UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE FRACCIONES DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv SOBRE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA-DR Y B7 EN MONOCITOS HUMANOS

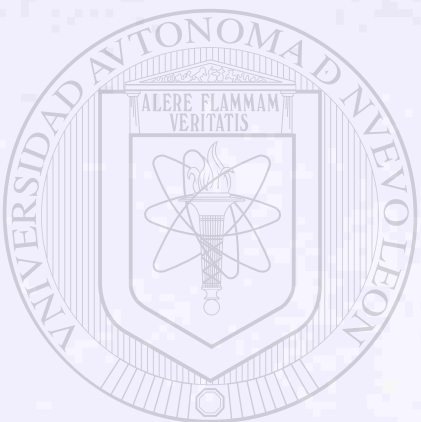
Por

SONIA ROSA ROBLERO OCHOA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Inmunología

Julio, 1997

TM
RC311
.4
R6
c.1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE FRACCIONES de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv SOBRE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA-DR Y B7 EN MONOCITOS HUMANOS

Por

SONIA ROSA ROBLERO OCHOA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Inmunología

Julio, 1997

FONDO TESIS MAESTRIA

TM
RC311
.4
R6

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE FRACCIONES DE

***Mycobacterium tuberculosis* H37Rv SOBRE LA**

EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA-DR

Y B7 EN MONOCITOS HUMANOS

Aprobación de la Tesis:

Dr. Mario César Salinas Carmona
PRESIDENTE

Dr. Mario Alberto Garza Elizondo
SECRETARIO

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
1er. VOCAL

M.C. María Alicia Suárez Semour
2o. VOCAL

Dra. Nohemí Waksman de Torres
3er. VOCAL

Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios
de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EFECTO DOSIS-RESPUESTA DE FRACCIONES DE

***Mycobacterium tuberculosis* H37Rv SOBRE LA**

EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA-DR

Y B7 EN MONOCITOS HUMANOS

Presentado por: Q.F.B. Sonia Rosa Roblero Ochoa

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 Dr. Mario César Salinas Carmona.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Asesora.

Dra Alma Yolanda Arce Mendoza

Coasesor

Dr. Mario C. Salinas Carmona

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, por aceptar asesorarme, por aportarme sus conocimientos. Porque de ella siempre recibí confianza, cariño y apoyo. Realmente le expreso mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por aceptarme como estudiante del Departamento de Inmunología. Por ser un excelente maestro, por dedicarme tiempo, ser paciente y por el apoyo que me brindo durante mi estancia en este Departamento.

A la Dra, Nohemí Waksman, por su colaboración y sugerencias en la realización de este trabajo. Por su trato amable y disponibilidad de ayuda.

Al M.C. Ernesto Torres López, por su amistad y su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

A la M.C. Ma. Alicia Suárez Semour y al Dr. Mario A. Garza Elizondo por las sugerencias aportadas para la redacción del presente trabajo

Al Dr. José Manuel Ramírez Aranda, por colaborar en el análisis estadístico de los resultados y por dedicarme parte de su tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al M.C. Pedro René Bodegas Valera, Rector de la UNACH, por el apoyo económico que me brindo para concluir esta tesis.

A todos los integrantes del Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL, por el apoyo que recibí de ellos.

A la M.C. Alma Isabel Ramos Cano por su calidad como ser humano, por tratar siempre de ayudar y por ser ejemplo de constancia y dedicación al trabajo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A todos mis compañeros del Departamento de Inmunología: Dr. Angel Licón, Silvia Casillas, Irma Alicia Martínez, Luis Edgar, Sergio Domínguez y Marisol por su amistad y apoyo que siempre me brindaron

A la Dra Angeles Castro y al Dr Carlos E. Medina de la Garza por su apoyo y amistad.

A Anna Velia, Isabel y Rosario porque siempre me brindaron amistad, apoyo y confianza.

Al Dr. Lucio Vera, por su amistad, por sus sugerencias y por darme siempre ánimo.

A Alejandra, Juan Carlos, Abdías, Blanca Ruth y Raúl por su colaboración en este trabajo en forma desinteresada, por su amistad y confianza. Muchas gracias.

Al personal del Departamento de Inmunología: Lizzy, Aracely, Betty, Hilda, Verónica, Paty, Vicente, Francisco y Don Carlitos. Por su cariño y apoyo que me brindaron.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

A toda mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A DIOS:

Por ser mi guía e iluminarme en todos los momentos de mi vida.

A MIS PADRES:

Edilberto Roblero y Forinda Ochoa porque siempre me han dado todo, los admiro y los amo.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo Página

1. INTRODUCCION 1

2. OBJETIVOS 18

3. MATERIAL Y METODOS 19

3.1 Obtención de las Fracciones Proteica, Lipídica y Polisacárida de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv . . . 19
3.1.1 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 19
3.1.2 Obtención de la Masa Bacteriana 19
3.1.3 Obtención de Proteínas Extracelulares 20
3.1.4 Obtención del Extracto Celular de *Mycobacterium tuberculosis*. 21
3.1.5 Obtención del Extracto Lipídico de *Mycobacterium tuberculosis*. 21
3.1.6 Obtención de la Fracción Polisacárida de *Mycobacterium tuberculosis* 22
3.2 Análisis de los Extractos Obtenidos 23
3.2.1 Determinación de la Concentración de Proteínas por el Método de Bradford 23
3.2.2 Determinación de la Concentración de Azúcares por el Método de Dubois 24
3.2.3 Electroforesis en gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (SDS-PAGE) 24
3.2.3.1 Preparación de Geles 24
3.2.3.2 Corrimiento Electroforético de los Extractos. 26
3.2.3.3 Tinción con Azul de Coomassie. 27
3.2.4 Cromatografía en Capa Fina del Extracto Lipídico de *Mycobacterium tuberculosis* 28
3.2.5 Preparación del Extracto Lipídico 29

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo Página

3.3 Obtención de Células Mononucleares Humanas. 29
3.3.1 Separación de Células Mononucleares Humanas, por la Técnica de Separación en Gradiente de Densidad, Ficoll-Diatrizoato de Sodio. 29
3.4 Determinación de la Cinética del Cambio de Expresión de la Molécula B7 en Monocitos Humanos. 30
3.4.1 Determinación de la Cinética de Expresión de la Molécula B7-1 en Monocitos Humanos. 31
3.4.2 Determinación de la Cinética de Expresión de la Molécula B7-2 en Monocitos Humanos. 31
3.5 Determinación del Efecto de Diferentes Dosis de Cada uno de los Extractos Sobre la Expresión de las Moléculas HLA-DR y B7-2 de Monocitos Humanos. . . . 32

4. RESULTADOS 35

4.1 Obtención de los Extractos de *Mycobacterium tuberculosis*. 35
4.1.1 Rendimiento de Proteínas Extracelulares. . . . . .
354.1.2 Rendimiento del Extracto Celular de *Mycobacterium tuberculosis* 35
4.1.2 Rendimiento del Extracto Polisacárido de *Mycobacterium tuberculosis* 36
4.1.3 Rendimiento y análisis del Extracto Lipídico de *Mycobacterium tuberculosis*. 37
4.1.4 Preparación del Extracto Lipídico de *Mycobacterium tuberculosis* 40
4.2 Determinación de la Cinética del Cambio de Expresión de la Molécula B7 en Monocitos Humanos 41
4.2.1 Determinación de la Cinética de Expresión de la Molécula B7-1 (CD80) en Monocitos Humanos. 41
4.2.2 Determinación de la Cinética de Expresión de la Molécula B7-2 (CD86) en Monocitos Humanos. . 43
4.3 Determinación del Efecto de Diferentes Dosis de Cada uno de los Extractos Sobre la Expresión de las Moléculas HLA-DR y B7-2 de Monocitos Humanos 46
4.3.1 Expresión de la Molécula HLA-DR en Monocitos Humanos, Estimulados con Diferentes Dosis de Cada uno de los Extractos de *M. tuberculosis* H37Rv. 47
4.3.2 Expresión de la Molécula B7-2 (CD86) en Monocitos Humanos, Estimulados con Diferentes Dosis

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

de Cada uno de los Extractos de *M. tuberculosis* H37Rv. 52

5. DISCUSION. 57

6. CONCLUSIONES. 65

LISTA DE ABREVIATURAS 72

APENDICES 75

APENDICE A 75

APENDICE B 77

APENDICE C 81

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

TABLA PAGINA

I. Concentración de Proteínas y carbohidratos de los extractos de *M. tuberculosis* H37Rv 37

II. Expresión de B7-1 (CD80) en Monocitos Humanos, Estimulados con LPS e Interferón α 42

III. Expresión de la Molécula B7-1 en Monocitos Humanos, Estimulados con Interferón γ 42

IV. Expresión de la Molécula B7-2 (CD86) en Monocitos Humanos, Estimulados con Lipopolisacárido 44

V. Expresión de la Molécula HLA-DR, en Monocitos Humanos, Estimulados con Diferentes Dosis de Extractos de *M. tuberculosis* H37Rv. 49

VI. Expresión de la Molécula B7-2, en Monocitos Humanos, Estimulados con Diferentes Dosis de Extractos de *M. tuberculosis* H37Rv. 53

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA PAGINA

1. Análisis de Proteínas de los Extractos de *M. tuberculosis* H37Rv en gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio en Gradiente de 10-18% T, 2.7% C. 38

2. Cromatografía en Capa Fina del Extracto Lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv. 39

3. Viabilidad celular de Células Mononucleares, al Ponerlas en Contacto con DMSO y Glicerol 40

4. Expresión de la Molécula B7-1 (CD80) en monocitos humanos, estimulados con LPS e IFN alfa 43

5. Expresión de B7-2 (CD86) en Monocitos Humanos, Estimulados con Lipopolisacárido de *E. coli* 055:B5 44

6. Expresión de B7-2 (CD86) en Monocitos Humanos, Estimulados con Concanavalina A 45

7. Expresión de B7-2 (CD86) en Monocitos Humanos, Estimulados con Interferón γ. 45

8. Expresión de la Molécula HLA-DR en Monocitos Humanos Estimulados con Proteínas Extracelulares de *M. tuberculosis* H37Rv. 50

9. Expresión de la Molécula HLA-DR en Monocitos Humanos, Estimulados con Extracto Celular de *M. tuberculosis* H37Rv. 50

10. Expresión de la Molécula HLA-DR en Monocitos Humanos Estimulados con Extracto Polisacárido de *M. tuberculosis*

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIGURA PAGINA

H37Rv. 51

11. Efecto del Extracto Lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv, sobre la expresión de las Moléculas HLA-DR en monocitos humanos. 51

12. Efecto de Acidos Micólicos de *M. tuberculosis*, Sobre la Expresión de las Moléculas HLA-DR en monocitos humanos 52

13. Expresión de B7-2 en Monocitos Humanos, Estimulados con Proteínas Extracelulares de *M. tuberculosis* H37Rv. . . 54

14 Expresión de B7-2 en Monocitos Humanos, Estimulados con Extracto Celular de *M. tuberculosis* H37Rv. 54

15. Expresión de B7-2 en Monocitos Humanos, Estimulados con Extracto Polisacárido de *M. tuberculosis* H37Rv 55

16. Expresión de B7-2 en Monocitos Humanos, Estimulados con Extracto Lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv. 55

17. Expresión de B7-2 en Monocitos Humanos, Estimulados con Acidos Micólicos de *M. tuberculosis* 56

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Sonia Rosa Roblero Ochoa **Fecha de graduación: Julio de 1997**

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: EFECTO DOSIS RESPUESTA DE FRACCIONES DE *M. tuberculosis* H37Rv SOBRE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA-DR Y B7 EN MONOCITOS HUMANOS.

Número de páginas: 87 **Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología**

Area de Estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: El macrófago juega un papel central en la respuesta inmune mediada por células a infecciones mycobacterianas. Algunos investigadores han reportado la expresión reducida de las moléculas clase II del CMH sobre macrófagos de ratones infectados con *M. microtti* y *M. kansassi.* Además, recientemente se ha demostrado que monocitos infectados con un gran número de *M. tuberculosis* presentan una inhibición en la expresión de las móleculas HLA-DR, lo cual es proporcional al número de bacilos utilizados para la infección. Debido a este efecto inhibitorio, en el presente estudio se investigó el efecto de extractos proteicos, polisacáridos y lipídicos de *M. tuberculosis* H37Rv sobre la expresión de las moléculas HLA-DR y B7 en monocitos humanos. Sé determinó el tiempo máximo de expresión de las moléculas B7-1 y B7-2 en monocitos humanos. También se obtuvieron proteínas extracelulares, extracto celular, extracto polisacárido y extracto lipídico de *M. tuberculosis.* Para la realización de este trabajo se estimuló con cuatro diferentes dosis de cada uno de los extractos y se determinó la expresión por citometría de flujo.

Contribuciones y Conclusiones: Al determinar la expresión de las moléculas B7-1 y B7-2 en monocitos humanos, se observó que la molécula B7-2 se expresa en mayor cantidad que la molécula B7-1. Sé obtuvo una disminución en la expresión de la molécula B7-2 en monocitos humanos, con proteínas extracelulares a una dosis de 100 y 150 µg/ml y con el extracto lipídico a una dosis de 50 y 100 µg/ml. En la expresión de HLA-DR, observamos incremento al estimular con todos los extractos obtenidos de *M.tuberculosis* H37Rv. Probablemente son las proteínas y los componentes lipídicos de pared celular, los que afecten la capacidad coestimuladora de la célula presentadora de antígenos.

FIRMA DEL ASESOR

Dra. ALMA VARCE MENDOZA

FIRMA DEL COASESOR

Dr. MARIO C. SALINAS CARMONA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad antigua, ha sido uno de los grandes azotes infecciosos de la humanidad a través de la historia y permanece como un problema de salud en la actualidad. Una razón de ello puede ser que no se ha desarrollado una vacuna efectiva, ya que la BCG (cepa atenuada de *M. bovis)* que se ha utilizado durante más de 60 años no es capaz de conferir una inmunidad protectora total, ya que algunas personas aunque hayan sido vacunadas desarrollan la enfermedad, sin embargo la vacuna reduce los riesgos de tuberculosis diseminada temprana, especialmente en niños (11).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se sabe que durante décadas pasadas la incidencia de la tuberculosis había disminuido sin embargo con el advenimiento de la epidemia del SIDA la tuberculosis se ha incrementado notablemente debido a la habilidad que tiene el virus de destruir el sistema inmune, por lo cual se considera un factor de riesgo muy importante para que la infección latente se active y se desarrolle la enfermedad clínica en pacientes adultos jóvenes, sobre todo en personas de los países desarrollados (1

La tuberculosis es capaz de afectar a cualquier órgano de la economía en forma progresiva y crónica, el cuadro clínico está en relación con el órgano o sistema de ataque. Las características clínicas de la infección con *Mycobacterium tuberculosis son* muy variadas y dependen de factores del hospedero, del microbio, así como de la interacción hospedero-microbio. Dentro de los factores del hospedero se encuentran la edad, estado inmune, estado de nutrición, factores genéticos e inmunización con el bacilo de Calmette Guérin (BCG). Dentro de los factores del microorganismo están la virulencia y el tropismo para tejidos específicos. Datos existentes sugieren que sólo un 10 % de las personas infectadas desarrollan las características clínicas de la tuberculosis y que un 90 % permanece latente, sin embargo en personas con inmunodeficiencias o en infantes, la proporción que desarrolla tuberculosis evidente es mucho más alta (2). Como ya se mencionó, uno de los factores más importantes en el desarrollo de las características clínicas de la infección depende del sitio involucrado. Aproximadamente el 85 % de los casos de tuberculosis reportados están limitados a los pulmones y el 15 % a sitios extrapulmonares (tejido linfático, pleura, sistema genitourinario, miliar, hueso, meninges y peritoneo) o a ambos sitios pulmonares y extrapulmonares. La tuberculosis que ocurre en cualquier sitio del organismo puede producir síntomas y hallazgos que no están específicamente relacionados con el órgano o tejido involucrado, sino más bien son sistémicos en naturaleza o son remotos del sitio de la enfermedad.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las manifestaciones sistémicas de la enfermedad incluyen fiebre, malestar general y pérdida de peso y son probablemente mediados por citocinas, especialmente por el factor de necrosis tumoral (FNTα). El diagnóstico presuntivo se establece tomando en cuenta la sintomatología y la evidencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en el producto clínico y es definitivo si se logra cultivar al bacilo (3).

