

## DEFECTOS EN LA PRODUCCION DE LINFOQUINAS POR LINFOCITOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

L. GARCIA, C. ZULUAGA, M. SANCHEZ

Estudiamos el efecto de los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con PPD y provenientes de individuos sanos tuberculina positivos y negativos y de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, en la prueba de MIF indirecto y en la ingestión de aceite rojo/reducción de NBT, utilizando células peritoneales (CEP) de cobayo inducidas con aceite mineral. Encontramos que los sobrenadantes de linfocitos de los controles tuberculina positivos estimulados con el antígeno, inhibieron la migración de las CEP, mientras que los de los controles tuberculina negativos estimulaban su migración. En los pacientes tuberculosos la respuesta fue variable encontrándose sobrenadantes que inhibieron la migración de las CEP y otros que no lo hacían y por el contrario la aumentaban. Los estudios metabólicos mostraron que los sobrenadantes de cultivos estimulados con PPD de controles tuberculina positivos inducían un aumento significativo del índice de R/I lo cual no se observó en los controles tuberculina negativos, ni en los pacientes tuberculosos. Estos resultados demuestran que en una proporción importante de pacientes tuberculoso los linfocitos no son capaces de producir las linfoquinas que actúan sobre los macrófagos.

### INTRODUCCION

La tuberculosis continúa siendo no sólo un problema de salud pública en los países en desarrollo sino también un reto a la investigación biomédica (1). Los datos contradictorios sobre la efectividad de la vacunación con BCG

(2, 3) indican la carencia de conocimiento sobre los inmunógenos relevantes en las micobacterias y sobre los mecanismos fundamentales en la defensa del huésped. El amplio espectro de la reactividad inmunológica (4), así como la presencia de múltiples anomalías específicas y no específicas (5-10) encontrados en los pacientes tuberculosos, hacen énfasis aún más en la necesidad de examinar cuidadosamente la respuesta inmune de individuos sanos sensibilizados a los antígenos micobacterianos, comparativamente con la de los pacientes tuberculosos. Se acepta que el mecanismo fundamental de defensa contra la tuberculosis es la inhibición del crecimiento bacteriano en el interior de los macrófagos tisulares; sin embargo, para que estas células sean capaces de cumplir su función adecuadamente, se requiere una activación metabólica que aumente sus propiedades antimicrobianas (11). Dicho aumento depende a su vez, de la presencia de linfoquinas producidas por linfocitos T específicos en respuesta a la estimulación antigénica (12, 13). En el presente estudio se investigó la producción de linfoquinas por parte de sujetos sanos y de pacientes tuberculosos y su efecto sobre diversas funciones de macrófagos peritoneales de cobayo.

### MATERIAL Y METODOS

**Sujetos estudiados:** Se estudiaron pacientes del Hospital La María de Medellín y del Consultorio de Vías Respiratorias de la misma ciudad, con diagnóstico de tuberculosis pulmonar comprobado bacteriológicamente. Se consideraron como no crónicos a quienes apenas iban a comenzar tratamiento antituberculoso por primera vez y como crónicos quienes después de seis meses o más de tratamiento continuaban positivos bacteriológicamente o habían presentado recidivas después de tratamientos

---

Dr. Luis F. García: Centro de Investigaciones Médicas; Carmen B. Zuluaga, María C. Sánchez: Sección de Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Solicitud de separatas al Dr. Luis F. García

previos. Como controles se estudiaron individuos sanos, tuberculina positivos o negativos. Se consideraron positivas induraciones de 10 mm o más, 72 horas después de la aplicación de 2 U.I. de PPD (PPD, Rt-23, Instituto Nacional de Salud, Bogotá) y como negativas las menores de 5 mm.

**Obtención de linfocitos.** Se tomaron muestras de sangre venosa utilizando heparina como anticoagulante. Las células mononucleares se separaron después de diluir la sangre total en igual volumen de solución balanceada de Hank's y centrifugada en Ficoll-Hypaque a 800 g/20 min (14). La capa de células mononucleares fue lavada dos veces en Hank's y resuspendida en RPMI-1640, adicionando 10% de suero bovino fetal inactivado y antibióticos, a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml.

