

# EVALUACIÓN DE CITOQUINAS, ENZIMAS Y ANTICUERPOS COMO BIOMARCADORES ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PLEURESÍAS INFECCIOSAS Y MALIGNAS.

Dr. Schierloh L. Pablo<sup>1#</sup>, Dra. Rosa M. Musella<sup>2</sup>, Sta. Elizabeth Colman<sup>3</sup>,  
Dra. Graciela C. de Casado<sup>2,4</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Experimental-IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. <sup>2</sup>Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz.

<sup>3</sup>Facultad de Biología, Universidad CAECE, Buenos Aires. <sup>3</sup>Instituto "Prof. Dr. R.F. Vaccarezza"-UBA, CABA, Argentina.

# lp\_shier@hotmail.com

## INTRODUCCION

La pleura es una membrana serosa que rodea los pulmones y recubre internamente la caja torácica definiendo una cavidad conocida como espacio pleural. Este espacio se encuentra bañado por una fina película de fluido cuyo volumen, composición y renovación se encuentran fisiológicamente controlados por el mesotelio pleural y, en menor medida por drenaje linfático. En condiciones fisiológicas, la función del líquido pleural (LP) es la de acoplamiento mecánico y lubricación entre la pared torácica y el pulmón durante los movimientos asociados a la respiración (Zocchi 2002).

En ciertas condiciones patológicas se produce un desbalance entre las fuerzas que controlan el volumen del LP dando lugar a un derrame o efusión pleural. Básicamente, estos derrames pueden clasificarse como trasudados o exudados dependiendo de su contenido en células y proteínas. En los procesos inflamatorios de la pleura (pleuritis) pueden desarrollarse exudados que contienen leucocitos que arriban al foco, como así también descamaciones del mesotelio y/o células de origen maligno (Mutsaers 2002). Las poblaciones celulares presentes como así también sus productos de secreción varían en función del origen etiológico y del tiempo de evolución de la pleuritis (Antony & Mohammed 1999).

Teniendo en cuenta que la composición del LP refleja el microambiente inflamatorio propio de la enfermedad en cuestión, nos preguntamos si algunas de estas características distintivas pueden ser explotadas para el diagnóstico específico.

A lo largo del presente trabajo desarrollamos y testeamos la aplicabilidad de una serie de técnicas de medición de biomarcadores a fin de identificar posibles candidatos útiles para el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa. Encontramos que el dosaje de anticuerpos específicos contra estructuras de la pared celular, péptidos secretados, lípidos y glicoconjugados de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) no revela aumentos significativos entre el LP y la sangre periférica (SP) de pacientes con TB. En consonancia con este resultado, tampoco verificamos aumentos significativos en la actividad peroxidasa del LP de pacientes con TB. Todo esto sugiere que ni los Anticuerpos específicos ni la actividad enzimática estudiada presentan las características deseables para un biomarcador diferencial.

En estudios previos (Schierloh et al. 2005, 2007, 2009, 2011), pusimos en consideración si el perfil inmunológico conocido como "TH1", que es característico de la pleuresía tuberculosa, podría aportar componentes celulares y solubles de significativo valor diagnóstico. Entre los compuestos solubles evocador por una respuesta TH1 nos inclinamos por analizar la molécula proinflamatoria interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), dado que ha sido comprobado fehacientemente su rol protector en pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (Kaufman 2005). Interesantemente encontramos que la producción endógena de esta molécula se encuentra fuertemente compartimentalizada pacientes TB dado que los LP de presentan un gran aumento respecto de los niveles séricos. En función de este resultado determinamos luego la actividad de las células productoras de esta citoquina en el LP. Para ello estimulamos por 24h células mononucleares pleurales (LPMC) con *Mtb* y medimos por citometría de flujo y por ELISA la producción *ex vivo* de IFN- $\gamma$ . Por el método de citometría de flujo pudimos identificar a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y a las células NK CD56<sup>brigh</sup> como las principales fuentes de dicha citoquina. Este hallazgo permitió aplicar un análisis discriminado que indica que determinación del% células NK IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> presenta la mayor sensibilidad y especificidad para diferenciar entre derrames pleurales TB y de otro origen.

## **OBJETIVOS:**

Puesta a punto, validación y análisis de factibilidad de nuevos inmunoensayos, bioensayos y determinaciones enzimáticas orientadas a discriminar etiológicamente exudados pleurales de origen maligno e infeccioso, con especial énfasis en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa.

## **MATERIALES Y METODOS:**

**Población en estudio:** Los pacientes fueron reclutados en el Pabellón de Tisioneumonología del Hospital Muñiz. Los pacientes incluidos en el estudio fueron HIV negativos con derrames pleurales a causa falla cardíaca congestiva (trasudado, n=1), cancer de origen no mesotelial (exudados, n=2), neumonía de la comunidad (exudados, n=6) y tuberculosis (exudado, n=35), quienes firmaron un consentimiento informado previo a la obtención de la muestra. El líquido pleural (LP) fue obtenido por el método de toracocentesis (Schierloh et al. 2005). El presente estudio ha sido avalado por los Comités de Ética de la Academia Nacional de Medicina y del Hospital Muñiz. Cabe aclarar que por razones de disponibilidad de muestras, no todos los ensayos pudieron aplicarse a todos los participantes. Para evitar el sesgo estadístico derivado de este hecho, para cada tipo de ensayo se empleo el método de muestro secuencial.

**Muestras a evaluar (SP y LP):** Sueros (SP) y líquidos pleurales libres de células (LP) sin tratar y/o de complementados por calor (30min. a 60°C) fueron obtenidos por centrifugación (5min; 500g; T° ambiente) y almacenados en freezer -20°C hasta el momento de ser analizados por medio de las metodologías que se detallan más adelante, previa dilución en PBS estéril o buffer de reacción.

**Células Mononucleares Pleurales (LPMC):** Las células mononucleares presentes en líquidos pleurales (PFMC) fueron obtenidas por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. Luego de 2 lavados en solución fisiológica, fueron contadas y resuspendidas en medio completo (RPMI 10% suero fetal bovino) a una densidad de  $1-2 \times 10^6$ /ml e incubadas por 18hs a 37°C. Para la detección de las citoquinas intracitoplasmáticas (ver más adelante) se agregó Brefeldina A (5µg/ml) durante las últimas 5h de cultivo a fin de inhibir la secreción via golgi. Para la medición de secreción de citoquinas se colectaron los medios condicionados (CM) los cuales se almacenaron sin diluir en freezer a -70°C hasta ser ensayados por medio de las metodologías que se detallan a continuación.