La tuberculosis en el ser humano es fundamentalmente producida por *Mycobacterium tuberculosis*, descubierto por Roberto Koch en 1882. *Mycobacterium tuberculosis* pertenece a la familia Mycobacteriaceae del orden Actinomycetales y por su alto contenido de lípidos es ácido-alcohol resistente; son bacilos alargados, rectos o ligeramente curvos, tienen una longitud de 1 a 4 µm y su grosor varía entre 0.2 y 0.5 µm. Son aerobios estrictos, inmóviles no esporulados y son parásitos obligados. No se desarrolla en medios usuales y crece lentamente en medios que tienen huevo o suero coagulado, su tiempo de generación es de 20 a 24 horas, se desarrolla a un pH entre 6.0 y 7.6 y crece en forma de colonias escamosas, pequeñas, secas y de superficie rugosa. Para distinguir *Mycobacterium tuberculosis* de otras micobacterias, se toma en cuenta su crecimiento lento, que no tenga pigmentos, que produzca niacina y reduzca los nitratos, que tenga catalasa termolábil y sea sensible a isoniazida (4,5).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M tuberculosis es capaz de sobrevivir en el interior de células fagocíticas del hospedero y es probable que su envoltura celular tenga una propiedad especial de defender al *bacilo contra* los procesos microbicidas del hospedero.

M tuberculosis y otras micobacterias son biológicamente parte de las bacterias grampositivas pero tienen algunas características distintas. Poseen peptidoglicanos, los cuales están asociados predominantemente con lípidos que contienen diversas estructuras. Los polisacáridos están unidos por enlace disácarido fosforil a el peptidoglicano semejante a la estructura de las bacterias grampositivas (6,7).

La envoltura micobacteriana posee una capa electrodensa de peptidoglicano, unido por enlaces fosfodiester a un polisacárido de cadena ramificada, el arabinogalactano (polisacárido que consiste exclusivamente de residuos de D-arabinosa y D-galactosa),el cual está esterificado con ácidos grasos de peso molecular alto (ácidos micólicos) formando ambos una capa electrotransparente.

El peptidoglicano es un polímero de aminoácidos y aminoazúcares (unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico).

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los ácidos micólicos son α-alkil,β hidroxi ácidos grasos de peso molecular alto. Los ácidos micólicos micobacterianos son distintos de aquellos de otros géneros tales como Corynebacterium, Nocardia y Rhodococcus. Los ácidos micólicos de las Micobacterias son más largos (tienen de 70 a 90 carbonos), tienen una cadena lateral más larga (de 20 a 24 carbonos), contienen una o dos insaturaciones y tienen ramificaciones metilo en el principal esqueleto de carbono (8).

Una segunda molécula que predomina en la pared celular micobacteriana es el lipoarabinomanano (LAM). El LAM tiene un polisácarido compuesto de arabinosa y manosa (arabinomanano), los cuales pueden estar acilados y no acilados. El arabinomanano acilado contiene ácido palmítico y tuberculoesteárico. El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunoregulatorias tales como la inhibición de la activación de macrófagos murinos mediados por IFN-γ, y media la producción de citocinas derivadas de macrófagos que pueden producir las manifestaciones clínicas de tuberculosis y lepra (9,43).

M. tuberculosis H37Rv posee un glucolípido fenólico el cual consta de trealosas no polares aciladas con ácidos grasos saturados de 16 a 18 carbonos y ácidos mucolipémicos, al cual se ha atribuido que tiene un papel importante en la virulencia (11).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las distintas características de la mayoría de las moléculas mencionadas ha llevado a especular que están involucradas en la virulencia y patogénesis del bacilo. Dentro de las moléculas implicadas en la interacción hospedero-parásito están el factor cuerda y los sulfátidos (10). Middlebrook y colaboradores en 1947 observaron que *M. tuberculosis* crece en la forma de cordones serpentinos y que podía ser distinguido de las especies avirulentas y saprofíticas por su propiedad de absorber el rojo neutro del colorante fenazina catiónica. Esto condujo a pensar que componentes de la pared celular estaban implicados en este fenómeno y que por lo tanto, pudieran estar relacionados a virulencia (11).

La identificación inicial por Bloch's del factor cuerda (trealosa, 6,6, dimicolato) en *M. tuberculosis* virulenta, condujo a la especulación concerniente a su papel en la virulencia y formación del cordón. Se han descrito varias actividades biológicas del factor cuerda como los eventos mediados por citocinas, tal como toxicidad sistémica, actividad antitumoral, liberación de factores quimiotácticos por parte del macrófago e inhibición de la migración de leucocitos (10,12).

La estructura de sulfátidos de *M. tuberculosis* H37Rv está basada en la composición de trealosa 2' sulfatos acilados con ácidos grasos de cadena sencilla o saturados. Por métodos cromatográficos se han identificado 5 clases de sulfolípidos, los cuales se diferencian en el número de acilaciones. Se ha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

reportado que los sulfolípidos inhiben la activación del fagosoma promoviendo de esta manera la sobrevivencia del patógeno (13).

Koch en 1882 preparó un producto conocido como tuberculina vieja de Koch, el cual es el filtrado de un cultivo de 8 semanas inactivado por calor. Koch sugirió que la tuberculina podría se usada en el diagnóstico de tuberculosis, ya que al ser inyectada por vía subcutánea producía una reacción característica de hipersensibilidad tipo tardío (DTH) .

F. Seibert y B. Munday fueron capaces de demostrar que el principio activo de tuberculina está presente en la fracción proteica del medio de cultivo, precipitada con sulfato de amonio, llamada derivado proteico purificado de tuberculina (PPD). La utilización del PPD en la intradermorreacción, es una herramienta epidemiológica y diagnóstica extremadamente útil, en algunos países (14).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dentro de las proteínas citoplásmicas de *M. tuberculosis* se han identificado las proteínas de shock térmico o proteínas de estrés de 71, 65 y 12 kDa. También se conocen otras proteínas de peso molecular de 38, 23 y 40 kDa. *M. tuberculosis* secreta proteínas a su medio y estas proteínas son extremadamente potentes en generar una respuesta inmune celular en ratones infectados con *M. tuberculosis* vivos (15). Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS de una preparación de un filtrado de cultivo se han

identificaron por lo menos 33 bandas, de las cuales se conoce muy poco la función. También se han descrito proteínas que están asociadas a la membrana o pared celular, las cuales generalmente están asociadas a lípidos. Young y Garbe (1991) demostraron la incorporación de palmitato [^{3}H] en cuatro proteínas de *M. tuberculosis* de peso molecular de 19, 26, 27 y 38 kDa. Se ha reportado que anticuerpos monoclonales contra micobacterias pueden ser capaces de discriminar entre *M. tuberculosis*, BCG y otras especies de micobacterias y observaron que estaban dirigidos contra la proteína de 38 kDa (16). También se ha reportado que la proteína de 38 kDa estimula los linfocitos T de ratones, cobayos y de humanos inmunizados (17).

RESPUESTA INMUNE CONTRA MICOBACTERIAS.

La respuesta inmune protectora contra micobacterias es mediada por células, donde las principales células son el fagocito mononuclear y el linfocito T. Para que se desarrolle la respuesta inmune contra el bacilo, el macrófago debe de fagocitar, procesar y presentar los fragmentos peptídicos unidos a las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) al linfocito T, los cuales son reconocidos mediante el receptor de la célula T (TcR) (18,19).

Para que se active el linfocito T, aparte de reconocer el antígeno unido a las moléculas de clase II del CMH, debe además recibir otras señales por parte

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

de la célula presentadora de antígeno, como la interleucina 1 y la molécula coestimuladora llamada B-7, la cual es reconocida por un receptor sobre el linfocito T (CD28 y CTLA-4). De esta manera el linfocito T se activa y empieza a producir citocinas tales como interferón γ e interleucina 2. El interferón γ incrementa la actividad del macrófago para producir otras citocinas como el factor de necrosis tumoral (FTN α) y sustancias químicas como óxido nítrico y formas tóxicas de oxígeno que conducen a la destrucción del microbio.

El complejo mayor de histocompatibilidad es una región de genes altamente polimorfos y sus productos son expresados en la superficie de una variedad de células. Las moléculas del CMH fueron originalmente identificadas como las moléculas responsables del rechazo de transplantes y más tarde se observó la importancia de estas moléculas en la respuesta inmune fisiológica. Se comprobó que la activación de linfocitos T estaba genéticamente controlada y que los linfocitos T no reconocen antígenos solubles o libres, sino fragmentos peptídicos unidos no covalentemente a las moléculas del MHC (20,21).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las moléculas clase II del CMH son glucoproteínas formadas por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente y son expresadas constitutivamente sobre células B, macrófagos y células dentríticas.

Como se sabe, el antígeno solo es insuficiente para disparar una reacción inmune óptima. Lafferty y colaboradores demostraron en experimentos

con transplantes, que las células de tejido no hematopoyético no eran fácilmente rechazadas, lo cual se interpretó como que la actividad de linfocitos necesaria para el rechazo de transplante requería segundas señales o señales coestimulatorias proporcionadas por las células presentadoras de antígeno (22).

Los ligandos para el receptor CD28 han sido identificados como antígenos de la familia B7. Se han identifcado dos moléculas relacionadas a B7. La molécula B7 original es ahora conocida como B7-1 (CD80). El segundo miembro es designado como B7-2 (CD86 o B70). Se ha reportado un tercer miembro de esta familia llamado B7-3 o BB-1, aunque su DNAc no se ha aislado, algunos estudios sugieren que está presente en células B $B7^+$ y $B7^-$.

La molécula B7 fue primero identificada por Yokochi como un antígeno presente en el linfoblasto B, el cual era reconocido por anticuerpo monoclonal BB1 y más tarde Freedman la identificó sobre células B activadas (23,24). La molécula B7-1 es una glucoproteína transmembranal de 262 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 44 kDa y es caracterizada por una región extracelular (216 aminoácidos) que contiene dos regiones parecidas a inmunoglobulinas (un dominio constante y un dominio variable), una región transmembranal y un tallo citoplásmico corto (19 aminoácidos). La molécula B7-2 es una proteína que tiene un peso molecular entre 60 - 80 kDa y de 306 residuos de aminoácidos, con un tallo citoplásmico corto (aproximadamente 60

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

residuos de aminoácidos) que presenta seis residuos de aminoácidos y tres sitios de fosforilación y una región extracelular de aproximadamente 220 residuos de aminoácidos. Al igual que B7-1, el segmento extracelular de la molécula B7-2 también contiene una región constante y una región variable parecido a inmunoglobulina, indicando que ambas moléculas son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. La identidad de secuencias de aminoácidos entre B7-1 y B7-2 humano es cerca del 25 % y esta homología específica de región es reflejado entre las dos regiones variables y las dos regiones constantes (25).

Se sabe que tanto la interacción de las moléculas clase II del CMH con el receptor de célula T (TcR), como la interacción de CD40 con su ligando gp39, la interleucina 2 y la interleucina 4, pueden inducir la expresión de la molécula B7-1 sobre células B. La interacción de los antígenos B7 y CD28 median la adhesión celular heterotípica, incrementan la proliferación de linfocito T y producción de citocinas y se ha visto también que incrementa los efectos de citotoxicidad del linfocito T citotóxico. Algunos investigadores han observado que cuando no hay expresión de la molécula coestimuladora, se puede producir desensibilización del antígeno, anergia o muerte del linfocito por apoptosis. Es posible que también pueda jugar un papel en el desarrollo de tolerancia periférica (26,27).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como se mencionó anteriormente, la molécula B7 se puede unir a CD28 o a CTLA-4, pero su afinidad de unión es mayor con CTLA-4. CTLA-4 es coexpresado con CD28 sobre linfocitos T activados, pero en un nivel mucho más bajo que CD28. Se ha observado que CD28 y B7-2 exhiben un patrón de expresión muy similar sobre células B y T y que la expresión de CTLA-4 y B7-1 también tiene una cinética de inducción similar , por lo que es probable que B7-2 sea el principal ligando para CD28 y que B7-1 sea el principal ligando para CTLA-4 (19). B7-1 originalmente se observó como un receptor expresado principalmente sobre células B. Estudios más recientes indican que monocitos activados, células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos, queratinocitos y células T activadas pueden expresar B7-1. Las células que expresan B7-2 incluyen células dendríticas y células de Langerhans cultivadas, células B, macrófagos, células de Kupffer, monocitos activados, clonas de células NK y células del endotelio vascular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La inmunidad mediada por células se ha caracterizado por la participación de una población de células T CD4 protectora que secretan citocinas y producen una activación local de macrófagos y el reclutamiento de monocitos para iniciar la formación de un granuloma (28,29). Se ha comprobado por un estudio realizado en 1992 por Friedland J. S y colaboradores, que se incrementa la secreción de IL-8 de monocitos humanos después de la fagocitosis de *M. tuberculosis*, concluyendo que el bacilo es un potente inductor de IL-8, lo cual sugiere que esta citocina está involucrada en

la formación del granuloma in vivo, posiblemente actúa como quimioatractante de células T (38).

Se ha observado que para su sobrevivencia los microorganismos intracelulares emplean mecanismos de evasión tales como: la inhibición de la fusión fagolisosoma, resistencia al contenido lisosomal, inactivación de enzimas lisosomales, modificación del fagolisosoma, esto con el objetivo de facilitar su sobrevivencia, replicación y escape al citoplasma . En un estudio realizado por Mcdonough y colaboradores observaron la interacción de *M. tuberculosis* (H37Ra y H37Rv) con macrófagos, reportaron que ambos cepas tenían la capacidad de escapar de las vesículas fusionadas conforme la infección progresaba. Después de la salida del fagolisosoma, la cepa H37Rv, pero no H37Ra, fue capaz de multiplicarse, lo cual sugiere un mecanismo por el cual *Mycobacterium tuberculosis* virulento elude el mecanismo microbicida del macrófago escapando de vesículas fusionadas a vesículas no fusionadas o al citoplasma (30).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Desde 1984 se propuso por Collings, Tridman y Poulter que las micobacterias pueden evadir la respuesta inmune a través de la modulación de la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II sobre las células presentadoras de antigeno (31,32).

Tweardy y Schacter en 1984 realizaron estudios con monocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar para examinar la expresión de moléculas HLA-DR. Por medio de un ensayo de citotoxicidad, utilizando un anticuerpo monoclonal contra la molécula HLA-DR y complemento, demostraron una disminución de la expresión, lo cual tradujeron como una actividad supresora por parte del macrófagos (33). Un resultado similar fue obtenido por Mshana y Hasting en 1988 con macrófagos de ratón infectados con *M. kansasii* vivo y estimulados con interferón γ (34).