**Obtención de células de exudado peritoneal (CEP):** Se inocularon i.p. cobayos adultos jóvenes con 10 ml de aceite mineral (aceite cristal) (15). Noventa y seis horas más tarde, los animales fueron sacrificados por descerebración; la piel del abdomen fue removida asépticamente y se lavó la cavidad peritoneal con 100 ml de Hank's-Alsever (v/v). Las células separadas fueron lavadas dos veces con Hank's y resuspendidas finalmente en medio RPMI-1640 suplementado como se describió para los linfocitos y a la concentración indicada para cada prueba.

**Prueba de MIF indirecto:** Con el fin de definir la dosis óptima de antígeno para la prueba del MIF indirecto (16), se cultivaron linfocitos en presencia de concentraciones variables de PPD (NIH, Bethesda, Md.) por 72 h/37°C. Después de la incubación los cultivos fueron centrifugados a 800 g/10 min y los sobrenadantes colectados se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ , hasta su uso.

En esta prueba, los macrófagos peritoneales inducidos de cobayo fueron ajustados a  $4 \times 10^7$ /ml; se llenaron tubos capilares con la suspensión de CEP y se sellaron en un extremo con Vaspar, se centrifugaron a 50 g/5 min y se cortaron utilizando lápiz de dia-

mante en la interfase entre células y medio. Los extremos de los tubos con las CEP fueron colocados por duplicado en cámaras de MacKness, las cuales fueron selladas con grasa silicona y llenadas con los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos diluidos 1/2, en medio completo. A los sobrenadantes controles se agregó antígeno en las concentraciones correspondientes. Las cámaras fueron incubadas 24 h/37°C, al cabo de las cuales se determinó el área de migración, utilizando un microscopio invertido y ocular calibrado. El porcentaje de inhibición de migración fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MIF} = 1 - \frac{\text{área experimental}}{\text{área control}} \times 100$$

**Efecto de los sobrenadantes sobre la ingestión de aceite rojo — reducción de Nitroazul de Tetrazolium (NBT):** Se cultivaron células de exudado peritoneal por 48 h/37°C a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml en presencia de sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados o no, con 50ug/ml de PPD (NIH, Bethesda, Md) diluidos en medio completo. A los sobrenadantes controles se adicionó antígeno, inmediatamente antes del cultivo con CEP. Después del cultivo las células fueron lavadas y ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^7$  cel viables/ml y su capacidad metabólica se evaluó de acuerdo con la técnica de Stossel (17). La ingestión se estudió mezclando 0.4 ml de NaCl 0.15 M y 0.2 ml de partículas de aceite rojo (amablemente proporcionadas por la Dra. María P. McGee, Bowman Gray Sch of Medicine, Winston Salem, N.C.) emulsionado con lipopolisacárido de *E. coli*. (Sigma Chemical Co) y opsonizados con una mezcla de sueros humanos normales. Para la reducción del NBT, el NaCl fue reemplazado por nitroazul de tetrazolium (Sigma Chemical Co) a una concentración de 2 mg/ml. Los tubos se incubaron a 37°C/20 min; las reacciones se pararon añadiendo 6 ml de solución 1 mM de N-etilmaleimida (Sigma Chemical Co) en NaCl 0.15 M a 4°C y los sedimentos resuspendidos en 2 ml de Dioxano (Merck), calen-

tados a 85°C/15 min, centrifugados a 500 g/15 min y la densidad óptica (DO) del sobrenadante del tubo con aceite rojo determinada a 520 y 580 nm, mientras que la del NBT a 580 nm solamente. Los resultados se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$I = \frac{DO_{520} \times 14.14^*}{T.I. \times \text{No. cel}/10^7}$$

$$R = \frac{DO_{580}(\text{Tubo con NBT}) - DO_{580}(\text{Tubo sin NBT}) \times 14.14^*}{T.I. \times \text{No. cel}/10^7}$$

$$\text{Indice} = \frac{\text{Reducción}}{\text{Ingestión}}$$

I: Ingestión (mg Ac. rojo/10<sup>7</sup> cel/min).  
R: Reducción (ug Formazan/10<sup>7</sup> cel/min)  
T.I.:Tiempo de incubación

\* Factor de conversión del aceite rojo a 520 nm (0.94/DO); donde 0.94 es la densidad (gr/1t) del aceite.