## **ELISAS:**

**Detección de Anticuerpos (Ab) anti-Antígenos (Ag) solubilizados:** Para la determinación semicuantitativa de Ab específicos dirigidos contra

Ag solubles, 1-10µg/well de Ag fueron dispensados en placas de 96 pozos de alto *binding* e incubados toda la noche (ON) a 4°C en diferentes soluciones de pegado (*coating Buffer*) que fueron seleccionadas en base a datos bibliográficos y nuestra experiencia. Luego de 3-7 lavados con soluciones de lavado (*washing buffer*) adecuadas según el Ag, se incubaron con diluciones seriadas de SP o LP por 3h a T° amb. Seguidamente, luego de 3-7 lavados, fueron incubadas con una dilución 1/1500 de Ab anti-hlgG/A/M conjugado con HRP. Por último, luego de 3-7 lavados más, se desarrolló la reacción colorimétrica empleando TMB como sustrato. Las mediciones cinéticas de DO (densidad óptica) se efectuaron a 652nm de longitud de onda de lectura mientras que las de punto final se efectuaron a 450nm (referencia 570nm) luego de detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Los Ag solubles testeados en el presente estudio fueron: PPD (*purified protein derivative*), ManLAM (*mannosylated lipoarabinomannan*), TLip (*total lipids extract*), P19KD (*19kD lipoprotein*), HSP10(*10kDa heat shock protein*) y poli Manano.

**Detección de Anticuerpos anti-Pared celular (Cell based ELISA):**

Para la determinación semicuantitativa de Ab específicos dirigidos contra estructuras de pared celular, 1-10x10<sup>6</sup> bacterias/well fueron dispensadas en placas de 96 pozos e incubadas con diluciones seriadas de SP, LP o CM. Luego de 3-7 lavados por centrifugación 5 a 13000rpm, serán incubadas con una dilución 1/1500 de Ab anti-hlgG/A/M conjugado con HRP. Por último, luego de 3-7 lavados más, se desarrollará la reacción colorimétrica empleando TMB como sustrato.

**Detección de Citoquinas:** Para la determinación cuantitativa de IFN-γ endógeno presente en SP y LP o secretado en los CM se empleó un Kit comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (*eBioscience*). Las muestras de SP y LP fueron diluidas entre 2-10 veces y los CM entre 5-50 veces.

**Citometría de flujo y microscopía de inmunofluorescencia:**

**Detección de Anticuerpos anti-Pared celular isotipo-específicos:**

*Mycobacterium bovis* BCG, *M. smegmatis* y diferentes aislados clínicos de *M.tuberculosis* (Mtb) inactivados por radiación gamma fueron incubados 20min a T° ambiente en presencia de una dilución (1/1000) de SP o LP. Luego de 2 lavados en PBS, las bacterias opsonizadas se incubarán en presencia

de anticuerpos secundarios conjugados con FITC dirigidos contra IgA, IgM, IgG, IgE o Igk humana y se analizarán por citometría de flujo y/o microscopía de inmunofluorescencia.

**Detección de citoquinas intracitoplasmáticas:** LPMC previamente incubadas en presencia de Mtb fueron marcadas superficialmente con mAb anti-CD3, CD4, y/o CD56 por 20min a 4°C. Luego, fueron lavadas, fijadas, permeabilizadas y finalmente incubadas 20min a T° ambiente con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ . Por último, la expresión intracelular de dicha citoquina fué determinada por citometría de flujo sobre diferentes poblaciones linfocitarias.

**Determinación de Actividad de Enzima Peroxidasa:** A un volumen de dilución de muestra SP o LP a T°ambiente se le adiciona igual volumen de solución de sustrato TMB (Ver tabla 3). La reacción se deja proceder en oscuridad por 25minutos. Trascurrido este período, se detiene la reacción con 1 volumen de H<sup>2</sup>SO<sup>4</sup> 2N se mide la DO a 450nm restando 570nm.

#### **Análisis y procesamiento de datos:**

**Cálculos y transformaciones:** Para el cálculo de Afinidades relativas de Ab se realizó un análisis de regresión no lineal con el software Prisma® (GraphPad Software Inc). Para los cálculos y transformación de datos crudos y para la representación de valores en escalas de colores (heatmap) se empleó Excel 2007 (Microsoft Office).

**Inferencia estadística:** Para efectuar inferencias estadísticas entre muestras pareadas (LP vs SP) de un mismo donante se aplicó la prueba de Wilcoxon (no paramétrica). Para comparaciones entre más de 2 tratamientos sobre una misma muestra se aplicó ANOVA de un factor para mediciones repetidas. Para comparaciones entre muestras provenientes de distintos individuos (TB vs no TB) aplicamos la prueba Mann-Whitney (no pareada, no paramétrica). Para el análisis de sensibilidad/especificidad se aplicó la curva ROC (Receiver operator characteristic curve). Para la representación gráfica de los resultados y efectuar los citados test estadísticos empleamos el software Prisma® (GraphPad Software Inc) considerando valores de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos.

**Análisis de Clusters:** Para el análisis de clusters se aplicó el método de k-means implementado en el programa SPSS 15.0 (SPSS inc.).

**Imágenes:** Photoshop (Adobe) fue empleado para el procesamiento de imágenes y la organización de las figuras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

### 1. Anticuerpos específicos dirigidos contra Ag solubilizados de Mtb

#### 1.1. Puesta a punto

*1.1.1. ELISA indirecto anti-PPD (Purified Protein derivative):* El Ag conocido como PPD es una preparación proteica purificada preparada a partir del medio condicionado de cultivo de Mtb. Normalmente se emplea para el ensayo diagnóstico de tuberculosis latente conocido como intradermoreacción o prueba de Mantoux. Para el dosaje de anticuerpos séricos o pleurales que reconozcan epítopes presentes en las proteínas PPD, desarrollamos un ensayo de ELISA indirecto donde se ajustaron los siguientes parámetros: Tipo de placa, concentración de Antígeno; composición y pH de los buffer de pegado, bloqueo y dilución; dilución de muestra y rango de sensibilidad; concentración y especificidad del Ab conjugado y sistema de revelado enzimático (Figura 1A y Tabla 1). El tipo de placa que seleccionamos en este paso fue la de media área, que debido a sus características también resultó adecuada para los demás Ag y permitió además reducir los costos de cada ensayo por emplear la mitad de volumen que las placas comunes.

*1.1.2. ELISA indirecto anti-TLip (Total lipid extract):* El Ag TLip es un extracto orgánico (cloroformo/metanol 2:1 a 55°C durante 18hs) de células de Mtb enteras. Para el dosaje de anticuerpos anti-TLip desarrollamos un ensayo de ELISA indirecto donde se ajustaron los mismos parámetros mencionados arriba. Cabe aclarar que la naturaleza hidrofóbica de este antígeno impidió el empleo de soluciones de pegado acuosas ni soluciones de lavado que contengan detergentes (Tabla 1). El extracto seco de TLip fue solubilizado en cloroformo a una concentración de 1mg/ml y esta solución fue diluida en la solución de pegando (Etanol 100%) e inmediatamente plaquada para evitar la formación de fases de diferente polaridad. A diferencia de los ensayos de ELISA con

soluciones de pegado acuosas, en este caso se dejó la placa destapada y a temperatura ambiente para favorecer la evaporación del líquido y la adsorción en seco del Ag a la placa.

