

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFECTO "IN VITRO" DE DIFERENTES DOSIS DE
Mycobacterium tuberculosis **EN LA EXPRESION DE IL-1**
DE MEMBRANA Y MOLECULAS HLA-DR
EN MACROFAGOS HUMANOS

POR

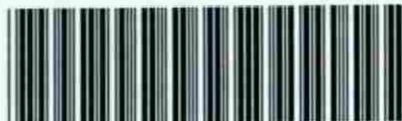
SERGIO DOMINGUEZ ARREVILLAGA

Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

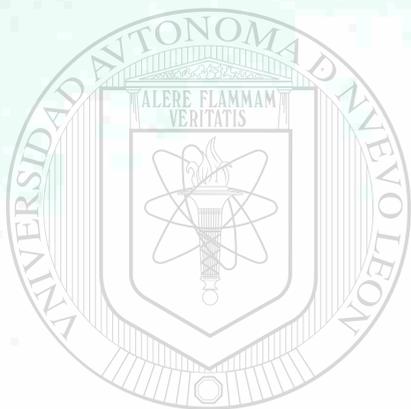
Monterrey, N. L.

Julio de 1996

TM
QR185
.8
M3
O6
C.1



1080077195



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



EFECTO "IN VITRO" DE DIFERENTES DOSIS DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LA EXPRESION DE IL-1 DE MEMBRANA Y MOLECULAS HLA-DR EN MACROFAGOS HUMANOS

Por

SERGIO DOMINGUEZ ARREVILLAGA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito para obtener el Grado de

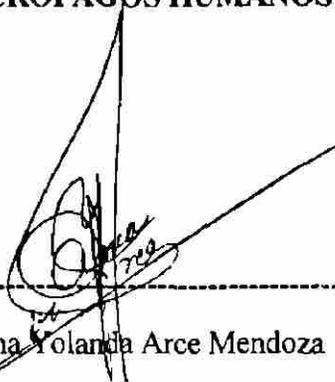
**MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

Monterrey, N.L.

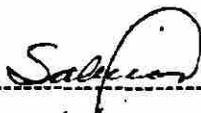
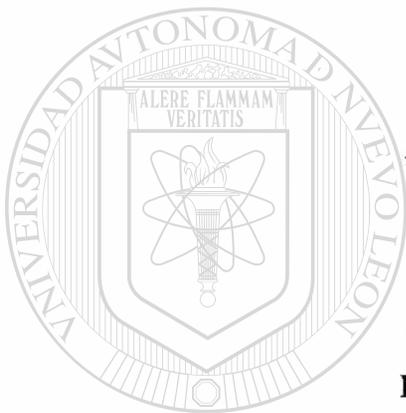
Julio de 1996

**EFFECTO "IN VITRO" DE DIFERENTES DOSIS DE *Mycobacterium tuberculosis*
EN LA EXPRESION DE IL-1 DE MEMBRANA Y MOLECULAS HLA-DR EN
MACROFAGOS HUMANOS**

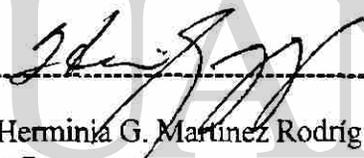
Aprobación de la tesis:



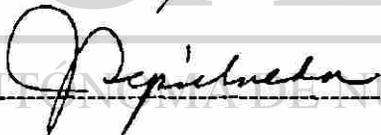
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Asesor de la tesis



Dr. Mario César Salinas Carmona



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez



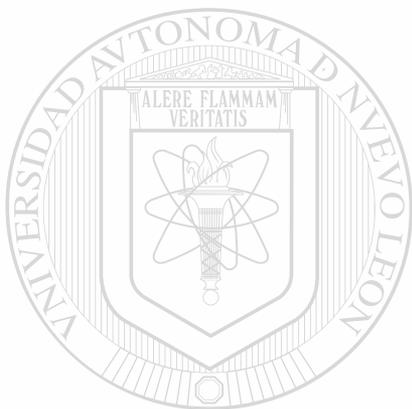
Ph.D Julio Sepúlveda Saavedra



Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla



Dra. Herminia G. Martínez
Secretaria académica del Area Básica
Subdirección de Estudios de Postgrado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

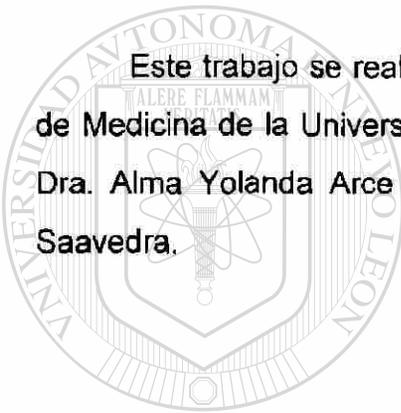
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



EFFECTO "IN VITRO" DE DIFERENTES DOSIS DE *Mycobacterium tuberculosis*
EN LA EXPRESION DE IL-1 DE MEMBRANA Y MOLECULAS HLA-DR EN
MACROFAGOS HUMANOS

Presentado por: Q. F. B. Sergio Domínguez Arrevillaga

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y la coasesoría del Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra.

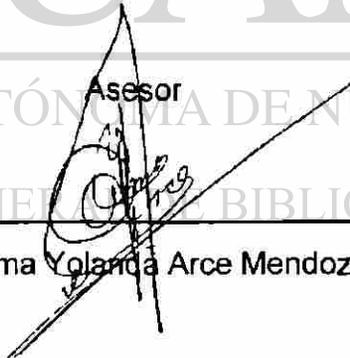


UANL

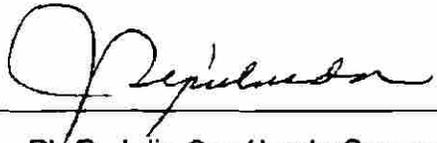
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Asesor


Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza

Coasesor


Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra

DEDICATORIA

.....La culminación de una meta es únicamente un paso apoyado conjuntamente por varias personas para el desarrollo de nuestra formación, la cual no sería posible sin la gracia de Dios

A Dios, por darme la oportunidad de vivir, por estar siempre conmigo, por caminar a mi lado , por bendecirme y ahora por darme la felicidad de ser papá.

A mi tía Rosita que se encuentra al lado de Dios, por sus lindos consejos, por motivarme siempre a estudiar y seguir adelante, y ahora sus recuerdos siempre me servirán de motivo de superación.

A mi abuelita Rosy por su gran ejemplo de lucha y trabajo, por acostumbrarme al esfuerzo y a alcanzar lo que se desea cuando se hace con dedicación.

A mi esposa y a nuestro bebé por ser mi felicidad , compañía y motivo de superación, por ser los que siempre están conmigo en las buenas y en las malas y porque los amo mucho.

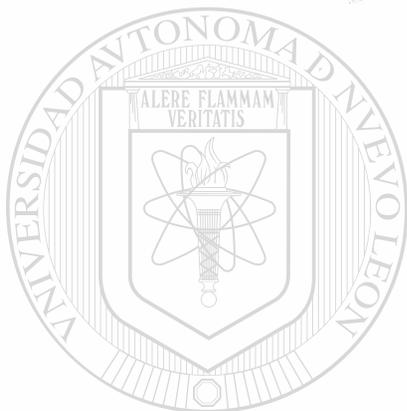
A mis padres, Sr. Ricardo Domínguez Roque y Sra. Concepción Arrebillaga de Domínguez, de quienes estoy muy orgulloso, por todos los sacrificios que hicieron para poder darme educación y salud, por todos sus consejos que me han servido de mucho y porque simplemente sin ellos no hubiera culminado mis metas. Gracias por su amor y cariño, me siento muy feliz de ser su hijo.

A mis hermanos, Flor, Nohemí, Ricardo, Patricia , Julio y Carlos, con quienes he compartido mi vida y la felicidad de nuestra familia, por su comprensión y respeto a lo que he decidido realizar durante el desarrollo de mi formación.

A mis suegros, Sr. Elfido de Jesús Espinoza Molina y Sra. Gloria Ruíz de Espinoza, por ser parte de mi familia, por sus consejos y cariño, por ser los padres de la mujer que amo y ahora por ser los abuelos de nuestro bebé.

A las familias, Aguila Espinoza, Sotelo Espinoza , Félix Espinoza y Espinoza Albores , por su apoyo incondicional, por sus consejos y por el cariño que reflejan hacia mi esposa y a mí.

A todos mis sobrinos con cariño, quienes nos han dado la felicidad en nuestras familias, para que algún día les sirva de motivo de superación y aprendan que cuando se lucha con dedicación se pueden lograr las metas deseadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza

Por su valiosa asesoría sin la cual no hubiera alcanzado esta meta.

A MI MAESTRO

Dr. Mario César Salinas Carmona

Jefe del Departamento de Inmunología

Por sus consejos y conocimientos, importantes para la realización de la tesis.

A MI COASESOR

Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra

Jefe del Departamento de Histología

Por sus consejos y participación en la coasesoría del trabajo.

Al Ing. M.C. Pedro René Bodegas Valera

Rector de la Universidad Autónoma de Chiapas

Por su valioso apoyo para la culminación de la tesis y obtención del grado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al Ing. Ramón Guajardo Quiroga

Ex-secretario Académico de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Por su tiempo y apoyo incondicional.

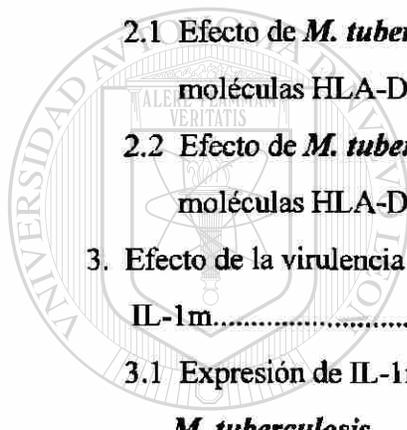
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

**Por la beca otorgada para la realización y obtención del grado de Maestría en
Ciencias.**

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.	3
III. HIPOTESIS.....	13
IV. OBJETIVO GENERAL.....	14
1. Objetivos específicos.....	15
V. MATERIAL Y METODOS.....	16
1. Obtención de la masa bacteriana de <i>M. tuberculosis</i>	16
1.1 Cepa de <i>M. tuberculosis</i>	16
1.2 Cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	16
1.3 Cuenta de bacilos y estandarización de las dosis.....	17
2. Obtención de células mononucleares humanas.....	18
2.1 Separación de células mononucleares de sangre venosa periférica de sujetos sanos.....	18
3. Determinación de la expresión de IL-1 alfa (IL-1 α) y moléculas HLA-DR por citometria de flujo.....	18
4. Determinación inmunocitoquímica de la presencia de IL-1 alfa y moléculas HLA-DR.....	20
4.1 Determinación del porcentaje de monocitos positivos para IL-1 alfa y HLA-DR.....	20

VI. RESULTADOS.....	22
1. <i>Expresión de IL-1 alfa (IL-1m)</i>	23
1.1 Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra sobre la expresión de IL-1m.....	23
1.2 Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv sobre la expresión de IL-1m.....	24
2. Expresión de moléculas HLA-DR.....	26
2.1 Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra sobre la expresión de moléculas HLA-DR.....	26
2.2 Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv sobre la expresión de moléculas HLA-DR.....	27
3. Efecto de la virulencia de <i>M. tuberculosis</i> en la expresión de IL-1m.....	28
3.1 Expresión de IL-1m relacionada con la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	28
<hr/>	
4. Efecto de la virulencia de <i>M. tuberculosis</i> en la expresión de moléculas HLA-DR.....	30
4.1 Comparación de la expresión de moléculas HLA-DR relacionada con la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	30
5. Porcentaje de monocitos HLA-DR e IL-1 alfa positivos.....	31
5.1 Efecto de <i>M. tuberculosis</i> en el porcentaje de monocitos IL-1 alfa positivos.....	33
5.2 Efecto de <i>M. tuberculosis</i> en el porcentaje de monocitos HLA-DR positivos.....	34



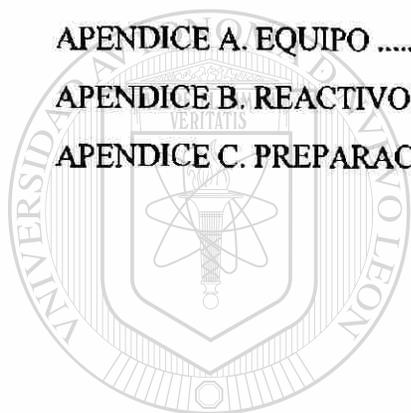
U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VII. DISCUSION.....	36
VIII. CONCLUSIONES.....	45
IX. BIBLIOGRAFIA.....	46
X. APENDICES.....	55
APENDICE A. EQUIPO	55
APENDICE B. REACTIVOS QUIMICOS.....	56
APENDICE C. PREPARACION DE REACTIVOS.....	58



UANL

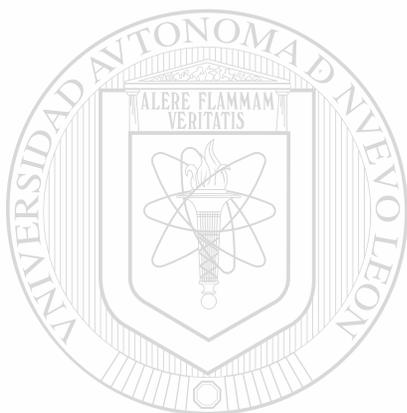
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Porcentaje de macrófagos IL-1 alfa y HLA-DR positivos determinado por inmunofluorescencia.....	32



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra sobre la expresión de IL-1m.....	24
2. Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv sobre la expresión de IL-1m.....	25
3. Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra sobre la expresión de moléculas HLA-DR.....	26
4. Efecto de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv sobre la expresión de moléculas HLA-DR.....	27
5. Expresión de IL-1m relacionada con la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	29
6. Comparación de la expresión de moléculas HLA-DR relacionada con la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	30
7. Efecto de <i>M. tuberculosis</i> en el porcentaje de monocitos IL-1 alfa positivos.....	33
8. Efecto de <i>M. tuberculosis</i> en el porcentaje de monocitos HLA-DR positivos.....	35

I. RESUMEN

La protección contra *M. tuberculosis* se lleva a cabo por la activación de los macrófagos infectados, lo cual es el resultado de la acción de las linfocinas liberadas por los linfocitos T cooperadores CD4+. Para que se monte una respuesta inmune específica contra el bacilo es necesaria la activación del linfocito T CD4+ y ésta requiere al menos dos señales. Una señal es dada por la unión del receptor del linfocito T con el complejo antígeno-molécula clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de la célula presentadora de antígeno. La segunda señal proviene de la interleucina 1 (alfa o beta) producida por la misma célula presentadora del antígeno. Este evento conduce a la expansión clonal bajo la influencia de interleucina 2 (Unanue, 1984).