Análisis de datos: En las pruebas de MIF indirecto se consideraron como inhibidores porcentajes mayores de 20% y como estimulación de migración valores inferiores a -20% (16). Las diferencias entre los cuatro grupos comparados en esta prueba se hicieron por medio del chi cuadrado. En el caso de las pruebas de ingestión de aceite rojo o reducción del NBT, la significancia de las diferencias entre las medias se evaluó por la prueba de la T de Student para grupos independientes.

### RESULTADOS

Los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos estimulados con diferentes concentraciones de PPD y provenientes de individuos controles tuberculina positivos, mostraron una inhibición de migración del 40% en sobrenadantes de cultivos con 50 ug/ml, concentraciones menores no indujeron una inhibición significativa de la migración de las CEP, variando entre 0.81% y 16.7% para 10 y 20 ug/ml de antígeno, respectivamente.

La prueba del MIF indirecto utilizando la dosis óptima de 50ug/ml de PPD (Figura 1)

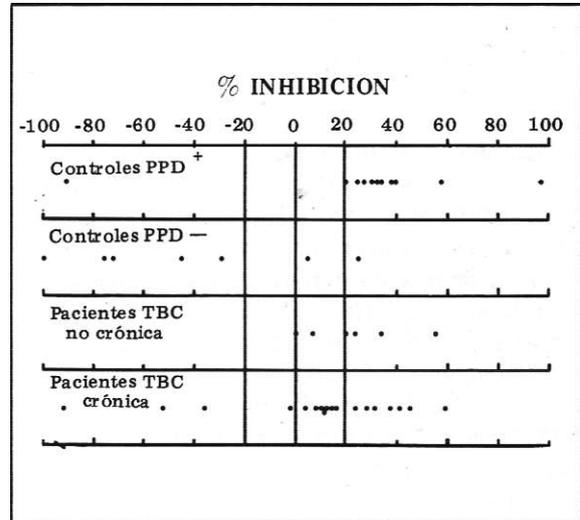


Figura 1. Inhibición de migración de macrófagos peritoneales de cobayo con sobrenadantes de cultivo de linfocitos de pacientes tuberculosos Vs sujetos sanos estimulados con P.P.D. (50 ug/ml.)

mostró diferencias significativas ( $p < 0.005$ ) entre los grupos estudiados. En los controles tuberculina positivos 10/11 presentaron MIF positivo y sólo uno indujo un aumento de la migración. En los controles tuberculina negativos, la situación fue inversa pues, 6/7 sobrenadantes no indujeron MIF y 5/7 mostraron un aumento de la migración. En los pacientes tuberculosos no crónicos 4/6 sobrenadantes exhibieron una inhibición de migración positiva y no se observó ningún caso de estimulación de la migración; finalmente, en los pacientes con tuberculosis crónica se observó la mayor heterogeneidad pues, 7/18 (39%) respondieron positivamente inhibiendo la migración de las CEP, 3/18 (17%) por el contrario la estimularon y, 8/18 (44%) no mostraron variaciones en la migración celular.

Los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de individuos controles o pacientes ejercieron un efecto variable sobre la capacidad de las CEP para ingerir aceite rojo y reducir el NBT (Tabla 1). En los controles tuberculino positivos la presencia del antígeno se reflejó en una disminución no significativa de la in-

**Tabla 1.** Efectos de los sobrenadantes de cultivos de linfocitos estimulados con PPD sobre la ingestión de aceite rojo y reducción del nitro azul de tetrazolium por macrófagos peritoneales de cobayo.