Trabajos realizados por Wallis y Fujimara con monocitos de pacientes con tuberculosis, estimulados con PPD, demostraron un incremento en la producción de interleucina 1, lo cual fue interpretado como otra de las moléculas asociadas con la supresión antígeno específica (35,36).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En 1993 Orme y colaboradores estudiaron la secreción de citocinas por linfocitos T CD4 en respuesta a una infección con *M. tuberculosis* en ratones, observando la producción de IFN-γ en los primeros días de cultivo (10 a 30 días), producción que declinó posteriormente. También se determinó la producción de IL-4, la cual se incrementó entre los 30 y 60 días. Esto sugiere la existencia de dos formas separadas de inmunidad adquirida mediada por células T en ratones infectados con *M. tuberculosis* virulento, siendo las células Th1 que secretan IFN-γ y después la respuesta es mediada por células Th2 que secreta IL-4 (39).

En 1994 Ohmen, Barnes y Barry R. Bloom determinaron por análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y citometría de flujo, la cadena β del receptor de célula T (TcR) en el fluido pleural y en sangre periférica de pacientes con pleuritis tuberculosa, en el cual encontraron una expansión local de células T β. Estos hallazgos dieron evidencia de la presencia de un superantígeno en *M. tuberculosis*, aspecto de los cuales puede contribuir a la inmunopatología de la tuberculosis y a la propiedad adyuvante de *M. tuberculosis* (37).

En otro de los estudios realizado por Gercken y colaboradores en 1994 observaron la presentación de antígeno defectuosa por monocitos infectados con *M. tuberculosis* y una proliferación de células T marcadamente reducida, cuando los monocitos eran infectados con un número grande de mycobacterias (40).

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En un estudio realizado en Sudáfrica por Wadee y Kuschke, investigaron la expresión de las moléculas de clase II sobre monocitos de individuos sanos estimulados con una proteína de 25 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* observando una reducción en su expresión. Ellos también investigaron el efecto de clofazimina y riminofenazina, sobre la expresión de esta molécula, observando un incremento en la expresión cuando eran añadidos al inicio del experimento, pero no fueron capaces de restaurar la inhibición después de la

estimulación de los monocitos con la proteína de *Mycobacterium tuberculosis* (41).

En el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L se han realizado estudios en monocitos de pacientes con lepra y tuberculosis. En 1989 la Dra. Arce, estudió el efecto de *Mycobacterium leprae* y de sus componentes glucolípido fenólico y lipoarabinomanano en la produción de Interleucina 1 producida por macrófagos de pacientes con lepra y observó que el glucolípido fenólico produjo un efecto estimulador dosis-respuesta en la expresión de esta citocina, observándose un efecto similar con lipoarabinomanano pero en menor grado y propuso que la interleucina 1 es en parte la responsable de las alteraciones y daño tisular en la lepra (42). Otros estudios realizados también indican una deficiencia de la actividad quimiotáctica y fagocítica de macrófagos en pacientes con lepra (43).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Debido a que la micobacteria y productos micobacterianos se han conocido que interfieren con la fusión fagosoma-lisosoma e influencían el ambiente celular, es probable que los mecanismos intracelulares necesarios para el procesamiento y asociación de péptidos inmunogénicos con las moléculas de clase II deben estar afectados en monocitos/macrófagos que portan el parásito. En un trabajo previo se estudió la expresión de moléculas HLA-DR e IL-1 sobre la superficie de macrófagos humanos estimulados con diferentes dosis de las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

muertos por calor , no se observó efecto en la producción de IL-1 pero si una disminución en la expresión de la moléculas HLA-DR conforme se incrementaba el estímulo con la cepa H37Rv (44), lo que sugiere que una infección multibacilar tenga un papel muy importante en la inmunosupresión contra esta micobacteria.

En el presente trabajo nos hemos dado a la tarea de investigar cuales componentes de la micobacteria son los responsables de esta supresión, así como determinar el efecto de esos componentes sobre la expresión de la molécula B7. Esta información ayudará a explicar si parte del defecto para que se monte una respuesta inmune adecuada contra el bacilo, se debe a la expresión defectuosa de moléculas de superficie de macrófagos, lo que es importante para su función como célula presentadora de antígenos.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de los extractos proteicos, polisacáridos y lipídicos de *M. tuberculosis* H37Rv sobre la expresión de las moléculas HLA-DR y B7 en la membrana de monocitos humanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener la masa bacteriana a partir de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
2. Obtener los extractos proteicos, polisacáridos y lipídicos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
3. Determinar la cinética del cambio de expresión de la molécula B7 (B7-1 y B7-2) en monocitos humanos.
4. Determinar el efecto de diferentes dosis de cada uno de los extractos sobre la expresión de las moléculas HLA-DR y B7 (B7-1 y B7-2) en monocitos humanos mediante citometría de flujo, en individuos PPD negativos.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 OBTENCION DE LAS FRACCIONES PROTEICA, LIPIDICA Y POLISACARIDA DE *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.1 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se utilizó la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que fue donada por el Dr. Oscar Rojas Espinoza del Departamento de Inmunología de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Se realizó el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio sólido de Lowestein-Jensen, el cual se dejó incubando 4 semanas a 37°C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.1.2 Obtención de la masa bacteriana

Para la obtención de la masa bacteriana se procedió a sembrar colonias de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas del medio de Lowestein-Jensen en 20 matraces con 300 ml de medio líquido de Proskauer-Beck modificado por Youmans. Estos cultivos se incubaron durante 3 meses. Después de este tiempo se mataron las micobacterias en autoclave a 121°C, 15 libras de presión

durante 30 minutos; se hizo la separación del medio de cultivo de la masa bacteriana por sedimentación y centrifugación a 4,270 x *g*. Del sobrenadante se obtuvieron las proteínas extracelulares. La masa bacteriana se lavó 3 veces con agua destilada estéril, centrifugando en cada lavado a 4,270 x *g* durante 20 minutos. Posteriormente se secó al vacío y se dejó a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que estuvo completamente seca.

3.1.3 Obtención de proteínas extracelulares.

El sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman No. 2 al vacío. Se procedió a concentrar por perevaporación hasta 200 ml y luego se dializó por 72 horas contra agua destilada. Las proteínas del medio de cultivo dializado se precipitaron con $(NH_4)_2SO_4$ al 50 %. La precipitación se llevó a cabo a 4°C, agregando gota a gota el $(NH_4)_2SO_4$ y se dejó agitando durante dos horas. Se centrifugó a 500 x *g* durante media hora y el precipitado se disolvió en amortiguador de salina fosfatos (PBS) estéril, pH de 7.2 y se dializó a 4°C contra agua destilada hasta estar libre de iones amonio, el cual se midió por conductividad, pH y cloruro de bario. El contenido proteico se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina como estándar (45). La preparación obtenida se liofilizó y se guardó a -20°C hasta utilizarse. Una alicuota se utilizó para determinar proteínas y realizar electroforesis.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.1.4 Obtención del extracto celular de *M. tuberculosis*.

10 g de masa bacteriana seca se deslipidizaron igual que *N. brasiliensis* (45) con una mezcla etanol-éter en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 por 6 veces, posteriormente las bacterias se secaron a temperatura ambiente. Las bacterias secas y deslipidizadas se trituraron con polvo de vidrio (1:2) en un mortero durante 1 hora. Posteriormente las bacterias y el polvo de vidrio se resuspendieron en 80 ml de solución amortiguadora Tris-HCl acetato de magnesio 0.01 M pH de 7.4 y se dejó agitando durante 12 horas a 4°C. La mezcla se centrifugó a 2300 x *g* durante 10 minutos, el precipitado se eliminó y el sobrenadante se puso a dializar contra agua destilada durante 24 horas. El dializado se liofilizó y una alícuota se separó para determinar proteínas por el método de Bradford (46) y realizar electroforesis.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.1.5 Obtención del extracto lipídico de *M. tuberculosis*.

Los lípidos de *Mycobacterium tuberculosis* se obtuvieron con extracción etanol-éter en proporción 1:1, 1:2 y 1:3; el extracto lipídico así obtenido se concentró por evaporación a 35°C en un rotavapor, posteriormente se secó con nitrógeno. Los lípidos obtenidos se trataron de disolver tanto en glicerol como en DMSO (dimetil sulfoxido) probando diferentes concentraciones. También se determinó cuál de estos solventes y a qué concentración son menos tóxicos

para las células, para ello se realizó viabilidad celular por el método de exclusón del colorante azul tripano.

3.1.6. Obtención de la fracción polisacárida de *M. tuberculosis.*

Para la obtención de polisacáridos, la masa bacteriana se deslipidizó con etanol-éter , se trituró con polvo de vidrio, utilizando el mismo método que para la obtención de proteínas intracelulares. La mezcla de bacterias molidas y polvo de vidrio se trataron con 80 ml de KCl 3 M y se dejó en agitación durante 12 horas a 4°C. Después se centrifugó a 500 x *g* durante 30 minutos. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó 2 veces a 4,512 x *g* por 30 minutos para eliminar células o detritus celulares. Posteriormente se añadieron al sobrenadante 10 volúmenes de metanol y la mezcla se dejó por 24 horas a 4°C en agitación. Después de este tiempo la mezcla se centrifugó a 500 x *g* durante 15 minutos y el precipitado se dejó secar y luego se disolvió en 30 ml de agua desionizada y se dializó. Para eliminar las proteínas se trató con 250 µl de proteinasa K (2mg/ml), para ello se resuspendió con 10 ml de Tris-HCl 0.01 M. pH 7.8 y se agregó la proteinasa K a una concentración de 50 µg/ml durante una hora a 55°C y la reacción se detuvo con 8.32 ml de TCA 0.11 *M* a 4°C por 1 hora. Después de centrifugar el material (500 x *g*/15 min), se dializó contra agua destilada. Esto es lo que constituyó el extracto polisacárido (47). Se guardó una alícuota para la determinación de azúcares por el método de Dubois (48) y el resto del extracto se liofilizó.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los extractos proteico extracelular, intracelular y polisacárido se esterilizaron por medio de filtración a través de una membrana de tamaño de poro de 0.45 μm (millipore), antes de su uso.

3.2 ANALISIS DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.

3.2.1 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Se determinó la concentración de proteínas de cada uno de los extractos obtenidos. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar albúmina sérica bovina a concentraciones de 2 a 18 μg/ml y como blanco agua destilada. A 0.5 ml de las muestras, blanco y estándares se les adicionó 0.5 ml del reactivo de Bradford (6 mg de azul de Coomassie G-250 en ácido perclórico al 3 %), se agitó en vortex y se dejó reposar 30 minutos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 595 nm. La concentración de proteínas de las muestras se determinó interpolando la absorbancia de cada una de ellas, en la curva de calibración (46).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.2 Determinación de la concentración de azúcares por el método de Dubois.

Se determinó la concentración de azúcares de cada uno de los extractos obtenidos. Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar galactosa a concentraciones de 10 a 100 µg/ml y como blanco agua destilada. A 1 ml de los estandares, blanco y muestras se les agregó 0.5 ml de fenol al 5% y 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agitó y se colocó en un baño de agua a 25-30°C durante 20 minutos. La absorbancia se midió a 490 nm. La concentración de azúcares en las muestras se obtuvo interpolando la absorbancia de cada una de ellas en la curva de calibración (48).

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

3.2.3.1 Preparación de geles.

Se analizaron los diferentes extractos obtenidos, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gradiente de 10 a 18% de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli, con un gel de empaquetamiento 5% T, 2.7% C

El gel de corrimiento 10-18% T se preparó de la siguiente manera:

Concentración % T	10%	18%
Acrilamida-Bis-Acrilamida (30% T, 2.7% C)	3.720 ml	1.259 ml
Amortiguador Tris-HCl 3.02 M, pH 8.8	1.396 ml	0.396 ml
Glicerol 50% v/v	0.144 ml	0.222 ml
Agua destilada	0.874 ml	0.193 ml
SDS 10 % (p/v)	0.020 ml	0.020 ml
Persulfato de Amonio 10% (p/v)	0.007 ml	0.007 ml
TEMED	0.001 ml	0.001 ml

El gel se realizó en el sistema de electroforesis Mini-Protean II (BIO-RAD). El gel de corrimiento se preparó con la ayuda de un dispositivo formador de gradiente (BIO-RAD), conectados a una bomba peristáltica Microperpex 2132 (LKB). La solución de acrilamida bis-acrilamida al 10 % se vació en el compartimento izquierdo del aparato y la solución de acrilamida bis-acrilamida al 18% en el compartimento de la derecha. Las dos soluciones se mezclaron en el compartimento de la derecha con ayuda de un agitador magnético, al abrir la cámara que une a ambos compartimentos. El mini cassette que se utilizó tiene una medida de 10 X 7 cm con espaciadores de 0.75 cm, al cual se agregó la mezcla a una velocidad de aproximadamente de * ml por min con ayuda de la bomba peristáltica. Una vez que se terminó de pasar la mezcla, se dejó polimerizar durante 1 hora colocando agua destilada sobre la superficie del gel

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

formando una interfase. Posteriormente se secó la capa de agua con papel filtro y se colocó un peine de teflón con los carriles deseados y se procedió a colocar el gel de *empaquetamiento* con una pipeta Pasteur.

El gel de empaquetamiento 5% T, 2.7% C se preparó de la siguiente manera:

Acrilamida-Bis-Acrilamida (30% T, 2.7% C)	0.499 ml
Amortiguador Tris-HCl 1 M, pH 6.8	0.375 ml
Agua destilada	1.980 ml
SDS 10% (p/v)	0.030 ml
Persulfato de amonio 10 % (p/v)	0.105 ml
TEMED	0.003 ml

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Después de polimerizado el gel, se sacó el peine y se lavaron los pozos con agua destilada.

3.2.3.2 Corrimiento electroforético de los extractos.

El cassette se colocó en la cámara de electroforesis y se aplicó el amortiguador de corrimiento (Tris-HCl 125 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1% p/v). El gel se precorrió a 50 V por 20 minutos con ayuda de una fuente de poder modelo PowerPac1000 (BIO-RAD).

37.5 µl de las muestras se mezclaron con 12.5 µl de amortiguador de muestra 4X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% p/v, β mercaptoetanol 10% v/v, glicerol al 50% v/v, y azul de bromofenol 0.2% como indicador de frente de corrida) y se sometieron a ebullición por 2 minutos. Posteriormente las muestras y los marcadores de peso molecular (36 µg y 6 µl, respectivamente) se aplicaron cuidadosamente en cada carril. La electroforesis se inició a 80 V hasta que el frente de corrida llegó al gel de corrimiento, y entonces se aumentó el voltaje a 150 V, hasta que el frente del colorante alcanzó la parte inferior del gel.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ALERE FLAMMAM VERITATIS

3.2.3.3 Tinción con azul de Coomassie.

El gel se sumergió en 50 ml de azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.1% p/v en metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v en agua destilada) toda la noche. El gel se destiñó con 200 ml de solución desteñidora (metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v en agua destilada) hasta que se eliminó el colorante no unido a proteínas.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.4 Cromatografía en capa fina del extracto lipídico de *Mycobacterium tuberculosis*.

La cromatografía se llevó a cabo en cromatofolios de aluminio con silicagel 60 F_{254}, con un espesor de capa de 0.2 mm (Merck). Se utilizaron como estándares los siguientes lípidos polares: fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidilinositol (Sigma). Tanto los estándares como la muestra se disolvieron en 1 ml de cloroformo. Se sembraron en el cromatofolio las siguientes cantidades: 5 µl (25 µg) de cada uno de los estándares, 3 y 6 µl del extracto lipídico.