Recientemente se ha propuesto que las micobacterias pueden evadir a la respuesta inmune modulando la expresión de las moléculas clase II del CMH sobre las células presentadoras de antígeno, y se han dado a conocer datos que muestran que la infección "in vitro" de macrófagos murinos con *M. microti* viva causa una reducción en la expresión de las moléculas Ia del CMH del ratón. De la misma manera pero utilizando *M. kansasii* y macrófagos peritoneales de ratón, se demostró también una disminución en el porcentaje de células que expresaban moléculas Ia. Además de que esta disminución de las moléculas era mas evidente cuando los macrófagos contenían un gran número de bacilos.

Se ha considerado que la IL-1 alfa asociada a la membrana celular está más involucrada con la respuesta inmune adquirida, mientras que la IL-1 beta que está presente en el citoplasma y es secretada bajo estimulación, está más relacionada con la resistencia natural. El objetivo de este trabajo fue el de determinar si existían cambios en la expresión de las moléculas HLA-DR e IL-1 alfa en la membrana de los macrófagos estimulados con diferentes dosis de *M. tuberculosis* H37Ra avirulenta y H37Rv virulenta.

La expresión de ambas moléculas se determinó mediante citometría de flujo y por inmunofluorescencia directa e indirecta. Cuando estimulamos con *M. tuberculosis* H37Ra obtuvimos un aumento en la expresión de ambas moléculas proporcional a la dosis de bacterias. Con la cepa H37Rv hubo una disminución significativa en la expresión de las moléculas HLA-DR, con la dosis más alta, mientras que la expresión de la IL-1 alfa no sufrió cambio en su expresión, lo que también pudiera interpretarse como una inhibición de su producción o síntesis. Con estos resultados podemos decir que se demostró lo planteado en la hipótesis, debido a que sí se presentó una disminución en la expresión de ambas moléculas en los macrófagos estimulados "in vitro" con *M. tuberculosis*, y este efecto fue dependiente de la dosis y virulencia de esta micobacteria.

Concluimos que una sobreinfección de los macrófagos al producir una disminución de la expresión de moléculas clase II (HLA-DR), y una posible supresión de la síntesis o expresión de IL-1m pudiera explicar en parte la falta de respuesta inmune celular en pacientes con tuberculosis crónica, resistente al tratamiento o en pacientes con tuberculosis diseminada.

II. INTRODUCCION

Las infecciones bacterianas en el hombre ilustran los mecanismos que intervienen en la relación huésped-parásito, y el resultado depende de la dotación genética del huésped y de la capacidad genética de la bacteria. En general se acepta que las bacterias poseen un grado extremo de variabilidad y tienen gran potencial de adaptación mediante mecanismos como mutación, alteraciones metabólicas provocadas por un cambio ambiental, lisogenización con bacteriófagos, producción de toxinas, y capacidad de supervivencia prolongada (esporulación). Estas respuestas complejas del patógeno bacteriano se encuentran con respuestas igualmente complejas y diversas del proceso inmunitario en el hombre.

La relación huésped-parásito es la interacción entre los factores que controlan la virulencia de un microorganismo y la respuesta inmune del huésped que ha de responder en forma rápida y eficaz para conservar el equilibrio inmunológico (homeostasis). Los factores que influyen en la relación huésped-parásito incluyen edad, predisposición genética, nutrición, estados metabólico y psicológico del huésped, así como el ambiente en el cual tiene lugar la relación.

El papel de los fagocitos mononucleares en la infección por bacterias intracelulares es doblemente importante porque son tanto el hábitat esencial para la supervivencia bacteriana, como también parte de las principales células efectoras de defensa.

Los microorganismos intracelulares tienden a utilizar principalmente al macrófago para poder multiplicarse. En 1952 Suter (1) utilizando bacilos de *M. tuberculosis* demostró

la participación directa de las células mononucleares en este tipo de infecciones. Posteriormente en 1962 Mackaness (2) demostró que los macrófagos de rata infectados con *listerias*, *brucelas* y *micobacterias*, eran capaces de destruir a estas bacterias intracelulares facultativas, y que además la infección previa en esas ratas con dosis altas de bacilos de *M. tuberculosis* las hacía resistentes a infecciones posteriores. Dannenberg (3) trabajando con *L. monocitogenes* y *S. typhimurium* postuló que los macrófagos pueden activarse o morir en una lesión infecciosa activa, y que esta activación o muerte depende del número de microorganismos infectantes y del estado previo de activación de los macrófagos.

Los fagocitos mononucleares son extremadamente heterogéneos con respecto a su capacidad antibacteriana, dependiendo de su localización en el tejido y del grado de activación por estímulos endógenos. Las principales funciones efectoras de los fagocitos mononucleares incluyen: la generación de intermediarios reactivos de oxígeno, producción de intermediarios reactivos de nitrógeno, acidificación del fagosoma y la fusión lisosoma-

fagosoma. La mayoría de estos mecanismos son inducidos por una activación apropiada, atribuida principalmente a la estimulación con interferón gamma. ®

La capacidad de replicarse dentro de la célula huésped es una de las características patológicas de las bacterias intracelulares. Se han descrito diferentes mecanismos por medio de los cuales estos microorganismos pueden permanecer intracelularmente: por evasión del compartimiento citoplásmico, interferencia con los intermediarios reactivos de oxígeno, inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, neutralización del pH fagosomal, resistencia a las enzimas lisosomales y la inducción de proteínas de choque térmico (4).

Uno de los microorganismos intracelulares que ha causado infecciones crónicas en el humano desde hace mucho tiempo es *M. tuberculosis* (bacilo de Koch), que se localiza principalmente en los pulmones y se identifica por la presencia de tubérculos y necrosis caseosa. También *M.bovis* es capaz de producir tuberculosis en el humano, aunque cada vez con menos frecuencia.

La tuberculosis aún representa un serio problema a nivel mundial en especial en países en vías de desarrollo. En años recientes, la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana ha incrementado el número de casos de tuberculosis especialmente en los países desarrollados. Anualmente en México se detectan unos 20,000 casos nuevos de tuberculosis, 95% pulmonar, y es causa de alrededor de 6,000 defunciones, aunque hay evidencias que estas cifras pueden estar por debajo del número real (5).

La tuberculosis es capaz de afectar a cualquier órgano de la economía en forma crónica y progresiva, por lo que su cuadro clínico está en relación con el órgano o sistema que ataque. La forma más frecuente, como se mencionó anteriormente, es la forma pulmonar, que en la mayoría de las veces provoca un cuadro crónico caracterizado por tos, expectoración, fiebre y ataque al estado general. Su diagnóstico presuntivo se establece tomando en cuenta la sintomatología y la evidencia de los bacilos ácido-alcohol resistentes en el producto clínico, y en forma definitiva si se logra aislar a *M.tuberculosis*. (6).

M.tuberculosis pertenece a la familia Mycobacteriaceae del orden Actinomycetales. Debido a su gran contenido en lípidos es ácido-alcohol resistente y al ser teñidos por la técnica de Ziehl Neelsen (fucsina básica con fenol y aplicación de calor) o de Kinyoun (el

mismo colorante en frío), retienen fuertemente al colorante y no se decoloran cuando la preparación se lava con alcohol-ácido. Así, los bacilos se tiñen de color púrpura y se ven fácilmente en el microscopio como bacilos alargados, ligeramente curvos, de 0.2-0.6 μm de ancho y 1-4 μm de largo (7,8). Es aerobio estricto, no esporulado, inmóvil y es un parásito obligado. En medios de cultivo sintéticos su crecimiento es lento, con un tiempo de generación de 15 a 20 horas. Sus colonias en medio sólido son rugosas, usualmente en cordones o bandas serpentinales. Se le puede aislar con relativa facilidad en cultivos de 3 a 6 semanas en medios sólidos con huevo (Lowenstein-Jensen, Petragiani), los cuales contienen inhibidores del crecimiento de otras bacterias que pudieran acompañar al inóculo. Para distinguir *M.tuberculosis* de otras micobacterias se toma en cuenta su crecimiento lento y que no tenga pigmento, que produzca niacina, reduzca nitratos, que tenga catalasa, que sea termolábil y sea sensible a la isoniazida (9,10).

Estructuralmente, *M.tuberculosis* está cubierto por una gruesa pared, la cual tiene una organización similar a la de otros actinomicetos y a la de las bacterias corineformes, y corresponde al tipo IV, con grandes cantidades de ácido meso-diaminopimélico[®] y arabinogalactana (9). Los componentes de esta pared son responsables de la resistencia bacteriana a la desecación, de su afinidad tintorial, de sus efectos tóxicos, de su capacidad adyuvante, y de la inducción de respuestas protectoras y de hipersensibilidad (10).

Desde el punto de vista antigénico, la molécula no proteínica inmunodominante en las respuestas humorales es el disacárido arabinogalactana (11). Se encuentra unida covalentemente, tanto al peptidoglicano como a los ácidos micólicos ramificados de peso

molecular alto, cuyo conjunto forma un complejo macromolecular que comprende el 35% de la masa molecular de la micobacteria (10). A este complejo se le asocian en forma no covalente el factor cuerda (dimicoliltrehalosa), varios sulfátidos, glicopeptidolípidos (GPL), lipooligosacáridos (LOS) y glicolípidos fenólicos (GLP). Otro complejo antigénicamente importante de la pared celular está constituido por la lipoarabinomanana (LAM) que está fuertemente acilada, contiene fosfoinositol y fosfatidilinositol y parece estar asociada a la membrana (12).

En la tuberculosis, similarmente a lo que ocurre en otras infecciones por microorganismos intracelulares, la protección inmunológica depende fundamentalmente de la respuesta mediada por linfocitos T (13). En los órganos linfoides la mayor parte de los linfocitos específicos para *M.tuberculosis* son alfa-beta, en tanto que en las mucosas son los linfocitos gamma-delta (14), aunque el papel de estos últimos aún no está bien definido.

La protección contra *M.tuberculosis* se lleva principalmente a cabo por medio de la activación de macrófagos infectados, lo cual es el resultado de la acción de las linfocinas secretadas por linfocitos T cooperadores (T_H) (15). Para que se monte una respuesta inmune específica contra el bacilo es necesario la activación del linfocito T CD4 y requiere al menos dos señales. Una señal es provista por la unión del receptor de la célula T con el complejo antígeno-molécula clase II de la célula presentadora de antígeno y la segunda señal proviene de la interleucina 1 (IL-1 alfa o beta), producida por la misma célula presentadora de antígeno. Este evento conduce a la expansión clonal bajo la influencia de interleucina 2 (16).

Considerando los mecanismos iniciales o tempranos de la respuesta inmune específica, está bien establecido que es necesaria la compatibilidad entre el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de la célula presentadora de antígeno (CPA) y la célula T (17-20). En un cultivo mixto de leucocitos, la proliferación de las células T respondedoras, no ocurre sin la presencia de células estimuladoras que expresan las moléculas clase II del CMH. La expresión de los antígenos clase II del CMH pueden ser inducidos o aumentados por linfocinas secretadas por células T activadas (21,22), como con el interferón gamma obtenido por recombinante (25,26). Las moléculas clase II, HLA-DR, -DP Y DQ del CMH son heterodímeros que consisten de dos cadenas de glucoproteína, una alfa (PM 34 kDa) y una beta (PM 29 kDa) en asociación no covalente. Las cadenas alfa y beta, están compuestas de 229 y 237 aminoácidos respectivamente, consisten cada cadena de tres regiones, una región extracelular hidrofílica, una región transmembranal hidrofóbica, y una región intracelular hidrofílica. La región hidrofílica de la cadena alfa contiene dos dominios denominados alfa 1 y alfa 2. La región extracelular hidrofílica de la cadena beta también contiene dos dominios denominados respectivamente beta 1 y beta 2. Los dominios alfa 2 y beta 2 muestran homología importante con los dominios de las regiones constantes de la inmunoglobulina. Las moléculas clase II tienen distribución celular limitada. Se encuentran principalmente sobre las células inmunocompetentes, linfocitos B, células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas) y, en humanos, en células T activadas. El complejo genético HLA del CMH ocupa un segmento de cerca de 3,500 kilobases en el brazo corto del cromosoma 6 (27,28).

