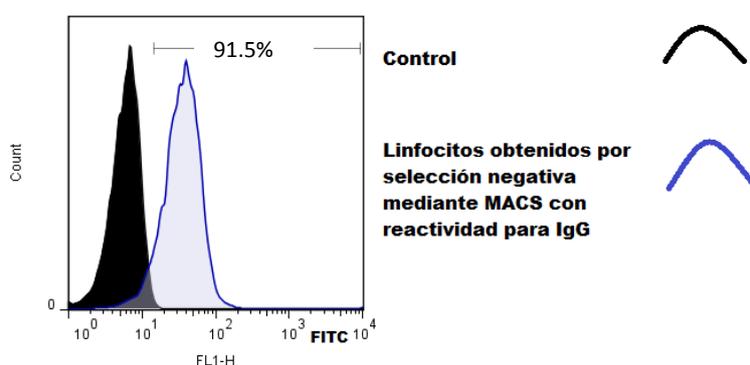


FIGURA II. ANEXOS-II. PROPORCIÓN DE LINFOCITOS QUE CAPTURAN IgG HUMANA SIN BLOQUEAR EL Fc $\gamma$ RII (CD32)

Sin embargo, la IgG también es reconocida por otros receptores presentes en los linfocitos como el receptor de la fracción constante de IgG (Fc $\gamma$ RII/ CD32). Es por ello que utilizamos fragmentos F(ab)'<sub>2</sub> de anticuerpos anti-CD32 (1.6  $\mu$ g para 10<sup>6</sup> células) para impedir que la IgG fuera reconocida por este receptor y encontramos que al bloquear este receptor la proporción de linfocitos que reconoce a la IgG es del 20.4% (ver figura III ANEXOS-II), de esta forma se identifico a la población de células B BCR Fc $\gamma$ -específico.

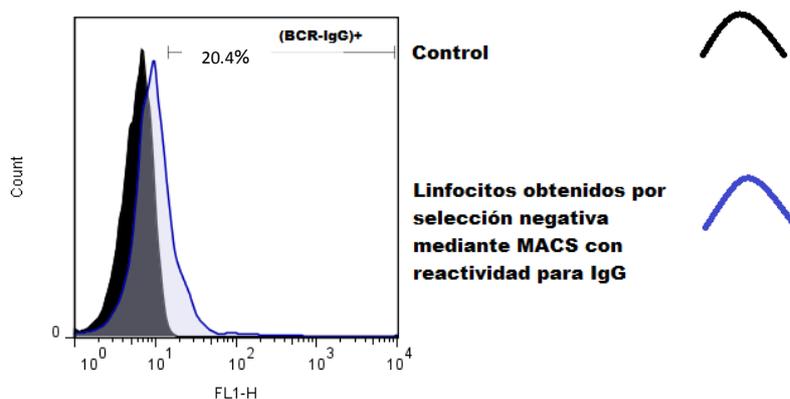
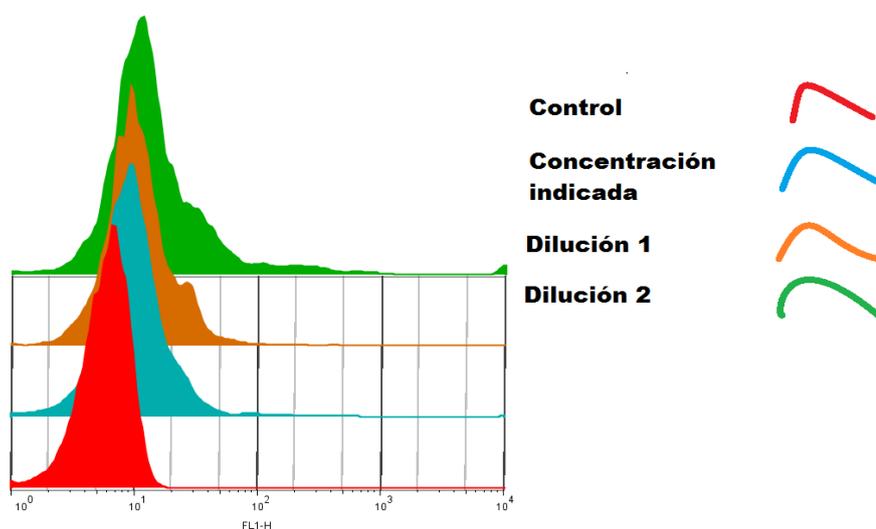