*1.1.3. ELISA indirecto anti-ManLAM (Mannosilated lipoarabinomannan):* El glicolípido ManLAM es el mayor lipoconjugado constituyente de las membranas plasmáticas de Mtb. Su purificación requiere de una serie de pasos preparativos de extracción orgánica y partición en fase acuosa, dada la naturaleza anfipática de la molécula. Los resultados de la puesta a punto del ELISA se resumen en Tabla 1. Para este Ag también omitimos el empleo de detergente en los lavados para evitar la desorción a la placa.

*1.1.4. ELISA indirecto anti-Proteína de 10KD (Proteína de Choque térmico derivada de Mtb):* La proteína de choque térmico de 10KD (HSP10) es un conocido Ag de Mtb cuya inmunogenicidad ha sido vinculada con su abundancia relativa en la bacteria. Para el dosaje de anticuerpos séricos o pleurales que reconozcan epítopes presentes en la proteína de 10KD, las condiciones óptimas de ensayo fueron casi idénticas que para PPD, con la excepción de que las muestras fueron plaquedas a mayor concentración (Tabla1).

*1.1.5. ELISA indirecto anti-Proteína de 19KD (Lipoproteína de 19KD derivada de Mtb):* La lipoproteína de 19KD es un conocido factor de virulencia presente en Mtb cuya porción lipídica ha sido vinculada al reconocimiento innato mediado por TLR2. El antígeno que empleamos aquí es una proteína recombinante expresada en E.coli por lo que carece de esta modificación postraduccional. Al igual que para HSP10, las condiciones de ensayo fueron las del PPD con diferencias de la dilución de la muestra (Tabla 1).

*1.1.6. ELISA indirecto anti-Manano (Polímero de manosas):* La pared de Mtb está fundamentalmente constituida por glicoconjugados ricos en arabinosa, galactosa y manosa. Teniendo esto en mente, diseñamos un ELISA empleando un polisacarido de manosas denominado Manano el cual potencialmente permite detectar la presencia de anticuerpos reactivos contra la pared de Mtb en muestras de pacientes con TB. Dicho antígeno se obtiene de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza). Encontramos que el Ag se adaptó perfectamente a nuestras condiciones normales de ensayo, con la excepción de que requirió una mayor cantidad de Ag y una mayor dilución de muestra para la detección óptima de la señal específica (Máxima relación OD total/OD blanco).

**Tabla 1:** En tabla 1 se resumen valores de los parámetros optimizados para los ensayos de ELISA indirecto obtenidos en pruebas de puesta a punto.

Antígeno	Concen-tración de pegado	Buffer de Pegado	Buffer de Lavado	Solución de bloqueo y diluyente	Dilución de Muestra	Sistema de detec-ción (Proveedor)
TLip <sup>1</sup>	10 µg/ml	EtOH 100%	PBS 1% BSA pH=7.2	PBS 0,5% BSA 1% HSA pH=7.2	1/1000	Anti-IgG/M/A humana conju-gado con HRP (Sigma)
ManLAM <sup>2</sup>	1µg/ml	PBS pH=8.4	PBS tween 0.05% pH=7.2		1/1000	
PPD <sup>3</sup>		Buffer CO <sup>3</sup> pH=9.5			1/1000	
HSP10 <sup>4</sup>					1/800	
P19KD <sup>5</sup>					1/500	
Manano <sup>6</sup>		5µg/ml				

<sup>1 y 2</sup> El extracto lipídico total y el ManLAM derivados de la cepa H37Rv fueron gentilmente provistos por el Dr Belisle (Colorado State University, USA).

<sup>3</sup> La PPD derivada de aislados clínicos europeos fue provista por el Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark)

<sup>4 y 5</sup> Las proteínas recombinantes clonadas de la cepa H37Rv, producidas en *E.coli* y purificadas por afinidad fueron provistas por la organización mundial de la salud (OMS).

<sup>6</sup> El manano fue comprado a Sigma-Aldrich (C.A.B.A, Argentina).

## 1.2. Prueba de Hipótesis

Dado que los datos bibliográficos presentan contradicciones respecto del valor diagnóstico de los anticuerpos presentes en el LP de diferentes etiologías, decidimos comparar los valores relativos de los títulos frente a los citados Ag micobacterianos en el LP y la SP de pacientes con TB. Analizados individualmente, ninguno de los Ag aquí estudiados presentó niveles significativamente incrementados de inmuno-reactividad en el LP. Este hecho, sumado a la gran variabilidad observada entre los participantes afectó negativamente las chances de que estos ensayos puedan ser considerados por se buenos predictores de enfermedad (Figura 1A). Por otra parte, realizamos un análisis grupal del patrón de inmuno-reactividad presente en la SP y el LP pleural de cada paciente con el fin de evidenciar si existía alguna asociación con valor diagnóstico entre los Ag (Análisis Multivariado). Mediante estos métodos pudimos clasificar a la población de pacientes en 4 clusters (Figura 1B). Los integrantes de cada cluster comparten un patrón de distribución y