De la misma manera como se ha considerado de gran importancia la expresión de las moléculas clase II en las células presentadoras de antígeno para la activación de la célula T cooperadora (T CD4); la Interleucina 1 (IL-1) es indispensable también para que se monte una respuesta inmune específica. Esta monocina producida y liberada por los macrófagos estimulados con antígenos, parásitos u otras moléculas inductoras, juegan un papel importante en los fenómenos de resistencia natural y en los mecanismos inductores de la respuesta inmunológica (29). Se han descrito dos genes que codifican para IL-1, los cuales codifican para dos distintos péptidos, IL-1 alfa y para IL-1 beta (30,31). Estas dos moléculas son diferentes en su estructura primaria pero aparentemente poseen afinidad por el mismo receptor y actividades biológicas iguales (32,33). Entre esas actividades se incluyen la estimulación de la célula T y síntesis de IL-2, proliferación de células B, producción de inmunoglobulinas, síntesis de colagenasa por células sinoviales, proliferación de fibroblastos, síntesis de proteínas de fase aguda y respuestas febriles entre otras (34,29)

La relación entre fagocitosis y presentación de antígeno representa un balance requerido para la inducción de una reacción inmune apropiada. La estimulación de monocitos con zimosán produce una reducción en la expresión de antígenos clase II del CMH y una pérdida en la capacidad presentadora de antígeno (35). Los antígenos Clase II del CMH (HLA-DR en el humano e Ia en el sistema murino), son importantes en la generación de la respuesta inmune celular contra muchos antígenos incluyendo a micobacterias (36-38). Recientemente se ha propuesto que las micobacterias pueden evadir la respuesta inmune modulando la expresión de las moléculas clase II del CMH sobre las

células presentadoras de antígeno (39,40). Kaye, Sims, y Feldmann (41) han dado a conocer datos que muestran que la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón con bacilos de *M. microti* viva causa una reducción de antígenos Ia. De la misma manera pero utilizando, *M. kansasii* para la infección in vitro de macrófagos peritoneales de ratón se demostró una disminución en el porcentaje de células que expresan los antígenos Ia (42). En este mismo estudio reportaron que cuando los macrófagos contenían un gran número de bacilos, la expresión de antígenos Ia era más afectada. En el laboratorio de Inmunoinfectología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, Arce, Cadena y Cols. reportaron que el bacilo de Calmette y Guérin (BCG) y una cepa de bacterias de *M. tuberculosis* aislada de un paciente con tuberculosis pulmonar, (8-10 bacterias/célula) fueron capaces de incrementar la expresión de la molécula HLA-DR en macrófagos humanos estimulados "in vitro".

Se ha considerado en base a lo reportado que el macrófago es uno de los participantes principales en la defensa inmunológica en contra de *M. tuberculosis* y que las citocinas que estos producen juegan un papel importante en la manifestación y eventos patológicos de la tuberculosis, especialmente en la formación de granulomas y síntomas sistémicos. Entre las más importantes dentro del sistema inmune se encuentra la interleucina 1. Su relación e importancia en las enfermedades infecciosas por microorganismos intracelulares está empezando a ser estudiada. IL-1 beta parece ser una citocina importante en la respuesta del huésped contra *M. tuberculosis*, ya que grandes cantidades son liberadas in vitro después de la estimulación de fagocitos mononucleares.

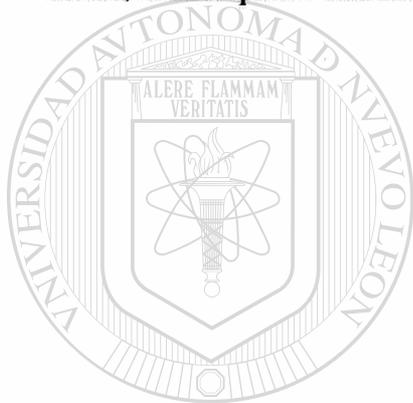
En estudios recientes efectuados en el Departamento de Inmunología se ha demostrado que los componentes de la pared celular de las micobacterias como el lipoarabinomannan (LAM) y los glicolípidos fenólicos (GLP-1) son potentes inductores de la expresión genética de interleucina 1 beta en monocitos humanos, y que se presentaba un efecto dosis - respuesta, tanto con estos inductores como con las bacterias completas de *M. tuberculosis* y *M. leprae* (43).

En 1985 Kurt-Jones y colaboradores (44) publicaron la presencia de moléculas de interleucina 1 asociada a la membrana de macrófagos murinos con capacidad de estimular también la proliferación de los linfocitos T y timocitos, la cual denominaron IL-1 alfa de membrana (IL-1m) Un año después, Weaver y Unanue (16) publicaron que su expresión estaba relacionada con la inducción antigénica específica y con la presencia de factores solubles derivados de linfocitos T.

En 1987 Conlon y colaboradores (45), observaron la superficie teñida de monocitos humanos al utilizar anticuerpos monoclonales contra la IL-1 alfa, lo cual no se observó cuando agregaron anticuerpos dirigidos contra IL-1 beta. Posteriormente reportaron también que al utilizar anticuerpos policlonales purificados contra la proteína IL-1 alfa, los efectos de activación de la proliferación de linfocitos podían ser inhibidos; mientras que no se presentó actividad inhibitoria al utilizar anticuerpos específicos contra la proteína IL-1 beta.

En este trabajo se planteó la hipótesis de que la IL-1 alfa (IL1m) está particularmente involucrada con la respuesta inmune adquirida, mientras que la IL-1 beta (IL-1s) está presente en el citoplasma, es secretada bajo estimulación y está más relacionada con la resistencia natural.

En base a los estudios recientes en los que se sugiere que las micobacterias pueden modular la expresión de moléculas importantes en la membrana de macrófagos , y considerando su influencia directa sobre la inducción de la respuesta inmune antimicobacteriana, consideramos importante el realizar un estudio “in vitro” de la influencia de *M. tuberculosis* virulenta sobre la expresión de interleucina 1 de membrana (IL-1m) y Moléculas Clase II (HLA-DR), en macrófagos provenientes de humanos sanos , lo que pudiera explicar en parte la falta de respuesta inmune celular en pacientes con tuberculosis miliar; evento que no ocurriría con una micobacteria avirulenta.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

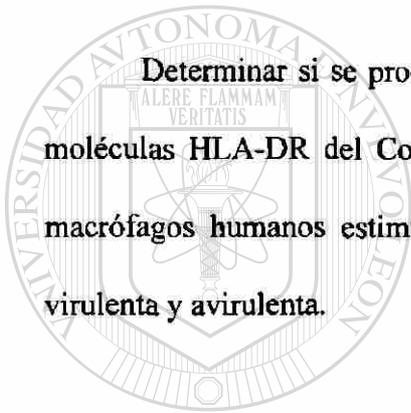
III. HIPOTESIS.

Se produce una disminución de la expresión de las moléculas de membrana IL-1 alfa (IL-1 α) y HLA-DR del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de los macrófagos humanos estimulados “in vitro” con *M. tuberculosis* y además este efecto, es dependiente de la dosis y virulencia del microorganismo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV.OBJETIVO GENERAL

Determinar si se producen cambios significativos en la expresión de IL-1 alfa y moléculas HLA-DR del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en la membrana de macrófagos humanos estimulados “in vitro” con diferentes dosis de *M. tuberculosis* virulenta y avirulenta.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Obtener la suspensión bacteriana de *M. tuberculosis* virulenta y avirulenta y estandarizar las diferentes dosis experimentales.

2.- Determinar la expresión de moléculas IL-1 alfa en la membrana de macrófagos humanos estimulados y no estimulados "in vitro" con 2×10^6 , 2×10^7 y 1×10^8 bacterias de *M. tuberculosis* virulenta y avirulenta utilizando la citometría de flujo.

3.- Estudiar la expresión de moléculas HLA-DR en la membrana de macrófagos humanos estimulados y no estimulados "in vitro" con 2×10^6 , 2×10^7 y 1×10^8 bacterias de *M. tuberculosis* virulenta y avirulenta, aplicando la citometría de flujo. ®

4.- Identificar el porcentaje de macrófagos estimulados y no estimulados que expresan las moléculas de IL-1 alfa y HLA-DR mediante Microscopía de Fluorescencia.

V. MATERIAL Y METODOS

1. OBTENCION DE LA MASA BACTERIANA DE *M. tuberculosis*.

1.1. Cepa de *M. tuberculosis*.

La cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv viva utilizada en este trabajo fue donada por el Dr. Oscar Rojas Espinosa del Departamento de Inmunología de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. La cepa avirulenta de *M. tuberculosis* H37Ra que son bacterias muertas fueron obtenidas de fuentes comerciales (Difco, Mich. USA).

1.2. Cultivo de *M. tuberculosis*.

Para obtener la masa bacteriana de *M. tuberculosis* de la cepa virulenta H37Rv se sembró primero en medio sólido de Lowenstein-Jensen durante 4 semanas a 37°C, y luego para su propagación se cultivó en matraces de 1 litro y se utilizó medio líquido de Proskauer-Beck modificado por Youmans (PBY) y el cultivo se realizó también durante otras 4 semanas a 37°C (46, 47).

1.3. Cuenta de bacilos y estandarización de las dosis experimentales.

Las bacterias de la cepa H37Rv fueron muertas por calor en autoclave a 15 lbs/pulg² durante 30 minutos a 121 °C, posteriormente se pasó el cultivo a través de papel filtro y así obtuvimos la masa bacteriana la cual se dejó secar a temperatura ambiente, se tomaron 6 gr y se prepararon 10 ml de suspensión celular en medio de cultivo conteniendo 5% de Tween 80. Para obtener una mejor disgregación bacteriana se utilizaron frascos con tapas herméticas para volumen de 5 ml , a los cuales se le colocaron perlas de vidrio y se mezcló la suspensión en un mezclador vortex durante 2 minutos . Para verificar la disgregación completa de la suspensión se prepararon diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 en solución salina y se tomó 1 µl de cada dilución con pipetas automáticas para después realizar la cuenta de bacilos en una área marcada de un portaobjetos, utilizando para la observación la tinción de Ziehl-Neelsen y considerando en la cuenta final el factor de dilución y el volumen total de la suspensión, a partir de la cual se tomó el volumen correspondiente para cada una de las dosis bacterianas experimentales en el grupo de estudio correspondiente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para el caso de la cepa H37Ra se realizó la cuenta de bacilos directamente de la preparación comercial (48).

2. OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

2.1. Separación de células mononucleares de sangre venosa periférica de sujetos sanos.

Por punción venosa se obtuvieron 30 ml. de sangre venosa periférica con 100 unidades de heparina los cuales se diluyeron con 30 ml de solución Hank's. Después se colocaron sin mezclarse 10 ml de la sangre diluída sobre 4 ml de Ficoll Hypaque (densidad 1.077). Después de centrifugar a 1,300 rpm/30 minutos se removió la monocapa de células mononucleares y se lavaron 3 veces (1,300 rpm/10 min.) con amortiguador salina fosfatos (PBS). Las células se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina 200mM, 5% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y la población celular se ajustó a 1×10^6 células/ml.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3. DETERMINACION DE LA EXPRESION DE IL-1 ALFA (IL-1 α) Y MOLECULAS HLA-DR POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Se trabajó con 4 grupos, por duplicado y todos los cultivos se hicieron en tubos de poliestireno Beckton Dickinson a los cuales se agregó 1 ml de suspensión celular: el primer grupo contenía únicamente la suspensión de células mononucleares en RPMI 1640, los otros tres grupos contenían además de la suspensión de mononucleares (1×10^6 cel/ml) las diferentes dosis de *M. tuberculosis* 2×10^6 , 2×10^7 y 1×10^8 bacterias (H37Ra o H37Rv) respectivamente. Los grupos fueron tratados en las mismas condiciones: Se incubaron

durante 48 hr a 37°C y 5%CO₂, pasado este tiempo se realizó un lavado con medio de cultivo y se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos para eliminar la mayor parte de bacilos de la suspensión y luego se agregaron 10 µl (1 µg) de anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-IL-1 alfa a cada uno de los tubos correspondientes de cada grupo, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se lavó 2 veces con PBS, luego agregamos 10 µl (5 µg) del anticuerpo antigamaglobulinas de conejo marcado con fluoresceína. En otra serie de tubos se agregó 10 µl (2 µg) de anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR marcado con isotiocianato de fluoresceína y todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasado este tiempo se hicieron 2 lavados con amortiguador salina fosfatos pH 7.2 para eliminar el exceso de anticuerpo y la suspensión celular se resuspendió finalmente en 1 ml de este mismo diluyente. La medición de la expresión de ambas moléculas en cada uno de los grupos se hizo por separado mediante

citometría utilizando un citómetro de flujo marca Beckton Dickinson modelo FACSort (49,50) para lo cual se utilizó el software Lysis II. Se ajustó el equipo con microesferas calibradoras (CaliBRITE Beads) de 5-6 µm de diámetro marcadas y no marcadas con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) con un flujo de paso de 1000 cel/seg. Así también se ajustaron los 3 detectores utilizados, el que detectó el ángulo de dispersión del rayo laser en base al eje de incidencia y que determinó el tamaño relativo celular (Forwar scatter-FSC), el detector que midió el ángulo mayor de dispersión de luz, específico de granularidad relativa celular (Side-scatter- SSC) y por último se ajustó el detector de la fluorescencia emitida (FL1) por el isotiocianato de fluoresceína presente en la microesferas marcadas. Se midió

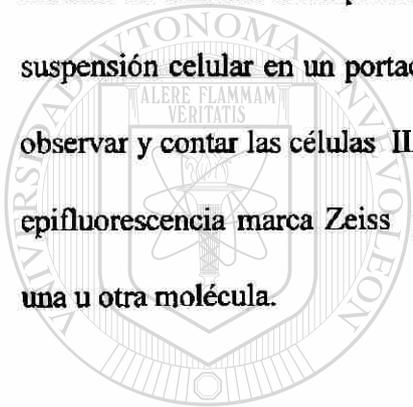
primeramente el control de autofluorescencia correspondiente al tubo que contenía 1 ml de suspensión celular (1×10^6 cel/ml) en PBS, al cuál no se le agregó el anticuerpo marcado con fluoresceína. Enseguida se colocó en el aparato el tubo que contenía el control de tinción inespecífica o tinción negativa, en este caso se utilizó inmunoglobulina inespecífica de ratón marcada con FITC del mismo isotipo al del anticuerpo monoclonal específico utilizado para determinar la expresión de las moléculas HLA-DR o IL-1 alfa. Una vez ajustado el aparato se colocó cada una de las muestras de los grupos problema y los resultados se obtuvieron mediante la impresión de gráficas conteniendo los valores y análisis estadístico de las medias relativas de intensidad de fluorescencia.