	PPD 50 ug/ml	Ingestión mg/10 <sup>7</sup> cel/min	Reducción ug/10 <sup>7</sup> cel/min	Índice R/I
Controles	-	.085 ± .024**	.012 ± .005	.127 ± .05
Tuberculina +	+	.023 ± .005	.039 ± .012	1.72 ± .30
				p = 0.005
Controles	-	.047 ± .008	.010 ± .004	.25 ± .11
Tuberculina -	+	.039 ± .008	.023 ± .002	.713 ± .15
				p = 0.02
Pacientes	-	.031 ± .006	.024 ± .008	.85 ± .32
	+	.024 ± .005	.016 ± .010	.96 ± .64

\*\* Media ± S.E.M. de seis (6) experimentos en cada grupo.

gestión de 0.085 a 0.023 mg/10<sup>7</sup> cel/min. de aceite rojo en los cultivos sin antígeno comparativamente con los cultivos con PPD; sin embargo, los cultivos estimulados presentaron una reducción de NBT de 0.039 ug/10<sup>7</sup> cel/min, tres veces mayor que la encontrada en los cultivos controles. Estos cambios se tradujeron en un índice de Reducción/Ingestión (R/D) significativamente elevado ( $p \leq 0.005$ ) en los cultivos con PPD que presentaron 1.72 con respecto a los controles cuyo índice fue de 0.127.

En los controles tuberculina negativos la presencia del antígeno no indujo cambios tan notorios en la capacidad de las CEP para ingerir aceite rojo o reducir NBT y aunque los índices de R/I fueron mayores en las CEP con sobrenadantes provenientes de cultivos con PPD, la diferencia con el control no fue estadísticamente significativa. De igual forma es importante señalar que mientras el índice en las CEP con sobrenadantes de tuberculina positivos incubados con PPD fue de 0.713, el de los controles tuberculina positivos fue de 1.72 como ya se señaló ( $p \leq 0.02$ ).

En los pacientes tuberculosos no se encontraron diferencias entre los sobrenadantes de tres crónicos y los tres no crónicos estudiados, por lo cual se presentan globalmente. La presencia de PPD no indujo cambios importantes en la capacidad de las CEP de ingerir aceite rojo o reducir NBT. Es interesante que aunque la diferencia no era significativa, el índice R/I en los cultivos sin antígeno fue de 0.85 mientras que en los controles tuberculi-

na positivos y negativos fue de 0.127 y 0.25 respectivamente. La presencia del antígeno indujo un leve aumento no significativo en el índice R/I de los pacientes, el cual fue de 0.96. La heterogeneidad en la capacidad de los sobrenadantes de linfocitos estimulados con PPD provenientes de los pacientes tuberculosos para inducir cambios en los CEP, fue evidenciada por la ausencia de reducción y por lo tanto un índice de cero (0) en dos pacientes (uno crónico y uno no crónico) mientras que en otro crónico, el índice alcanzó valores de 2.72 y en los otros tres valores intermedios.

#### DISCUSION

Los resultados de la presente investigación muestran que una proporción importante de los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de pacientes tuberculosos, estimulados *in vitro*, con antígenos micobacterianos; son incapaces de activar metabólicamente los macrófagos o de inhibir la migración de estas células comparativamente con los sobrenadantes provenientes de individuos sanos tuberculina positivos.