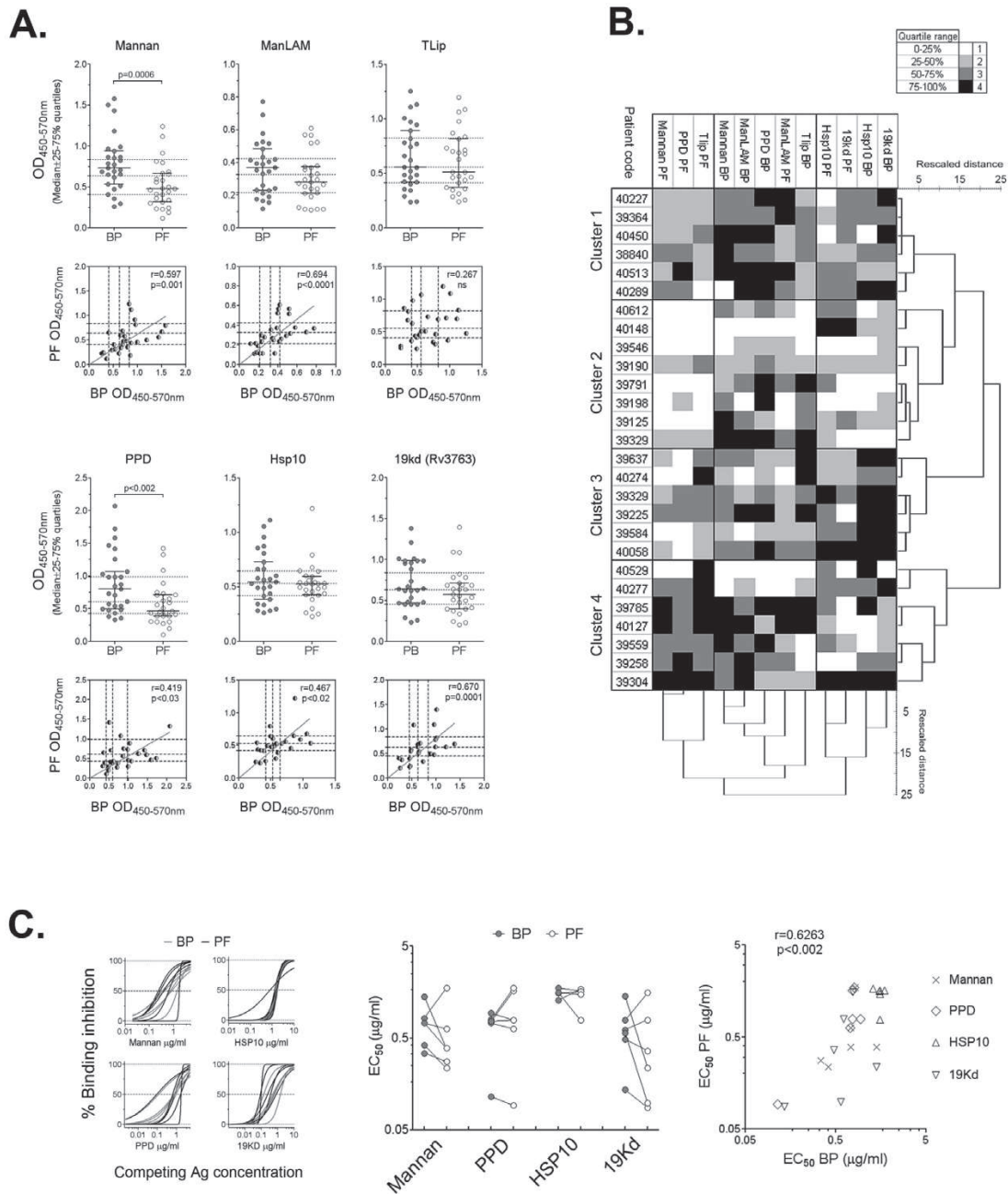
especificidad de la inmuno-reactividad que los diferencia significativamente de los pacientes que integran los demás clusters. Si bien esta caracterización podría tener cierto interés académico, el valor práctico de estos patrones en el diagnóstico de la pleuresía es despreciable con respecto al esfuerzo analítico-experimental que requiere su realización. Finalmente, testeamos si el análisis de la afinidad relativa de los Ab presentes en LP y SP podría revelar características diferenciales con algún potencial diagnóstico. Lamentablemente no hallamos evidencias que justifiquen esta hipótesis (Figura 1C.). Tomando todo esto en consideración, concluimos que un diagnóstico serológico del LP basado en Ab específicos no presentó en ninguno de los 6 Ag micobacterianos aquí estudiados, las características de factibilidad requeridas para estudios posteriores.

## **2. ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA PARED CELULAR DE MTB.**

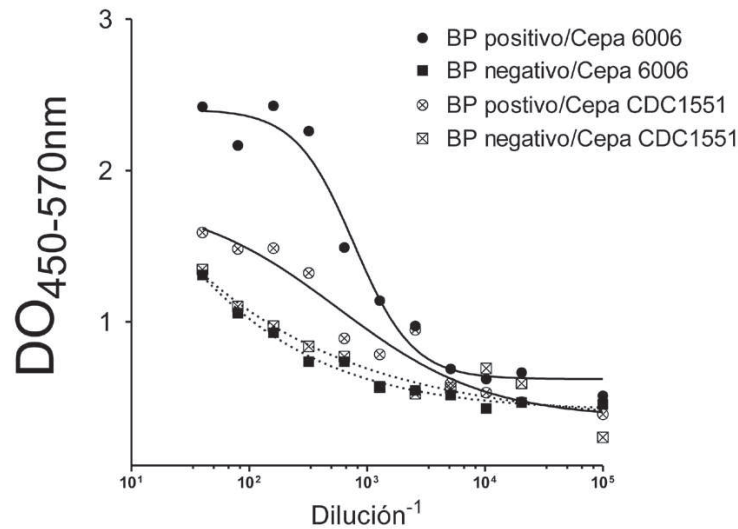
### **2.1. ELISA basado en Células, puesta a punto.**

El LP de pacientes con tuberculosis (TB) es un exudado rico en moléculas secretadas por células del sistema inmune que son específicamente reclutadas al foco inflamatorio. En este sentido, nosotros hipotetizamos que anticuerpos específicos dirigidos contra la bacteria podrían encontrarse aumentados en el LP de pacientes TB, constituyendo una herramienta para el diagnóstico diferencial del derrame pleural por TB.

A fin de medir anticuerpos que reconozcan estructuras presentes en la pared celular de Mtb, desarrollamos un método de ELISA donde empleamos como Ag la bacteria intacta en lugar de emplear un Ag soluble adsorbido a un soporte sólido como es común observar. Este método garantiza que sólo los anticuerpos capaces de reconocer epítopes accesibles en la superficie del patógeno serán detectables. Durante la fase de puesta a punto, optimizamos distintos parámetros experimentales como dilución de la muestra, concentración de Ag particulado, tiempos de incubación, etc. También comparamos el desempeño de 2 cepas de Mtb para ser empleadas en este ensayo. Una es un aislamiento de un brote de alta virulencia en USA (Valway et al. 1998) denominada CDC1551. La otra cepa es un aislamiento local perteneciente al linaje latino-americano (LAM) conocida como 6006. El desempeño como Ag particulado en suspensión de ésta última fue muy superior (Figura 2) por lo que fué seleccionada para ser empleada en los sucesivos ensayos de dosaje de Anticuerpos anti-pared celular.



**Figura 1.** Ensayos de ELISA indirectos para la detección en SP y LP de Anticuerpos específicos dirigidos contra moléculas abundantemente expresadas en *M. tuberculosis*. A. muestra los resultados de los 6 ensayos diferentes donde se evaluaron 2 muestras pareadas (PF, líquido pleural y PB, plasma sanguíneo) de 27 pacientes. Los datos son presentados en función del tipo de muestra y correlacionados para cada paciente. B. Análisis multivariado (clasificación de K-means basada en un análisis previo de componentes principales) del conjunto de datos del panel A. C. Análisis de afinidad relativa de 6 pacientes representativos. Los datos son presentados en función del tipo de muestra y el tipo de Ag (Izquierda) y correlacionados para cada paciente (Derecha).