4. TECNICA INMUNOCITOQUIMICA.

4.1. Determinación del porcentaje de monocitos positivos para IL-1 alfa y HLA-DR

La determinación del porcentaje de monocitos que expresan las moléculas IL-1 alfa y HLA-DR de los diferentes grupos se hizo de manera similar a la metodología anterior, se trabajó con los cuatro grupos uno de los cuales se consideró como control negativo correspondiente al cultivo de las células mononucleares con RPMI 1640, mientras que en los otros grupos 1 ml (1×10^6 cel/ml) de la suspensión celular se incubó con 1×10^8 bacterias de *M. tuberculosis* (H37Ra o H37Rv) respectivamente, debido a que fué la dosis que nos dió resultados más significativos al hacer la determinación por citometría de flujo. Todos los cultivos se incubaron por 48 hr a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se hicieron 2 lavados con PBS pH 7.2 y se centrifugaron los tubos a 1200 rpm durante 3 minutos para

eliminar los bacilos que se encontraron en el sobrenadante y luego se colocaron 10 μ l (5 μ g) del anticuerpo policlonal anti- IL-1 alfa a una serie de tubos conteniendo 1 ml de suspensión celular y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, lavamos 2 veces con PBS y luego agregamos 10 μ l (5 μ g) del anticuerpo antigamas de conejo marcado con fluoresceína. Por otro lado, en otra serie de tubos de cada uno de los grupos de cultivo se colocaron 10 μ l de anticuerpo anti- HLA-DR . Todos los tubos se incubaron durante 1 hr a 4°C, pasado este tiempo se lavaron 3 veces con PBS, para luego fijar las células con glutaraldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y como último paso se colocaron 100 μ l de la suspensión celular en un portaobjetos al cual se le colocó un cubreobjetos y se procedió a observar y contar las células IL-1 alfa positivas o HLA-DR positivas en un microscopio de epifluorescencia marca Zeiss y se determinó el porcentaje de monocitos que expresaron una u otra molécula.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. RESULTADOS

Resultados de la expresión de IL-1 alfa (IL-1 α) y moléculas HLA-DR del CMH por los macrófagos de sujetos clínicamente sanos , utilizando como estímulo diferentes dosis de bacilos de *M. tuberculosis* de la cepa avirulenta H37Ra y de la cepa virulenta H37Rv . Los resultados del control de expresión basal se obtuvieron incubando las células únicamente con el medio de cultivo RPMI 1640 .

Los estudios se realizaron en dos etapas trabajando con 15 individuos clínicamente sanos, siendo en total 30 muestras analizadas y todo se realizó por duplicado. En la primera etapa se hizo la determinación de la expresión de las moléculas anteriormente mencionadas, utilizando como estímulo la cepa avirulenta H37Ra de *M. tuberculosis* y en la segunda etapa se realizó el mismo procedimiento pero utilizando la cepa virulenta H37Rv para la determinación de expresión. Todas estas determinaciones se hicieron mediante citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia.

Para el caso de la determinación mediante citometría de flujo, en las gráficas se encuentran los resultados expresados en valores promedio de la intensidad de fluorescencia emitida por las moléculas de IL-1 α y HLA-DR de los macrófagos estimulados y no estimulados con las diferentes cepas de *M.tuberculosis*. Los resultados obtenidos mediante Inmunofluorescencia se encuentran representados en las gráficas como el porcentaje de células que expresan IL-1 alfa o moléculas HLA-DR.

Se hizo el análisis estadístico de los datos mediante la prueba de T student's para muestras pareadas. Para determinar el grado de significancia o diferencia se realizó la comparación de medias aritméticas de los grupos, entre los cuales se encontraba también el grupo control de expresión basal.

1. EXPRESION DE IL-1 ALFA (IL-1m)

1.1 Efecto de *M. tuberculosis* H37Ra sobre la expresión de IL-1m

En la figura 1 se representan los valores de expresión de la molécula IL-1 alfa cuando las células fueron estimuladas con la cepa avirulenta H37Ra a diferentes dosis y trabajando con un control basal en el cual las células fueron incubadas únicamente con el medio de cultivo RPMI 1640

Mediante el análisis de los resultados y comparando con el control basal se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la expresión de IL-1m cuando se estimuló a los macrófagos con la primera dosis de bacterias de la cepa H37Ra avirulenta, y al utilizar dosis mayores de estas bacterias los resultados fueron más significativos ($P < 0.001$), presentándose un efecto directamente proporcional a la dosis o número de bacterias colocadas en el cultivo. Mediante este resultado se demostró el efecto adyuvante característico de *M.tuberculosis* avirulenta.

que se realizó un análisis estadístico en la expresión de IL-1 de membrana cuando las células fueron incubadas con los *M.tuberculosis* H37Rv virulentos.

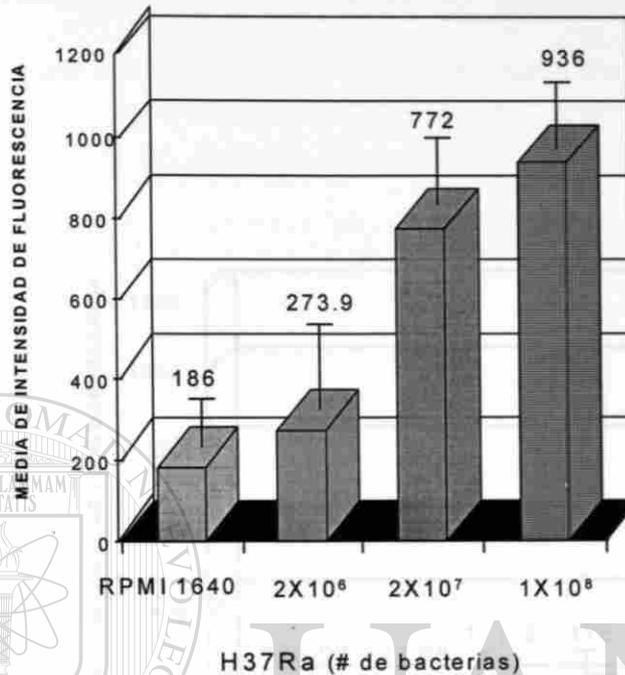


Fig.1 Expresión de moléculas IL-1 alfa de macrófagos estimulados con diferentes dosis bacterianas de *M.tuberculosis* H37Ra e incubados con medio de cultivo RPMI 1640 como control de expresión basal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



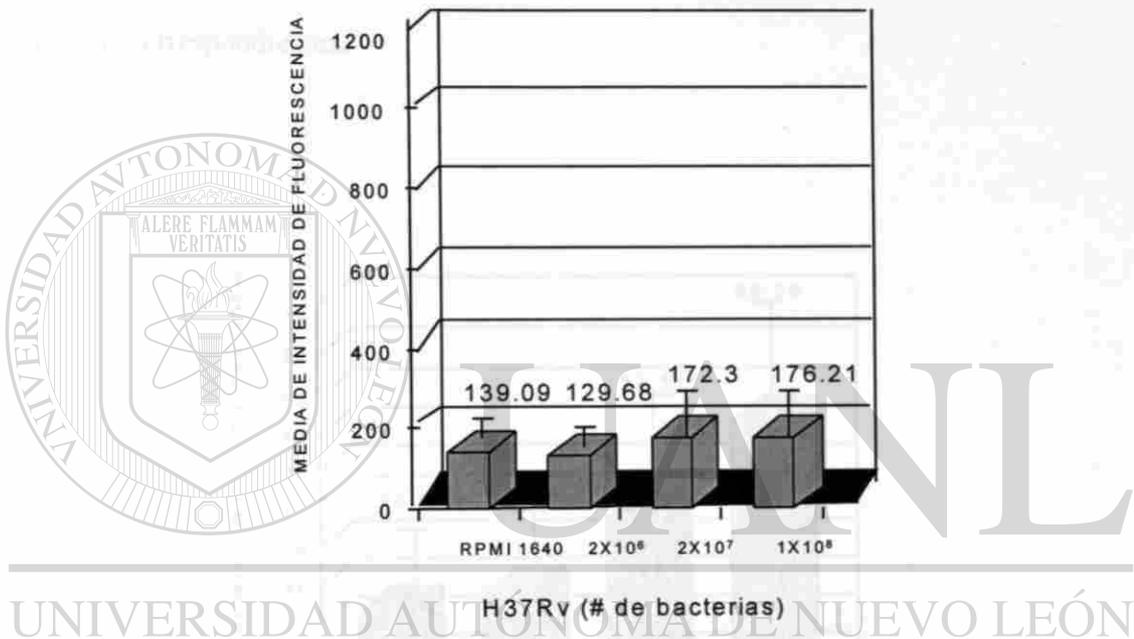
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2. Efecto de *M.tuberculosis* H37Rv sobre la expresión de IL-1m.

La figura 2 muestra los resultados promedio de expresión de IL-1 de membrana, cuando las células fueron incubadas con la cepa virulenta de *M.tuberculosis*. Analizando los resultados y haciendo la comparación con el control de expresión basal se pudo observar

que no existió un cambio significativo en la expresión de IL-1 de membrana cuando las células fueron incubadas con las diferentes dosis bacterianas de *M.tuberculosis* virulenta.

La expresión promedio de las moléculas HLA-DR de los macrófagos estimulados con la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* se incrementa exponencialmente con el aumento de las dosis bacterianas utilizadas de *M. tuberculosis* en las



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 2. Expresión de IL-1 de membrana en macrófagos de sujetos sanos estimulados con diferentes dosis bacterianas de la cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis*.

2. EXPRESION DE MOLECULAS HLA-DR

2.1 Efecto de *M. tuberculosis* H37Ra sobre la expresión de HLA-DR.

La expresión promedio de las moléculas HLA-DR de los macrófagos estimulados “in vitro” con la cepa avirulenta H37Ra de *M. tuberculosis* se encuentra representado en la figura 3, observándose un aumento en la expresión de las moléculas directamente proporcional al aumento de las dosis bacterianas utilizadas de *M. tuberculosis* en los cultivos correspondientes.

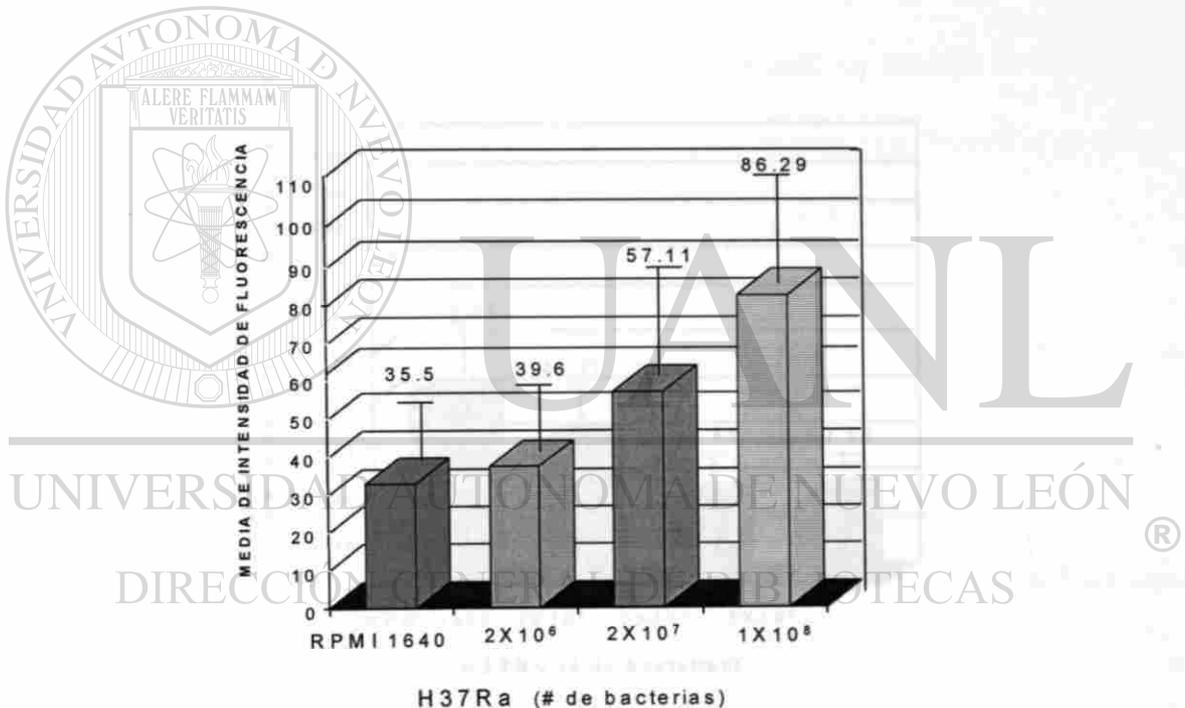


Fig. 3 Expresión de moléculas HLA-DR con diferentes dosis bacterianas de *M. tuberculosis* H37Ra y con medio de cultivo RPMI 1640 como control de expresión basal.