FIGURA III. ANEXOS-II. PROPORCIÓN DE LINFOCITOS QUE CAPTURAN IgG BLOQUEANDO EL Fc $\gamma$ RII (CD32).

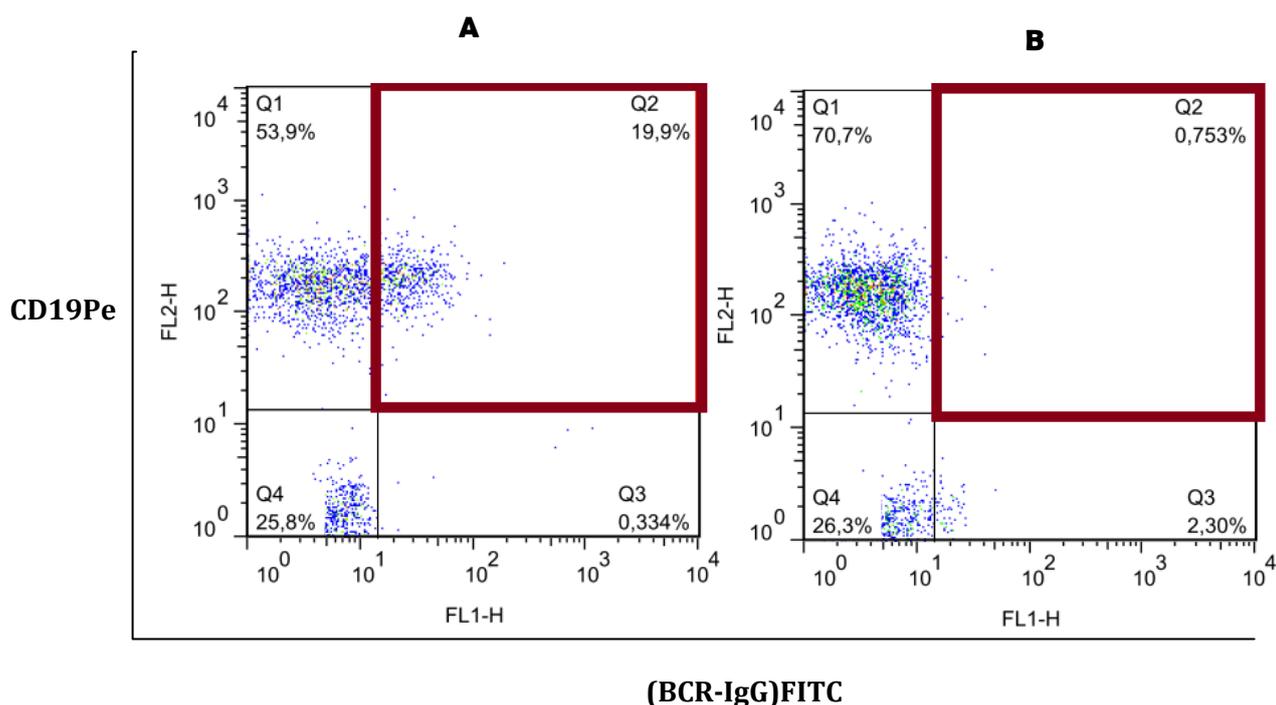
Para tener la certeza de que la concentración de anti-CD32 era la indicada realizamos diluciones de la concentración recomendada y encontramos que la proporción de linfocitos positivos aumenta conforme se diluye la concentración de anticuerpo (ver figura IV ANEXOS-II). Además si se utilizaba una concentración 3 veces mayor comienza a presentarse el bloqueo de los anticuerpos a su ligando. Por lo tanto la concentración que utilizamos era la indicada. También se utilizaron fragmentos F(ab)'2 de anticuerpos anti-CD16 y anti-CD64 en una dilución 1:40 de la concentración recomendada, ya que algunos reportes indican la presencia los receptores CD16 (FcγRIII) y CD64 (FcγRI) en una proporción de hasta el 2% en LB de sujetos sanos, mientras que el CD32 según este reporte se encuentra en el 93% de los LB [128].