Se utilizó una cámara de vidrio de 11 X 14 X 9.6 cm y una fase móvil compuesta de los siguientes solventes: cloroformo-acetona-metanol-ácido-acético-agua en una proporción de 50: 20: 10: 10: 5 v/v. La cámara de vidrio se dejó saturar con los vapores del solvente por 30 minutos y luego se colocó el cromatofolio y se retiró hasta que el frente del eluente llegó al extremo superior del cromatofolio. Se dejó secar y se reveló con ácido fosfomolibdico en etanol al 10% y calor; para ello después de rociar el ácido fosfomolibdico uniformemente sobre la superficie de la placa se colocó a 120°C durante 1-2 minutos hasta obtener la formación de un color óptimo.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.5 Preparación del extracto lipídico.

Se prepararon diferentes diluciones de glicerol y dimetil sulfóxido para probar en cuál de ellas se disolvían mejor los lípidos. Se trabajó con soluciones concentradas, al 10%, 20% y 50% de cada uno, en amortiguador de fosfatos (PBS) v/v. Después de haber pesado los lípidos secos, se procedió a agregarlos en cada una de los solventes para tener una concentración de 1 mg/ml en cada uno de ellos, y se agitó en el vortex para disolverlos. Posteriormente se determinó qué concentración de cada uno de ellos era menos tóxica para las células; para esto, 1 ml de una suspensión celular (1×10^6 células/ml) se puso en contacto con 10, 50 y 100 µl de cada una de las soluciones y se incubó durante 48 horas. Se midió viabilidad a las 24 y 48 horas de incubación, por el método de exclusión de azul tripano.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3 OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

3.3.1 Separación de células mononucleares, por la técnica de separación en gradiente de densidad, Ficoll-diatrizoato de sodio.

A 32 personas se les aplicó la intradermoreacción a PPD, de los cuales 12 personas fueron PPD negativo. Se utilizaron las 12 personas que resultaron ser PPD negativo. en un rango de edad entre 18 y 45 años. Se obtuvieron 30 ml de sangre venosa periférica con 100 unidades de heparina. Se hizo una

dilución 1:2 de la sangre con solución amortiguadora salina fosfato (PBS), pH de 7.2, se colocaron 10 ml de sangre diluida sobre 5 ml de Ficoll-diatrizoato de sodio (densidad de 1.077) sin mezclar. Se procedió a centrifugar a 120 x *g* durante 30 minutos y luego se removió la capa de células mononucleares, las cuales se lavaron 3 veces con solución amortiguadora salina fosfato (PBS), centrifugando en cada lavado a 140 x *g*/10 minutos. El botón celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina 2 mM, 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina G, 50 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomicina. Las células obtenidas se contaron en una cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:10 con ácido acético y se ajustó a una concentración de $1x10^6$ células/ml. También se observó la viabilidad celular por medio de la técnica de exclusión del colorante azul tripano.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4 DETERMINACION DE LA CINETICA DEL CAMBIO DE EXPRESION DE LA MOLECULA B7 EN MONOCITOS HUMANOS.

Todos los experimentos se realizaron en tubos de poliestireno Beckton Dickinson para citometría de flujo (Falcon).

3.4.1. Determinación de la cinética de expresión de la molécula B7-1 en monocitos humanos.

Para determinar el tiempo de incubación, en el que se observa la máxima expresión de la molécula B7-1 en la membrana de monocitos, se incubaron $1x10^6$ células mononucleares por 24, 48, 72, 96 y 120 horas a 37°C y 5% de CO_2, estimulando con LPS de *E. coli* 055:B5 e interferón α (INTRON). En cada tiempo se llevó un control sin estímulo, el cual consistió de células mononucleares únicamente con medio de cultivo. Después de cada uno de los tiempos correspondientes se realizó un lavado con medio de cultivo centrifugándose a 140 x *g* por 10 minutos, luego se decantó y al botón celular se agregó 20 µl del anticuerpo monoclonal anti B7-1 conjugado con ficoeritrina (PE) (Beckton Dickinson) a cada uno de los tubos. Se procedió a incubar 30 minutos en frío y posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS, pH de 7.2 para eliminar el exceso de anticuerpo y se resuspendió finalmente en 1 ml de formaldehído al 2% en PBS, pH de 7.2. La medición de la expresión se realizó mediante citometría de flujo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4.2. Determinación de la cinética de expresión de la molécula B7-2 en monocitos humanos.

Para determinar el tiempo de expresión de la molécula B7-2 en la membrana de monocitos, se incubaron $1x10^6$ células mononucleares por 24,

48, 72, 96 y 120 horas a 37°C y 5% de CO_2, estimulando las células mononucleares con LPS de *E. coli* 055:B5, Concanavalina A (Con A) e interferón γ. En cada tiempo se llevó un control sin estímulo. Después de cada uno de los tiempos correspondientes se realizó un lavado con medio de cultivo y se centrifugó a 140 x *g* durante 10 minutos, luego se agregó 50 µl del anticuerpo monoclonal anti B7-2 conjugado con PE (Ancell Corporation) a cada uno de los tubos. Se procedió a incubar 45 minutos en frío y posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS, pH de 7.2 y se resuspendió en 1 ml de formaldehído al 2% en PBS, pH de 7.2. La medición de la expresión se realizó mediante citometría de flujo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ALERE FLAMMAM VERITATIS
UANL

3.5 DETERMINACION DEL EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE CADA UNO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA-DR Y B7-2 DE MONOCITOS HUMANOS.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se trabajó con 5 grupos y cada uno fue realizado por duplicado para determinar en una serie de tubos la expresión de HLA-DR y en la otra serie la expresión de B7-2. Se trabajó con $1x10^6$ células/ml, y cada grupo fue estimulado con las proteínas extracelulares, extracto celular, extracto polisacárido, extracto lipídico y ácidos micólicos de *Mycobacterium tuberculosis* (SIGMA), respectivamente. Se estimularon con 4 diferentes dosis de cada antígeno: 10, 50, 100 y 150 µg/ml y como control de expresión basal, las

células únicamente con medio de cultivo RPMI 1640. También se incluyó como control, células tratadas con dimetil sulfóxido (DMSO). La serie de tubos para determinar la expresión de HLA-DR se incubó 48 horas y la serie de tubos para determinar la expresión de B7-2 se incubó 24 horas. Después del tiempo de incubación respectivo se realizó un lavado con medio de cultivo RPMI 1640 y se centrifugó a 140 x *g* durante 10 minutos y se decantó. A la primera serie de tubos se agregó 10 µl de anticuerpo monoclonal anti HLA-DR conjugado con FITC (SIGMA), y a la segunda serie 50 µl del anticuerpo monoclonal anti B7-2 conjugado con PE (Ancell Corporation). Se procedió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente para HLA-DR y 45 minutos en frío para B7-2 y posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS, pH de 7.2 y se resuspendió en 1 ml de formaldehído al 2 % en PBS, pH de 7.2. La medición de la expresión se llevó a cabo en un citómetro de flujo Beckton Dickinson Modelo B0273 FACSort, para lo cual se utilizó el software Lysis II. Los resultados se obtuvieron mediante gráficas y % de células que expresaron cada una de las moléculas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todos los tubos con células mononucleares estimuladas y no estimuladas se analizaron por expresión de imagen en el citómetro de flujo con fuente láser 15.0 mW. Se manejaron como controles:

a). Autocontrol de fluorescencia: Consistió en agregar a las células mononucleares sin estímulo, 10 µl del diluyente (PBS, pH de 7.4) en lugar del anticuerpo monoclonal.

b). Isocontrol de fluorescencia: Consistió en agregar a las células mononucleares sin estímulo 10 µl de un anticuerpo heterólogo, (γ_1/γ_{2a})que es la combinación de dos anticuerpos monoclonales murinos, uno conjugado con FITC y el otro concjugado con PE.

La lectura fué exclusivamente de monocitos por parámetros de medición del citómetro de flujo (región o gate).

Los resultados se obtuvieron mediante gráficas y % de células que expresan cada una de las moléculas y se analizaron estadísticamente por la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4. RESULTADOS

4.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Mycobacterium tuberculosis.*

4.1.1 Rendimiento de proteínas extracelulares.

Se recuperó en promedio 2000 ml de medio de cultivo, de cada cosecha del cultivo de *M. tuberculosis.* Se obtuvieron 35.5 mg de proteínas, determinadas por el método de Bradford con un contenido de polisacáridos de 3.9 mg, determinados por el método de Dubois. Al realizar electroforesis en condiciones desnaturalizantes se observó que hay un contenido de proteínas que están distribuidas entre los marcadores de 14 a 66 kDa (figura 1, carril 1).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1.2 Rendimiento del extracto celular de *M. tuberculosis.*

El promedio de masa bacteriana seca obtenida de 5 cosechas de cultivo de *M. tuberculosis* de 20 matraces de medio de cultivo PBY fue de 10 g por cosecha, de la cual se obtuvo 6.11 mg de proteínas. En la figura 1 se muestra el patrón electroforético del extracto celular en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y teñido con azul de Coomassie (carril 4), en el

que se observa una serie de bandas con un peso molecular entre 66 y 14 kDa y también se observan bandas por arriba del marcador de 66 kDa y por abajo de 14 kDa. Es importante señalar que el extracto celular, tiene un alto contenido de polisacáridos (4819.37 μg/ml), en una relación de 1:10 de proteína: polisacárido.

4.1.3 Rendimiento y análisis del extracto polisacárido de *M. tuberculosis.*

A partir de 8 g de masa bacteriana seca, se obtuvieron 31.3 mg de polisacáridos (determinación de galactosa por el método de Dubois), con un contenido de proteínas de 2.43 mg. Se desproteinizó 28 mg del extracto polisacárido y se obtuvo 21.56 mg de polisacáridos con trazas de proteínas. Después se realizó electroferesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no se observó ninguna banda al teñir con azul de Coomassie (figura 1, carril 3).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los resultados de las proteínas extracelulares, extracto celular y polisacáridos se encuentran en la tabla I y figura 1.

TABLA I. Concentración de proteínas y carbohidratos de los extractos de *M. tuberculosis* H37Rv.

Extracto	Proteínas (Bradford) µg/ml	Carbohidratos (Dubois) µg/ml
Proteínas Extracelulares	1965	230
Celular	453.7	4819.37
Polisacárido	0.8	770

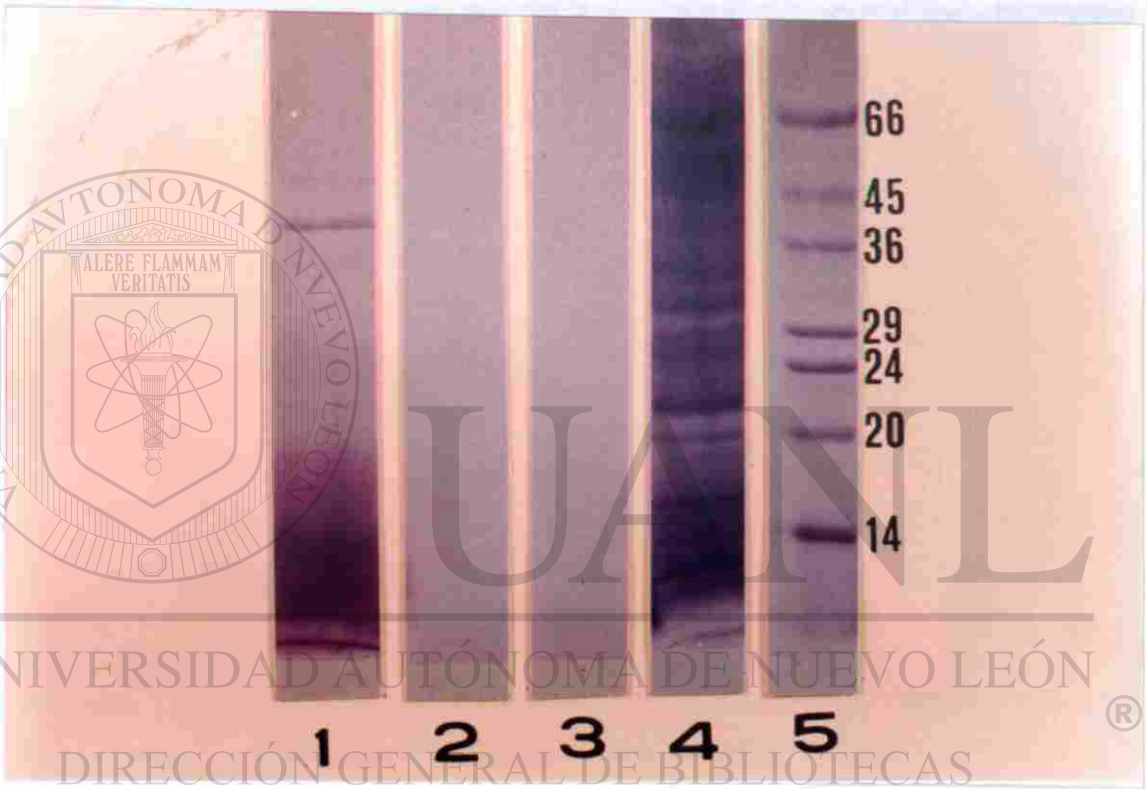
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ALERE FLAMMAM VERITATIS

4.1.4 Rendimiento y análisis del extracto lipídico de *M. tuberculosis*.

A partir de la deslipidización con etanol-éter de 10 g de masa bacteriana, se obtuvo aproximadamente 200 ml de la mezcla etérea, en el cual estaban contenidos los lípidos.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al realizar cromatografía en capa fina del extracto lípidico y revelar con ácido fosfomolíbdico y calor, se observó que el extracto contiene lípidos de naturaleza polar y no polar (figura No. 2). En cuanto a contenido proteico, al realizar electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, no se observaron bandas que indiquen la presencia de proteínas (figura No. 1,carril 2).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig No. 1. Análisis de proteínas de los extractos de *M. tuberculosis* H37Rv en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en gradiente de 10-18% T, 2.7% C. Carril 1). Proteínas Extracelulares. Carril 2). Extracto polisacárido. Carril 3). Extracto lipídico. Carril 4). Extracto celular. Carril 5). Marcadores de peso molecular. Tinción con azul de Coomassie.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura No. 2. Cromatografía en capa fina del extracto lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv. Microplaca revelada con ácido fosfomolíbdico y calor. Carril 1). Fosfatidiletanolamina. Carril 2). Fosfatidilcolina. Carril 3). Esfingomielina. Carril 4). Fosfatidilinositol. Carril 4 y 5) Extracto lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv, 3 y 6 μl, respectivamente.