Mediante el análisis de comparación entre los valores promedio de la expresión de la molécula para cada dosis bacteriana, y el control se determinaron valores significativos ($P < 0.05$) a partir de la dosis de 2×10^7 bacterias.

2.2 Efecto de *M.tuberculosis* H37Rv sobre la expresión de HLA-DR

En la figura 4 se presentan los resultados de expresión de las moléculas HLA-DR

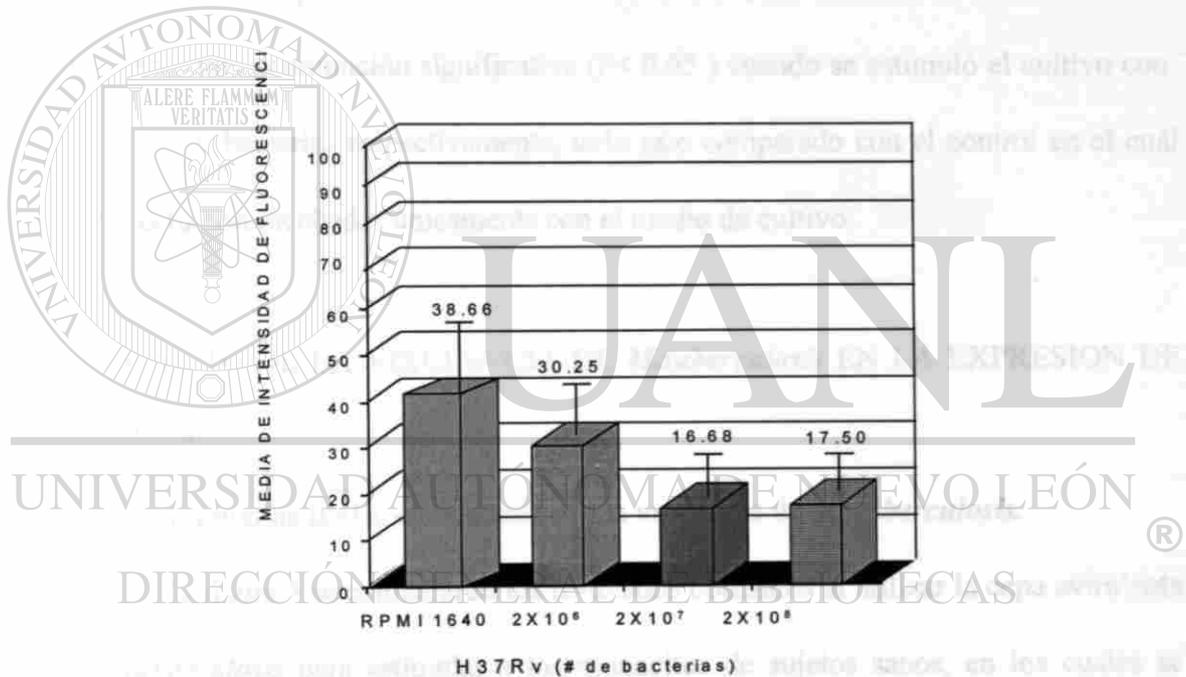


Fig. 4. Expresión de moléculas HLA-DR en la membrana de macrófagos de sujetos sanos estimulados con diferentes dosis bacterianas de la cepa virulenta H37Rv de *M.tuberculosis*.

graficados en valores promedio de intensidad de fluorescencia correspondientes al grupo de estudio, en el cual las células fueron incubadas con diferentes dosis bacterianas de la cepa *M. tuberculosis* virulenta H37Rv y con medio de cultivo RPMI 1640 como control de expresión basal.

Como se puede observar la expresión de la molécula HLA-DR en la membrana de las células de los sujetos sanos disminuyó cuando se utilizó como estímulo las diferentes dosis bacterianas de *M. tuberculosis* H37Rv. Se presentó un efecto inversamente proporcional de la expresión de la molécula en relación a las dosis bacterianas utilizadas, y se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) cuando se estimuló el cultivo con 2×10^7 y 2×10^8 bacterias respectivamente, todo esto comparado con el control en el cual las células fueron incubadas únicamente con el medio de cultivo.

3. EFECTO DE LA VIRULENCIA DE *M.tuberculosis* EN LA EXPRESION DE IL-1m

3.1 Expresión de IL-1m relacionada con la virulencia de *M. tuberculosis*.

En la figura 5 se compararon los resultados obtenidos al utilizar la cepa avirulenta de *M. tuberculosis* para estimular a los monocitos de sujetos sanos, en los cuales se presentó un efecto dosis-respuesta, es decir a mayor número de bacterias colocadas en el cultivo, mayor expresión de las moléculas IL-1 alfa. Con la cepa virulenta H37Rv, no se observó ningún cambio significativo. Obsérvese lo diferente de su comportamiento.

4 EFECTO DE LA VIRULENCIA DE *M. tuberculosis* EN LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD14 EN MACRÓFAGOS DE SUJETOS SANOS

4.1 Efecto de diferentes dosis bacterianas de *M. tuberculosis* con la virulencia.

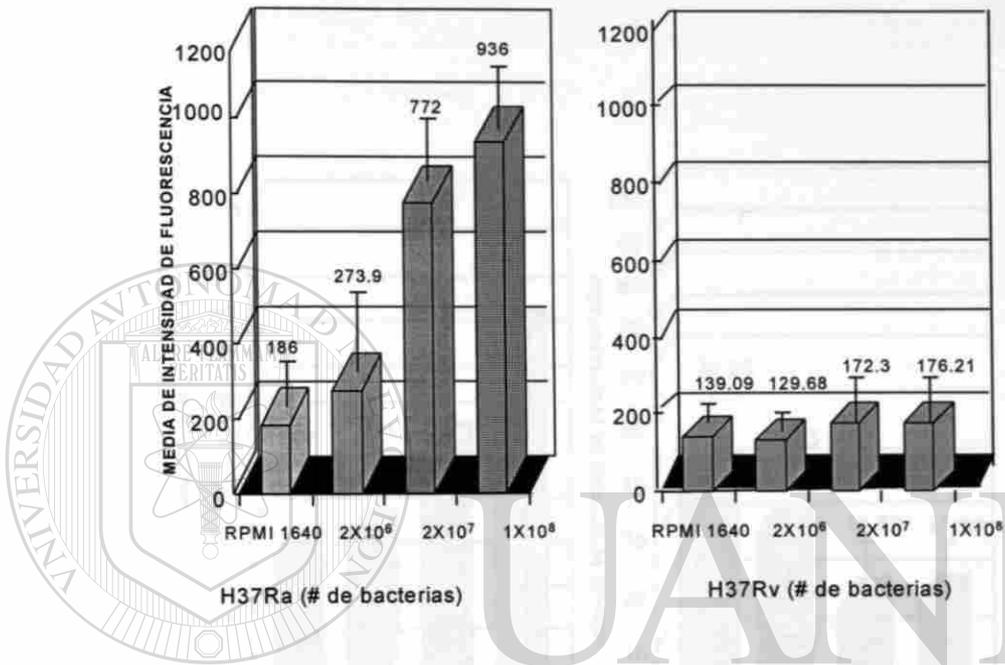


Fig. 5. Comparación de la expresión de la molécula IL-1 alfa de macrófagos de sujetos sanos, utilizando como estímulo diferentes dosis bacterianas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4. EFECTO DE LA VIRULENCIA DE *M. tuberculosis* EN LA EXPRESION DE MOLECULAS HLA-DR.

4.1 Expresión de moléculas HLA-DR relacionada con la virulencia.

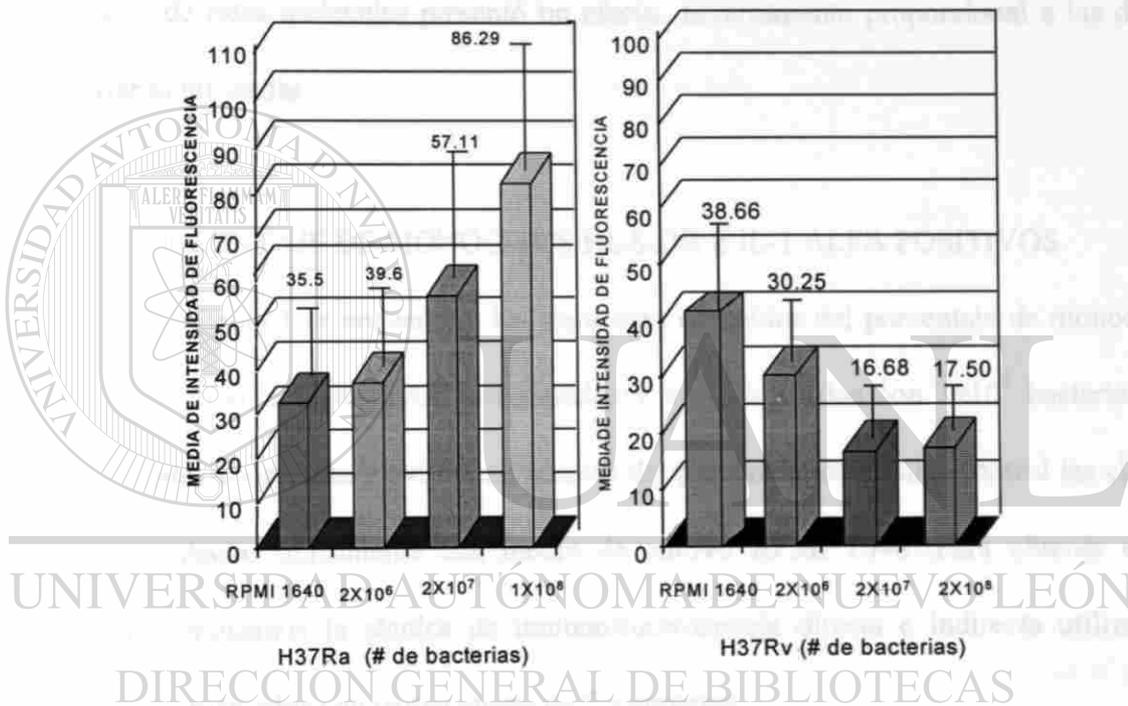


Fig. 6. Comparación de la expresión de moléculas HLA-DR con las diferentes dosis bacterianas de la cepa avirulenta H37Ra y virulenta H37Rv de *M.tuberculosis* en macrófagos de sujetos sanos.

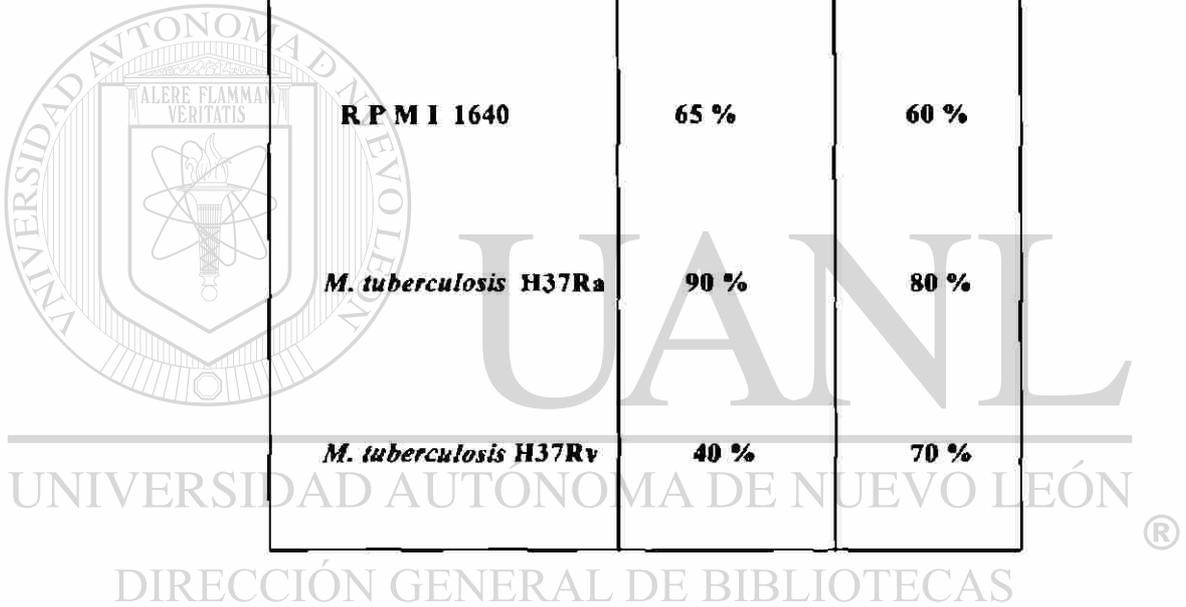
De la misma manera que en la expresión de las moléculas IL-1 alfa, observamos la misma característica en cuanto al efecto dosis-respuesta en la expresión de las moléculas HLA-DR por los monocitos estimulados con las diferentes dosis bacterianas de la cepa avirulenta H37Ra de *M. tuberculosis*. Sin embargo al hacer la comparación (figura 6) con la expresión de las moléculas HLA-DR que presentaron los monocitos estimulados con la cepa virulenta H37Rv, pudimos observar como en este grupo la expresión de estas moléculas presentó un efecto inversamente proporcional a las dosis bacterianas utilizadas.

5. PORCENTAJE DE MONOCITOS HLA-DR E IL-1 ALFA POSITIVOS

En la tabla 1 se encuentran los resultados obtenidos del porcentaje de monocitos HLA-DR e IL-1 alfa positivos estimulados y no estimulados con 1×10^8 bacterias de *M. tuberculosis* virulenta y avirulenta además del porcentaje de células control las cuales fueron incubadas únicamente con medio de cultivo RPMI 1640. Para obtener estos resultados aplicamos la técnica de inmunofluorescencia directa e indirecta utilizando anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína.