En la prueba de MIF indirecto, utilizando células de exudado peritoneal de cobayo como indicadores, se observó claramente que mientras los sobrenadantes de controles positivos o negativos diferenciaban la respuesta migratoria, en los pacientes tuberculosos podían diferenciarse tres patrones de respuesta: 1) la mayoría de los pacientes con tuberculosis no crónica y cerca del 40% de los pacientes con infección crónica produjeron MIF, 2) una tercera parte de los pacientes no crónicos y cerca del 45% de los crónicos presentaron una respuesta de MIF negativa y tampoco indujeron un aumento en la migración de las CEP y 3) una proporción menor (17%) de los crónicos cuyos sobrenadantes aumentaron la migración de las CEP. Se sabe que el resultado neto de la migración en las pruebas de MIF, depende de la presencia de factores inhibidores y estimuladores de la migración en el sobrenadante del cultivo de linfocitos (18, 19); pero quizá lo más importante de esta observación es que estos factores parecen ser producidos por células diferentes (20) de tal manera que el factor inhibidor de

la migración de los macrófagos (MIF) sería producido en el ratón por linfocitos Lyt-1.2 y en humanos por linfocitos T<sub>H</sub> considerados como linfocitos T ayudadores mientras que el factor estimulador de la migración (MStF) sería producido en el ratón por las células Lyt-2.2 y en el humano por linfocitos T de fenotipo supresor. En este sentido nuestros resultados confirman que la prueba de MIF es un indicativo de la regulación de la respuesta inmune contra el bacilo tuberculoso y que la producción de linfoquinas está sujeta a los mecanismos de ayuda y supresión (21) que como se ha demostrado se encuentran alterados en el paciente tuberculoso (22, 23). Sin embargo es necesario recurrir a otras pruebas que se correlacionen más directamente con la capacidad de las linfoquinas producidas por el linfocito T para activar metabólicamente a los macrófagos y en consecuencia aumentar su capacidad antimicrobiana. En este sentido la técnica de ingestión de aceite rojo y reducción del NBT es especialmente significativa pues permite detectar simultáneamente la capacidad fagocítica y la activación del metabolismo de la glucosa por vía de la hexosamnofosfato (17, 24) que lleva a la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual parece tener un potente efecto anti-micobacteriano (25). En nuestros experimentos se demostró claramente que los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de individuos controles tuberculina positivos estimulados *in vitro* con PPD indujeron un aumento del índice de R/I el cual fue finalmente un indicativo de la efectividad del proceso fagocítico. Dicho aumento no se demostró en los controles tuberculina negativos ni en los pacientes tuberculosos; pero hay que insistir en que al igual que en los estudios de MIF, en este caso los pacientes también mostraron una mayor variabilidad debida a la ausencia de reducción por parte de macrófagos incubados con sobrenadantes de dos cultivos de linfocitos estimulados con el antígeno. Otro de los hallazgos interesantes en los estudios con aceite rojo/NBT fue la disminución en la ingestión inducida por los sobrenadantes de los cultivos con PPD de los controles tuberculina positivos. Varios autores han reportado (26, 27) que monocitos

aislados de pacientes tuberculosos presentan naturalmente un estado de activación mayor que las células de individuos no enfermos; aunque los macrófagos estudiados por nosotros en las pruebas metabólicas provenían de cobayos, llama la atención que los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de dos pacientes, aun en ausencia de antígeno, indujeron un índice R/I intermedio entre los controles tuberculina positivos y negativos, es posible que este estado intermedio de activación se dé por linfoquinas producidas por linfocitos estimulados previamente *in vivo* en los pacientes tuberculosos que cuando son cultivados *in vitro* continúan produciendo las linfoquinas en bajas concentraciones; sin embargo, esta posibilidad debe ser investigada más cuidadosamente antes de validarla.

La naturaleza de los factores activadores de los macrófagos no es bien conocida. Hace algunos años se propuso que MIF y MAF podrían corresponder a una misma molécula (28); pero más recientemente utilizando hibridomas de células T (29, 30), clones de Linfocitos T (31) y tecnología deDNA recombinante (32) se ha demostrado que el interferón-gamma es la molécula más importante, pero no la única, en la activación de los macrófagos. En el caso específico del *Mycobacterium tuberculosis* los datos son contradictorios pues Douvas et al (33), utilizando la técnica de unidades formadoras de colonia, demostraron que el interferón-gamma recombinante paradójicamente estimulaba la multiplicación del microorganismo intracelularmente mientras que Rook et al (34) basándose en la incorporación de 3H-Uracilo demostraron un efecto positivo del interferón-gamma recombinante inhibiendo la replicación del bacilo dentro de los macrófagos humanos.