Sample Name	Population Name	Median, FL1-H	Geom. Mean	Mode, FL1-H	Freq. of Total	Freq. of Grandparent	Freq. of Parent	Count
Data.002	Control isotipo	15.5	15.9	14.9	0.024%	0.029%	0.261%	24
Data.003	Concentración indicada	20.8	27.3	14.9	0.628%	0.706%	20.7%	628
Data.007	Dilución 1	21.8	24.8	14.9	1.03%	1.16%	25.0%	1029
Data.008	Dilución 2	25.8	34.8	14.9	1.67%	1.94%	37.2%	1674

FIGURA IV. ANEXOS-II. IDENTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN INDICADA DE ANTI-CD32 PARA FAVORECER LA CAPTURA DE IgG MEDIANTE EL BCR.

Adicionalmente, al evaluar la población doble positiva CD19+(BCR-IgG)+ se detectó que su capacidad de unir IgG-FITC+ disminuyó hasta ser casi nula al incubarse previamente con fragmentos Fc de IgG purificados en concentraciones de saturación (ver **Figura V-B. ANEXO II**), esto debido a una competencia de unión vía BCR. Por lo tanto la población doble positiva identificada cuando bloqueamos solamente los Fc $\gamma$ R mediante anti-CD32, anti-CD64 y anti-CD16, corresponde a las células B que captan mediante su BCR a la porción Fc de IgG (ver **Figura V-A. ANEXO II**).



**FIGURA V. ANEXOS-II. DOT-PLOTS. EN (A) SE MUESTRA CÉLULAS B CUYOS Fc $\gamma$ Rs FUERON BLOQUEADOS MEDIANTE EL ANTICUERPO ANTI-CD32. EN (B) LAS CÉLULAS B QUE PREVIAMENTE FUERON INCUBADAS CON FRAGMENTOS Fc de IgG.**

### ANEXO III. CULTIVO CELULAR.

#### ANEXO III-A.

Mediante espectrofotometría usando rezasurina al 10% (Alamar blue) se evaluó la proliferación en co-cultivo de las células no B, siendo esta utilizada como una evidencia indirecta de la función de la célula BCR-Fcγ específica como APC. Mediante la siguiente fórmula se identificó la actividad metabólica; representada por el porcentaje de reducción del medio cultivo.

$$\text{Percentage reduction of alamarBlue (equation 1)} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)} \times 100$$

Where: O1 = molar extinction coefficient (E) of oxidized alamarBlue (Blue) at 570nm  
 O2 = E of oxidized alamarBlue at 600nm  
 R1 = E of reduced alamarBlue (Red) at 570nm  
 R2 = E of reduced alamarBlue at 600nm  
 A1 = absorbance of test wells at 570nm  
 A2 = absorbance of test wells at 600nm  
 N1 = absorbance of negative control well (media plus alamarBlue but no cells) at 570nm  
 N2 = absorbance of negative control well (media plus alamarBlue but no cells) at 600nm

Con este procedimiento se cultivaron 100, 50 y 25 mil de células no B autólogas ; se determinó que no existe inhibición por contacto (ver figura V ANEXOS III-A).