**TABLA 1. PORCENTAJE DE MACROFAGOS IL-1 ALFA Y HLA-DR
POSITIVOS DETERMINADO POR INMUNOFLUORESCENCIA**

ESTIMULO	EXPRESION (%)	
	HLA-DR	IL-1 ALFA
RPMI 1640	65 %	60 %
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	90 %	80 %
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	40 %	70 %



5.1 Efecto de *M. tuberculosis* en el porcentaje de monocitos IL-1 alfa positivos .

Como podemos observar en la figura 7, cuando los monocitos fueron estimulados con *M. tuberculosis* H37Ra se produjo un aumento en el porcentaje de estas células IL-1 alfa positivas comparado con el porcentaje determinado para el grupo control en el cual los monocitos fueron incubados con el medio de cultivo RPMI 1640.

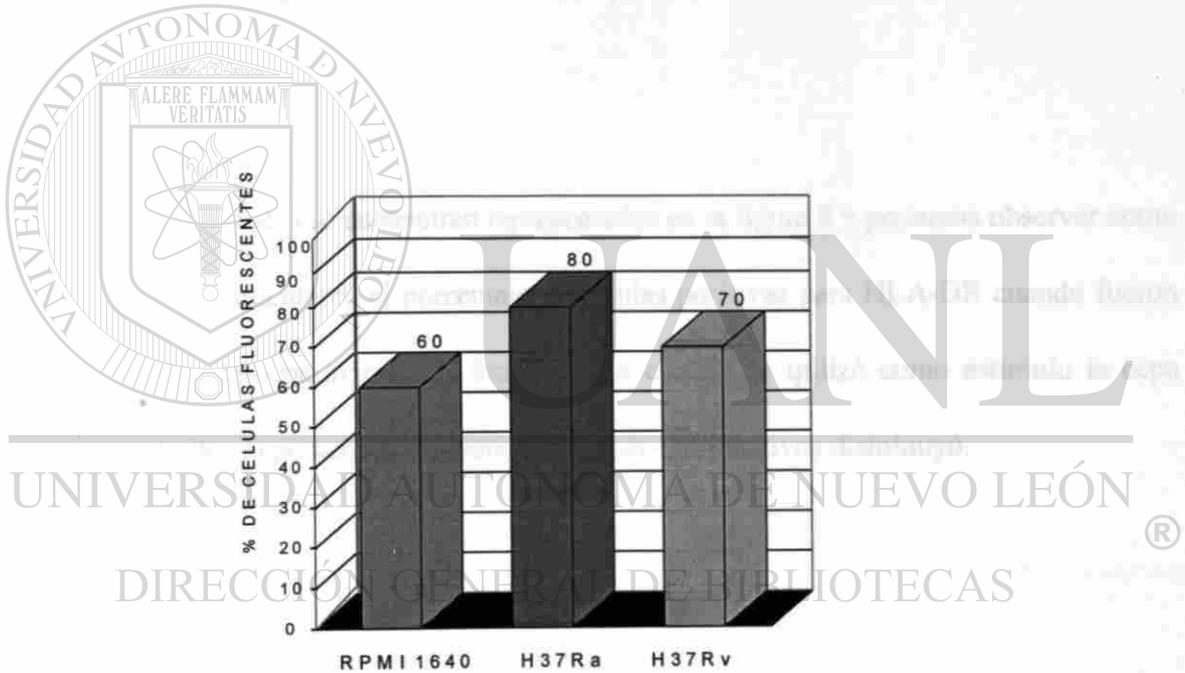


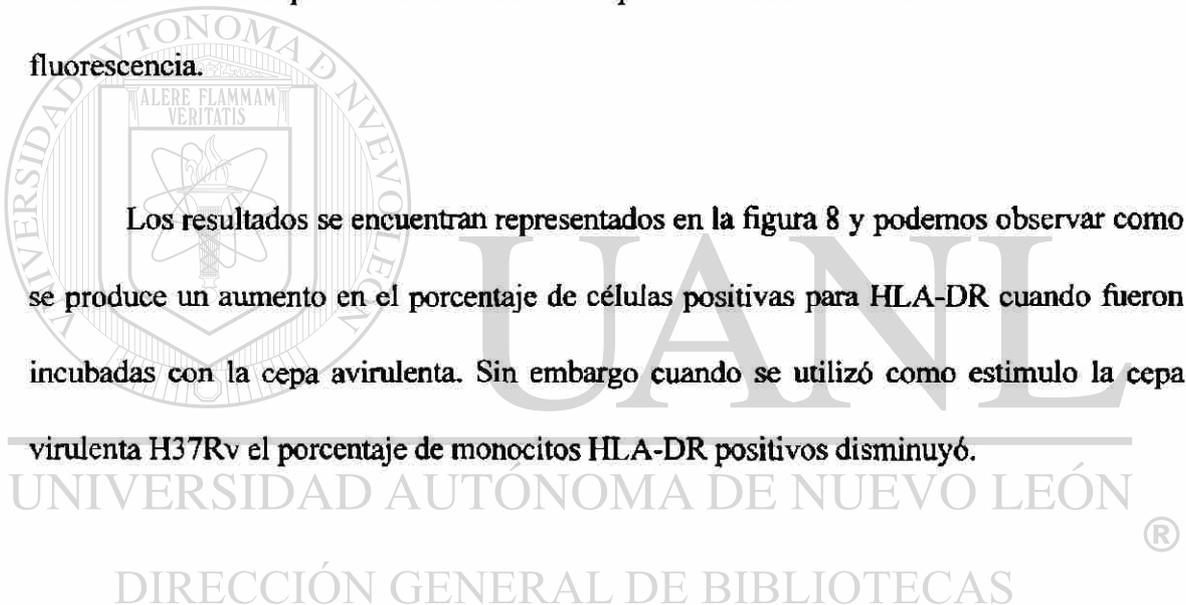
Fig. 7. Porcentaje de macrófagos IL-1 alfa positivos de sujetos sanos. Los macrófagos fueron estimulados con 1×10^8 bacterias de la cepa virulenta y avirulenta de *M. tuberculosis*, y utilizando como control las células incubadas únicamente con el medio de cultivo RPMI 1640.

Cuando las células fueron incubadas con la cepa virulenta H37Rv se presentó también un aumento en el porcentaje de células positivas para IL-1 alfa pero en menor grado al obtenido al utilizar la cepa avirulenta como estímulo en el cultivo celular.

5.2 Efecto de *M. tuberculosis* en el porcentaje de monocitos HLA-DR positivos.

En este grupo las células fueron incubadas también con las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis* y como grupo control con medio de cultivo únicamente, la determinación de expresión de moléculas fue posible también mediante la observación de fluorescencia.

Los resultados se encuentran representados en la figura 8 y podemos observar como se produce un aumento en el porcentaje de células positivas para HLA-DR cuando fueron incubadas con la cepa avirulenta. Sin embargo cuando se utilizó como estímulo la cepa virulenta H37Rv el porcentaje de monocitos HLA-DR positivos disminuyó.



776 DISCUSIÓN

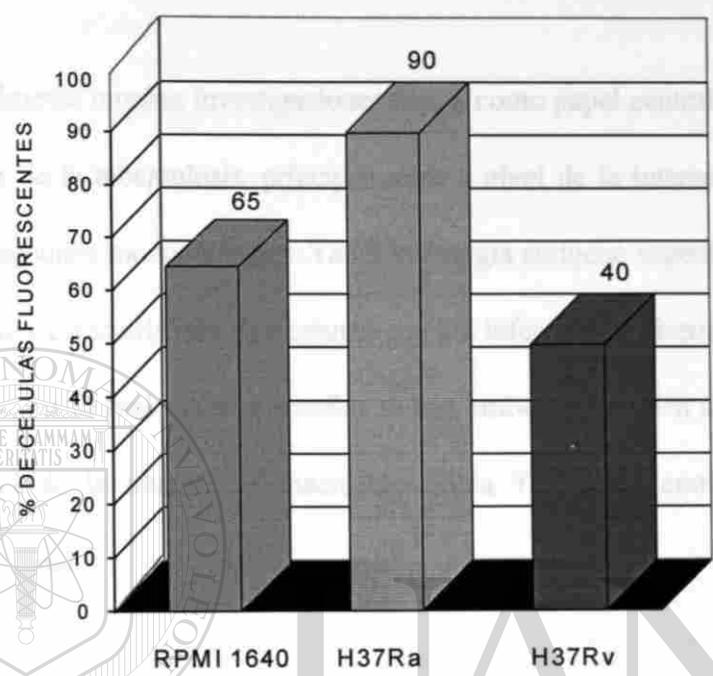


Fig. 8. Porcentaje de macrófagos HLA-DR positivos de sujetos sanos. Las células fueron incubadas con 1×10^8 bacterias de las cepas virulenta y avirulenta de *M. tuberculosis*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VII. DISCUSION

Actualmente muchas investigaciones tienen como papel central el entendimiento de la patogénesis de la tuberculosis, principalmente a nivel de la interacción entre el agente causal y los fagocitos mononucleares. Tanto la anergia antígeno específica como la anergia inespecífica son características importantes en las infecciones diseminadas causadas por micobacterias, por lo cual muchos estudios se han enfocado también a la respuesta inmune inicial a nivel de la interacción macrófago-célula T y a su consecuencia que es la proliferación clonal.

La pregunta clave que nos hicimos en este trabajo fue la de determinar si la interacción entre *Mycobacterium tuberculosis* y el macrófago produce en esta célula algún efecto sobre la expresión de moléculas de membrana importantes en la presentación del antígeno y en la activación de una respuesta inmune específica adecuada. Por lo tanto para saber más acerca de la patogénesis de la tuberculosis nuestros estudios se avocaron a evaluar el efecto de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la expresión de IL-1 de membrana (IL-1m) y moléculas HLA-DR en macrófagos de sujetos sanos.

La mayoría de los estudios en los que se relaciona el efecto de la infección por diversas especies de micobacterias sobre la expresión de moléculas HLA-DR del CMH se

han realizado en macrófagos murinos y además se ha sugerido que cuando este microorganismo intracelular está vivo puede modular la expresión de otras moléculas importantes en la membrana de los macrófagos (25-26), como consecuencia de una influencia directa de la respuesta inmune anti-micobacterial. Según los resultados de Kaye, Sims, y Feldmann (41) se presenta una reducción en la expresión de antígenos en macrófagos peritoneales murinos cuando son infectados con diferentes dosis de bacterias de *M. microti* . Estos mismos resultados se han obtenido utilizando bacilos de *M. kansasii* (42) y se ha considerado un efecto mas significativo cuando utilizaron la bacteria viva que al estimular con el microorganismo muerto. Sin embargo la mayoría de los estudios inmunológicos realizados en infecciones por micobacterias enfocados sobre los componentes efectores de la respuesta inmune , han asumido que los bacilos vivos o muertos pueden producir reacciones inmunológicas similares. Otros estudios “in vitro” de proliferación de linfocitos en los que se ha utilizado bacilos vivos o muertos por calor dan a conocer que, cuando la bacteria está viva, se requiere de bajas dosis bacilares para producir una fuerte respuesta de células T, y que al utilizar la bacteria muerta se obtiene una respuesta dosis dependiente (42).

Con otros microorganismos intracelulares se han obtenido otro tipo de resultados con respecto a la molécula clase II ya que se ha descrito que la infección “in vivo” de células peritoneales con *Listeria monocytogenes* produce un aumento en la proporción de células que expresan las moléculas clase II (55, 56) . Estas discrepancias en cuanto al

aumento o disminución en la expresión de estas moléculas se han tomado como hecho importante para seguir investigando las alteraciones que se presentan en la expresión de antígenos HLA-DR y que además afectan las funciones de los monocitos en la respuesta inmune. Poco se sabe también acerca de los cambios dinámicos de esta molécula en los estados de salud y enfermedad. Sin embargo actualmente este fenómeno de alteración se ha relacionado más en las infecciones o enfermedades causadas por micobacterias. Examinando la interacción huésped - parásito a nivel de las células que actúan en la respuesta inmune, Mathew en 1983 (57) analizó granulomas inducidos por *M. bovis* y *Mycobacterium leprae* en cobayos y reportó la ausencia de células epiteloides la positivas. Van Voorhis (58) y colaboradores observaron cortes histológicos de pacientes con lepra lepromatosa y tuberculoide y analizaron la presencia de las moléculas HLA-DR en las células de los tejidos afectados, encontrando valores normales o elevados en ambos grupos de estudio. En contraste, Poulter (59), ha descrito una disminución de células HLA-DR positivas en lesiones de pacientes con lepra lepromatosa. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todo lo que se ha reportado referente a los cambios en la expresión de las moléculas HLA-DR ha sido con diferentes sistemas de cultivos celulares y en los que se han utilizado diversas especies de micobacterias u otros microorganismos intracelulares; en nuestro estudio nosotros utilizamos cultivos de monocitos de sujetos sanos y cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Primeramente estudiamos si se producía algún cambio en la expresión de las moléculas HLA-DR en la membrana de estas células las cuales fueron

estimuladas con *M. tuberculosis* y valoramos también si el efecto causado por el estímulo dependía de la dosis y virulencia de este microorganismo. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por algunos autores que han trabajado con cultivos de macrófagos peritoneales murinos midiendo expresión de moléculas Ia y en el caso de nuestro estudio determinando la expresión de moléculas HLA-DR en monocitos humanos. Se encontró como resultado un aumento significativo en la expresión de estas moléculas cuando las células fueron estimuladas con la cepa avirulenta H37Ra de *M. tuberculosis* (fig. 3) y se presentó un efecto proporcional dosis-respuesta con respecto al cultivo control de expresión basal. Sin embargo cuando estimulamos a las células con la cepa virulenta H37Rv se presentó un efecto de supresión dosis dependiente en la expresión de las moléculas HLA-DR (fig. 4). Con este resultado podemos decir que hemos cumplido parte de la hipótesis planteada en la que nos referimos a que la disminución en la expresión de esta molécula dependía de la dosis y virulencia de *M. tuberculosis*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Hasta el momento se desconoce como las micobacterias pueden modular la expresión de moléculas importantes en la membrana de los macrófagos estimulados o infectados . Se han realizado diversos estudios en los que se menciona que un posible mecanismo de modulación es a través de mediadores como prostaglandinas que actúan como reguladores fisiológicos (60). Alternativamente se ha demostrado que *M. microti* produce un incremento en los niveles de AMP cíclico , lo cual provoca una inhibición en la expresión de moléculas Ia en células de ratón. Más recientemente se ha descrito (61) que