Finalmente, nuestros resultados, al igual que los de muchos otros autores, confirman un defecto en la respuesta inmune de los pacientes tuberculosos la cual debe estudiarse más detalladamente con el fin de obtener una mejor comprensión de los mecanismos normales y patológicos que ocurren en las defensas frente a este microorganismo y eventualmente mejorar la prevención y el manejo de esta enfermedad.

## SUMMARY

Lymphocytes from patients with pulmonary tuberculosis and from tuberculin positive and negative healthy controls were cultured with and without PPD for 72 hours at 32°C. Culture supernatants were assayed by indirect MIF and by oil red ingestion/NBT reduction techniques using guinea pig peritoneal cells as indicator macrophages. Supernatants from positive controls inhibited macrophage migration while those from negative controls stimulated their migration. Supernatants from patients with pulmonary tuberculosis showed variable results but less than half were able to inhibit macrophage migration. Oil red ingestion/NBT reduction assay demonstrated that supernatants from cultures of tuberculin positive controls stimulated with antigen (PPD) induced a significant increase of the reduction/ingestion index which was not seen in supernatants from negative controls nor from patients. These results show a defect in the lymphocytes of patients with pulmonary tuberculosis, which in a significant number do not produce lymphokines able to activate macrophages.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Personal del Hospital La María y del Consultorio de Vías Respiratorias del Servicio Seccional de Salud de Antioquia. La presente investigación fue financiada por Colciencias y por el Comité Central de Investigaciones de la Universidad de Antioquia a los cuales los autores expresan su reconocimiento.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ASSAAD F, AZUMA I, BUCHANAN TM, et al. Plan of action for research in the Immunology of tuberculosis: Memorandum from a WHO Meeting. Bull WHO 1983 ; 61: 779-785.
- 2.- Vaccination against Tuberculosis: Report of an ICMR/WHO Scientific group. WHO Technical report series, No. 651, 1980.
- 3.- YOUMANS GP. Tuberculosis. Philadelphia: WB Saunders Co, 1979.
- 4.- LENZINI L, ROTTOLI P, ROTTOLI L. The spectrum of human tuberculosis. Clin Exp Immunol 1977; 27: 230-237.
- 5.- ZEITZ SJ, OSTROW JH, ARSDEL PPV. Humoral and cellular immunity in the anergic tuberculosis patient. J All Clin Immunol 1974; 53: 20-26.
- 6.- NASH DR, DOUGLASS EU. Anergy in active pulmonary tuberculosis. A comparison between positive and negative reactors and an evaluation of 5 TU and 250 TU skin test doses. Chest 1980; 77: 32-37.
- 7.- Mc MURRAY DN, ECHEVERRI A. Cell-Mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis. Am Rev Resp Dis 1978; 118: 827-834.
- 8.- KVENTNY J. T-Lymphocyte determination in tuberculosis. Scand J Resp Dis 1977; 58: 181-184.
- 9.- AL-TAWIL NG, THEWAINI AJ. Study of the immunological status of patients with pulmonary tuberculosis. Scand J Immunol 1978; 8: 333-338.
- 10.- ARISTIZABAL L, GARCIA LF. Formation of total and stable E- Rosettes by lymphocytes from patients with pulmonary tuberculosis stimulated by Con A or PPD. J Clin Lab Immunol 1985; 16: 31-36.
- 11.- LAGRANGE PH, CLOSS O. Protective immunity to chronic bacterial infection. Scand J Immunol 1979; 10:285-290.