4.1.5 Preparación del extracto lipídico de *M. tuberculosis.*

Al tratar de disolver los lípidos secos obtenidos de *M. tuberculosis* H37Rv, tanto en glicerol como en dimetil sulfóxido, se observó que se disolvieron mejor en dimetil sulfóxido en todas las diluciones probadas (concentrado,10%, 20% y 50%), que en glicerol. Posteriormente, se probó si el glicerol y dimetil sulfóxido eran tóxicos para las células y se observó que ninguno producía muerte celular (96% de viabilidad) a una concentración de 10 y 20%, tanto a las 24 horas como a las 48 horas. De acuerdo a estos resultados, optamos por disolver los lípidos con DMSO al 10%, el cual se utilizó durante todo el trabajo experimental (Figura 3).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

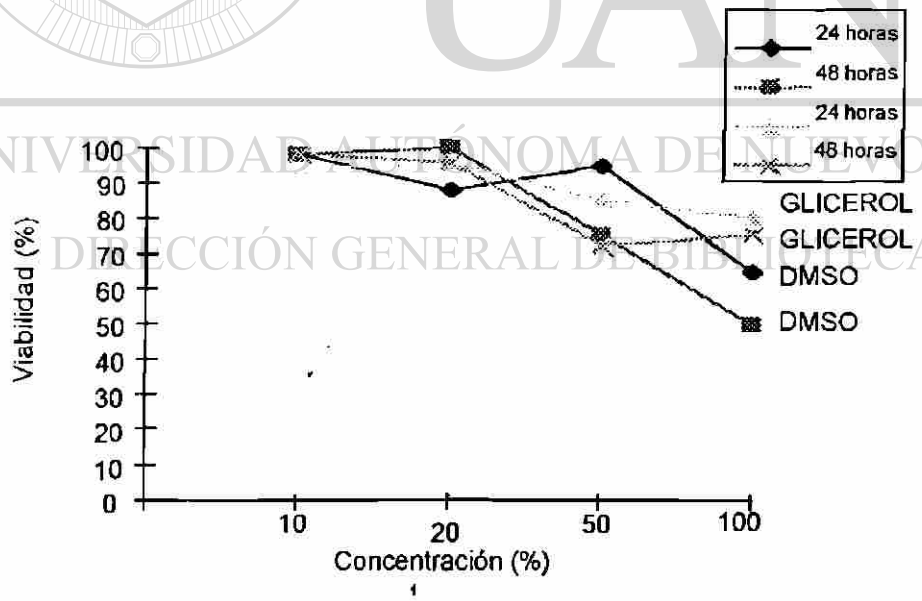


Figura 3. Viabilidad celular de las células mononucleares, al ponerlas en contacto con DMSO y glicerol.

4.2 DETERMINACION DE LA CINETICA DEL CAMBIO DE EXPRESION DE LA MOLECULA B7 EN MONOCITOS HUMANOS.

4.2.1 Determinación de la cinética de expresión de la molécula B7-1 (CD80) en monocitos humanos.

Se realizaron 3 experimentos para determinar, la expresión de la molécula B7-1, estimulando con LPS de *E. coli* 055:B5 e interferón α. De acuerdo a los resultados obtenidos, la molécula B7-1 en monocitos humanos, se expresó en cantidades muy bajas, ya que el porcentaje de células positivas determinadas por citometría de flujo fue relativamente escaso. Los resultados se representan en la tabla II y figura 4. También se estimuló con interferón γ con una concentración de 500, 1000 y 2000 U/ml, incubando por 24 horas, obteniéndose resultados similares (tabla III).

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA II. Expresión de B7-1 (CD80) en monocitos humanos estimulando con LPS e interferón α.

Tiempo de ncubación	s/estímulo RPMI 1640	LPS (10 µg/ml)	Interferón α 1000 U
	% células positivas		
24 horas	0.45	0.39	0.79
48 horas	0.38	0.72	1.15
72 horas	0.5	0.49	0.89
96 horas	0.4	0.49	1.22
120 horas	0.85	0.5	0.89
144 horas	0.49	0.73	0.64

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA III. Expresión de la molécula B7-1 en monocitos humanos, estimulados con interferón γ.

	S/estímulo	Interferón γ		
	RPMI 1640	500 U	1000 U	2000 U
% células	1.24	1.13	1.15	0.91

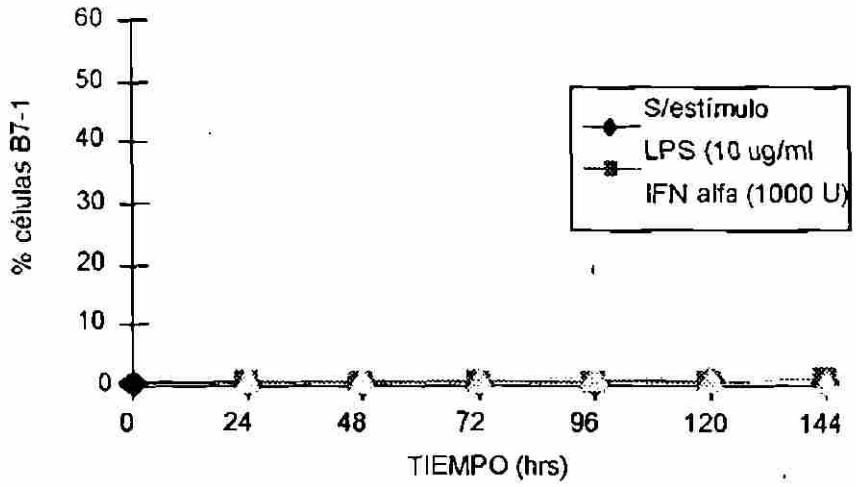


Figura 4. Expresión de la molécula B7-1 (CD80) en monocitos humanos, estimulados con LPS e IFN alfa.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ALERE FLAMMAM VERITATIS
UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.2 Determinación de la cinética de expresión de la molécula B7-2 (CD86) en monocitos humanos.

Se estimularon 1 x 10^6 células/ml con diferentes dosis de LPS de *E. coli* 055:B5 e interferón γ y además con Concanavalina A. Con LPS se observó un aumento en la expresión, a una dosis de 25 µg/ml, a un tiempo de 24 horas, con una tendencia a la disminución al aumentar el tiempo de incubación (tabla IV y figura 5). Al estimular las células con Concanavalina A e interferón γ no obtuvimos un aumento en la expresión de ésta molécula (figuras 6 y 7). De acuerdo, a los resultados obtenidos con lipopolisacáridos, se decidió tomar el tiempo de 24 horas, como el tiempo máximo de expresión de la molécula B7-2 y la concentración de 25 µg como control positivo de expresión.

TABLA IV. Expresión de la molécula B7-2 (CD86) en monocitos humanos, estimulados con LPS.

	s/estímulo	LPS * (2 µg/ml)	LPS 5 µg/ml	LPS 10 µg/ml	LPS 25 µg/ml	LPS 50 µg/ml
Tiempo 0	19.54					
24 horas	55.52 %	60.32 %	★	61.95 %	68.69 %	56.63 %
48 horas	46.11 %	40.46 %	29.99 %	49.63 %	39.72 %	25.95 %
72 horas	33.54 %	25.83 %	★	36.84 %	27.32 %	27.54 %
96 horas	15.17 %	17.50 %	★	15.24 %	14.01 %	13.84 %
120 horas	30.01 %	23.62 %	★	15.87 %	16.37 %	13.78 %

★ No se determinó

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

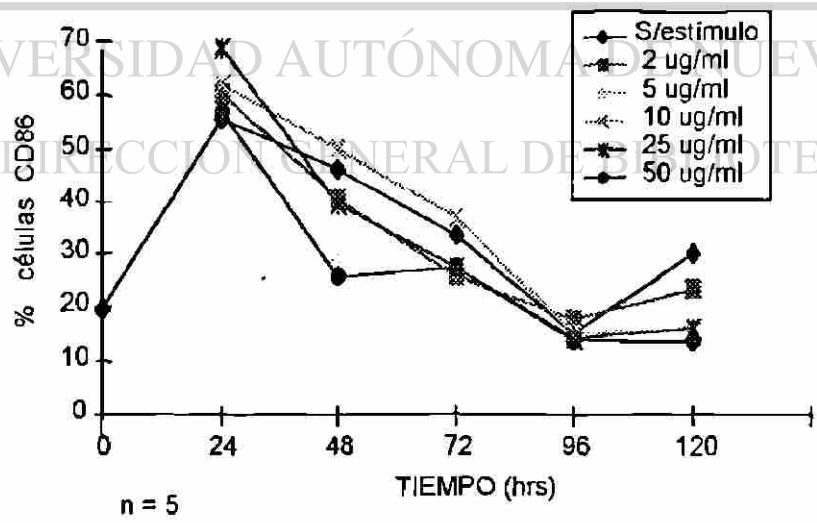


Figura 5. Expresión de B7-2 (CD86) en monocitos humanos, estimulados con lipopolisacáridos de *E. coli* 055:B5

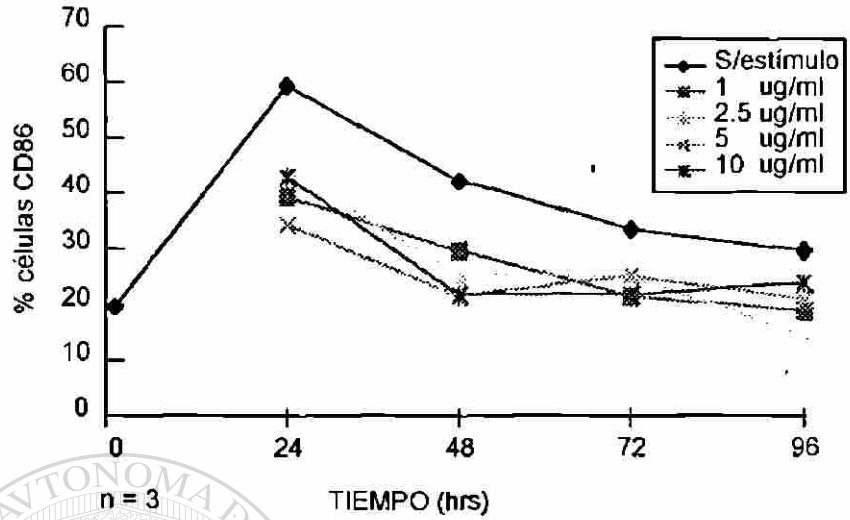


Figura 6. Expresión de B7-2 (CD86) en monocitos humanos, estimulados con Concanavalina A.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

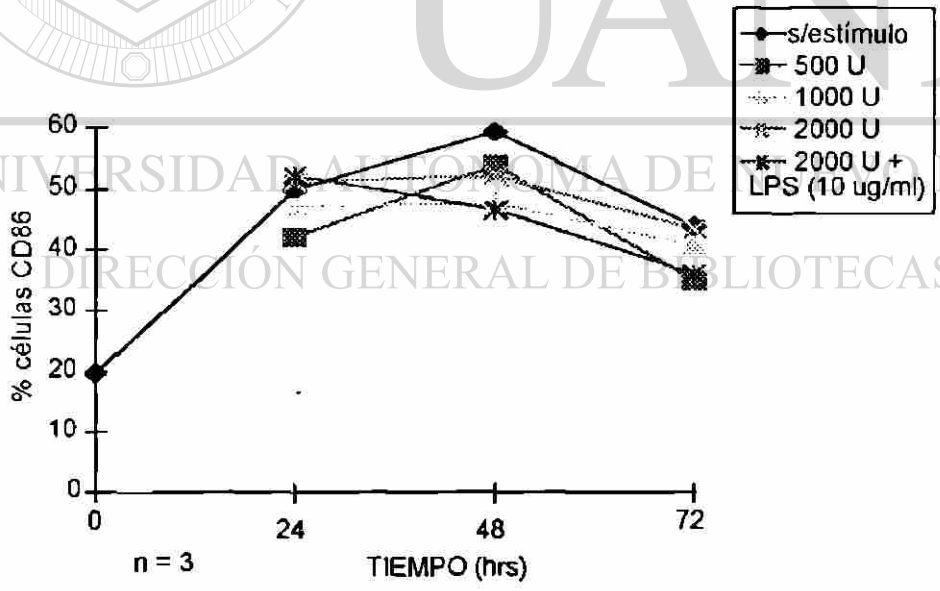


Figura 7. Expresión de B7-2 (CD86) en monocitos humanos, estimulados con interferón gamma.

4.3 Determinación del efecto de diferentes dosis de cada uno de los *extractos sobre la expresión* de las moléculas HLA-DR y B7-2 de monocitos humanos.

La determinación de la expresión de las moléculas de superficie de monocitos humanos, HLA-DR y B7-2, estimulados con 4 diferentes dosis de cada uno de los antígenos en estudio (proteínas extracelulares, extracto celular, extracto polisacárido, extracto lipídico y ácidos micólicos) se realizó en monocitos de sujetos sanos PPD negativos. La expresión de la molécula HLA-DR se llevó a cabo en 10 sujetos sanos y la expresión de las molécula B7-2 en 12 sujetos sanos. Los resultados están representados como la media del % de células que expresan dichas moléculas determinadas por citometría de flujo.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de Wilcoxon para pruebas pareadas, comparando el resultado de cada uno de los grupos con el resultado de expresión basal (células no estimuladas).

4.3.1 Expresión de la molécula HLA-DR en monocitos humanos, estimulados con diferentes dosis de cada uno de los extractos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

En la tabla V se representan los resultados obtenidos como la media del % de células HLA-DR de 10 experimentos ± desviación estándar, al estimular con las 4 dosis utilizadas de cada extracto y del control basal. Se puede observar un aumento de la expresión con todos los extractos al compararlos con el % obtenido con las células no estimuladas. También se muestra el % de células positivas al estimular con DMSO.

Al estimular con proteínas extracelulares a dosis de 50 y 100 μg/ml se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) . Los resultados están representados en la figura No. 8. En la figura No. 9 se muestran los resultados de células estimuladas con el extracto celular de *M. tuberculosis*, observándose un incremento directamente proporcional a la dosis utilizada, iniciando este incremento con la dosis de 50 μg/ml ($p = 0.05$) y siendo más significativo al aumentar la dosis a 100 μg/ml ($p < 0.05$) y 150 μg/ml ($p< 0.005$). La figura 10 muestra los resultados de expresión de HLA-DR, cuando las células fueron estimuladas con el extracto polisacárido. Al estimular con las 3 últimas dosis de polisacáridos se observó un incremento significativo ($p < 0.05$).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la figura 11 y 12, se representan los resultados de las células estimuladas con lípidos y ácidos micólicos; con ambos estímulos podemos observar que se produjo un incremento estadísticamente significativo en la expresión, iniciándose con lípidos a la dosis de 50 μg/ml y con ácidos micólicos a la dosis de 100 μg/ml. En la figura 11 también se muestra el resultado al estimular con DMSO a una concentración de 15 μl/ml y 1.25 μl/ml, con los cuales se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Estos experimentos se realizaron para ver si podría estar interfiriendo el DMSO en el efecto de los lípidos.

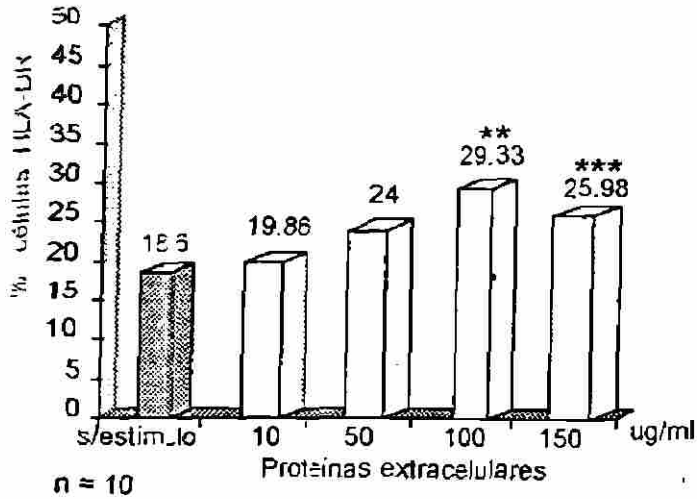
UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA V. Expresión de la molécula HLA-DR, en monocitos humanos, estimulados con diferentes dosis de extractos de *M. tuberculosis* H37Rv..