**Figura 2. Puesta a punto de un ensayo de ELISA-basado en células para el dosaje de Anticuerpos anti-pared celular de *Mtb* en pacientes con tuberculosis pleural.** Los resultados muestran el desempeño de 2 cepas de *Mtb* utilizadas como antígeno particulado en suspensión. Nótese que la cepa del linaje LAM derivada de un aislamiento local (Cepa 6006) presenta un mejor desempeño que la cepa obtenida de un brote en USA durante la década de los'90 (CDC1551, Valway et al. 1998; N Engl J Med 338, 633-639.).

### 2.1.1 Prueba de Hipótesis

En estudios sucesivos comparamos la inmureactividad de 25 muestras pareadas de SP y LP contra la cepa 6006 empleando el ensayo descrito en la sección 2.1. No hallamos diferencias significativas entre ambos tipos de muestra, a la vez que evidenciamos una alta variabilidad entre pacientes (Datos no presentados). Esto sugiere que los Ab totales dirigidos contra la pared de *Mtb* tampoco presentan compartimentalización en el sitio lesional al igual que los Ab contra moléculas solubles (sección 1.1).

### 2.2. Citometría de Flujo, puesta a punto.

Continuado con la tarea de caracterizar Ab que reconozcan estructuras presentes en la pared celular de *Mtb*, desarrollamos una serie métodos basados inmuno-fluorescencia indirecta mediante citometría de flujo. Por medio del uso de anticuerpos secundarios fluorescentes de especificidad definida, estos métodos permiten no solo estimar la cantidad relativa de anticuerpos anti-pared de *Mtb* presentes en una dada muestra, sino también discriminar

el isotipo de los mismos. Durante la fase de puesta a punto, optimizamos distintos parámetros experimentales como dilución de la muestra, tiempos de incubación, concentración de bacteria, etc. También se analizó si existe una inmunoreactividad diferencial dependiendo del background genético del patógeno. Para esto enfrentamos diferentes aislados locales de Mtb con un pool de sueros de alto título contra Mtb de la cepa 6006 determinado con el método descrito en la sección 2.1.

Nuestros resultados mostraron una mayor inmuno-reactividad de los anticuerpos de isotipo IgG e IgM pero no se evidenciaron patrones diferenciales entre muestras de suero o LP. Por otro lado, pudimos evidenciar una alta variabilidad entre la inmunoreactividad de las distintas cepas sin que se observe un correlato evidente con su background genético (Figura 3).

### *2.2.1 Prueba de Hipótesis*

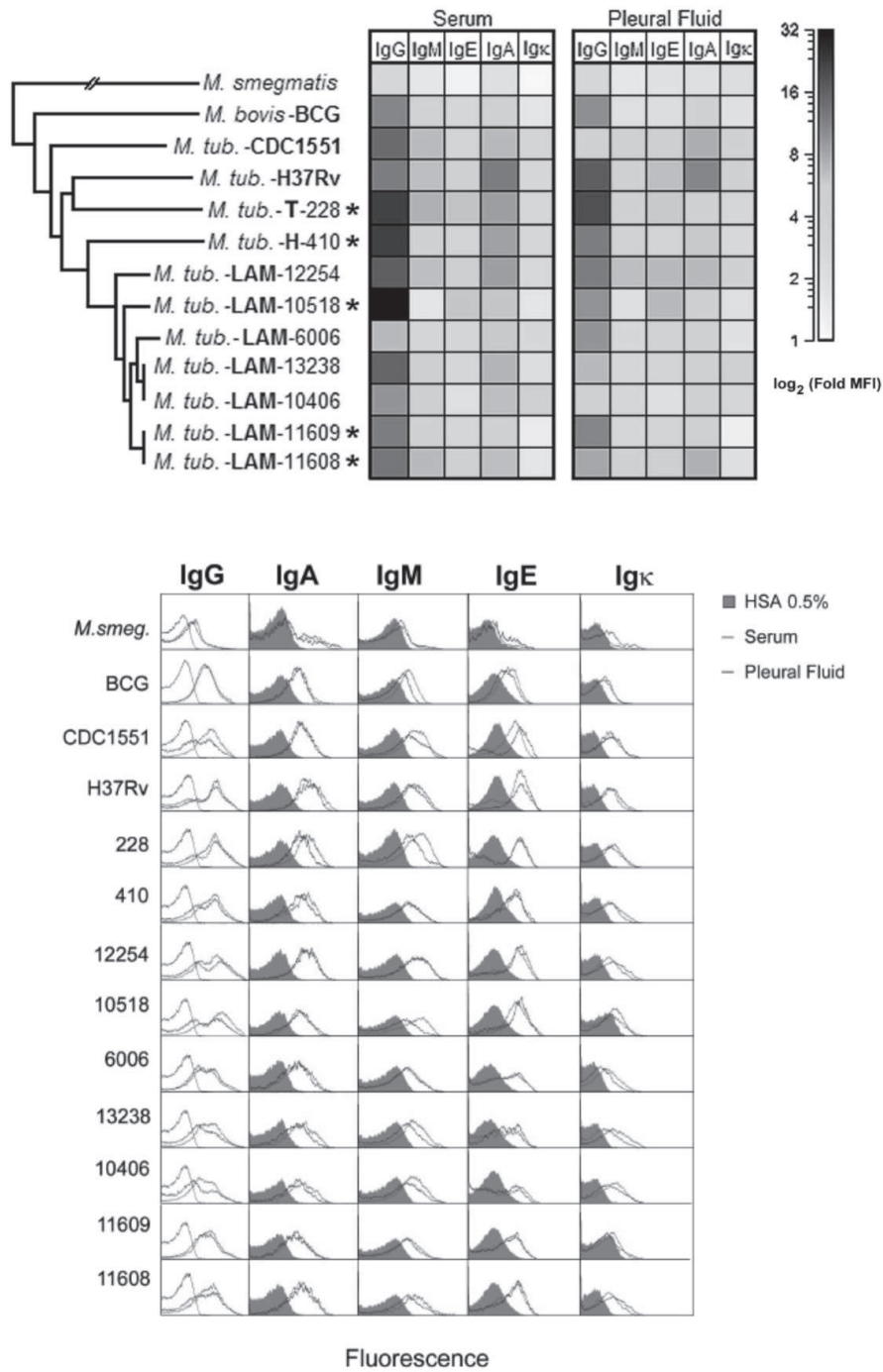
Finalmente, dado que presentaron un comportamiento más estable en los ensayos de puesta a punto, seleccionamos la cepa 6006 y los Ag de tipo IgG para llevar a cabo un estudio de factibilidad con 20 muestras pareadas de SP y LP pleural. Encontramos el los niveles de Ab IgG levemente mayores ( $p < 0.05$ ) en SP que en LP, lo cual resulta de cierto interés académico pero de escaso valor diagnóstico de acuerdo a nuestros propósitos anunciados.