M. tuberculosis induce un incremento en la expresión de genes tempranos (c-fos, JE, KC) que de alguna manera pueden afectar la expresión de moléculas importantes para las funciones propias de los macrófagos infectados. Entre estas moléculas se encuentra también la interleucina 1 (IL-1) que participa de manera importante junto con las moléculas clase II en la presentación del antígeno y en la activación de los linfocitos T CD4 para que se active la respuesta inmune específica . En el Departamento de Inmunología se han realizado trabajos en los que se han estudiado los cambios en cuanto a la síntesis y secreción de IL-1 beta en infecciones por microorganismos intracelulares. En 1987 (43) se hizo un estudio en el que se planteó que la producción de IL-1 beta (intracelular y extracelular) era deficiente en los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, en comparación con la IL-1 producida por los macrófagos de los pacientes con lepra tuberculoide, que sí desarrollan una respuesta inmune específica contra *M. leprae*. En este trabajo se concluyó que no existía una deficiencia en la producción de IL-1 beta en los pacientes lepromatosos, sino que por el contrario liberaron espontáneamente más IL-1 (dosis- dependiente) que los pacientes con lepra tuberculoide. Hasta este trabajo, se había considerado el estudio de la producción o participación de IL-1 beta en infecciones por microorganismos intracelulares, sin embargo con el presente trabajo se ha iniciado la tarea de estudiar a la molécula de IL-1 anclada a la membrana denominada IL-1 alfa o IL-1 de membrana (IL-1m) . En este estudio en parte de la hipótesis se planteó que la disminución en la expresión de IL-1m de los macrófagos estimulados “in vitro” con *M.tuberculosis* , era dependiente de la dosis y virulencia de este microorganismo. Para hacer este planteamiento se consideraron de manera importante los

estudios realizados por Kurt-Jones y Unanue (62) donde relacionan la expresión de moléculas Ia e IL-1 de membrana con la presentación de antígenos de *Listeria monocytogenes*. Usando este sistema ellos demostraron que la disminución cuantitativa en esas dos moléculas estaba asociada con cambios en la magnitud de la respuesta de células T o respuesta inmune celular.

A partir de 1985 se ha demostrado por varios investigadores la presencia y actividad biológica de las moléculas de IL-1 alfa presentes en la membrana de macrófagos tanto murinos como de humanos (44,45). Se ha establecido que esta molécula está más involucrada en la respuesta inmune adquirida, mientras que la IL-1 soluble (IL-1 beta) está más relacionada con la resistencia natural.

En nuestro estudio primeramente determinamos el efecto de diferentes dosis bacterianas de *M. tuberculosis* avirulenta H37Ra en la expresión de IL-1m en macrófagos humanos, y encontramos como resultado un aumento significativo en la expresión de esta molécula considerando un efecto dosis-respuesta atribuible a la característica de adyuvante de la micobacteria. Para considerar si existía un cambio en el patrón de expresión de IL-1m al utilizar una cepa virulenta de *M. tuberculosis*, incubamos a las células con dosis crecientes de bacilos de la cepa H37Rv y nuestros resultados no mostraron cambio significativo en la expresión de IL-1m comparado con el control de expresión basal (fig. 5).

Los estudios en los mecanismos de regulación en la expresión de los dos tipos de IL-1 han servido de base para considerar funciones específicas diferentes en ambas moléculas. Lange- Watzin en 1987 (63) observaron una inhibición en la expresión de IL-1m al estudiar el efecto de la luz U.V. sobre macrófagos de ratas, y al mismo tiempo se presentó una estimulación en la liberación de IL-1 beta, concluyendo estos autores que la IL-1 de membrana y la soluble son reguladas diferencialmente. En este trabajo se encontraron diferencias en la expresión de las moléculas de IL-1m dependiendo de la cepa de *M. tuberculosis* estudiada . La cepa avirulenta incrementó su expresión mientras que la cepa virulenta no produjo cambios significativos comparado con el control o quizá está realmente produciendo una inhibición de su expresión. Se podría entonces especular que dicho efecto de no cambio o inhibición de expresión de IL-1 m al utilizar la cepa virulenta de *M.tuberculosis* podría deberse a que los componentes de virulencia de la bacteria estan modulando de manera diferente la expresión de IL-1m comparado con lo observado con la cepa avirulenta . Quizás se podría presentar una disminución significativa en la expresión de las moléculas al aumentar las dosis de bacterias de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* en el cultivo celular.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual se pueden estar llevando a cabo los eventos de disminución o aumento en la expresión de ambas moléculas de IL-1 , sin embargo ya se han demostrado algunas posibles vías de regulación , sobre las cuales quizás algunos microorganismos intracelulares llevan a cabo su efecto evasivo modulando la expresión de moléculas importantes para que se monte una respuesta inmune adecuada.

Así en los estudios de Kovacs en 1988 (64) se observó una inhibición en la acumulación citosólica del RNA que codifica para IL-1 m, al utilizar antagonistas de protein cinasa C y calmodulina sugiriéndose que la inducción de IL-1 está relacionada con estas vías. También se ha sugerido que un aumento en los niveles de prostaglandina PGE₂ puede llegar a producir una inhibición en la expresión de IL-1m (65).

En este trabajo se hizo la determinación de expresión de las moléculas HLA-DR e IL-1 alfa por dos métodos, con el objetivo de relacionar tanto la densidad de las moléculas en la membrana de la célula estimulada (expresado en citometría como la media de intensidad de fluorescencia) como con el número de células que expresan una u otra molécula (determinado por inmunocitoquímica). Se encontró con esta última técnica que cuando las células fueron estimuladas con 1×10^8 bacterias de la cepa avirulenta de *M. tuberculosis* se produjo un aumento en el número de células que expresaron moléculas de IL-1m, diferente a lo que se observó cuando se utilizó como estímulo la cepa virulenta H37Rv, ya que no existió cambio significativo en el porcentaje de células que expresaron dicha molécula comparado con el control.

La determinación del número de células que expresaron las moléculas HLA-DR se hizo de manera similar y se observó un aumento en el porcentaje de dichas células cuando se estimularon con la cepa avirulenta de *M. tuberculosis* siendo estos resultados semejantes a los encontrados por Voorhis (58) en células de pacientes con lepra lepromatosa y tuberculoide. Por el contrario cuando se estimuló con la cepa virulenta H37Rv, se encontró una disminución en el número de células que expresaron las moléculas HLA-DR, parecido

a lo reportado por Poulter (59) en lesiones de pacientes con lepra lepromatosa. Estos resultados aportan más evidencia de que el mecanismo de modulación sobre la expresión de IL-1 alfa en las células estimuladas con *M. tuberculosis* podría tener relación con la virulencia de este microorganismo.

En resumen, con estos resultados podemos decir que se acepta la hipótesis, debido a que sí se presentó una disminución en la expresión de las moléculas HLA-DR del CMH y una inhibición de la producción de la IL-1m en los macrófagos estimulados “in vitro” con *M. tuberculosis*, y este efecto fué dependiente de la dosis y virulencia de esta micobacteria.

Aún queda mucho por hacer para entender exactamente cuales son los mecanismos que intervienen en la patogenia de la tuberculosis, más sin embargo se ha avanzado y se ha dado una gran importancia a las moléculas de membrana de los macrófagos que son los que inicialmente son infectados y que tienen la tarea de presentar los antígenos a los linfocitos T cooperadores para que se monte la respuesta inmune específica. Con nuestros hallazgos y comparándolos con los de otros autores en otros modelos, se sugiere que la infección natural con *M. tuberculosis* puede resultar en una inmunosupresión que incluye la disminución de la expresión de moléculas importantes como la IL-1m y determinantes HLA-DR en los macrófagos infectados o estimulados.

VIII. CONCLUSIONES

Al hacer el análisis de los resultados en esta investigación podemos concluir lo siguiente:

- 1.- Se demostró un aumento significativo ($P < 0.01$) en la expresión de IL-1 alfa (IL-1m) y moléculas HLA-DR cuando estimulamos a los macrófagos con *M. tuberculosis* H37Ra.
- 2.- Se demostró una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.01$) en la expresión de moléculas HLA-DR cuando estimulamos a los macrófagos con *M. tuberculosis* H37Rv.
- 3.- No observamos diferencia significativa en la expresión de IL-1m cuando se utilizó como estímulo *M. tuberculosis* H37Rv.
- 4.- Por inmunofluorescencia se demostró una disminución en el porcentaje de células HLA-DR positivas cuando fueron estimuladas con 1×10^8 bacterias de *M. tuberculosis* virulenta y no hubo cambio al utilizar la cepa avirulenta.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- SUTER, E. and RANSEIR, H. 1964. Cellular reactions in infections. Adv. Immunol. 4: 117.
- 2.- MACKANESS, G.B. 1962. Cellular resistance to infections. J. Exp. Med. 116: 381.
- 3.- DANNENBER, A., ANDO, M. and CHIMA, K. 1972. Macrophage accumulation, division, maturation and digestive and microbicidal capacities in tuberculous lesions. J. Immunol. 109 (5): 1109 .
- 4.- ABBAS, K. AND LICHTMAN A. 1991. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company. page. 301.
- 5.- Consejo Asesor en Epidemiología. 1990. México: Información Prioritaria en Salud. México. D.F: SSA.
- 6.- DES PREZ RM, HEIM CR. 1990. Mycobacterium tuberculosis. In: Principles and Practice of infectious diseases, third edition, Mandell GL, Douglas RG, Benett JE (de). New York: Churchill Livinstone . 1877.
- 7.- SOMMERS HM, GOOD, RC. 1985. Mycobacterium . In : Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: Am. Society for Microbiology, 1985. pp 216.
- 8.- KONEMAN EW. 1987. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Third edition. Philadelphia. Pp 535.

- 9.- LECHEVALIER MP, LECHEVALIER H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 20: 435.
- 10.- BRENNAN PJ. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins . *Rev. Infect. Dis.* 11. S420.
- 11.- MISAKI A, SETO N, AZUMA Y. 1974. Structure and immunological properties of D- arabino-D-galactan isolated from cell walls of *Mycobacterium* species. *J. Biochem.* 76: 15.
- 12.- HUNTER SW, GAYLORDH. 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharides of the tubercle and leprosy bacilli. *J. Biol. Chem.* 261: 12345.
- 13.- MACKANESS GB. 1968. The immunology of antituberculous immunity. *Am. Rev. Resp. Dis.* 97: 337.
-
- 14.-O'BRIEN RL. 1989. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis* . *Cell.* 57: 667. ®
- 15.-ROOK GAW. 1988. Role of activated macrophages in the Immunology of tuberculosis. *Br. Med. Bull.* 44: 61.
- 16.-WEAVER, C. and UNANUE, E. 1985. T cell induction of membrane IL-1 on macrophages. *J. Immunol.* 137 (12): 3868.

- 17.-ROSENTHAL, A.S., and E. M. SHEVACH . 1973. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J. Exp. Med. 138: 1194.
- 18.-SHEVACH, E.M., and A. S. ROSENTHAL. 1973. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocytes. II. Role of macrophages in the recognition of genetic control of the immune response,. J. Exp. Med. 138: 1213.
- 19.-BENACERRAF, B. 1981. Role of MHC gene product in immune regulation. Science, 212.
- 20.-QUVIGSTAD, E., H. SCOT, and THORSBY. 1985. HLA class II restriction of antigen specific T cell activation. Prog. Allergy 36: 73.
- 21.-SHER, M. G., E. R. UNANUE, and D. Y. BELTER. 1982. Regulation of macrophages populations. III. The immunologic induction of exudates rich in Ia-positive macrophages is a radiosensitive process. J. Immunol. 128:447.
- 22.-SHER, M. D., D. I. BELLER and UNANUE. 1980. Demonstration of a soluble mediator that induces exudates rich in Ia positive macrophages. J. Exp. Med. 152: 1684.
- 23.-WONG, G H., Y. CLARK-LEWIS, and A. L. HARRIS. 1983. INTERFERON- γ induces enhanced expression of Ia and H-2 antigen on B-lymphoid, macrophages and myeloid cell lines. J. Immunol. 131: 788
- 24.-STEEG, P., R. MOORE, H. JOHNSON, and OPPENHEIM. 1982. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. J. Immunol. 129: 2402.