- 12.- COLLINS FM. Cellular mediators of tuberculin hypersensitivity and antituberculous immunity. Afr J Clin Exp Immunol 1982; 3: 265-279.
- 13.- CHAPARAS SD. Immunity in tuberculosis. Bull WHO 1982; 60: 447-462.
- 14.- BOYUM A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Immunol 1976; 5 (Suppl 5): 9-15.
- 15.- STUART AE, HABESHAW JA, DAVIDSON E. Phagocytes in vitro. In: WEIR, DM, ed. Handbook of Experimental Immunology. Oxford: Blackwell Sci Pub 1979.
- 16.- BLOOM BR, GLADE PR. In vitro methods in Cell-mediated immunity. New York: Academic Press; 1971.
- 17.- STOSSEL TP. Phagocytosis. In: ROSE NR, FREEDMAN H, eds. Manual of clinical immunology. Washington: Am Soc Microbiol; Cap 38.
- 18.- BERGSTRAND H. Lymphocyte derived factors affecting cell migration *in vitro*. Allergy 1979; 34: 69-96.
- 19.- Mc SWENN JM, RAJARAMAN K, RAJARAMAN R, FOX RA. Macrophage migration inhibition factor (MIF): Reducing the variables. J Immunol Meth 1982; 52: 127-136.
- 20.- FOX RA, RAJARAMAN K. A Link between helper and suppressor factors and the lymphokines migration inhibition factor and migration stimulation factor. Cell Immunol 1981; 59: 448-454.
- 21.- FOX RA, RAJARAMAN K. The role of suppressor cells in the production of macrophage migration inhibition factor. Immunol Comm 1978; 7: 311-321.
- 22.- ELLNER JJ. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. Immunol 1978; 121: 2573-2579.
- 23.- WADEE AA, MENDELSON D, RABSON AR. Characterization of a suppressor Cell-Activating factor (SCAF) released by adherent cells treated with *M. tuberculosis*. J Immunol 1983; 130: 2266-2670.
- 24.- ALFOLDY P, LEMMEL EM. Reduction of nitroblue tetrazolium for functional evaluation of activated macrophages in the Cell-mediated immune reaction. Clin Immunol Immunopathol 1979; 12: 263-270.
- 25.- LOWRIE DB. The Macrophage and mycobacterial infections. Trans Roy Soc Trop Med 1983;77: 646-655.
- 26.- KING GW, BAIN G, LOBUGLIO AF. The effect of tuberculosis and neoplasia on human monocyte staphylocidal activity. Cell Immunol 1975; 16: 389-395.
- 27.- ELLNER JJ, SPAGNUOLO PJ, SCHACHTER BZ. Augmentation of selective monocyte functions in tuberculosis J Inf Dis 1981; 144: 391-398.
- 28.- DAVID JR Macrophage activation by lymphocyte mediators. Fed Proc 1975; 34: 17-30.
- 29.- SCHEREIBER RD, PAU JL RUSSEL SW, ALTMAN A, KATZ DH. Macrophage-activating factor produced by a T-cell hybridoma: Physico-chemical and bio-synthetic resemblance to g-interferon. J Immunol 1983; 131: 826-832.
- 30.- WU-HSIEH B, ZLOTNIK A, HOWARD DH. T-cell hybridoma produced lymphokine that activated macrophages to suppress intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immunity 1984; 43: 380-385.
- 31.- TITUS RC, KELSO A, LOUIS JA. Intracellular destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor/interferon.

- Clin Exp Immunol 1984; 55: 157-165.
- 32.- SCHULTZ RM, KLEINSCHMIDT WI. Functional identity between murine g-interferon and macrophage activating factor. Nature 1983; 305: 239-242.
- 33.- DOUVAS GS, LOOKER DL, VATTER AE, CROWLE AJ. Gamma interferon activated human macrophages to become tumoricidal and leishmaniacidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. Infect Immunity 1985; 50: 1-8.
- 34.- ROOK GAW, STEELE J, FRAHER L, BARKER S, KARMALI R, O'RIORDAN J, STANFORD J. Vitamin D<sub>3</sub>, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. Immunology 1986; 57: 159-163.