	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml
Extracto proteico extracelular	19.86 ± 9.69	24.0 ± 12.58 **	29.33 ±13.18 ***	25.98 ±15.07
Extracto celular	21.98 ± 6.93	28.72 ±13.43 *	32.86 ±15.91 **	48.42 ±31.43 ****
Extracto polisacárido	25.44 ±16.52	26.56 ±14.27 **	30.57 ±21.11 **	27.43 ±15.14 **
Extracto lipídico	22.25 ±11.08	28.71 ±16.32 *	35.05 ±19.20 **	32.12 ±14.21 ***
Acidos micólicos	26.31 ±13.74	25.11 ±14.41	29.1 ± 15.22 **	32.39 ±21.39 **
Sin estímulo	18.62 ± 6.57			
DMSO (15 µl/ml)	33.25 ±13.44 **			

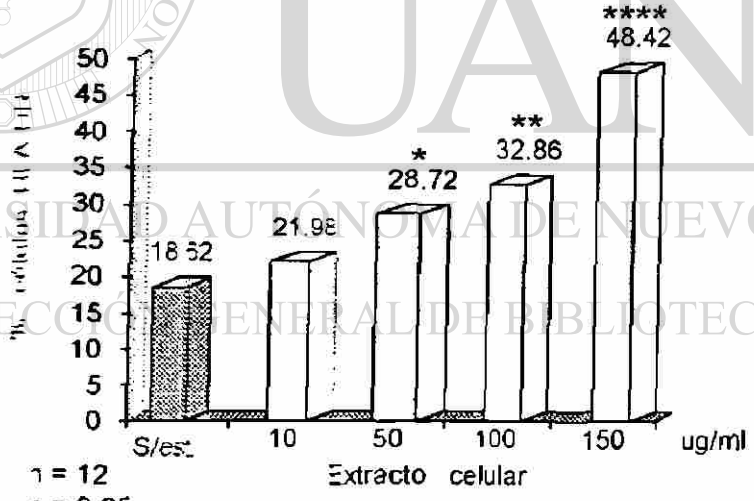
* p = 0.05 ** p < 0.05 *** p = 0.005 **** p < 0.005

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



n = 10
** p < 0.05
*** p = 0.005

Figura 2 Expresión de la molécula HLA-DR en monocitos humanos, estimulados con proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* H37Rv.



n = 12
* p = 0.05
** p < 0.05
**** p < 0.005

Figura 3 Expresión de la molécula HLA-DR en monocitos humanos, estimulados con extracto celular de *M. tuberculosis* H37Rv.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

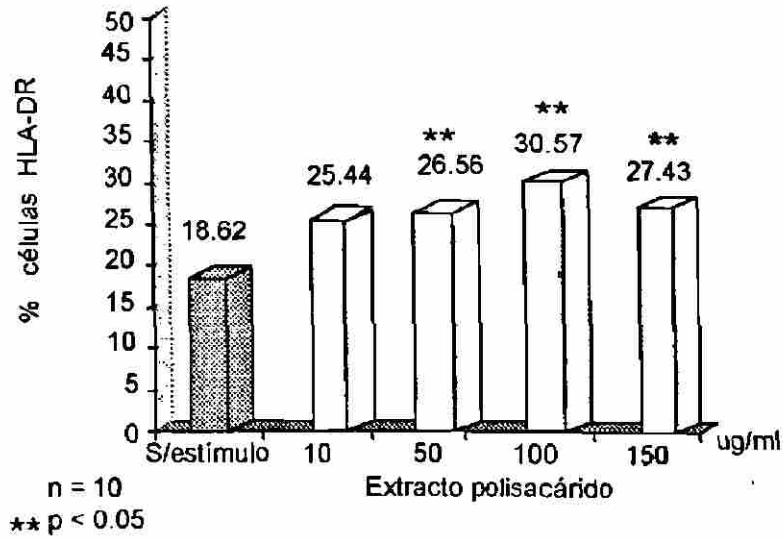


Figura 10. Expresión de la molécula HLA-DR en monocitos humanos, estimulados con extracto polisacárido de *M. tuberculosis* H37Rv.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
UANL
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

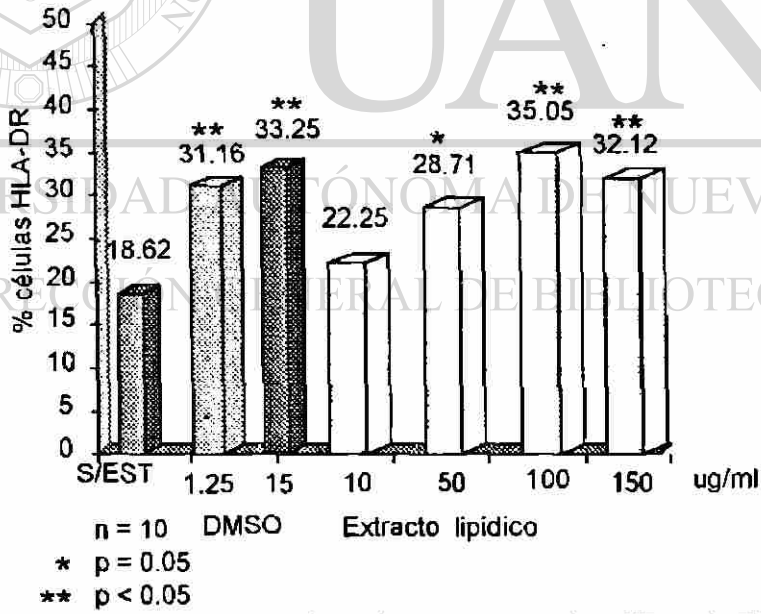


Figura 11. Efecto del extracto lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv y de DMSO, sobre la expresión de las moléculas HLA-DR en monocitos humanos

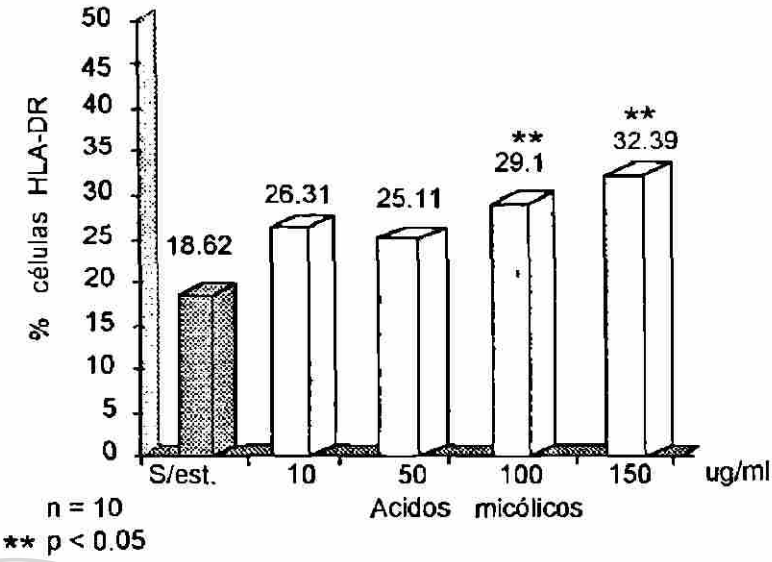


Figura 12. Efecto de ácidos micólicos de *M. tuberculosis*, sobre la expresión de las moléculas HLA-DR en monocitos humanos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.3.2 Expresión de la molécula B7-2 en monocitos humanos, estimulados con diferentes dosis de cada uno de los extractos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv..

En la tabla VI se representan los valores de expresión de la molécula B7-2 (CD86), cuando las células fueron estimuladas con las diferentes dosis de cada uno de los extractos y ácidos micólicos de *M. tuberculosis* y del control basal. Comparando las células que fueron estimuladas con proteínas extracelulares a la dosis de 100 y 150 µg/ml (figura 13) y con el extracto lipídico a una dosis de 50 y 100 µg/ml (figura 16), con el control basal se observó una disminución significativa en la expresión de la molécula B7-2. En la figura 14, 15 y 17 se representan los resultados

obtenidos al estimular con las 4 dosis de extracto celular, extracto polisacárido y ácidos micólicos, respectivamente; donde no se observó ningún cambio en la expresión de la molécula B7-2. En la figura 16 también se muestra el valor del % de células positivas B7-2 cuando las células se estimularon con DMSO, el cual no modificó la expresión de dicha molécula.

TABLA VI. Expresión de B7-2 en monocitos humanos, estimulados con diferentes dosis de los extractos de *M. tuberculosis* y ácidos micólicos.

	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml
Proteínas extracelulares.	47.12 ±17.82	37.31 ±23.19	33.02 ±19.25 ***	37.08 ±15.09 *
Extracto celular (Proteínas intracelulares)	48.18 ±21.12	54.47 ±23.07	47.99 ±23.68	42.65 ±24.65
Extracto polisacárido	50.25 ±22.08	47.25 ±24.71	45.67 ±25.9	46.65 ±27.48
Extracto lipídico	43.15 ±26.3	41.69 ±24.69 *	41.07 ±22.21 **	44.22 ±23.09
Acidos micólicos	45.65 ±25.19	45.22 ±25.92	47.39 ±25.99	47.56 ±24.55
(DMSO (15µl/ml)	54.32			
Sin estímulo	51.41 ±22.2			

* p = 0.05 ** p = 0.01 *** p < 0.01

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

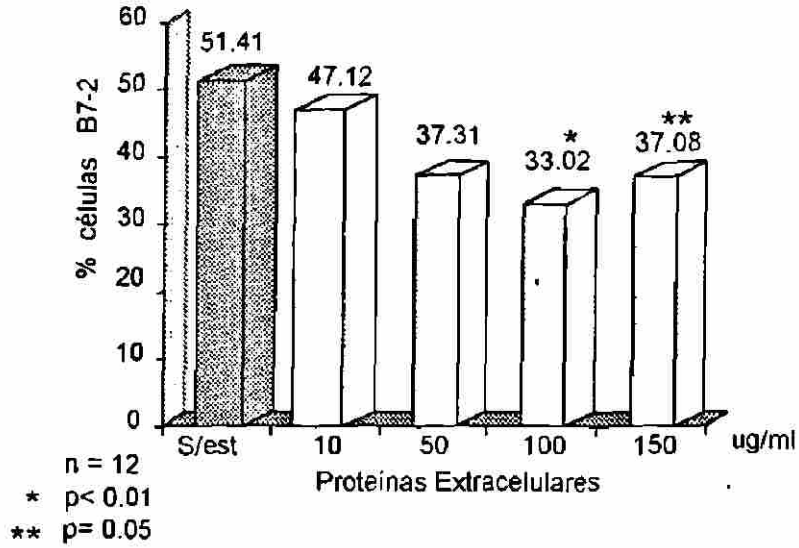


Figura 13. Expresión de B7-2 en monocitos humanos, estimulados con proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* H37Rv.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ALERE FLAMMAM VERITATIS
UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

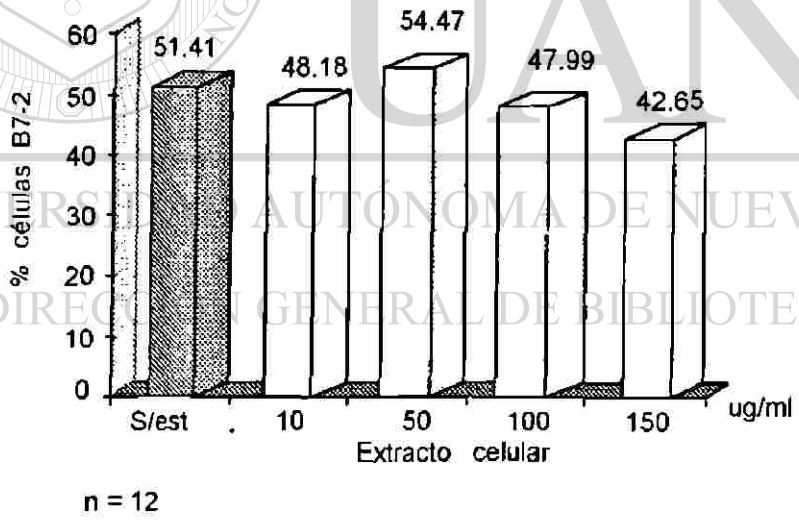


Figura 14. Expresión de la molécula B7-2 en monocitos, estimulados con extracto celular de *M. tuberculosis* H37Rv.

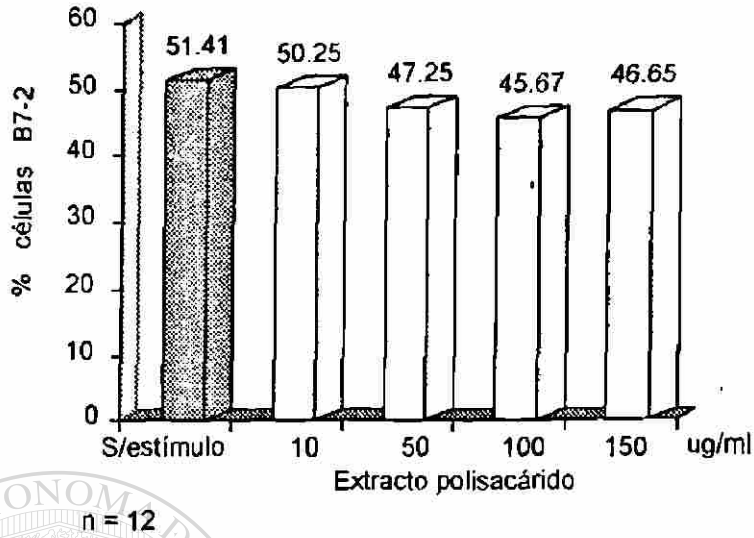


Figura 15. Expresión de B7-2 en monocitos humanos, estimulados con extracto polisacárido de *M. tuberculosis* H37Rv.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

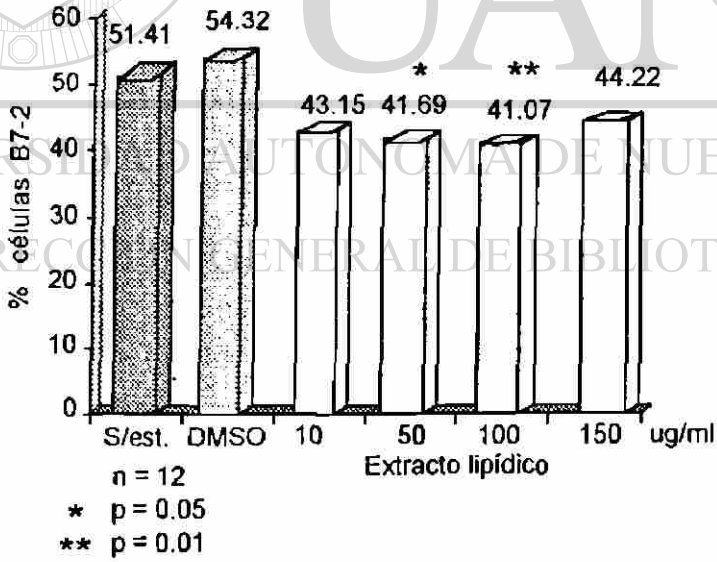


Figura 16. Expresión de B7-2 en monocitos humanos, estimulados con extracto lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv.