## **3. ACTIVIDAD PEROXIDASA**

### 3.1. Puesta a punto:

Considerando que nuestros sobre Ab como biomarcadores no arrojaron resultados plausibles para el diagnóstico diferencial, nos planteamos estudiar actividades enzimáticas asociadas a leucocitos inflamatorios. Para esto, primero llevamos a cabo la puesta a punto de un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad peroxidasa, una enzima muy estable y fuertemente asociada a leucocitos PMN (mieloperoxidasa).

Inicialmente, pusimos a prueba una serie de sustratos colormétricos y buffers de reacción en busca de aquellos que sean compatibles con nuestro formato de ensayo, tipo de muestra y las condiciones de almacenamiento de las mismas. Encontramos que una solución de TMB (3,3', 5,5' tetramethyl benzidine) en Buffer Citrato/Fosfato resulta adecuada y produce resultados consistentes utilizando muestras de exudado congeladas (LP) como fuente de enzima (ver Tabla 2).



**Figura 3.** Matriz de valores de Intensidad de fluorescencia relativa (A.) e Histogramas representativos (B.) de la inmunoreactividad isotipo-específica de diferentes aislados clínicos locales y extranjeros de *Mtb*, BCG y *M.smegmantis*. Los aislados de *Mtb* multiresistentes a drogas se señalan con\*.

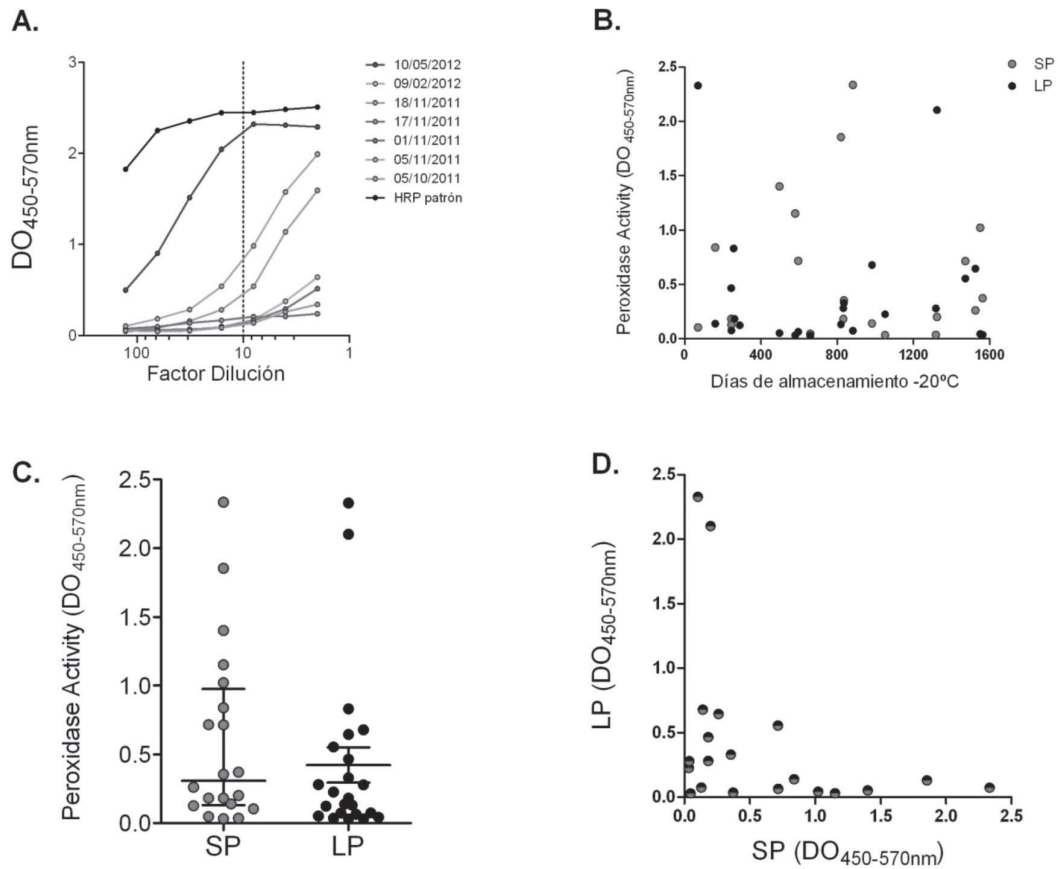
Luego, determinamos las diluciones de las muestras en las cuales el ensayo resulta más sensible (Figura 4A). También establecimos el rango de tiempo de almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el cual la actividad enzimática permanece estable. Observamos que en muestras almacenadas entre 1000-1600 días la actividad enzimática no difería de la presente en muestras almacenadas de 0-400 días ( $p>0,05$ ; Figura 4B) por lo que se infirió que la enzima resulta estable en el tiempo y temperatura indicados.

**Tabla 2:** Puesta a punto de un ensayo de Actividad Peroxidasa en LP de pacientes con TB.

Descripción del Procedimiento	A un volumen (vol.) de dilución de muestra a $T^{\circ}$ ambiente se le adiciona igual volumen de solución (sln.) de sustrato. La reacción (rxn) se deja proceder en oscuridad por 25 minutos. Trascurrido este período, con 1 volumen de sln. stop se detiene la rxn y se mide la DO a 450nm restando 570nm.
Formato del Ensayo	Placa 96 pocillos de media área
Vol. de muestra (SP o LP)	2 $\mu$ l
Vol. y tipo de Buffer de dilución	20 $\mu$ l de Buffer Citrato/Fosfato 0,05M
Vol. y especificaciones de sln. de sustrato	20 $\mu$ l de TMB 0,006% w/vol./ 0,003% $\text{H}_2\text{O}_2$ en Buffer Citrato/Fosfato 0,05M
Especificaciones de Sustrato elegido	Polvo estéril, Sigma
Solvente de reconstitución del sustrato	Etanol 100% (Solución stock 0,3% TMB)
Vol. de $\text{H}_2\text{O}_2$ agregado a sln sustrato	2 $\mu$ l cada 10ml
Tipo, vol. y concentración de sln. stop	20 $\mu$ l $\text{H}_2\text{SO}_4$ 2N

### 3.2. Prueba de Hipótesis

Finalmente, aplicamos nuestro ensayo a una población de muestras pareadas de LP y SP ( $n=20$ ) de pacientes con TB, a fin de estimar su valor diagnóstico. En tal sentido, no hallamos una tendencia estadísticamente significativa lo cual sugiere que esta enzima, a pesar de su estabilidad, no reúne las características necesarias para ser considerada como un biomarcador de interés (Figura 4C). Interesantemente, encontramos cierta compartimentalización en la actividad dado que pacientes que presentan alta actividad en LP presentan baja actividad en SP y viceversa (Figura 4D).



**Figura 4.** Actividad Peroxidasa en SP y LP de pacientes con TB. **A:** Puesta a punto de dilución óptima para el ensayo colorimétrico. **B:** Estudio de estabilidad de la actividad enzimática en función del tiempo de almacenado de las muestras a -20°C. **C:** Estudio poblacional de la actividad de Peroxidasa en función del tipo de muestra. **D:** Análisis de correlación de la actividad enzimática medida en cada tipo de muestra.

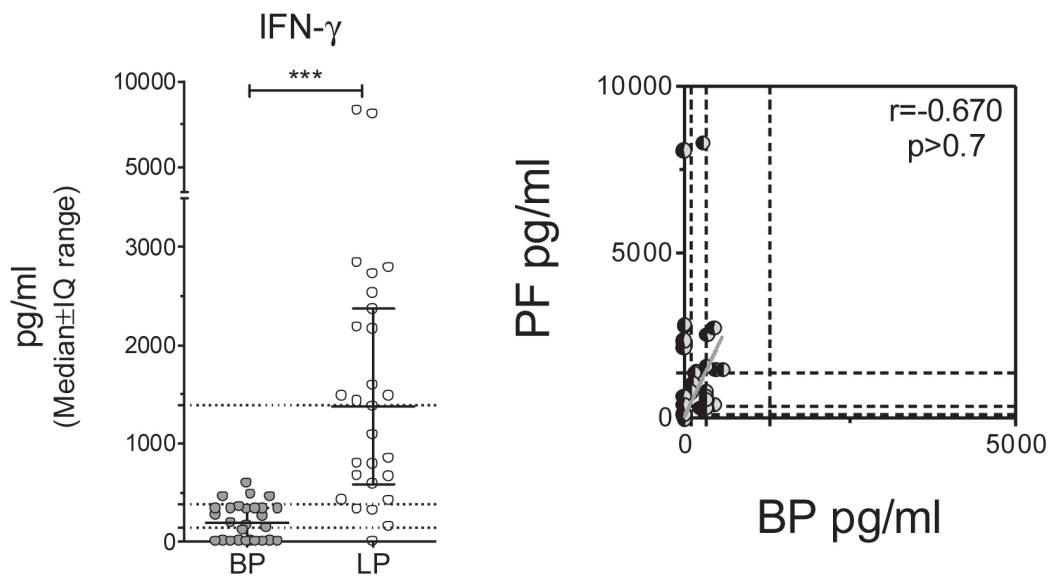
## 4. INTERFERÓN GAMMA

### 4.1. In vivo: ELISA sándwich de LP y plasma sanguíneo (PB)

El LP de pacientes con tuberculosis es un exudado rico en células T efectoras que son reclutadas al sitio de infección en respuesta a la presencia de Ag micobacterianos. Estas células son del tipo TH1, por lo que son secretoras de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN-g. Tomando esto en consideración, decidimos evaluar el potencial diagnóstico de estas citoquinas en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa. Durante el presente

período, determinamos mediante un kit de ELISA comercial (e-Bioscience, L.A, USA) la cantidad de IFN-g en suero (BP) y LP a partir de una población de 27 pacientes tuberculosos. El resultado del estudio preliminar se resume en la figura 5. Pudimos evidenciar que la mencionada citoquina se encuentra altamente enriquecida en el LP respecto de la BP ( $p < 0.0001$ , test pareado de Willcoxon) en la mayoría de los pacientes estudiados (25/27).

El presente resultado fuertemente sugiere que el IFN-g resulta ser un biomarcador muy promisorio para ser aplicado en el diagnóstico diferencial de la pleuresía tuberculosa, dado que se halla fuertemente compartimentalizado en el sitio lesional.



**Figura 5. Dosaje de IFN-g en muestras de plasma (BP) y líquido pleural (LP) de pacientes con tuberculosis pleural activa. Resultados agrupados por tipo de muestra (Gráficos superiores) y correlación entre tipo de muestra dentro de cada paciente (Gráficos inferiores). \*\*\*  $p < 0.0001$ .**

#### 4.2. Ex vivo: Citometría de Flujo

A partir de los resultados de la sección 4.1 y resultados previos (Losi et al. 2011, Eldin et al 2012, Schierloh et al 2012) decidimos identificar y caracterizar la funcionalidad cuales son las células productoras de IFN-g en LP y evaluar métodos para detectarlas. Para ello realizamos un análisis retros-



pectivo de muestras testeadas para producción intracitoplasmática de IFN- $\gamma$  inducida por estimulación *ex vivo* con Mtb irradiado. Para este análisis incluimos derrames pleurales TB, derrames pleurales debidos a otras etiologías infecciosas como helmintiasis e infecciones paraneumónicas bacterianas y derrames pleurales secundarios a patologías malignas (adenomas y mesoteliomas) remitidos a nuestro laboratorio entre los años 2005-2010. Sólo se incluyeron muestras negativas para HIV.

El análisis de ROC (Receiver Operating Characteristic curve) arrojó que un bioensayo basado en % de linfocitos pleurales IFN- $\gamma$  positivos es altamente predictivo para discernir entre derrame pleural tuberculoso y derrame pleural de otro origen ( $p < 0.001$ , datos no presentados). Más aún, realizando un análisis discriminado entre las poblaciones pleurales linfoides productoras de IFN- $\gamma$ , observamos que las células Natural Killer presentan un mayor poder predictivo que las células T (Figura 6A), a pesar de que estas últimas, en función de su mayor número, aportan mayor cantidad neta de dicha citoquina al sobrenadante de cultivo (Figura 6B).

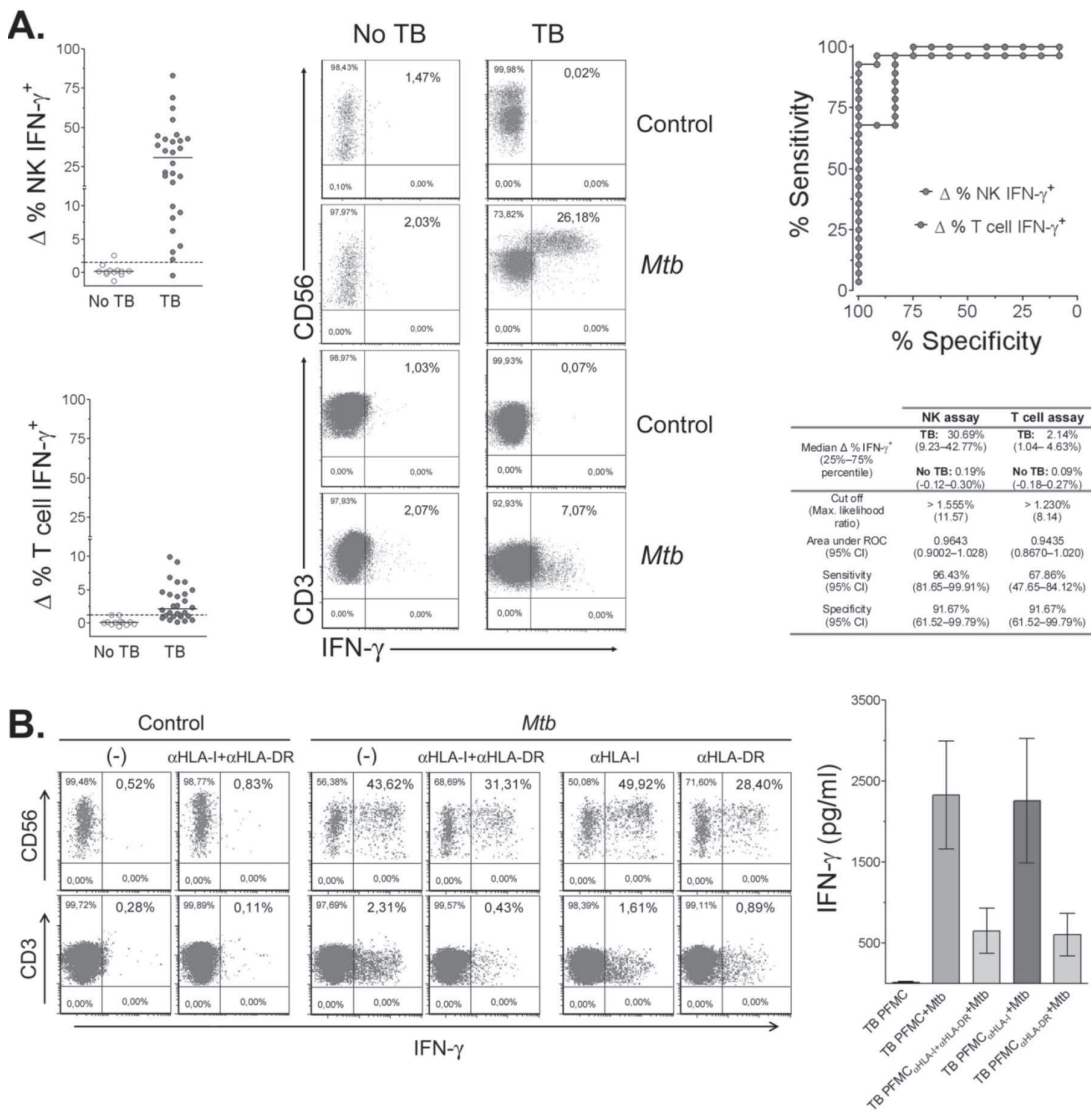
#### **4.3. Ex vivo: ELISA sándwich de Medios Condicionados (MC).**

En virtud de los promisorios resultados del ensayos de producción *ex vivo* de IFN- $\gamma$  medido por citometría de flujo y teniendo en cuenta que la disponibilidad de este equipamiento es todavía infrecuente en los laboratorios de análisis clínicos de nuestro país, nos propusimos evaluar el mismo esquema anterior pero midiendo la secreción de dicha citoquina por ELISA (Figura 6B, panel derecho y datos no presentados). Nuestros resultados preliminares indican que este método presenta las características más promisorias debido a la alta sensibilidad y especificidad diagnóstica sumada al hecho de que su realización no requiere equipamiento sofisticado como la citometría de flujo.

### **RESUMEN**

El diagnóstico de la Pleuresía tuberculosa plantea aún dificultades para la clínica dado esta afección comparte muchas características con otros exudados pleurales de origen maligno e infeccioso. En el presente estudio se describe el desarrollo y puesta a punto de una serie de metodologías de detección de biomarcadores a fin de evaluar su posible valor en la clasificación diferencial de exudados pleurales de distinto origen. Nuestros resultados indican que los ensayos basados en detección de Anticuerpos específicos

como así también la determinación de actividad peroxidasa en líquido pleural (LP) no presentan características que justifiquen su consideración como candidatos útiles. Por otro lado, tanto el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) endógeno presente en la efusión pleural como la producción de IFN- $\gamma$  frente a la estimulación ex vivo con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), son predictores promisorios de pleuresía de origen tuberculoso (TB).



**Figura 6.** ROC análisis de ensayos de respuesta de interferón gamma (IFN-g) en células NK pleurales (rojo) y células T pleurales (violeta) (A.). Análisis de la contribución individual de cada población celular pleural (linfocitos T CD4 positivos, CD8 positivos y NK) a la producción total de IFN-g (B.).

## ABSTRACT

Tuberculous pleurisy diagnosis still remains as an unresolved clinical issue given that this condition shares many characteristic with pleural exudates from infectious or malignant origin. In this study we describe development and implementation of several biomarker assays oriented to cluster pleural effusion of different origins. Our results show that specific Antibodies and pleural peroxidase activity do not exhibited enough capabilities to be considered as potential candidates. By contrast, pleural measurements and ex vivo production of gamma interferon are promising predictors of tuberculous pleurisy.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aleman M, de la Barrera SS, Schierloh PL, et al. 2005. *J Infect Dis.* 192(3):399-409.
2. Antony VB and Mohammed KA. 1999. *Semin Respir Infect.* 14: 9-17.
3. Balboa, L., M. M. Romero, J. I. Basile, C. A. Sabio y Garcia, P. Schierloh, et al. 2011. *J Leukoc Biol* 90:69-75.
4. Eldin EN, Omar A, Khairy M, Mekawy AH, Ghanem MK. *Ann Thorac Med.* 2012
5. Light, R. W. 2002. *N Engl J Med* 346:1971-1977.
6. Losi M, Bocchino M, Matarese A, et al. 2011. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 24(1):159-65.
7. Mutsaers SE. 2002. *Respirology.* 7(3):171-91.
8. Schierloh, P., S. De La Barrera, and M. Sasiain. 2012. INTECH. ISBN 979-953-307-698-979.
9. Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, et al. 2009. *Eur J Immunol.* 39(9):2450-8.
10. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, et al 2007. *Infect Immun.* 75(11):5325-37.
11. Schierloh, P., M. Aleman, N. Yokobori, et al. 2005. *Immunology* 116:541-552.
12. Schierloh P, Yokobori N, Alemán M, et al. 2005. *J Immunol.* 175(10):6852-60.
13. Sharma RK et al. 2003 *Chest.*124:682-687.
14. Valway et al. 1998; *N Engl J Med* 338, 633-639
15. Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, et al. 2009. *Clin Exp Immunol.*157(3):385-94.
16. Zocchi L. 2002. *European Respiratory Journal.* 20: 1545–1558.