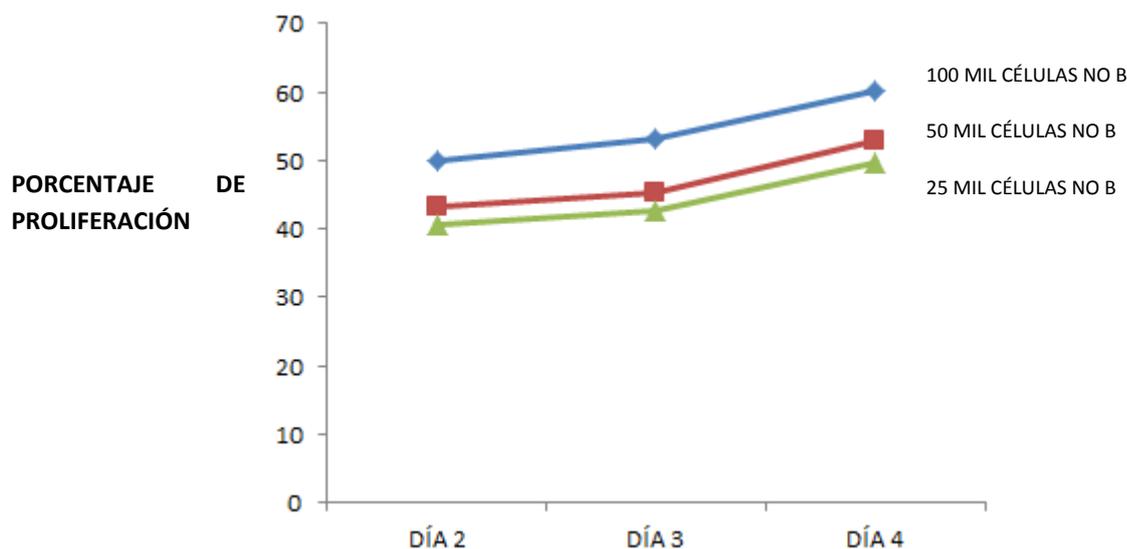
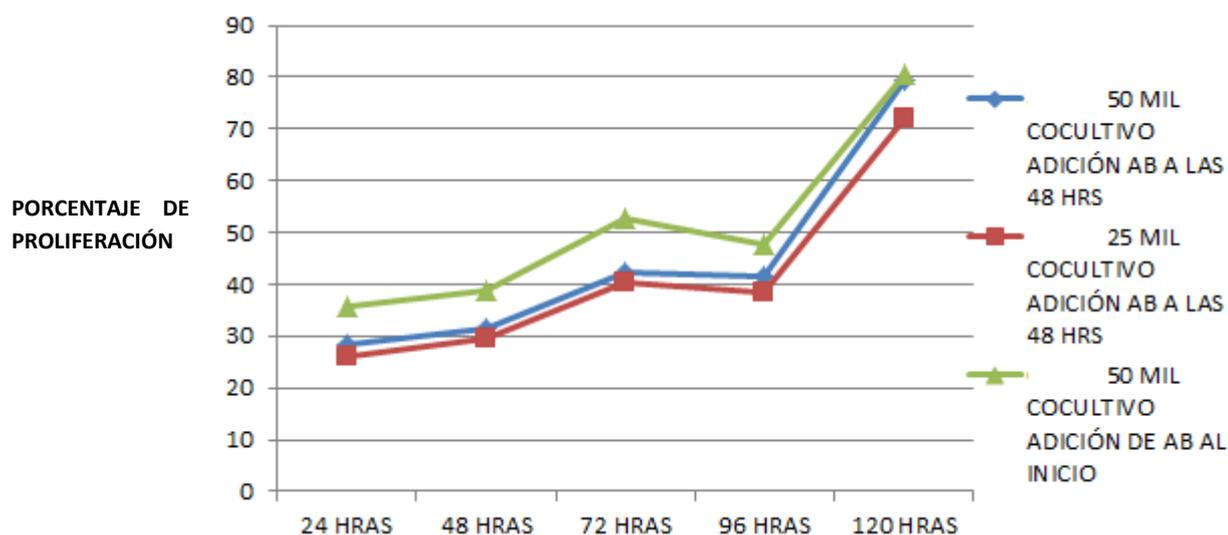


FIGURA V. ANEXOS III-A. PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE CÉLULAS NO B. SEMBRADAS CON 100, 50 Y 25 MIL CÉLULAS.

#### ANEXO III-B.

Decidimos adicionar el AB justo al inicio del co-cultivo, en la figura VI ANEXOS III-B de

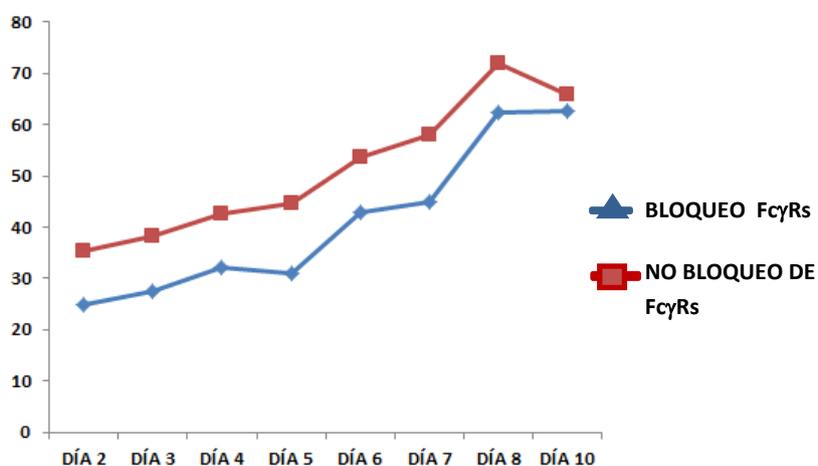
este apartado se observa que no hay diferencia alguna entre adicionar el AB 48 horas después de haber iniciado el ensayo de co-cultivo de células B y células no B.



**FIGURA VI. ANEXOS III-B. PORCENTAJE REDUCCIÓN (PROLIFERACIÓN) ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.**

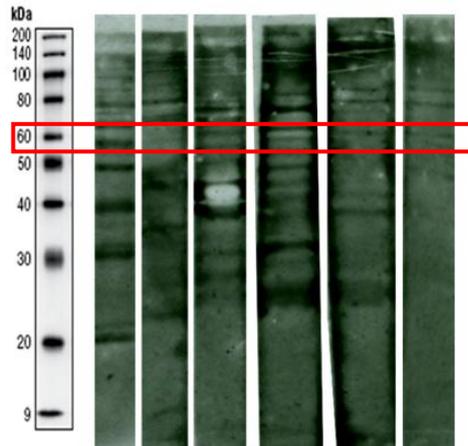
### ANEXO III-C.

La proliferación de las células no B entre las diferentes condiciones de cultivo se determinó por el porcentaje de reducción (ver figura VII ANEXOS III-C). Donde se observa que la actividad celular en la condición de captura de los complejos inmunes mediante el BCR es mayor respecto a la condición donde la captura de los complejos se realiza mediante el BCR y/o el FcγR.



**FIGURA VII. ANEXO III-C. PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NO B EN COCULTIVO BLOQUEANDO EL FcγR Y SIN BLOQUEAR EL FcγR.**

**EN UNA MUESTRA REPRESENTATIVA DE UN PACIENTE CON TB. EVALUACIÓN MEDIANTE EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN.**

**ANEXO IV. Western Blot.**

**FIGURA ANEXO IV. INMUNOBLOT. RECONOCIMIENTO DE ANTICUERPOS A PROTEÍNAS CON DIVERSOS PESOS MOLECULARES DEL ECM<sub>tb</sub>. EL CUADRO ROJO INDICA LAS BANDAS POSITIVAS CONSIDERANDO EL MARCADOR DE PESO DE REFERENCIA (60 KDA). LA PRIMER BANDA CORRESPONDE A UNA MEZCLA DE SUEROS, LAS ÚLTIMAS 5 BANDAS DE LADO IZQUIERDO CORRESPONDEN AL SUERO DE 5 PACIENTES CON TB.**