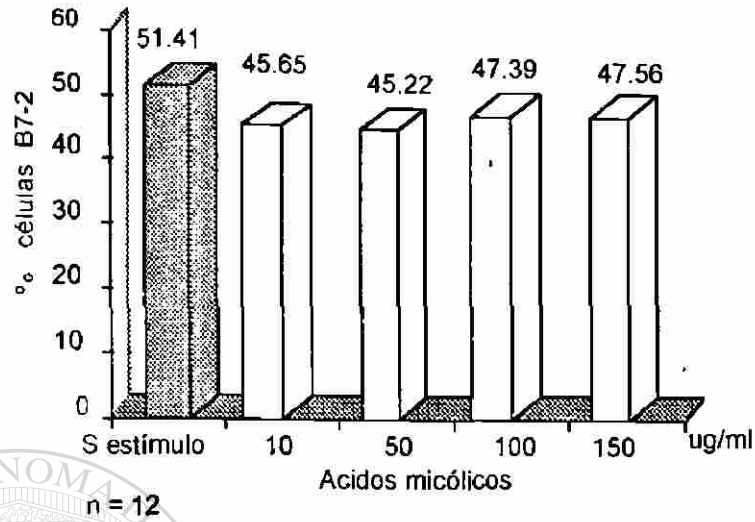


Figura 17 x sión de la molécula B7-2 en monocitos humanos, e ados con ac dos micólicos de *M. tuberculosis.*

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSION

La interacción entre las células presentadoras de antígenos y linfocitos T conduce a una respuesta proliferativa de estos últimos y requiere de señales coestimulatorias. En este trabajo, al determinar la cinética de expresión de B7 (B7-1 y B7-2), encontramos que B7-2 (CD86) se expresa en mayor cantidad que B7-1 (CD80) y al estimular con LPS, Con A e IFN γ, encontramos que el LPS es el mejor estimulante para inducir la expresión de B7-2. Estudios realizados en células B murinas reportan que B7-2 se expresa en mayor cantidad que B7-1 y que son sobreexpresadas cuando se estimula con LPS, teniendo un máximo de expresión de B7-2 (CD86) a las 24 horas y de B7-1 (CD80) a los 3 días. También observaron que Con A es estimulante para ambas moléculas (50). En linfocitos B humanos han reportado un pico de expresión de B7-2 a las 24 horas de activación y que el pico máximo de expresión para B7-1 se produce días más tarde (26). Nosotros encontramos resultados similares en cuanto a la expresión de B7-2 en monocitos humanos, ya que también se obtuvo un tiempo máximo de expresión de 24 horas y se incrementó con LPS, pero no con B7-1, ya que se estudió hasta el sexto día y no se encontraron cantidades apreciables de la molécula. Con A produjó una inhibición en la expresión de B7-2. Las diferencias pueden deberse a que los

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

estudios reportados han sido en linfocitos B de ratón y no en células mononucleares humanas, otros trabajaron con una población homogénea de células B y los resultados los expresaron como media de intensidad de fluorescencia, en cambio nosotros trabajamos con células mononucleares humanas y los resultados los obtuvimos realizando un gate o ventana de monocitos (tomando en cuenta parámetros del citómetro de flujo) y se expresó como el % de células positivas

En cuanto a la expresión de B7-2, estimulando con IFN γ, se tienen resultados que varían, ya que en células B murinas, algunos autores han reportado que IFN γ produce un nivel de expresión más bajo que LPS (51) y otros autores mencionan que IFN γ incrementa la expresión de B7-2 sobre células B y macrófagos peritoneales (52). En nuestro trabajo encontramos que el IFN γ no produjo ningún efecto sobre la expresión de B7-2 en monocitos humanos. Estas diferencias obtenidas pudieran deberse al tipo de célula utilizada en cada modelo experimental o que el monocito como célula precursora responde diferente que el macrófago ya diferenciado con una residencia tisular determinada.

Con referencia al tiempo de expresión de ambas moléculas, algunos autores mencionan que probablemente la molécula B7-2 sea el principal ligando para CD28, ya que tienen un tiempo y patrón de expresión similar, lo cual generaría una señal temprana y positiva para la activación del linfocito T.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como la molécula B7-1 tiene una cinética de expresión similar con CTLA-4, se ha propuesto que sea el principal ligando para CTLA-4 y que probablemente envíe una señal tardía negativa al linfocito T, dado que esencialmente se expresa después de la activación del linfocito T (26).

En la literatura no se ha reportado sobre la cinética de expresión de la molécula B7-2 en monocitos humanos, pero algunos autores mencionan que monocitos, macrófagos y células dendríticas expresan constitutivamente B7-1 y B7-2 y que se incrementan después de la activación (53). Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que efectivamente B7-2 se expresa constitutivamente, ya que al tiempo cero se encontró expresión y que después de la estimulación se incrementó, teniendo un tiempo máximo de expresión de 24 horas. Los resultados obtenidos con B7-1 también expresado constitutivamente en monocitos humanos difieren de los reportados en la literatura con linfocitos B murinos, ya que incubamos hasta 6 días y no encontramos un incremento en la expresión, ni estimulando con LPS o interferón.

No se ha estudiado extensamente la modulación de la expresión de la molécula B7 por mycobacterias. Gercken menciona que la inducción de la expresión de la molécula B7 es marcadamente reducida en monocitos infectados con *M. tuberculosis* (40). En este trabajo no se determinó la expresión de B7-1 en monocitos estimulados con extractos obtenidos de

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M. tuberculosis, debido a que su expresión basal y con estímulo que se obtuvo fue relativamente baja. En el presente estudio se obtuvieron proteínas extracelulares, extracto celular, extracto polisacárido y extracto lipídico de *M. tuberculosis* H37Rv y se probó el efecto de cada uno de ellos en la expresión de la molécula B7-2. También se probó el efecto de ácidos micólicos de *M. tuberculosis* (SIGMA), encontrándose solo un efecto inhibitorio con proteínas extracelulares y con el extracto lipídico. Esta inhibición fue estadísticamente significativa a dosis de 100 y 150 μg/ml con proteínas extracelulares y 50 y 100 μg/ml con extracto lipídico. Relacionando estos resultados con los obtenidos por Gercken (40), puede ser que la carga bacilar sea importante para los cambios funcionales observados, ya que al haber mayor carga bacilar, hay mayor cantidad de proteínas extracelulares liberadas y mayor contenido de lípidos, lo que probablemente cause que estos componentes celulares puedan estar contribuyendo a una coestimulación ineficiente por la célula presentadora de antígenos hacia el linfocito T.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las infecciones micobacterianas se han asociado frecuentemente con daño de la respuesta inmune. Recientemente se ha puesto más atención a una posible alteración en la presentación de antígenos y funciones accesorias de monocitos/macrófagos. Se han realizado diversas investigaciones donde se ha estudiado el efecto de diferentes micobacterias en la expresión de las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, reportándose un efecto inhibitorio, tanto en macrófagos peritoneales de ratón como en

monocitos humanos. Estudios realizados en macrófagos peritoneales de ratón infectados con *Mycobacterium microtti* (49) y *Mycobacterium kansassi* (34) reportaron una supresión en la expresión de las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (moléculas Ia) y demostraron que esta supresión fue proporcional al número de micobacterias utilizadas para la infección, también observaron que esta reducción era más pronunciada con bacilos vivos que muertos por calor. Más recientemente Gercken (40) demostró una significante inhibición de antígenos de clase II en monocitos humanos incubados con *M. tuberculosis,* tanto vivos como muertos por calor. Hallazgos similares fueron obtenidos por Domínguez y Arce al estimular monocitos de sujetos sanos con *M. tuberculosis* H37Rv (44).

En el presente trabajo se obtuvieron fracciones proteicas, polisacáridas y lipídicas de *M. tuberculosis* H37Rv, con el fin de utilizarlos también para determinar la expresión de HLA-DR en monocitos humanos; y ver cual o cuales fracciones de la micobacteria pudieran ser las responsables de la supresión observada en la expresión de HLA-DR en monocitos. Nosotros encontramos que al estimular con diferentes dosis de los extracto obtenidos de *M. tuberculosis*, hubo un incremento en la expresión de las moléculas HLA-DR en monocitos humanos, y que este incremento fue más pronunciado con el extracto celular de *M. tuberculosis*, el cual fue proporcional a la dosis utilizada. Cabe mencionar que el extracto celular esta compuesto de proteínas y polisacáridos en una relación 1:10, respectivamente, por lo tanto, podemos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

deducir que el extracto celular contiene gran cantidad de polisacáridos y que la mezcla de proteínas y polisacáridos es estimulante para la expresión de HLA-DR. En un estudio realizado por Wadee y Kuschke (41) donde investigaron el efecto de una proteína de 25 kDa del bacilo de *M. tuberculosis*, observaron que la proteína no producía ningún efecto en la expresión de las moléculas HLA-DR en monocitos de sujetos sanos, *pero que al estimular monocitos con* estimulantes, tales como, levaduras, LPS o IFN γ y la proteína, sí se producía una inhibición significativa. Sin embargo, nosotros con el extracto celular, donde hay una gran cantidad de proteínas y polisacáridos, no observamos el mismo efecto. Esto nos indica que quizás aunque la proteína de 25 kDa esté presente no podemos ver el efecto inhibitorio, debido a la presencia de otras glicoproteínas y carbohidratos que mostraron tener capacidad de producir un incremento en la expresión de las moléculas de membrana.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

También se pudo observar que aunque con todos los extractos se incrementó la expresión, con el extracto polisacárido, extracto lipídico y proteínas extracelulares a una concentración de 150 µg/ml, se observó una tendencia a la disminución. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores y con el trabajo de Domínguez y Arce, donde se observó que con el bacilo completo de *M. tuberculosis* H37Rv, se produjo una disminución en la expresión de las moléculas HLA-DR, podemos deducir que probablemente se produzca una disminución en la expresión de HLA-DR,

estimulando con dosis mayores de 150 µg/ml o bien que se necesite el bacilo completo para producir una inhibición.

En este trabajo también se investigó el efecto del DMSO sobre la expresión de la molécula HLA-DR, ya que los lípidos obtenidos de *M. tuberculosis* H37Rv se disolvieron en DMSO al 10% en amortiguador de fosfatos (PBS).Se estimuló 1 ml de la suspensión celular ($1x10^6$ cél/ml) con 15 µl de DMSO y se observó un incremento en la expresión de HLA-DR. Posteriormente, se estimuló con una cantidad más pequeña de DMSO (1.25 µl) y encontramos resultados similares a los anteriores; esto quiere decir que el DMSO, por sí solo y en cantidades pequeñas, es capaz de producir incremento en la expresión de la molécula HLA-DR. En un estudio piloto de 2 experimentos, se estimuló con lípidos disueltos con una cantidad de 1.25 µl de DMSO, los resultados revelaron una inhibición de la expresión de la molécula HLA-DR, por lo tanto, es muy probable que el DMSO pueda estar interfiriendo en el efecto inhibitorio que producen los lípidos, por lo que sería importante utilizar otro diluyente y determinar que no produzca ningún efecto en la expresión de HLA-DR, y poder deducir con certeza si los lípidos de *M. tuberculosis* realmente producen una disminución en la expresión de tales moléculas. Relacionando nuestros resultados a lo que se presenta "in vivo" en pacientes con tuberculosis, que no responden inmunológicamente y que sus macrófagos están parasitados con una gran cantidad de bacilos, probablemente no hay una buena presentación de antígenos al linfocito T por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

un defecto en la coestimulación por la molécula B7-2 y una disminución de moléculas presentadoras de antígeno y por lo tanto, no se desarrolla una respuesta inmune adecuada. No se sabe si a esta alteración se le asocie un daño al procesamiento de antígenos, en su avidez para asociarse a la molécula de clase II del CMH y/o a su transporte a la superficie celular. En conclusión los datos hasta ahora obtenidos indican que después de la ingestión de *M. tuberculosis*, la capacidad presentadora de antígenos y función accesoria (coestimuladora) de monocitos está alterada.

En un futuro, sería importante determinar si a concentraciones más altas de los extractos estudiados, se produce una inhibición en la expresión de las moléculas HLA-DR y también determinar cuál o cuáles fracciones electroforéticas de las proteínas extracelulares, así como los componentes lípidicos (glucolípido fenólico, lipoarabinomanano o el factor cuerda) son los encargados de la supresión de B7-2 y así llegar a conocer más de estos componentes bacterianos y de su relación con la virulencia y patogenicidad de *M. tuberculosis.*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

1. La molécula B7-1 (CD80) se encuentra expresada constitutivamente y en concentración muy baja en monocitos humanos, y su expresión no se aumentó con LPS e IFN α.

2. La molécula B7-2 (CD86) se encuentra expresada constitutivamente y en concentraciones más altas que B7-1 en monocitos humanos, con un tiempo máximo de expresión de 24 horas y su expresión se incrementó con LPS a una concentración de 25 μg/ml.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. La expresión de B7-2 en monocitos humanos, disminuyó cuando se estimuló con proteínas extracelulares a una dosis de 100 y 150 μg/ml y con extracto lipídico a una dosis de 50 y 100 μg/ml, por lo que pueden ser los factores importantes que afecten la coestimulación del linfocito T

4. La expresión de la molécula HLA-DR en monocitos humanos, no disminuyó con ninguna de las concentraciones de los extractos de *M. tuberculosis* H37Rv, por lo que probablemente se requiere mayor

concentración de ellos o al bacilo completo, para observar la inhibición en la expresión de la molécula.

5. Aparentemente se requiere el bacilo completo para afectar las señales de ctivación para el linfocito T y son las proteínas extracelulares y los componentes lipídicos más superficiales de la pared celular, los que más afectan la capacidad coestimuladora de la célula parasitada.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFIA

1. Selwin. P.A., D. Hartel, and I.A. Lewis. 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug abusers with human immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med. **320**: 545-550.

2. Selwin. P.A., B.M. Sckell, P. Alcabes, G.H. Friedland, R.S. Klein and E.E. Schoenbaum. 1992. High risk of active tuberculosis in HIV-infected drug users with cutaneus anergy. JAMA. **268**:504-509.

3. Desprez. R.M. C.R. Hein. *Mycobacterium tuberculosis* In: Principles and Practice of infectious diseases. Third Edition, New York:. 1990. pp 1877-1906.

4. Lennette E.H. Balows A, Hauster W.J. Shadomy HJ. Manual of clinical *microbiology. Fourth Edition* Washington D.C. Am Society for Microbiology 1985 pp 216-248.

5. Koneman E. W.. S.D. Allen, V.R. Dowell, W.M. Janda, H.M. Sommers, Winn W.C. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Third Edition. JB Lippincott Co Philadelphia: 1987. pp 535-572.

6. Lederr. E., A. Adam, R. Ciorbaru, J.F. Petit and J. Wietzerbin. 1975. Cell walls of mycobacteria *an related organisms; chemistry an* immunostimulant properties. Mol. Cell. Biochem. **7**:87-104.

7. McNeil M., M. Dalle, and P.J. Brennan. 1990. Evidence for the nature the link between the arabinogalactan *and peptidoglycan components* of mycobacterial cell walls. J. Bio. Chem. **265**:18200-206.

8. M. Goodfellow, M. Murdorsky, and S. T. Williams. The Biology of the Actinomycetes. Academic Press, London. 1984. p 7-164.

9. Wallis R. S., M. Amir-Tahmasseb, and J. J. Ellner. 1990. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: The monocyte western blot. Proc. Acad. Sci. USA. **87**:3348-52

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

10. Youmans G.P. Tuberculosis.W B. Saunders Co. Philadelphia. 1979 p 69-173.

11. Bloom R.B. . Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. American Society For Microbiology Press. 1994

12. Goren, M.B. 1982. Immunoreactive susbstances of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. **125**(2): 50-59. .

13. Goren, M.B. 1987. Polyanionic agents do not inhibit phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. J. Leukocyte Biol. **41**:122-129.

14. Seibert, F.B, and B. Munday 1982. *The compositions of the active* principles of tuberculin. XV. A precipited purified tuberculin protein suitable for the preparation of a standard tuberculin. Am. Rev. Tuberc. **25**: 724-737.

15. Andersen, P.Askgoaard, L. et all. 1991. T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. **59**: 1558-1563.

16. Engers, H.D. et all . 1986. Results of a World Health Organization sponsored workshop to characterize antigens recognized by mycobacterium-specific monoclonal antibodies. Infect. Immun. **51**: 718-723.

17. Young, D.L. et all. 1986. Immunological activity of a 38-Kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. **54**:177-183.