- 25.-WONG, G. H. W., Y. CLARK-LEWIS, and A. L. HARRIS. 1984. Effect of cloned interferon- γ on expression of H-2 and Ia antigens on cell lines haemopoietic, lymphoid, epithelioid fibroblastic and neuronal origin. *Eur. J. Immunol.* 14: 52.
- 26.-FIERZ, W., B. ENDLER, K. RESKE, H. WEKERLE, and A. FONTANE. 1985. Astrocyte as antigen presenting cell: induction of Ia antigen expression on astrocytes by T- cell via immune interferon and its effect on antigen presentation. *J. Immunol.* 134: 3785.
- 27.-ALBRECHTSEN D. 1977. HLA-D- associated "Ia-like" antigens on human macrophages. *Scand J immunol.*6: 907.
- 28.- ENGLEMAN EG, CHARRON DJ. 1980. Ia antigen on peripheral blood mononuclear leukocytes in man.I. Expression, biosynthesis, and function of HLA-DR antigen on non-T cells. *J. Exp. Med.* 152 : 99S.
-
- 29.-DINARELLO, C. A 1984. Interleukin 1. *Rev. Infect. Dis.* 6: 51
- 30.-MARCH, C.J. , MOSLEY, B. 1985. Cloning, secuencia and expression of two distinct human interleukin 1 complementary DNAs. *Nature.* 315: 641.
- 31.- LOMEDICO, P.T., GUBLER, B., HELLMAN. C.P. 1984. Cloning and expression of murine interleukin 1 complementary DNAs. *Nature.* 315: 641.
- 32.-DOWER, S.K. , KRONHEIM, S.R. 1986. The cell surface receptors for interleukin 1B are identical. *Nature.* 324: 266.

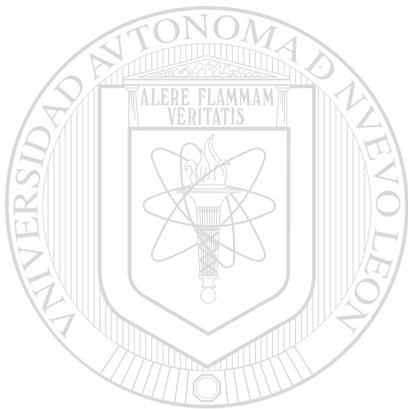
- 33.-DINARELLO, C.A., CANNON J.G.. 1986. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J. Clin. Invest.* 77: 1734.
- 34.-OPPENHEIM , J.J., KOVACS, E.J., MATSUSHIMA, K. and DURUM S.K.. 1986. There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today* 7, 45.
- 35.-YEM, A. W., and M. J. PARMELY. 1981. Modulation of Ia-like antigen expression and antigen presenting activity of human monocytes by endotoxin and zymosan A. *J. Immunol.* 127: 2245.
- 36.-ROOK, G. A. W., B. R. CHAMPION and J. L. STANFORD . 1985. Ia restricted activation of anti-tuberculosis activity in immune macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 59: 414.
- 37.-HAANEN, J. B. A. B., T. H. M. OTTENHOFF, A. VOORDOUW . 1986. HLA Class II restricted *Mycobacterium leprae* reactive T- cell clones from leprosy patients established with a minimal requirement for autologous mononuclear cells. *J. Immunol.* 23: 101.
-
- 38.-OGASAWARA, K. H., H. KOJIMA, H. IKEDA. 1986. A study on Class antigens involved in the T-cell proliferative responses to PPD using cross-reacting monoclonal antibodies in human and murine systems. *Immunobiol.* 171: 112.
- 39.-COLLINGS, L. A., N. TIDMAN, and L. W. POULTER. 1985. Quantitation of HLA-DR expression by cell involved in the skin lesions of tuberculoid and lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 61: 58.

- 40.- COLLINGS, L. A., N. TIDMAN, and L. W. POULTER. 1985. The involvement of dendritic cell in the cutaneous lesions associated with tuberculoid and lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 62: 458.
- 41.- KAYE, P.M., M. SIMS, and M. FELDMAN. 1986. Regulation of macrophages accessory cell activity by mycobacteria. II. In vitro inhibition of Ia expression by *Mycobacterium microti*. *Clin. Exp. Immunol.* 64: 28.
- 42.- MSHANA, R.N., R. HASTINGS, and J. KRAHENBUHL. 1988. Infection with live *Mycobacteria* inhibits in vitro detection of Ia antigen on macrophages. *Immunobiol.*, vol. 177: 40.
- 43.-Arce, A. Y. 1989. Producción de Interleucina 1 por macrófagos de pacientes con lepra y su papel en la inmunopatogenia de la enfermedad lepromatosa. Tesis doctoral en Inmunología. Facultad de Medicina U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- 44.-KURT- JONES , E. BELLER, D. MIZEL, B. and UNANUE, E. 1985. Identification of membrane associated Interleukin 1 on macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 1204.
- 45.-CONLON, P. J., GRANSTEIN, K. H., ALPER, A., KATHRYN, S. P., HOPP, T. P. and GILLIS, S. 1987. Localization of human mononuclear cell interleukin 1. 1987. *J. immunol.* 139: 98.
- 46.-B.W. ALLEN, F.J. BAKER. 1985. *Mycobacteria: Aislamiento, Identificación y Pruebas de Sensibilidad.* Cap. 7, 65.
- 47.- LAWRENCE, G. W. 1984. Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for Research Purpose. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. Edited by Barry Bloom. Charter 6, Pag. 73.

- 48.- CHARLES C. SHEPARD and DOROTHY H. MCRAE. 1968. A Method for Counting Acid - fast Bacteria. *International Journal of Leprosy*. 36 (1): 78-82.
- 49.- COTNER, C; WILLIAMS, J.M. 1983. Simultaneous Flow Cytometric Analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *J. Exp. Med.* vol. 157:461.
- 50.- SUMNER, H; ABRAHAM, D. 1991. Simultaneous measurement of cell surface and intracellular antigens by multiple flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 136: 259.
- 51.- BEESLEY, J.E. 1993. *Immunocytochemistry: A practical Approach*. Oxford University Press Inc., New York
- 52.- JAVOIS, L. C. 1994. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Human Press Inc., Totowa, New Jersey.
-
- 53.- SELGAME, P. R., N. H. ANTIA. 1983. Mechanism of immunosuppression in leprosy: Presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. *Infect. Immun.* 40: 1119.
- 54.- BIRDI, T. J., N. F. MISTRY. 1983. Alterations in the membrane of macrophages from leprosy patients. *Infect. Immunol.* 41: 121.
- 55.- CALLAMAI, E. G. , D. Y. BELLER, and E. UNANUE. 1982. Regulation of macrophage populations : IV. Modulation of Ia expression in bone marrow-derived macrophages . *J. Immunol.* 128: 1692.

- 56.- BELLER, D. Y. 1984. Functional significance of the regulation of macrophages of Ia expression. *Eur. J. Immunol.* 14: 138.
- 57.- MATHEW, R. C., GUPTA, S. K. 1983. Analysis of cell of mononuclear phagocyte series in experimental mycobacterial granulomas by monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39, 344.
- 58.- VAN VOORHIS, W. C., KAPLAN, G. et. al. 1982. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T cell phenotypes. *N. Engl. J. Med.* 307., 1593.
- 59.- POULTER, L. W., COLLINS, L. A. 1984. Parasitism of antigen presenting cells in hiperbacillary leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 55, 611.
- 60.- SNYDER, D. S., UNANUE, E. R. 1982. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature*, 299, 163.
- 61.- ROACH, T. I., BARTON, C. H. 1993. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of mycobacterium tuberculosis differentially induces the early genes *c-fos*, *KC*, *JE*, and tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol.* 150 (5), 1886.
- 62.- KURT-JONES, E. A., HERBERT, W. V., UNANUE, E. R. 1985. Relationship of macrophage Ia and membrane IL-1 expression to antigen presentation. *J. Immunol.* 135 (6), 3652.
- 63.- LANGE-WANTZIN, G., ROTHLEIN, J. 1987. Effect of UV irradiation on expression of membrane IL-1 by rat macrophages. *J. Immunol.* 138, 3803.

- 64.- KOVACS, E. J., RADZIOCH, D., YOUNG, H. A. 1988. Differential inhibition of IL-1 and TNF- α mRNA expression by agents which block second messenger pathway in murine macrophages. *J. Immunol.* 141, 3101.
- 65.- BRANDWEIN, S. R. 1990. Differential regulation of soluble interleukin 1 release and membrane expression by pharmacologic agents. *Agents and actions*, vol. 30. 381.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

X. APENDICES

APENDICE A

EQUIPO:

1. Agitador magnético RC-353 (CORNING)
2. Autoclave (MARKET-FORGE STERILMATIC)
3. Cámara de Neubauer (BAXTER)
4. Campana de flujo laminar (CCI BIO HAZARD HOOD)
5. Centrífuga eppendorf 5415 (BRINKMANN)
6. Centrífuga J2-21 (BECKMAN)
7. Centrífuga TJ-6 (BECKMAN)
8. Centrífuga Serofuga II (CLAY ADAMS)
9. Compresor de aire para la incubadora
10. Citómetro de flujo (BECTON DICKINSON)
11. Hemocitómetro (Beeder)
12. Incubadora (J. M. ORTIZ)
13. Invertoscópio Zeiss
14. Microscópio Zeiss modelo K-7
15. Potenciómetro 43 (BEKMAN)
16. Refrigerador Ultra Low (AMERICAN SCI. PROD.)
17. Refrigerador (KELVINATOR)
18. Tanques de CO₂
19. Vortex mixer s/p (AMERICAN SCI. PROD.)

APENDICE B

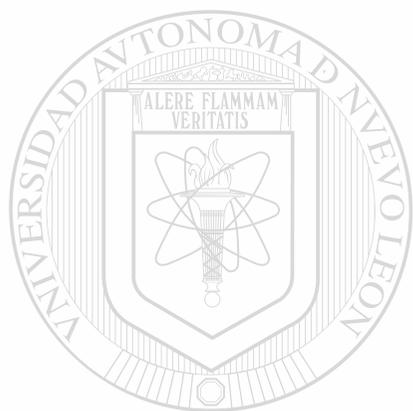
REACTIVOS QUIMICOS

1. Acido clorhídrico (MERCK)
2. Azul de tripano (SIGMA)
3. Albúmina sérica bovina (SIGMA)
5. Anticuerpo anti-gamma de conejo desarrollada en cabra conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (Elaborado en el departamento de Inmunología)
6. Anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR humana desarrollado ratón conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (SIGMA)
7. Anticuerpo policlonal anti-IL-1 α humana desarrollado en conejo (GENZYME)
8. Bicarbonato de sodio (FISHER)
9. Cloruro de potasio (MERCK)
10. Cloruro de sodio (MERCK)
11. Diatrizoato de sodio (SIGMA)
12. Etanol (MERCK)
13. Fenol (MERCK)
14. Ficoll (SIGMA)
15. Fosfato dibásico de sodio anhidro (MONTERREY)
16. Fosfato de sodio monobásico (MONTERREY)
17. Gentamicina (SIGMA)
18. Glicerol (SIGMA)
19. Hidróxido de sodio (FISHER)
20. L-glutamina (SIGMA)
21. Medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA)
22. Medio de cultivo Iscove (SIGMA)
23. Microesferas calibradoras (BECKTON DICKINSON)

24. Penicilina G (SIGMA)

25. Streptomicina (SIGMA)

26. Tween 80 (SIGMA)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE C

PREPARACION DE REACTIVOS

I. SOLUCION SALINA DE FOSFATOS (PBS) 0.1M pH 7.4

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de sodio.12H ₂ O	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Agua bidestilada hasta	1000 ml
Ajustar el pH a 7.4	

II. FICOLL- HYPAQUE

10 partes de diatrizoato de sodio (Hypaque) al 34% y 24 partes de ficoll al 9% en agua destilada. La densidad se ajusta con un picnómetro a 1.077+/-

0.001g/ml.

Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos

III. MEDIO RPMI 1640 1X

RPMI 1640 en polvo	5.195 g
Mezcla de antibióticos	5.0 ml
Bicarbonato de sodio 7.5%	12.5 ml
Agua bidestilada	447.5 ml
Esterilizar con membrana de 0.22µm	

IV. RPMI 1640 SUPLEMENTADO

RPMI 1640 1X	18.6 ml
Suero fetal de ternera	1.0 ml
Aminoácidos esenciales	0.2 ml
Glutamina	0.2 ml

Esterilizar con membrana de 0.22µm

V. MEDIO DE CULTIVO PROSKAUER-BECK MODIFICADO POR YOUMANS (PBY)

Asparagina	5 g
Fosfato monobásico de potasio	5 g
Sulfato de potasio	0.5 g
Citrato de sodio	0.6 g
Cloruro de magnesio	0.2 g
Glicerol	50 ml

Tween 80	0.5 ml
Agua bidestilada hasta	1000 ml

Ajustar pH a 6.8

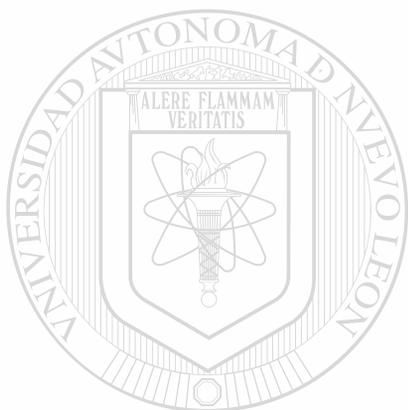
Esterilizar a 121° C, 15 lbs/pulg² durante 15 minutos

VI. MEDIO DE CULTIVO DE LOWENSTEIN-JENSEN

Fosfato monopotásico anhidro	2.4 g
Sulfato de magnesio.7H ₂ O	0.24 g
Citrato de magnesio	0.6 g
L. Asparagina	3.6 g

Glicerina	12.0 ml
Agua destilada c.s.p.	600 ml
Huevos enteros	1000 ml
Verde de malaquita	0.4 g

Esterilizar la solución de sales, asparagina y glicerina en autoclave a 121° C, presión de 15 lbs/pulg² durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y luego agregar asépticamente el litro de huevo. Distribuir en tubos con tapón de rosca esterilizados.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