18. Abbas, A.K., Lichtman A.H., Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology.. 2a ed. W.B. Saunder Company. A Division of Harcourt Brace & Company. 1994.

19. Shevach, E. M, and Rosenthal, A.S. 1993. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T-lymphocyte. II. Role of macrophage in the recognition of genetic control of the response immune. J. Exp. Med. **138**:1213.1221.

20. Askonas B.A. 1990. From protein synthesis to antibody formation and cellular immunity: A Personal View. Annu. Rev Immunol. **8**: 1-21.

21. Paul, W.E. Fundamental Immunology. . Raven Press.New York 1984. p 23-40.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

22. Lafferty, K.J., Prowse, S.J., Simeonovic,C.J. 1983. Immunobiology of tissue *transplanti*: A *roturn* to the passenger leukocyte concept. Annu. Rev. Immunol **1**: 143-73.

23. Yokochi, T., Holly, R.D., Clark, E.A. 1981. B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus activated B cell blasts,B Lymphoblastoid cell lines and Burkitt's lymphomas. J. Immunol **128**: 823-27.

24. Freedman, A.S., Freeman, G., Horowitz, J.C., Daley, J., Nadler, L.M. 1987. A B cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. J. Immunol. **139**:3260-67.

25. Lenschow D.J., Walunas T.L. and Bluestone J.A. 1996. CD28/B7 Systems of T Cell Costimulation. Annu. Rev. Immunol. **14:** 233-58.

26. June, C.H. Bluestone, J.A.,Nadler L.M and Thompson, C.B. 1994. The B7 and CD28 receptor families. Inmunol. Today **15** (7): 321-31.

27. Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Schwart, R.H. 1989. Clonal expansion vs. functional clonal inactivation: A costimulatory pathway determines the outcomes of T cell receptor occupancy. Annu. Rev Immunol **7**: 445-80.

28. Boom, W.H., Husson R.N., Young, R.A., David, J.R. and Piessen W.F. 1987. In vivo and in vitro characterization of murine T cell clones reactive to *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun.**55**: 2223.

29. Orne, I.M. 1987. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*.J. Immunol. **138**:293.

30. McDonough, K.A, Kress, Y. and Bloom, B. R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis. Interaction of *M. tuberculosis* with Macrophages. Infect. Immun. **61** (7): 2763-73.

31. Colling, L.A. Tidman, N. and Poulter, L.W. 1985. The involvement of dendritic cell in the cutaneous lesions associated with tuberculoid and lepromatous leprosy. Clin. Exp. Immunol. **61**: 458.

32. Colling, L.A. Tidman, N. and Poulter, L.W. 1985. Quantitation of HLA-DR expression by cells involved in the skin of tuberculoid and lepromatous leprosy. Clin. Exp. Immunol. **61**: 58.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

33. Tweardy, D.L., Schacter, B.Z. and Ellner, J.J. 1984. Association of *altered Dynamics* of Monocyte Surface Espression of Human Leucukocyte Antigen DR with Immunosuppression in Tuoerculosis. The Journal of Infectious Diseases. **149** (1): 31-37.

34. Mshana. R.N., Hasting, R.C. and Krahenbuhl, J.K. 1988. Infection with *live Mycobacteria Inhibits in vitro* Detection of *Ia* Antigeno Macrophages. Immunobiol. **177**: 40-54.

35. Wallis R.S, Fujimara H and Ellner J.J. 1986. Direct Stimulation of monocyte Release of Interleukin 1 By Mycobacterial Protein Antigens. **136** (1): 193-96.

36. Fujimara H. Kleinhenz M.E., Wallis R.S., Ellner J.J. 1986 Increased interleukin 1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis Am. Rev. Respir Dis. **133**: 73-7.

37. Ohmen J.D. et all. 1994. Evidence for a superantigen in Human Tuberculosis. Immunity 1: 35-43.

38. Friedland J.S; Remick D.G; Shattock R; Griffin G.E. 1992. Secretion of interleukin-8 following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocyte cell fines. Eur. J. Immunol. **22**(6): 1373-78.

39. Orne I.M, *Alan R.D; Griffin J.P. and Abrams J.S.* 1993 Cytokine Secretion by CD4 T lymphocyte Adquired in Response to *M. tuberculosis* Infection. J. Immunol **151** (1): 518-25.

40. Gercken J; Pryjma J; Ernest M; Flad H.D. 1994. Defective antigen *presentation by Mycobacterium tuberculosis* -infected monocytes. Infect. Immun 62 (8): 3472-8

41. Wadee. A.A, Kuschke R.H, Dooms T.G. 1995. The *inhibitoty effects of Mycobacterium tuberculosis* in MHC clase II expression by monocytes activated with riminophenazine and phagocyte stimulants. Clin. Exp. Immunol. **100** (3): 434-9.

42. Arce, A.Y. 1989. Producción de Interleucina 1 por macrófagos de paciente con lepra y su papel en la inmunopatogenia de la enfermedad lepromatosa.U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis de Doctorado en Ciencias.

43. Cruz U.F. 1991. Estudio "in vitro" del efecto de clofazimine sobre la quimiotaxis y fagocitosis de monocitos (macrófagos) de sujetos sanos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

y de pacientes con lepra. U.N.A.L. Facultad de Medicina. Departamento de Inmunología. Tesis de Licenciatura.

44. Domínguez, S. 1996. Efecto "in vitro" de diferentes dosis de *Mycobacterium tuberculosis* en la expresión de IL-1 de membrana y moléculas HLA-DR en macrófagos humanos. U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis de Maestria en Ciencias.

45. Vera, L. 1990. Aislamiento y purificación de dos antígenos inmunodominantes de *Nocardia brasiliensis*. U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis de Doctorado en Ciencias.

46. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-54.

47. Martínez, I:A: 1996. Determinación de la respuesta de anticuerpos contra fracciones lipídica, proteica y polisacárida de *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c. U.A.N.L. Facultad de Medicina. Tesis de Maestría en Ciencias.

48. Dubois., M; Gilles, K.A; Hamilton, J.K; Rebers P.A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. **28**: 350-56.

49. Kaye, P.M. Sims, M. Feldman, M. 1986. Regulation of macrophage accesory cell activity by mycobacteria. II. In vitro inhibition of la expression by *Mycobaterium microtti*. Clin. Exp. Immunol. **64**:28-34.

50. Lenschow, D.J. Huei-Ting Su, G. Zuckerman, L.A. et al 1993. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. Proc. Natl. Acad. Sci. **90**: 11054-58.

51. Razi-Wolf, Z. Freeman, G.J. Galvin, F. Benacerraf, B. Nadler, L. and Reiser, H. 1992. Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. Proc. Natl. Acad. Sci.**89**:4210-14.

52. Lenschow, D.J. Walunas, T.L. and Bluestone, J:A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu. Rev. Immunol. **14**: 233-58.

53. Petro, T.M. Chen, S.A. and Panther, R.B. 1995. Effect of CD80 and CD86 on T cell cytokine production. Immunol Inv. **24**:(6) 965-76.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette Guérin
β	Beta
CO_2	Bióxido de carbono
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Con A	Concanavalina A
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	Acido desoxirribonucleico complementario
E. coli	*Escherichia coli*
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNTα	Factor de necrosis tumoral alfa
γ	Gamma
°C	Grados centrigados
[^{3}H]	Tritiado
IFN	Interferón
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

kDa	kilodalton
KCl	Cloruro de potasio
LPS	Lipopolisacárido.
µg	*Microgramos*
µl	Microlitros
µm	Micrometros
mg	Miligramos
min	*Minutos*
ml	Mililitros
mm	Milimetros
mM	Milimolar
M	Molar
n	Tamaño de muestra
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio
NK	Asesinas naturales (Natural Killer)
nm	Nanómetros
p	Grado de significancia
PE	Ficoeritrina
pH	*Potencial de hidrógeno*
%	Porcentaje
%C	Porcentaje de bisacrilamida en el total de acrilamida
%T	Porcentaje total de acrilamida-bisacrilamida en el gel
PPD	Derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis*

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

p/v	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
TcR	Receptor de célula T
Th1	Célula T Cooperadora 1
Th2	Célula T Cooperadora 2
U	Unidades
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICES

APENDICE A

EQUIPO:

1. Agitador magnético RC-353 (CORNING)
2. Autoclave (MARKET-FORGE STERILMATIC)
3. Balanza granataria (SARTORIUS)
4. Balanza analítica 2024MP (SARTORIUS)
5. Bomba peristáltica (LKB)
6. Cámara para cromatografía en capa fina (SIGMA ALDRICH)
7. Cámara de Neubauer (BAXTER)
8. Campana de flujo laminar (CCI BIO HAZARD HOOD)
9. Centrifuga eppendorf 5415 (BRINKMAN)
10. Centrifuga refrigerada TJ-6 (BECKMAN)
11. Centrifuga refrigerada GS-15R (BECKMAN)
12. Citómetro de flujo FACsort (BECTON DICKINSON)
13. Espectrofotómetro DU-6 (BECKMAN)
14. Fuente de poder Modelo PowerPac1000 (BIORAD)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE B

REACTIVOS QUIMICOS

1. Acetona (BAKER)
2. Acetato de magnesio (MALLINCKRODT)
3. Acido acético glacial (MERCK)
4. Acido clorhídrico (MERCK)
5. Acido fosfomolíbdico (SIGMA)
6. Acidos micólicos de *M. tuberculosis* (SIGMA)
7. Acido perclórico (MERCK)
8. Acido sulfúrico (MERCK)
9. Acido tricloroacético (BAKER)
10. Acrilamida (SIGMA)
11. Albúmina bovina (SIGMA)
12. Amberlita XAD-7 (SIGMA)
13. Anticuerpo monoclonal anti HLA-DR humana conjugada a FITC (SIGMA)
14. Anticuerpo monoclonal anti B7-1 humano conjugado a PE (BECTON DICKINSON)
15. Anticuerpo monoclonal anti B7-2 humano conjugado a PE (Ancell Corporation)
16. Anticuerpos monoclonales murinos (γ_1FITC/γ_{2a}PE) (BECTON DICKINSON)
17. Asparagina (SIGMA)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

18. Azida de sodio (FISHER)
19. Azul de bromofenol (SIGMA)
20. Azul de Coomassie G-250 (LKB)
21. Azul de Coomassie R-250 (SIGMA)
22. Azul tripano (SIGMA)
23. Base de medio de Lowenstein-Jensen (BIOXON)
24. β- mercaptoetanol (SIGMA)
25. Bicarbonato de sodio (SIGMA)
26. Citrato de sodio (J.T.Baker)
27. Cloroformo (MONTERREY)
28. Cloruro de bario (MONTERREY)
29. Cloruro de magnesio (SIGMA)
30. Cloruro de potasio (MERCK)
31. Cloruro de sodio (MERCK)
32. Concanavalina A (SIGMA)
33. Diatrizoato de sodio (SIGMA)
34. Dimetil sulfóxido (SIGMA)
35. Dodecil sulfato de sodio (SIGMA)
36. Esfingomielina (SIGMA)
37. Etanol
38. Eter etílico (MERCK)
39. Fenol (MERCK)
40. Estreptomicina (SIGMA)

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

41. Ficoll (SIGMA)
42. Fosfatidiletanolamina (SIGMA)
43. Fosfatidilcolina (SIGMA)
44. Fosfatidilinositol (SIGMA)
45. Fosfato dicásico de sodio anhidro (MONTERREY)
46. Fosfato de sodio monobásico (MONTERREY)
47. Formaldehido (J.T.Baker)
48. Galactosa FISHER)
49. Glicerol (SIGMA)
50. Glicina (SIGMA)
51. Hidróxido de sodio (MERCK)
52. Interferón α (INTRON)
53. Interferón (R&D Systems)
54. Lipopolisacárido de *E. coli* 005:B5 (SIGMA)
55. L-glutamina (SIGMA)
56. Marcadores de peso molecular stock No. SDS-7L Dalton Marck (SIGMA)
57. Medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA)
58. Metanol (MERCK)
59. Microesferas calibradoras (BECTON DICKINSON)
60. N,N', - metilen-bis-acrilamida (SIGMA)
61. N,N,N',N', - tetrametiletilendiamino (SIGMA)
62. Penicilina G (SIGMA)
63. PPD Tuberculin Purified Protein Derivative (CONNAUGTH)

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

64. Proteinasa K (SIGMA)
65. Silicagel (MERCK)
66. Suero bovino fetal (SIGMA)
67. Sulfato de amonio (MONTERREY)
68. Sulfato de potasio (MALLINCKRODT)
69. Trizma-base (SIGMA)
70. Trizma hidroclorado (SIGMA)

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE C

PREPARACION DE REACTIVOS

1. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de potasio.$12H_2O$	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Agua bidestilada	1000 ml

Ajustar el pH entre 7.2-7.4

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. Ficoll-diatrizoato de sodio.

10 partes de diatrizoato de sodio al 34% y 24 partes de Ficoll al 9% en agua destilada. La densidad se ajusta con un picnómetro a 1.077± 0.001 g/ml.

Esterilizar en autoclave a 121oC durante 15 minutos.

3. Medio de cultivo celular RPMI 1640.

RPMI 1640 en polvo	10.4 g
Bicarbonato de sodio	2.0 g

Glutamina	2 mM
Antibióticos	
Penicilina G	100 U/ml
Gentamicina	50 µg/ml
Estreptomicina	50 µg/ml
Agua bidestilada	1000 ml

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

4. Medio de Proskauer Beck modificado por Youmans.

Asparagina	5 g
Fosfato dibásico de potasio	5 g
Sulfato de potasio	5 g
Glicerol	20 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada

Ajustar el pH a 6.8-7.0 con NaOH 40%

Agregar:

Citrato de sodio	0.68 g
Cloruro de magnesio	0.197 g

Esterilizar en autoclave a 121°Cpor 20 minutos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5. Medio de Lowenstein - Jensen

Base de medio de Lowestein-Jensen	37.3 g
Glicerol	12.0 ml
Agua destilada	600 ml

Calentar y hervir durante 1 minuto.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C

Preparar 1 litro de huevo íntegro obtenido asépticamente y mezclar sin introducir burbujas de aire. Mezclar el huevo y la base.

Distribuir en tubos con tapón de rosca.

Colocar los tubos en posición inclinada

Tindalizar entre 85 a 90°C durante 45 minutos.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6. Buffer para diluir el anticuerpo monoclonal anti-CD86.

Fosfato de sodio	50 mM pH 7.5
Cloruro de potasio	500 mM
Cloruro de sodio	150 mM
Glicerol	15%
Albúmina sérica bovina	0.2%
Azida de sodio	0.04%

7. SOLUCION DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA

Acrilamida	30.0 g
Bisacrilamida	0.8 g
Agua bidestilada	60.0 ml

Agitar durante 12 hr a 4°C

Aforar a 100 ml con agua bidestilada, agregar 4 g de amberlita

Agitar durante 1 hora, filtrar en papel Whatman No. 1

Guardar en oscuridad a 4°C.

8. Buffer Tris-OH 3.02 M pH 8.8

Tris-OH 18.3 g

Agregar 25 ml H_2O bidestilada

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 5 N

Aforar a 50 ml con H_2O bidestilada.

9. Buffer Tris-OH 1 M pH 6.8

Tris-OH 2.99 g

Agregar 25 ml H_2O bidestilada

Aforar a 50 ml con H_2O bidestilada.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

10. Buffer de corrimiento para electroforesis.

Glicina	14.4 g
Trizma base	2.02 g
SDS	1.0 g

Aforar a 1000 ml con H_2O bidestilada.

UANL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS