

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



"DETERMINACION DE LAS MOLECULAS
COESTIMULADORAS CD28 Y CD80 Y SU EFECTO EN LA
PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON
LEPRA LEPROMATOSA"

TRABAJO QUE CON CARÁCTER DE
TESIS DOCTORAL
P R E S E N T A
MARY FAFUTIS MORRIS
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
B I O L O G I C A S
AREA INMUNOBIOLOGIA
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. MAYO 1998

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Area Inmunobiología

Presenta

M.en C. Mary Fafutis Morris

Tutor

Dra. en C. Galina Zaitzeva Petrovna

Título

Determinación de la moléculas coestimuladoras CD28 y CD80 y su efecto
en la proliferación de linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa

Lugar de realización

Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología
Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Universidad de Guadalajara
e
Instituto Dermatológico de Jalisco
"Dr. José Barba Rubio"

96602/016600
P182
G.A.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**M.C. MARY FAFUTIS MORRIS
PRESENTE.**

La presente es para informarle que su proyecto de tesis titulado **DETERMINACION DE LAS MOLECULAS COESTIMULATORIAS CD28 Y CD80 Y SU EFECTO EN LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON LEPROMA LEPRMATOSA**, se considera **aceptado** por el Consejo de Posgrado en Ciencias Biológicas. Se sugiere que Ud. tome en cuenta las observaciones que se hicieron durante su presentación ante dicho consejo y en caso necesario que realice las modificaciones oportunas.

Así mismo le informo que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la **Dra. Galina Zaitseva Petrovna**.

El Comité Tutorial que lo apoyará y evaluará en su trabajo de Doctorado esta formado por las siguientes personas:

Dra. en C. Galina Zaitseva Petrovna
Dr. en C. Adrian Daneri Navarro
Dr. en C. Alberto Morales Villagran
Dra. en C. Anne Santerre Lucas
Dr. en C. Juan Armendaris Borunda

Sin otro particular por el momento, agradecemos su presentación y su dedicación y aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., el 21 de abril de 1995

Dra. Galina Zaitseva Petrovna
Coordinadora de Investigación y Posgrado

c.c.p. Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas.
c.c.p. Director de Tesis.
c.c.p. Comité Tutorial.

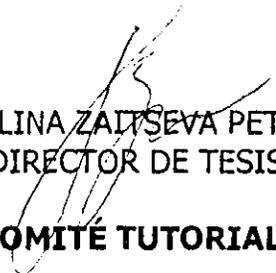
Dr. EDUARDO RIOS JARA
COORDINADOR DEL POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por el C. **MARY FAFUTIS MORRIS**, con el título: **DETERMINACION DE LAS MOLECULAS COESTIMULATORIAS CD₂₈ Y CD₈₀ Y SU EFECTO EN LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON LEPROMATOSA**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro en particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Zapopan, Jal., a 7 de mayo de 1998


Dra. GALINA ZAITSEVA PETROVNA
DIRECTOR DE TESIS

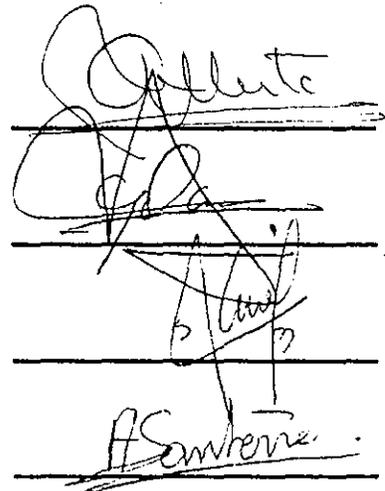
COMITÉ TUTORIAL:

Dr. Alberto Morales Villagran

Dr. Adrian Daneri Navarro

Dr. Juan Armendaris Borunda

Dra. Anne Santerre Lucas



AGRADECIMIENTOS.

A TODOS LOS PACIENTES DE HANSEN DEL INSTITUTO DERMATOLOGICO DE JALISCO " DR. JOSE BARBA RUBIO" QUE COLABORARON DESINTERESADAMENTE EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A LA DRA. EN C. GALINA ZAITZEVA PETROVNA, DR. EN C. JUAN ARMENDARIZ BORUNDA, DR. EN C. ADRIAN DANERI NAVARRO, AL M.C. ROBERTO MORALES ORTIZ, AL DR. AMADO GONZALEZ MENDOZA Y AL M.EN C. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.

A TODO EL PERSONAL DEL CENTRO DE INVESTIGACION EN INMUNOLOGIA Y DERMATOLOGIA (CIINDE), ESPECIALMENTE A LA M. EN C: CECILIA GUILLEN VARGAS.

AL PERSONAL DE LA UNIDAD DE PATOLOGÍA CLÍNICA ESPECIALMENTE AL DR. LUIS SANTOSCOY TOVAR.

GRACIAS.

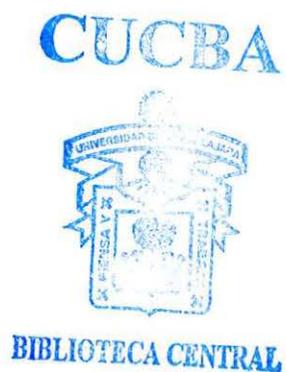
DEDICATORIAS

A MI ESPOSO Y A MIS HIJOS.

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MIS AMIGAS

ESPERO QUE ESTE MANUSCRITO COMPENSE EN PARTE EL TIEMPO
QUE NO LES HE DEDICADO



CONTENIDO

Instituciones Participantes

Resumen

Antecedentes Históricos

Epidemiología

Aspectos Clínicos

Inmunología de la Lepra

Reconocimiento antigénico y señales coestimuladoras

Planteamiento del problema

Hipótesis

Objetivo principal

Objetivos particulares

Material y metodología

Resultados

Discusión

Conclusiones.

Bibliografía

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

1.-CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD (CUCS) DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

2.- INSTITUTO DERMATOLOGICO DE JALISCO "DR. JOSE BARBA RUBIO"

3.- CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (APOYO OBTENIDO BAJO EL CODIGO 1485P-M)

CUCPA



BIBLIOTECA CENTRAL

RESUMEN.

Durante el reconocimiento específico de un antígeno (Ag), los linfocitos T en reposo, son estimulados mediante de la interacción con las células presentadoras de Ag (CPA), a través dos señales , la primera es proporcionada por la interacción del complejo TCR/CD3 del linfocito T con antígenos (o mitógenos) presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II por las CPA). La segunda es mediada por la molécula CD28, presente en la membrana de linfocitos T y su ligando específico CD80 que es una glucoproteína inducible por activación en las CPA. Ambas señales inician una serie de eventos metabólicos a partir de la membrana con reacciones de fosforilación, y posteriormente coinciden a nivel del núcleo en la activación del factor transcripcional JUN involucrado directamente en la síntesis de IL-2.

Debido a que los linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa presentan deficiencias tanto en la proliferación como en la síntesis de IL-2, eventos en los que está involucrada la coestimulación vía CD28/CD80 . Se planteó el presente trabajo para conocer y evaluar la presencia y funcionalidad de estas dos moléculas en los linfocitos T y CPA de los pacientes con lepra lepromatosa.

Los resultados obtenidos en los experimentos en que se comparó la expresión de la molécula coestimuladora CD80 en linfocitos B y macrófagos de pacientes con lepra lepromatosa y sujetos sanos, no se encontró ninguna diferencia significativa. En la expresión de las subpoblaciones funcionales CD4 y CD8 no hubo diferencia entre los individuos sanos y los pacientes con LL. Sin embargo, en la expresión de la molécula coestimuladora CD28 se observó una disminución significativa de $p < 0.01$ en los linfocitos de los pacientes con LL al compararlos con sujetos sanos.

Por otro lado, los índices de estimulación obtenidos en cultivo de los linfocitos T de pacientes con LL fueron significativamente menores ($p < 0.02$) que los obtenidos en linfocitos T de sujetos sanos, en presencia del mitógeno (PHA). Revirtiéndose esta diferencia cuando se coestimularon exogenamente con el anticuerpo antiCD28.

La adición del anticuerpo antiCD80 no ejerció ningún efecto en la proliferación de los linfocitos T de pacientes LL. ante el mismo estímulo.

El I.E. de los linfocitos T de pacientes LL estimulados con antígeno de *M.leprae* fué significativamente menor que el presentado por los linfocitos T de sujetos sanos ante el mismo estímulo. La adición de los anticuerpos anti-CD28 y anti-CD80 no modificaron los datos ya encontrados.

Se desconoce el mecanismo por el cual se inicia la anergia que presentan los linfocitos T de pacientes LL, pero los datos aquí presentados señalan claramente tres cosas: 1) los pacientes LL tienen deficiencia en la expresión de la molécula coestimuladora CD28 . 2) los linfocitos T de pacientes LL presentan una proliferación disminuida ante mitógenos, que se recupera al adicionar el

anticuerpo anti-CD28 y 3) la deficiente proliferación ante estímulo antigénico con *M.leprae* que presentan los linfocitos de los pacientes LL no se modifica con la adición de los agonistas de las moléculas coestimuladoras CD28 y CD80

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL



ANTECEDENTES HISTORICOS.

La lepra es una enfermedad muy antigua, se han encontrado tratados médicos provenientes de en China e India que datan del siglo XV a.C. donde se describe la lepra. Existen reportes que señalan que se conocía en Indostán hacia 1500 a.C., Rueda Samhita menciona el termino “kushta” que comprende a la lepra y otras enfermedades de la piel 1400 a.C. Un anónimo bardo alude a la enfermedad en uno de los Vedas, libros sagrados del Brahmanismo 1300-1000 a.C. en Egipto. El papiro Ebers y el papiro Brugsh mencionan la lepra bajo el termino Uchedu 800 a.C. En el Antiguo Testamento ” 782-732 a.C. la cultura hebrea la denominaba TSARAATH relacionándolo con el pecado y siendo sinónimo de impureza.

En China, alrededor de 500 a.C. en el Nei Ching Su Wen, uno de los escritos clásicos de la medicina, describe a la lepra con el término de “lifeng” (parálisis severa) caracterizada por la pérdida de las cejas, nódulos y ulceraciones atribuidas a “una falta del movimiento de las fuerzas de defensa (wei-chi)”.

Herodoto, 480-425 a.C., escribió sobre la lepra desde Persia, y posteriormente en la Antigua Grecia, Areato de Capodacia realiza una descripción de la lepra. En Egipto se examinaron momias que datan del siglo II a.C. donde se encontraron pruebas de la existencia de la enfermedad (1). En los siglos V y VI la lepra empieza a diseminarse. La Edad Media fue un periodo de gran propagación de la endemia,

con importante diseminación en las Cruzadas; las peregrinaciones de la Cristiandad Europea a Santiago de Compostela, provocaron el contagio en la población de Galicia. Los colonizadores noruegos, portugueses y españoles, trajeron la lepra al Nuevo Mundo.

La lepra llegó a México hace más de 4 siglos, extendiéndose poco a poco. Las relaciones comerciales con el Oriente y Europa durante toda la Colonia, contribuyeron a aumentarla. Un siglo después se fundó el Hospital de San Lázaro que duró más de tres siglos, aunque esto fue insuficiente para detener el lento pero implacable progreso de la endemia de lepra en este país.

Fue hasta 1873 cuando Gerhard Henrik Armauer Hansen, médico noruego, observó en cortes de lesiones de pacientes con lepra la presencia constante de pequeños bastones intracelulares y propuso así su teoría de que estos eran los responsables de la enfermedad. Debido a esto se le considera el descubridor del agente causal de la enfermedad, el bacilo *Mycobacterium leprae* o bacilo de Hansen (2,3,4,5).

En 1980 la OMS introdujo en el mundo, un ambicioso programa para erradicar la lepra antes del año 2000 que consiste en una terapia multidroga a base de antibióticos y bacteriostáticos, rifampicina, clofacimina y dapsona. Al parecer el programa ha resultado todo un éxito, para 1997 han sanado ya 8 millones de personas en el mundo, 890000 están siguiendo el tratamiento. Sin embargo, se detectaron alrededor de 570,000 nuevos casos en este año.(1).

EPIDEMIOLOGIA

La lepra es una enfermedad cosmopolita, que actualmente predomina en regiones tropicales y subtropicales, pero anteriormente existió en zonas con clima frío, siendo endémica en algunos países de Europa (4)

En Estados Unidos se reportan cerca de 6000 casos, y como zonas endémicas Louisiana, Texas, California y Hawaii. De estos pacientes el 75% son extranjeros; en su mayoría originarios de México, Filipinas y el Sudoeste de Asia (6).

En México se estima que pueden existir entre 50 y 100 mil pacientes, aunque los registros hablan de 15 a 20 mil casos, la OMS recomienda multiplicar por 5 la cifra de pacientes registrados. Hay lepra en todo el país, predominando en 3 zonas: la principal es la Centro Occidental: Sinaloa, Colima, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, Durango, Querétaro, Estado de México y Distrito Federal. Los 4 primeros estados presentan una prevalencia mayor de 1 X 1000, pudiendo llegar hasta de 3 X 1000 habitantes. La zona peninsular incluye Yucatán y Campeche, y la zona Nororiental formada por Nuevo León y Tamaulipas.

En general México se considera como país de mediana endemia, con una prevalencia de menos de 0.5 X 1000 habitantes.

Transmisión.

La principal fuente de contagio de la lepra humana es através del propio enfermo a los sujetos contacto, no todos los pacientes son capaces de transmitir la enfermedad, ocurre principalmente por pacientes lepromatosos no tratados, o tratados inadecuadamente. El riesgo de la infección depende de la proximidad del contacto, cantidad de bacilos y tiempo de exposición. Es de pensar que la lepra se adquiere en las primeras décadas de la vida, pero su periodo de incubación tan largo y lo discreto de sus síntomas al inicio, ocasiona que se detecte con mayor frecuencia en los pacientes mayores de 30 años. La lepra sobre todo la lepromatosa en general, es mas predominante en hombres, mientras que la tuberculoide en mujeres.

Aunque la dermis esta intensamente infiltrada en los pacientes, la piel intacta contiene pocos gérmenes y es escasamente contagiosa. Hay bacilos en la leche materna, pero no hay pruebas de transmisión por el aparato digestivo. *M. leprae* puede localizarse también en sangre, orina, semen y heces, pero no son importantes focos de diseminación. Por el contrario las secreciones nasales son consideradas como la principal fuente, ya que contienen de 107 a 108 bacilos por ml(5,7,8)

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

ASPECTOS CLINICOS.

La lepra afecta predominantemente la piel, nervios periféricos y las mucosas. La clínica distintiva de la enfermedad puede ser agrupada en tres aspectos dependiendo de su mecanismo 1) Debido principalmente a la proliferación bacteriana, 2) a la respuesta inmunológica del huésped contra el bacilo de la lepra y 3) a la neuritis periférica causada por los dos primeros procesos. La lepra siempre involucra nervios periféricos, casi siempre involucra la piel y frecuentemente mucosas. Los tres signos cardinales de la enfermedad son lesión de la piel, anestesia de la piel y engrosamiento de los nervios periféricos.

La mayoría de las personas resisten efectivamente la infección del *M.leprae*, aun en áreas altamente endémicas. Se cree que unos 200 individuos llegan a infectarse con el bacilo por cada caso que se desarrolla y se detecta (9,10,11).

LEPRA LEPROMATOSA (LL).- Es la forma anérgica de la enfermedad. La proliferación de *M.leprae* resulta en lesiones de la piel con una variedad de tipos, desde el desarrollo difuso y generalizado, hasta el nodular (nódulos llamados lepromas) en una dispersa y simétrica distribución. Los lepromas de la piel en una LL avanzada, pueden contener 1010 bacilos por gramo de tejido. Las lesiones lepromatosas características involucran segmentos fríos de la superficie corporal central. Con esta preferencia de temperatura del bacilo, son afectados bacteriológicamente el tercio anterior del ojo, la mucosa nasal y troncos de nervios

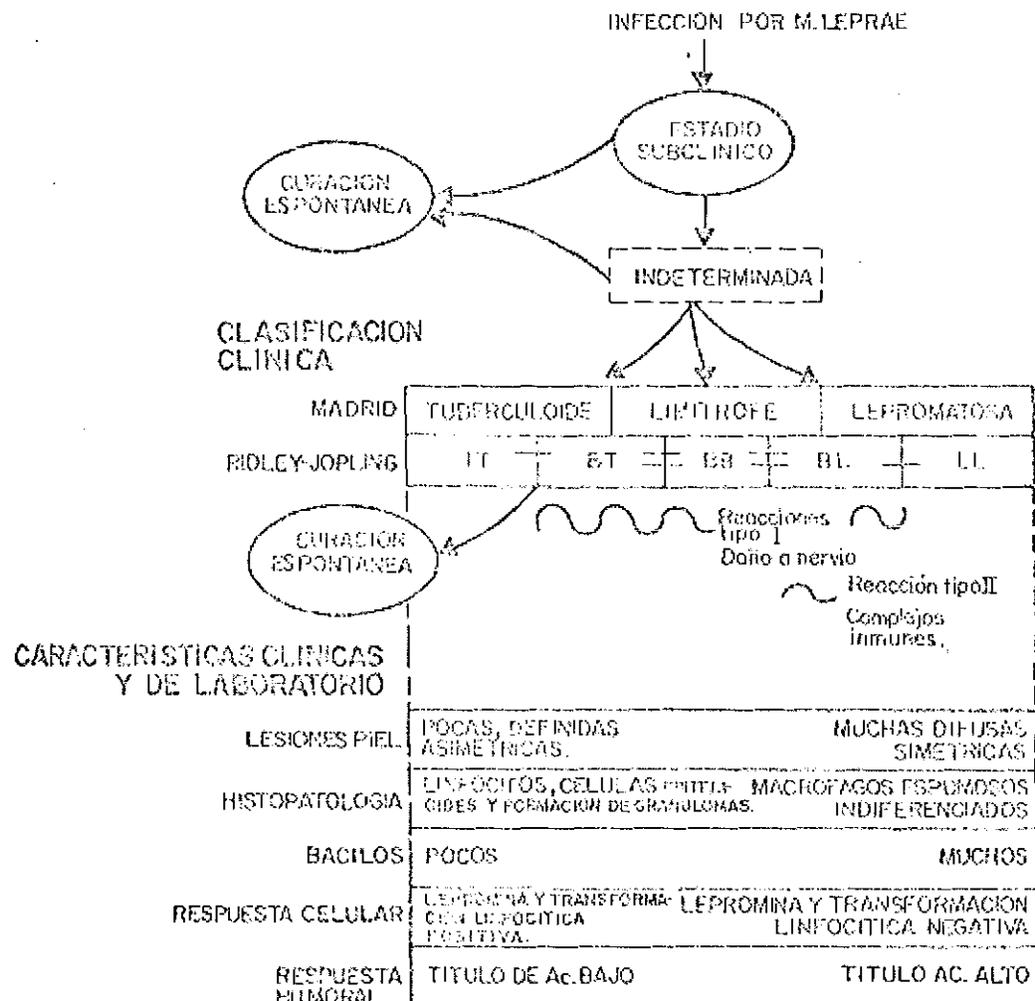
periféricos de curso superficial (los cubitales en codos, medianos en muñecas, peroneales en rodillas y tibial posterior en tobillo). Hay un patrón característico de pérdida sensorial debido a la afección de fibras nerviosas dérmicas en la LL avanzada, involucrando también áreas frías de la superficie corporal.

Los pacientes tienen marcados síntomas causados por la masa bacteriana y los acúmulos de macrófagos requeridos para contenerla. La histopatología de las lesiones lepromatosas es característica por contener una masiva colección de macrófagos y en su interior una gran cantidad de bacilos y lípidos, los cuales crean una apariencia espumosa, pudiendo ocupar el 90% de la dermis, siendo separados por una zona clara (banda de Unna) (12,13).

LEPRA TUBERCULOIDE (TT).- Es la otra forma polar de la enfermedad, en contraste con la lepra lepromatosa en lo que a la proliferación bacteriana signos y síntomas resulta. Gran parte de la presentación clínica en la TT es debido a la combinación de la proliferación bacteriana y la respuesta inmunológica del hospedero contra el bacilo. En la TT, se presentan una o cuando mucho unas pocas lesiones de la piel, bien circunscritas y anestésicas. Puede haber engrosamiento de los nervios periféricos en la vecindad de la piel lesionada. Histopatológicamente hay muy escasos o ningún bacilo ácido-alcohol resistente demostrable, existe un denso y bien organizado granuloma, células epitelioides rodeadas por linfocitos y

células multinucleadas gigantes de Langherhans, el granuloma incluye la capa basal de la epidermis (12).

LEPRA LIMITROFE MEDIA (BB).- La lepra limítrofe abarca aquellos tipos de la enfermedad entre la LL y la TT. La BB es muy rara porque es muy inestable. Un paciente con BB puede desarrollar clínica, bacteriológica e histopatológicamente con el tiempo, rasgos más distintivos de enfermedad tuberculoides siendo llamada reacción de mejoramiento (en inglés Upgrading). Por el contrario al desarrollar con el tiempo la enfermedad lepromatosa ocurre una reacción de empeoramiento (en inglés Downgrading)(14,15) (figura 1) .



INMUNOLOGIA DE LA LEPRO.

Normalmente, los linfocitos cooperadores (TH), que tienen marcador de membrana CD4+, reconoce a través del receptor TCR, a los antígenos (Ag) previamente procesados y presentados en asociación a moléculas clase II del MHC, por CPA que principalmente son macrófagos y células de Langherhans.

Las reacciones de hipersensibilidad tardía son iniciadas por los linfocitos específicamente sensibilizados, generados durante el contacto inicial con el Ag. Algunas células de memoria permanecen en la circulación largo tiempo, a menudo años. Cuando el individuo se vuelve a exponer al Ag específico, los linfocitos T de memoria son estimulados para dividirse y liberar citocinas(16). Esta respuesta dependiente de linfocitos T o respuesta inmune celular (RIC) es la responsable de la protección en la lepra y de acuerdo con su grado de efectividad se determina la posición del individuo infectado con *M.leprae* en el espectro de la enfermedad.

El conocimiento inmunológico de la lepra se inicia con los trabajos de los leprologos japoneses Hayashi y Mitsuda en 1919, cuando aplicaron a los pacientes de lepra por vía intradérmica, un antígeno preparado de nódulos de enfermos infectantes que llevaba bacilos muertos y observaron que en unos enfermos daban respuesta positiva a las 3 semanas y otros no daban ningún tipo de respuesta. Precisamente aquéllos pacientes que mostraban una gran cantidad de bacilos, eran los que no respondían al antígeno llamado lepromina. No es hasta los años 60s en

que los inmunólogos definen a la lepra como un modelo inmunológico único, que está caracterizada por un amplio espectro en la respuesta del hospedero, con una gran variabilidad en la histopatología y en el curso clínico de la infección. Así mismo existe un espectro en la respuesta humoral y en la inmunidad celular del hospedero a la infección. Desde un inicio los patólogos reconocieron la importancia de la RIC en TT, manifestada por el granuloma de células epiteloides así como una fuerte respuesta tipo de hipersensibilidad retardada a los antígenos de *M.leprae* (mitsuda positivo), y patrón de citocinas tipo TH2, confiriéndole resistencia , llegando a curarse de una manera espontánea y sin tratamiento (5,17)

En el lado opuesto del espectro clínico e inmunológico, los pacientes LL presentan una exacerbada respuesta inmune humoral inespecífica, caracterizada principalmente por falsas positivas a VDRL, proteína "C" reactiva positiva, y formación de complejos inmunes, con el posterior alojamiento y daño en los nervios periféricos. Los pacientes con LL son negativos a la prueba de la lepromina, y permanece de esta manera aun después de años de utilizar la quimioterapia. In vitro se ha demostrado esta anergia específica por falla en la proliferación de linfocitos T ante Ag. de *M.leprae* (18,19) además de su deficiencia en la síntesis de IL-2 e IFN γ (14,20,21). Existen trabajos que señalan que esta anergia también la presentan los linfocitos in vitro ante estímulos policlonales no específicos como PHA (Fitohemaglutinina), ConA (concanavalina A) y po

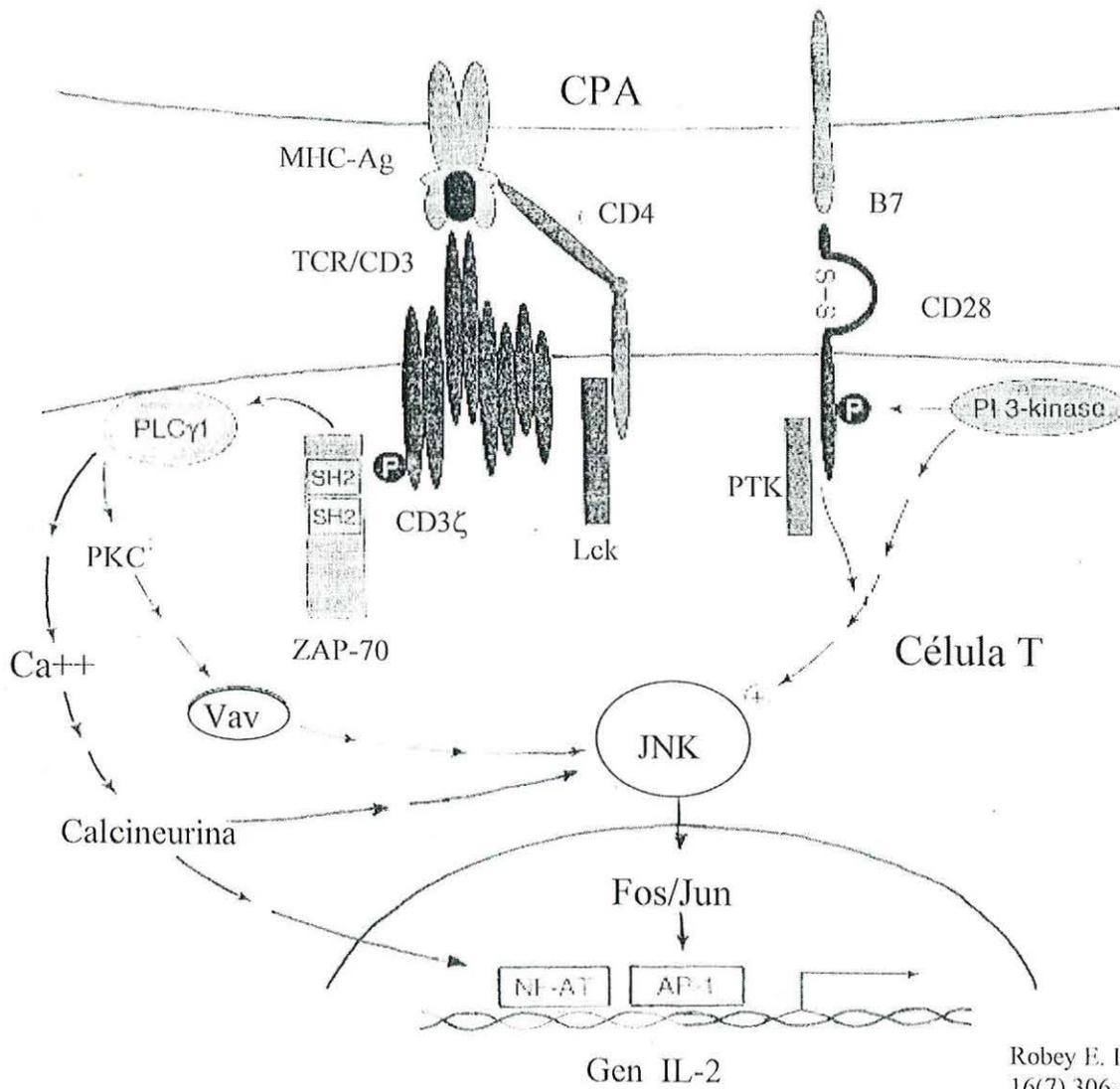
anticuerpos anti CD3 (22,23,24) con deficiencias en la proliferación y síntesis de IL-2 e IFN γ , no así el receptor para IL-2 (IL-2r) (25)

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO Y SEÑALES COESTIMULATORIAS

Durante el reconocimiento específico del antígeno, los linfocitos T en reposo son estimulados a través de la interacción con las células presentadoras de antígeno.

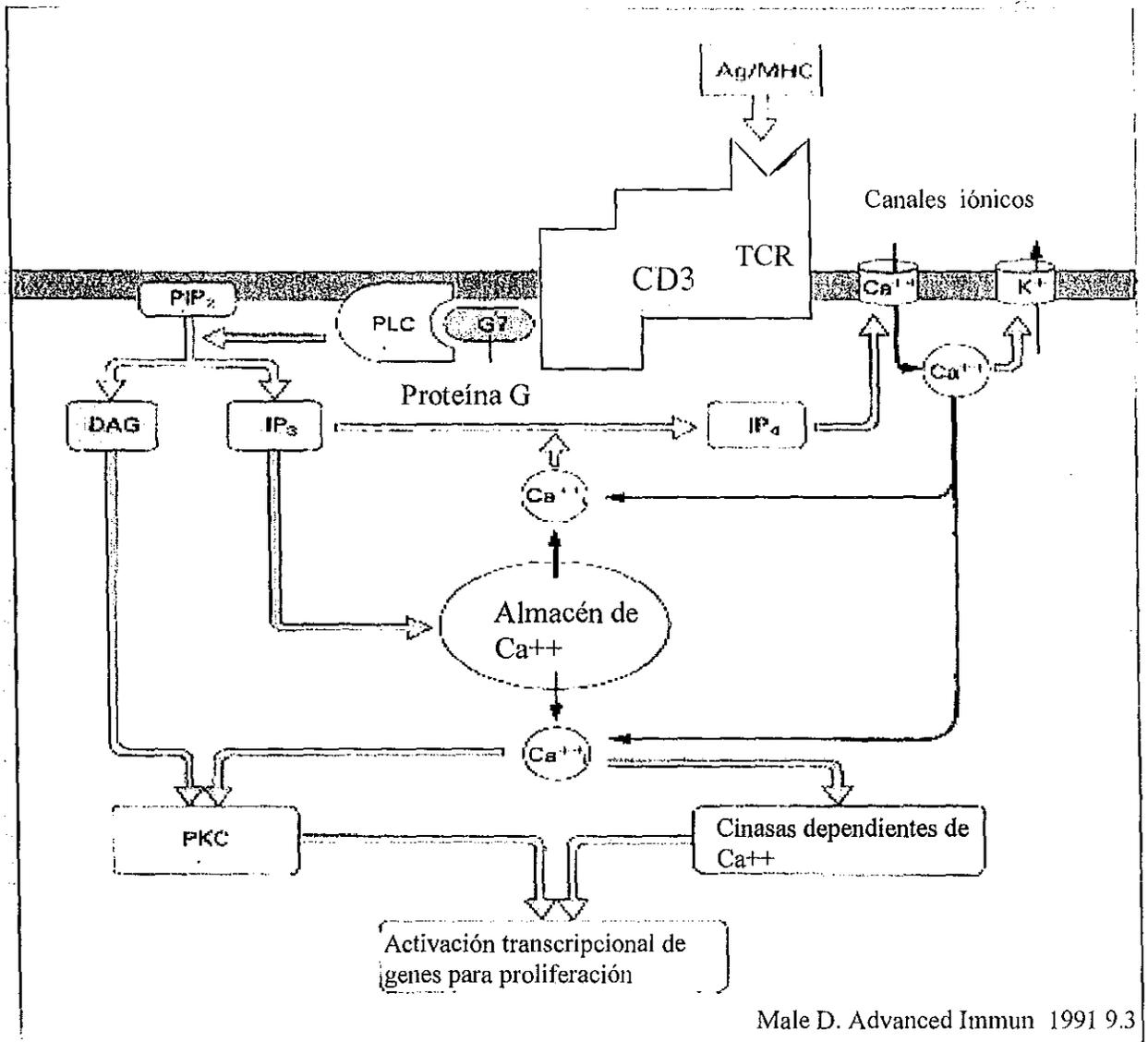
Desde 1969 Peter A. Bretsher y Melvin Cohn propusieron un modelo donde se requería por lo menos de 2 señales para activar las células T ambas señales proporcionadas por las CPA y dependientes del Ag(26). Sin embargo en 1974 Kevin J. Lafferty y Alison J. Cunninham (27) propusieron otro modelo de la doble señal, sólo que en esta propuesta la segunda señal no dependía del reconocimiento antigénico (26). En la actualidad se sabe que la primera señal es dada por la unión del complejo receptor de células T (28), la capacidad del TCR para traducir señales a través de la membrana de células T es mediada por el dominio citoplásmico de la subunidad CD3 y la porción intracelular de cadena ζ , esta cadena y el CD3 contienen una secuencia común, el EX2, YX21/IX7, YX2 L/J llamada secuencia de activación de tirosina (ITAM), perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas y es crucial para las subsecuentes respuestas de señalamiento vía TCR.

Dos proteínas cinasas de tirosina (PTK) están asociadas al complejo TCR/CD3. La familia de las p59fyn y la PTK de 70kd, llamada Zap-70 y una segunda familia



Robey E. Immun Today 1995
16(7) 306-309

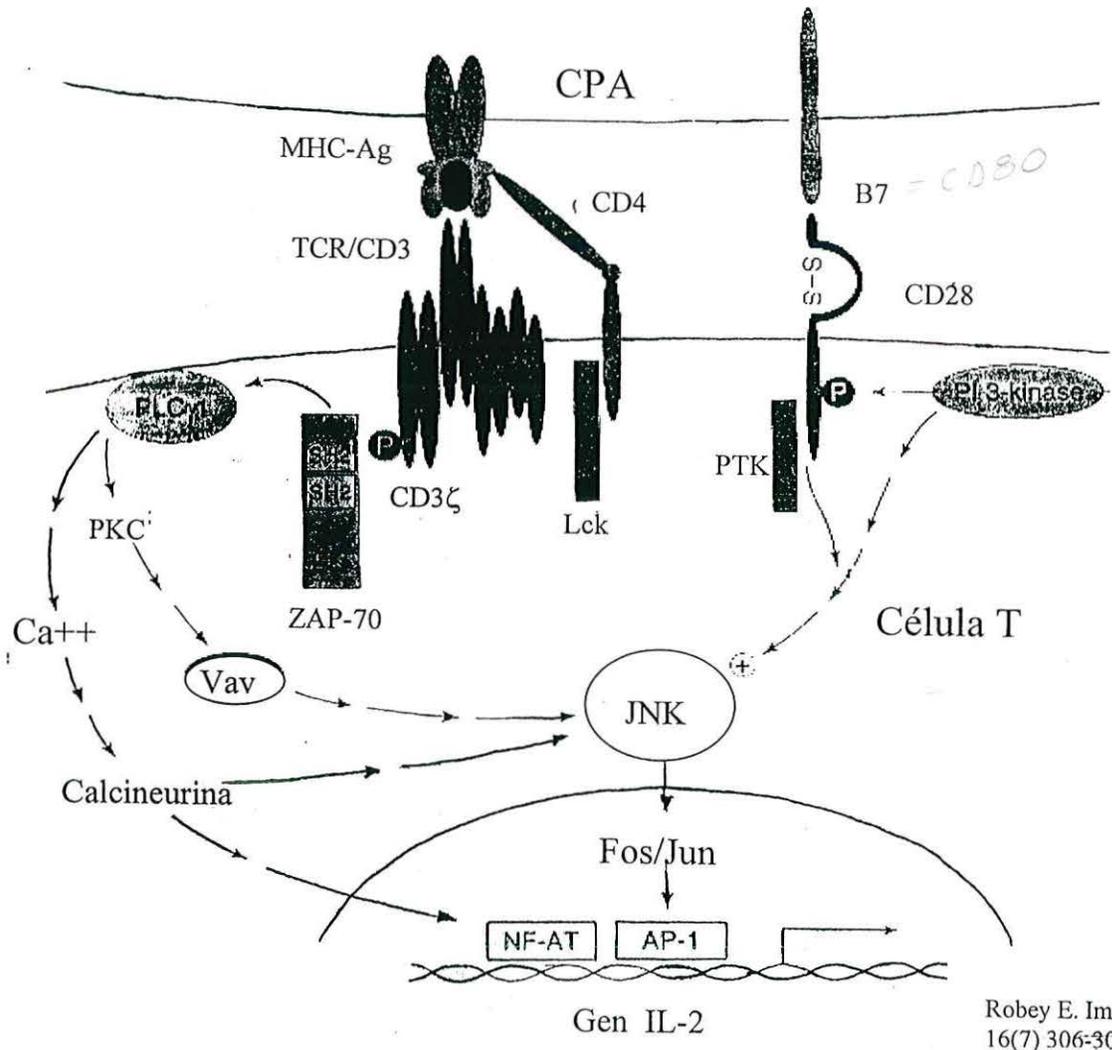
PTK src p56 lck . (29,30) (fig 2). El complejo TCR/CD3 se une al péptido antigénico, ligado por las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las CPA, posterior a esta unión, se presenta una serie compleja de eventos metabólicos que culmina en el encendido de las funciones efectoras y en la proliferación celular requerida para expandir las subpoblaciones de células capaces de reconocer al Ag. en un segundo encuentro. El primero de estos eventos parece ser la activación de una enzima tirosina cinasa (fyn, lck o zap-70) a partir de ITAM que al añadir un fosfato activa a la fosfolipasa Cg1 , que a su vez hidroliza al componente de membrana 4,5-fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) y otros fosfoinositósidos, esta hidrólisis produce dos metabolitos, a) 1,4,5 inositol trifosfato (IP3), y b) el diacilglicerol (DAG) (26,28,31), ambos tienen importantes funciones como segundos mensajeros en el proceso de activación celular. El IP3 se une a receptores específicos en las vesículas que almacenan Ca^{++} e inicia una liberación transitoria de este hacia el citosol, esta elevación citosólica de este ion es suplementada además por el influjo de Ca^{++} del espacio extracelular, al parecer, existen evidencias recientes que sugieren que en las células T, hay canales de Ca^{++} independientes de voltaje que pueden ser abiertos en respuesta al IP4 (1,3,4,5 inositol tetrafosfato) formado por la fosforilación del IP3. Todos estos eventos, pueden ser mimetizados experimentalmente, por la adición de ionóforos de calcio, como la ionomicina o el



Male D. Advanced Immun 1991 9.3

A23187. El sólo aumento de Ca^{++} no es suficiente para completar la activación de células T que también requieren de la hiperpolarización de la membrana, proporcionada principalmente por el flujo de iones K^+ a través de canales específicos dependientes de voltaje (fig 3) (32) Todas estas señales iónicas promueven un incremento de la actividad enzimática que conlleva a que el factor nuclear de células T activadas (NF-AT) se modifique de tal manera, para que pueda migrar del citoplasma al interior del núcleo .

Además de las señales iónicas, las células T requieren de otros metabolitos para activarse, estos son provistas por el otro producto de la hidrólisis del PIP₂, el diacilglicerol (DAG) que activa a la proteína cinasa C (PKC), enzima dependiente de calcio capaz de modular la función de una serie de proteínas mediante fosforilaciones de residuos de serina y treonina desembocando en la síntesis del complejo proteico AP-1. Una vez sintetizado, se une al NF-AT formando un complejo que se une al ADN vecino de determinados genes y permite que estos se transcriban. Muchos genes de linfocinas pueden transcribirse debido a que unos cuantos factores de transcripción se unen en sus regiones de control. El gen de la IL-2 (interleucina-2) sin embargo parece estar sujeto a una regulación mucho más estricta, no puede transcribirse si no es en presencia del complejo NF-AT/AP-1, de AP-1 y de otros 2 factores de transcripción (Oct y NF- κ B) (26).



Robey E. Immun Today 1995
16(7) 306-309

Todos los factores deben haberse sintetizado recientemente, o activado químicamente .

La PKC puede ser activada experimentalmente por ésteres de forbol como el PMA (12,13 forbol miristato acetato). La PKC presenta diferentes isoenzimas, con diferentes requerimientos de Ca^{++} , las células T expresan particularmente, altos niveles de PKC β . (33)

Aun con los cuatro factores de transcripción no basta para que la célula produzca la cantidad suficiente de IL-2 para la división, se requiere de un coestimulo (llamado también segunda señal) que es proporcionado por las células accesorias.

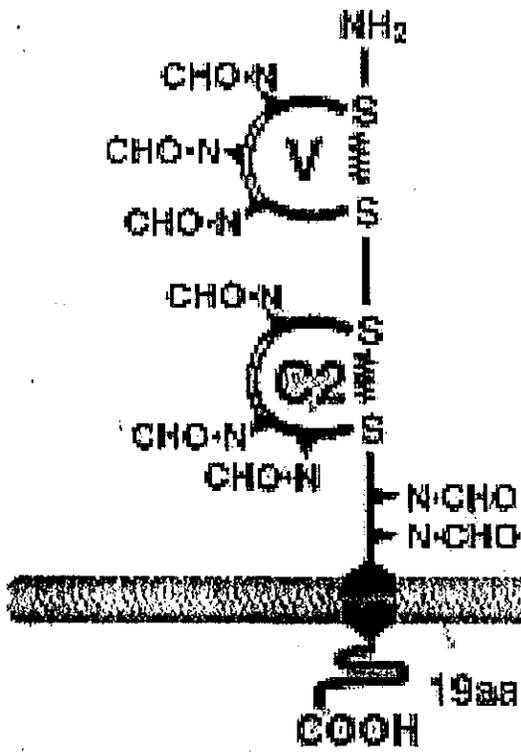
La naturaleza del coestimulo antígeno no específico, en términos moleculares, representa señales generadas a través de una o más interacciones adhesivas entre las CPA generalmente de origen hematopoyético y los linfocitos T (34). Se han propuesto muchos pares de moléculas ligando /receptor como los implicados en proveer la coestimulación necesaria para la presentación antigénica adecuada, entre los cuales se incluyen LFA-1 (antígeno de función leucocitaria-1)/ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), LFA-1/ICAM-2, ICAM-3, CD40/gp39 y CD28/CD80(B7). Estos pares ligando receptor, funcionan incrementando la adhesión entre células T y CPA y proveen las señales coestimuladoras para la respuesta proliferativa de células T (34,35).

Estudios recientes señalan al par CD28/CD80 como el más directamente involucrado en la activación de células T.

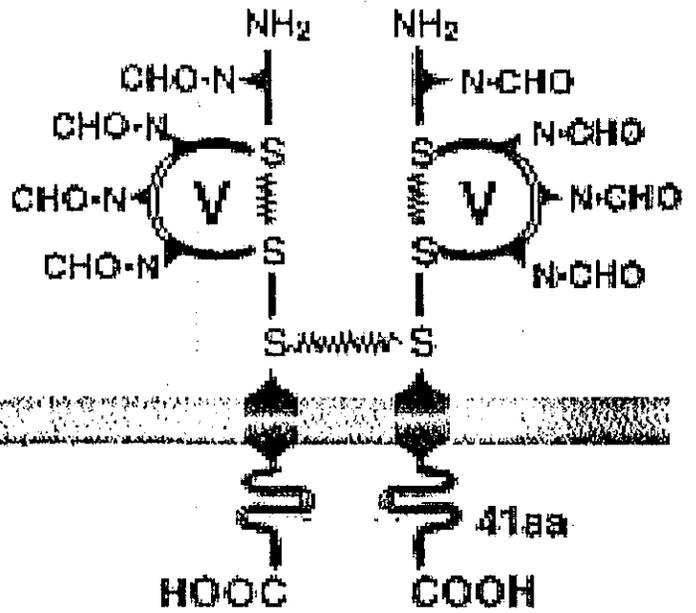
La molécula CD28 (fig 4) es una glicoproteína homodimérica, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas compuesta por subunidades de 44 kD unidas por puentes disulfuro. El ADN complementario de humanos, transcribe una proteína madura de 202 aminoácidos (aa), con un segmento de 41 aa en la región citoplásmica y uno de 134 residuos en el dominio extracelular. El antígeno CD28 es codificado en el humano en el cromosoma 2q33-q34. Esta molécula se expresa constitutivamente en la superficie del 80% de las células T humanas, prácticamente el 100% de los CD4+ y el 50% de los CD8+, y virtualmente en todas las células T de origen murino (36,37,38,39). También se ha observado su presencia en los timocitos en desarrollo, aunque su papel en esta etapa todavía no se comprende (40,41). La expresión del CD28 no es estática, ya que los niveles de este se incrementan seguida la activación celular (42)

La molécula B7 (CD80), es el ligando para el receptor CD28. La designación "B" para esta molécula, proviene de los primeros estudios con anticuerpos monoclonales que fueron utilizados para identificar Ag. desconocidos de células B (43,44). El CD80 es una glicoproteína transmembranal de 54 kD. con 262 residuos de aa, cuya región citoplásmica consiste solo de un residuo de 19 aa y el dominio extracelular de 216 aa (45-46). Este segmento, contiene dos dominios tipo

B7-1/CD80



CD28

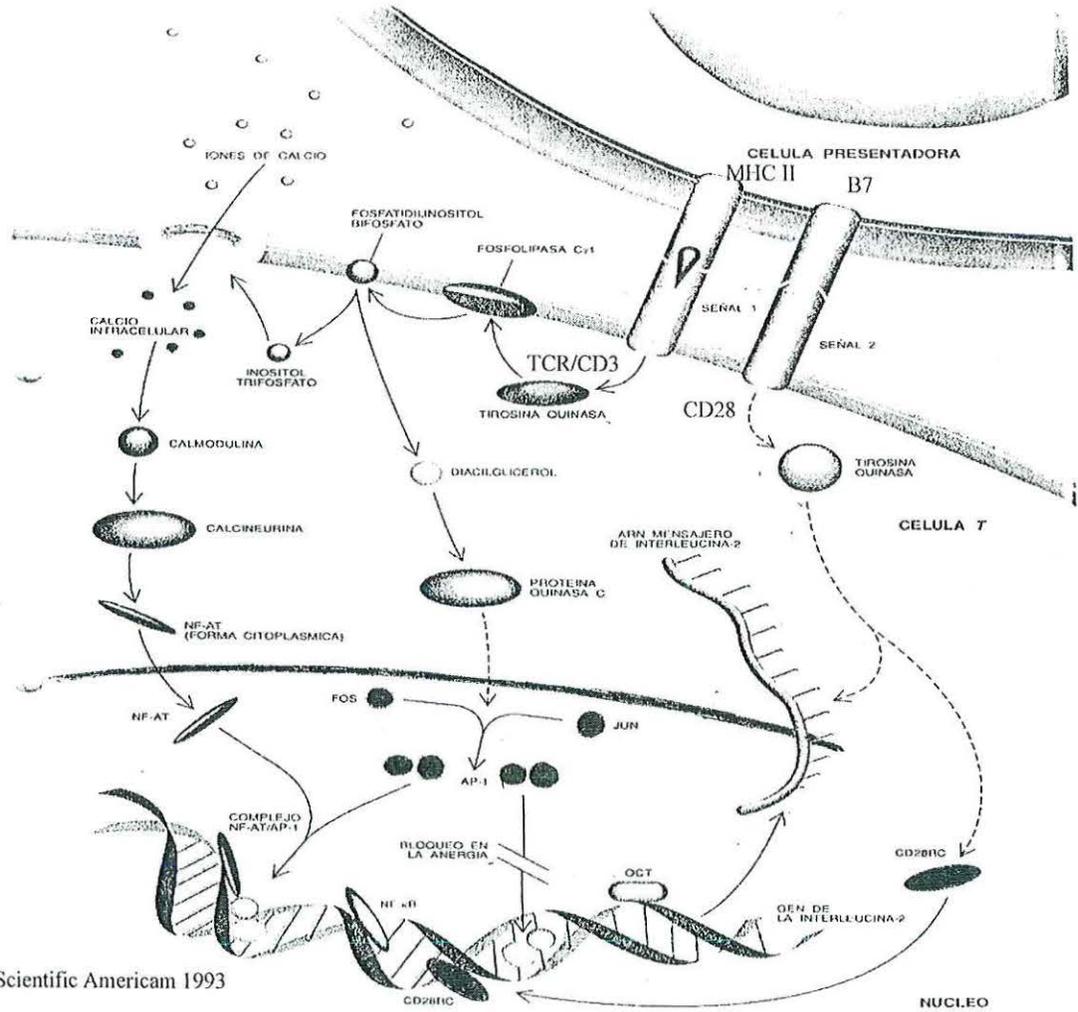


Cytokine R&D Systems 1997 -5

inmunoglobulina, y el tallo pequeño citoplásmico contiene tres sitios potenciales para fosforilación por PKC, indicativo del papel importante de señalización de esta molécula, de hecho en las células B esta molécula se fosforila después de ser activada la célula. El CD80 se codifica en el cromosoma humano 3q13-q23 (47,48). Se ha observado la presencia de esta proteína en células dendríticas de sangre periférica, así como de Langerhans, células B y macrófagos, siempre y cuando estén activados, también en keratinocitos y en algunas ocasiones en las propias células T (49,50,51). La regulación de la expresión de CD80 es controlada por las interacciones célula/célula y la producción de citocinas. Se ha descrito un papel importante de la vía CD40/CD40L en controlar la expresión del CD80 (52,53), así como la influencia de IL-4, L-10 e IF γ (54,55).

La coestimulación vía CD28/CD80 da como resultado la estabilización de mRNA de IL-2, incrementa la secreción de IL-2 y la sobreexpresión de las cadenas α, β, γ del receptor para IL-2 (IL-2R). Existen varias propuestas para tratar de elucidar los mecanismos bioquímicos que están involucrados en esta ruta de coestimulación, si bien es cierto que implican diferentes caminos, todos coinciden en la activación de otra proteína tirosina cinasa. Su(56) en 1994 y Schneider en 1995(57) proponen el papel de CD28 en la activación de jun cinasa, la cual fosforila a jun que es un componente del factor de transcripción AP-1 que se une a algunas secuencias blanco en la región 5' del gen incrementador de IL-2. Las MAP cinasas Erk1 y

Erk2, se activan por estímulos vía TCR, pero para la activación completa de estas MAP cinasas, la fosforilación de jun y la activación de los dominios jnk1 y jnk2 se requieren ambas rutas TCR y CD28, sugiriendo que la integración de las señales para la óptima activación de las células T ocurre a nivel de la activación de jnk (56,57)(fig 5). Por su parte Migita 1995(58) y Boussiotis 1996 (59) señalan que durante la inducción de una respuesta inmune mediante la estimulación con aloantígenos en presencia de la coestimulación de CD80, el resultado es la fosforilación de la cadena ϵ del CD3 y la hiperfosforilación de la cadena ζ de TCR, ambas asociadas con lck y zap-70 . Existen algunas propuestas más para tratar de explicar estos mecanismos, sin que hasta la fecha haya un consenso generalizado, sin embargo lo que está claro, es que una célula T no puede producir, sin coestimulación, suficiente cantidad de interleucina 2 para su división (60,61) Si ambas moléculas TCR y CD28 están unidas a sus ligandos adecuados, se inicia la activación y la proliferación con diferentes subtipos funcionales (62,63), si solo el TCR es ligado, la célula entra entonces en un estado de anergia (falta de respuesta) y puede incluso llegar a apoptosis (muerte celular programada) . Si sólo el Ag. CD28 es ligado, no hay ningún efecto de activación (64).



Schwartz R. Scientific American 1993

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa muestran deficiencias tanto en la proliferación como en la síntesis de IL-2 (22,23,24), eventos en los que está involucrada la coestimulación a través de las moléculas de superficie CD28/CD80, surge el interés de estudiar la presencia y funcionalidad de estas dos moléculas, en células mononucleares de pacientes con lepra lepromatosa bajo estímulos antigénicos y mitogénicos en comparación con los de individuos sanos.



HIPOTESIS

La anergia que presentan los pacientes con lepra lepromatosa, se debe por lo menos parcialmente a la deficiencia en la expresión y/o funcionalidad de las moléculas coestimuladoras CD28 en los linfocitos T y CD80 en linfocitos B y macrófagos .

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la presencia y funcionalidad de los receptores CD28 y CD80 en linfocitos T, linfocitos B y macrófagos de pacientes con lepra lepromatosa.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Cuantificar el porcentaje de linfocitos B y macrófagos activados CD80+ de sangre periférica de pacientes con LL e individuos sanos.

2.- Comparar el porcentaje de linfocitos T CD28+ en sangre periférica de pacientes con LL e individuos sanos.

3 - Evaluar la respuesta proliferativa ante estímulos mitogénicos y antigénicos de linfocitos de T pacientes con lepra lepromatosa.

4.- Evaluar el efecto de los anticuerpos antiCD28 y antiCD80 en la proliferación de linfocitos T de individuos con LL ante estímulos mitogénico y antigénicos.

MATERIAL Y METODOLOGIA

Se trata de un estudio descriptivo, transversal y comparativo

Sujetos de Estudio

50 pacientes, 22 mujeres y 28 hombres, entre 20 y 65 años de edad. provenientes del Instituto Dermatológico de Jalisco "Dr. José Barba Rubio" con diagnóstico de lepra lepromatosa, clasificados de acuerdo a los criterios Internacionales de Ridley y Jopling e Ivangy(12, 14) basados en los datos clínicos, histopatológicos, con baciloscopia positiva (+++), así como su respuesta negativa (-) a la lepromina.

Todos los pacientes en el momento de la toma de la muestra se encontraban bajo el tratamiento propuesto por la OMS (1) denominado poliquimioterapia que consiste en Rifampicina, Clofacimina y Dapsone (2,4 diaminodifenilsulfona)

Criterios de no inclusión:

Todos los individuos que presentaban cualquier otra infección, enfermedad asociada o reacción leprosa de cualquier tipo, así como aquellos que estaban tomando otro medicamento distinto de los mencionados y aquéllos que no han iniciado el tratamiento.

Fueron incluidos 50 voluntarios sanos, no relacionados con los pacientes con edad +/- 5 años y de igual sexo y condición socioeconómica, como control en el estudio.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Muestras

Se obtuvieron 15 ml de sangre periférica heparinizada tanto de los individuos con LL como de los controles sanos. La muestra se dividió en 2 alíquotas.

- 1) Para cuantificación del porcentaje de marcadores de superficie por Citometría de flujo;
- 2) para la obtención de células mononucleares y medición de la proliferación

Determinación de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo



BIBLIOTECA CENTRAL

A partir de la sangre periférica de ambos grupos de individuos se realizaron los estudios de citometría de flujo mediante el uso de los anticuerpos monoclonales CD3,CD4,CD8,CD13,CD19 marcados con isothiocianato de fluoresceína y CD28 Y CD80 marcados con rodamina (Leinco Technologies, St. Louis. M.O.), la metodología en breve consistió en lo siguiente:

- 1.- Se colocaron 100 μ l de sangre periférica heparinizada en cada tubo (5 en total)
- 2.-Se adicionaron 10 μ l de anticuerpo monoclonal conjugado con el cromógeno.
- 3.-Se incubaron 30 min. a temperatura ambiente.
- 4.-Se lisaron los eritrocitos con una solución de NH_4Cl 1.5M
- 5.- Se incubaron con esta sol. 15 min. a temperatura ambiente y en agitación constante.
- 6.-Se lavaron dos veces con sol. buffer salino de fosfatos (PBS)
- 7.- Se fijaron con 2 ml de una solución de paraformaldehído al 10%.
- 8.- Se analizaron mediante un citómetro de flujo (Epics V Coulter)

Los resultados se obtuvieron como porcentaje de células T CD3+/CD28+, CD4+, CD8+, células B CD19+/CD80+ y macrófagos CD13+/CD80+.

Para la medición de la expresión de la molécula coestimuladora CD80 sobre la membrana tanto de células B como de macrófagos, ambas poblaciones celulares se estimularon *in vitro* con 1 μ g de PHA durante 24 hrs(67)

Los resultados se analizaron por la prueba paramétrica "t" de Student apareada de una cola . Utilizandose los promedios +/- error standard.

Obtención de células mononucleares(técnica de Böyum (66))

- 1.- Se mezclaron 10 ml de sangre periférica heparinizada, volumen a volumen con solución salina balanceada de Hank's (HBSS).
- 2.-En un tubo cónico se depositaron 4 ml de la solución Hystopaque con densidad de 1.072 (Sigma,Chemicals) y cuidadosamente resbalando por la pared del tubo se adicionan 8 ml de la mezcla sangre/HBSS con pipeta Pasteur.
- 3.- Se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 20 min. a T ambiente.
- 4.- Se extrajo con pipeta Pasteur el anillo de células blancas formado en la interface del gradiente de densidad.
- 5.- Se lavaron las células dos veces con HBSS a 4°C
- 6.- Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island N.Y.) suplementado con 5% de suero fetal de ternera (SFT), 100 mg/ml de estreptomicina y 100U/ml de penicilina.
- 7.- Finalmente las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 cel/ml.

Ensayo de Proliferación

2×10^5 células de la suspensión obtenida anteriormente se colocaron en pozos de microplacas de cultivo (Costar 96 microwell plates) bajo las siguientes condiciones.

Estimulo mitogénico.

- a) Medio de cultivo RPMI 1640
- b) PHA 10 $\mu\text{g/ml}$
- c) PHA 10 $\mu\text{g/ml}$ + ac.anti CD28 10ng/ml
- d) PHA 10 $\mu\text{g/ml}$ + ac.anti CD80 1 $\mu\text{g/ml}$

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Como control se cultivaron células en presencia de ac.anti CD28 sólo y ac. anti CD80 solo. Los ensayos referentes al inciso “d” sólo se realizaron en 5 individuos sanos ya que la inhibición de proliferación mediada por el bloqueo de la molécula coestimuladora CD80 se confirmó con esta muestra (n=5)

Se cultivaron en una estufa de CO_2 y temperatura controlada, durante 72 hrs, a 37°C , con atmósfera húmeda y 95% de aire y 5% de CO_2 , 18 hrs. antes de cosecharse se dió un pulso con 10 μCi de Timidina marcada con tritio ([methyl]- $^3\text{HTdr}$ Amersham life science con actividad específica de 6.7 Ci/mmol) Se cosecharon en tiras de fibra de vidrio (Nunc 8th well harvester) mediante un cosechador automático (Nunc harvester)

Se colocaron en los viales y se adicionó 3 ml de líquido de centelleo (mezcla de fluoruros PPO , POPOP Sigma Chemicals)

Se midió la incorporación de $^3\text{HTdr}$ a las células mediante un contador de centelleo Packard beta. Los resultados de la proliferación se obtuvieron en cpm (cuentas por minuto) y se expresaron como índice de estimulación (I.E.)= cpm células estimuladas/cpm células sin estímulo.

Estimulo antigénico.

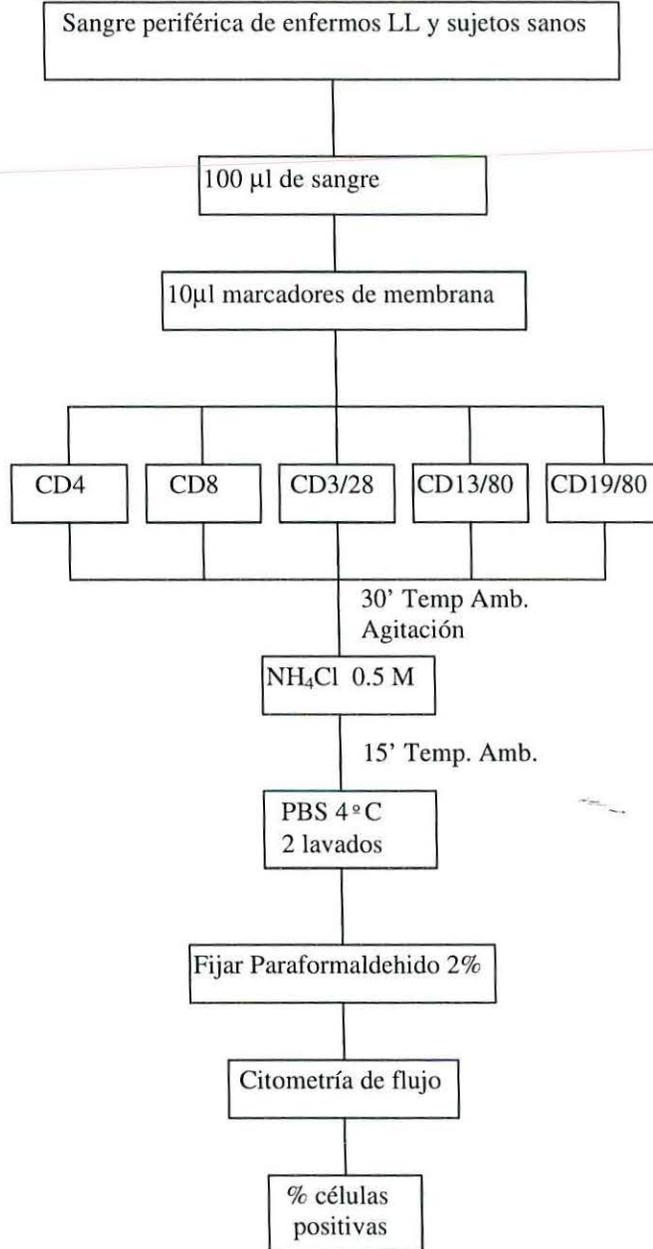
Para la proliferación bajo estímulo antigénico se procedió de la misma manera descrita y las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- a) RPMI 1640
- b) Ag de *M. leprae* sonificado 30 $\mu\text{g/ml}$
- c) Ag. *M. leprae* 30 $\mu\text{g/ml}$ + ac. anti CD28 10ng/ml
- d) Ag. *M. leprae* 30 $\mu\text{g/ml}$ + ac. anti CD80 1 $\mu\text{g/ml}$

Se cultivaron igual que en estímulo mitogénico, sólo que el tiempo de incubación fué de 96 hrs en total.

MATERIAL Y METODOS

MARCADORES DE SUPERFICIE



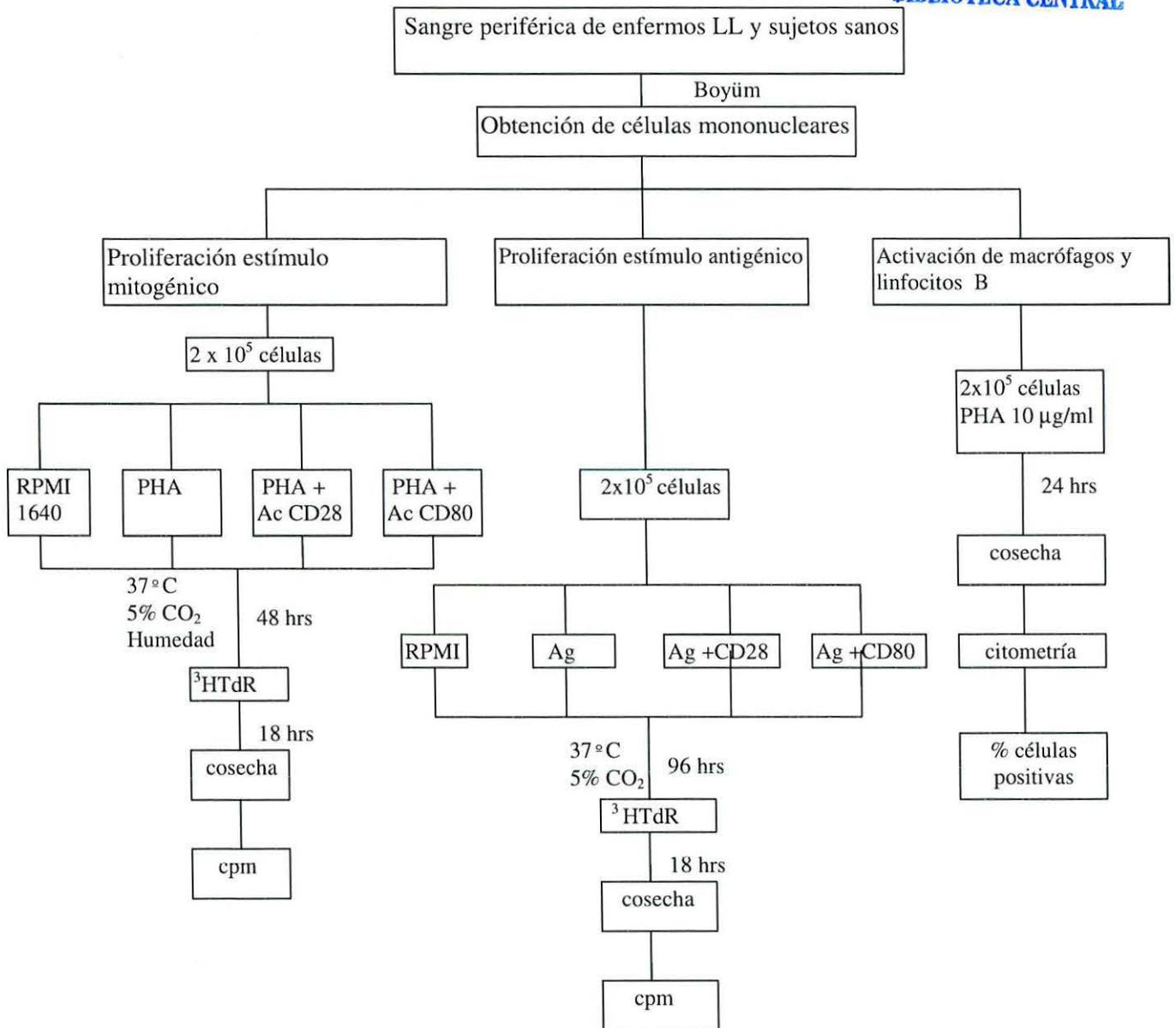
CU



BIBLIOTECA CENTRAL



ENSAYO DE PROLIFERACIÓN



RESULTADOS

Expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD28 en la membrana de los macrófagos y linfocitos B y T

La expresión (bajo el estímulo de PHA) de la molécula coestimuladora CD80 en los macrófagos (CD13+) y en los linfocitos B (CD19+) de pacientes LL no presentó ninguna diferencia estadística significativa, cuando se comparó con la expresión de dicha molécula en los macrófagos y linfocitos B de sujetos sanos de la misma edad, sexo y condición socioeconómica (cuadro 1, fig. 1 y 2). La expresión de la molécula coestimuladora CD28 en linfocitos T (CD3+) de sangre periférica de pacientes con LL fué significativamente menor ($p < 0.01$) que la expresión de ésta en los linfocitos T de los sujetos sanos (cuadro 2, fig. 4).

En cuanto a las subpoblaciones funcionales de linfocitos T cooperadoras CD4+ y citotóxicas CD8+ no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, cuando se compararon los linfocitos T de sangre periférica de pacientes LL con los linfocitos T de los sujetos sanos (cuadro 2, fig. 3).

Respuesta proliferativa de linfocitos T ante el estímulo mitogénico de fitohemaglutinina (PHA).

El índice de estimulación (IE) de linfocitos T de pacientes con LL en cultivo *in vitro* bajo el estímulo de 10µg/ml de PHA fué estadísticamente más bajo ($p < 0.05$) que el IE de los individuos sanos con el mismo estímulo (cuadro 3, fig.5)

Respuesta proliferativa de linfocitos T ante el estímulo de antígeno de *Mycobacterium leprae*

Los resultados del IE de linfocitos T de pacientes con LL en cultivo *in vitro* con estímulo antigénico de *M.leprae* revelan una proliferación significativamente menor ($p < 0.01$) que la de los linfocitos T de sujetos sanos bajo el mismo estímulo (cuadro 4, fig. 8).

Efecto del anticuerpo anti CD80 sobre la proliferación de linfocitos T inducida por mitógeno (PHA) y antígeno de *M. leprae*

La adición del anticuerpo anti CD80 en el cultivo *in vitro* de linfocitos T de pacientes con LL tanto ante el estímulo mitogénico, así como antigénico, no

modificó significativamente la proliferación (IE) de los linfocitos T (cuadro 4, fig.9).

Efecto del anticuerpo anti CD28 sobre la proliferación de linfocitos T inducida por mitógeno (PHA).

La adición del anticuerpo anti CD28 en el cultivo *in vitro* de linfocitos T de pacientes con LL ante el estímulo mitogénico de PHA incrementó significativamente ($p < 0.05$) el índice de estimulación de los linfocitos T, que alcanzó al nivel de IE de los sujetos sanos (cuadro 3, fig. 6).

Efecto del anticuerpo anti CD28 sobre la proliferación de linfocitos T inducida por el antígeno de *M.leprae*

La adición del anticuerpo anti CD28 en el cultivo *in vitro* de linfocitos T de pacientes con LL ante el estímulo antigénico de *M.leprae* no modificó el bajo índice de estimulación que presentaron los linfocitos T (cuadro 3, fig. 9).

Expresión de la molécula coestimuladora CD80:

En los experimentos en los que se comparó la expresión de la molécula coestimuladora CD80 en linfocitos B (CD19⁺) y macrófagos (CD13⁺) entre pacientes con lepra lepromatosa y sujetos sanos, no se encontró ninguna diferencia significativa (cuadro 1).

Porcentaje de linfocitos B y macrófagos CD80⁺ en células de sangre periférica activadas con PHA de pacientes LL e individuos sanos

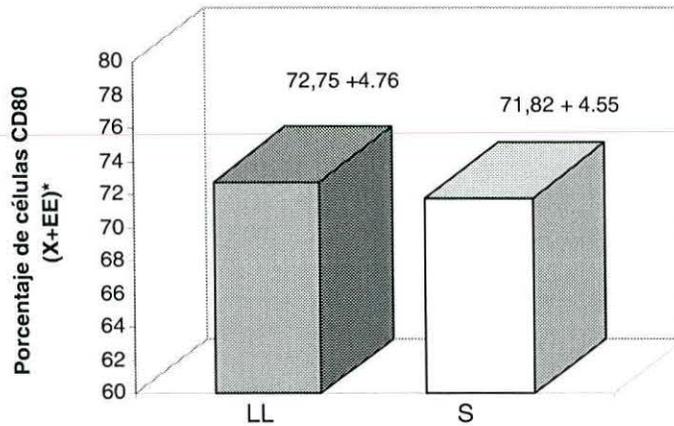
GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
LLCD13+/CD80+ (%)	SCD13+/CD80+ (%)	LLCD19+/CD80+ (%)	SCD19+/CD80+ (%)
3	46	2	17
85	96	36	43
86	69	16	10
20	92	43	61
61	17	68	77
78	59	50	72
81	84	36	14
94	91	37	57
84	29	99	93
44	61	90	85
92	72	65	85
37	94	41	53
71	94	80	59
81	92	64	59
79	57	91	92
95	57	43	86
99	98	16	93
80	95	98	90
93	98	84	65
98	94	81	56
99	99	88	74
99	99	99	74
99	94	86	79
99	94	13	15
99	98	28	10
84	71	12	10
40	32	24	10
39	43	14	13
62	43	36	30
14	81	3	7
94	72	21	33
25	33		
34	34		
17	15		
47	43		
X= 72,7586207	X= 71,8275862	X= 53,137931	X= 54,2068966
e.e.= 4,76	e.e = 4,55	e.e.= 5,61	e.e.= 5,54

Prueba paramétrica t Student apareada.

CD13+/CD80+ 1 vs 2 p<0.4 N.S. CD19+/CD80+ 3 vs 4 p<0.3 N.S.

FIGURA 1

**Expresión de la molécula coestimuladora CD80*
en la membrana de macrófagos de pacientes LL
y sujetos sanos**



X + EE = media + error estándar

LL = macrófagos de pacientes con lepra lepromatosa CD80+

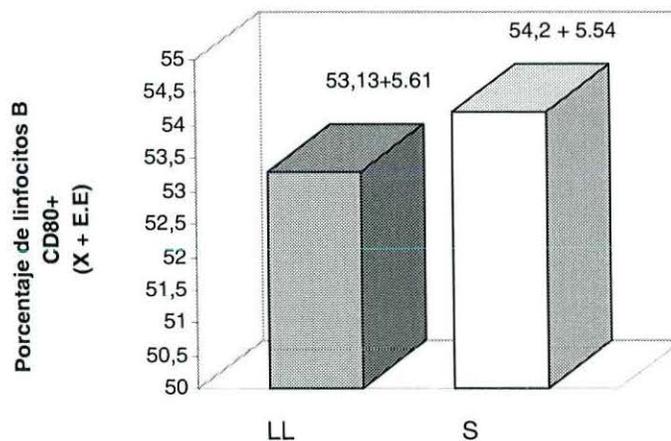
S = macrófagos de individuos sanos CD80+

* Estimulados durante 24 hs con Fitohemaglutinina

LL vs S: p = N.S.

FIGURA 2

**Expresión de la molécula coestimuladora
CD80* en la membrana de linfocitos B de
pacientes LL y sujetos sanos**



X + EE = media + error estándar

LL = Linfocitos B de pacientes con lepra lepromatosa CD80+

S = Linfocitos B de individuos sanos CD80+

* Estimulados durante 24 hs con Fitohemaglutinina

LL vs S: p = N.S.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Expresión de los marcadores de superficie CD4, CD8 y CD3/28:

El cuadro 2 muestra los resultados de los experimentos en los que se midió y comparó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺/CD28⁺ de sangre periférica tanto de pacientes LL como de los individuos control, no encontrándose diferencia significativa en el caso de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺, sin embargo existe una disminución significativa ($p < 0.01$) en la expresión de CD28⁺ en los linfocitos T de pacientes con LL.

CUADRO 2

Porcentaje de linfocitos T CD4+, CD8+, CD3+/CD28+ de sangre periférica de pacientes LL e individuos sanos.

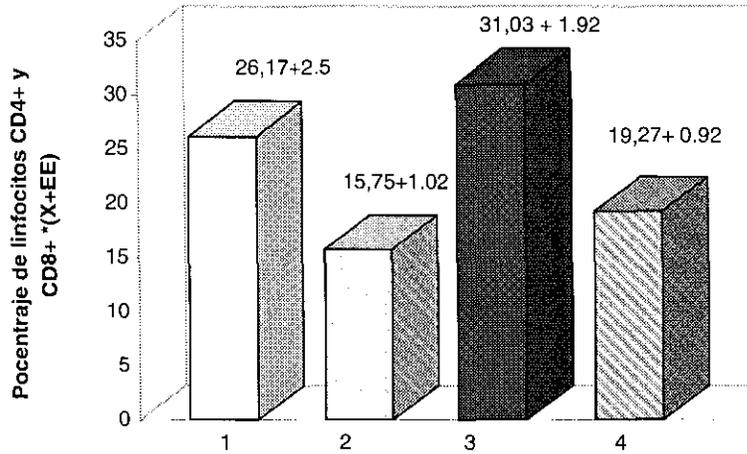
GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
LLCD28+ (%)	SCD28+ (%)	LLCD4+ (%)	SCD4+ (%)	LLCD8+ (%)	SCD8+ (%)
25	22	22	31	18	11
30	34	58	36	19	16
43	34	25	31	20	23
21	55	30	31	15	15
17	18	13	3	27	15
63	43	45	42	16	5
28	45	24	39	19	24
56	45	48	48	31	15
35	52	35	34	12	27
21	31	31	34	15	27
45	31	29	13	11	21
60	57	28	31	14	31
51	75	28	31	27	31
27	47	24	30	27	24
2	28	24	35	20	24
1	19	6	46	11	19
21	41	21	26	14	22
27	39	33	18	22	22
47	22	38	15	23	20
41	22	34	18	26	13
28	54	68	53	18	21
22	54	0.2	40	14	13
32	52	20	10	4	13
25	50	17	28	12	17
26	26	28	44	16	15
3	12	12	44	22	21
20	17	3	36	18	21
53	56	17	29	19	21
38	45	12	33	5	23
		50	31	14	15
		50	44	15	15
		7	42	15	19
		25	14	15	15
		34	28	14	20
		8	12	1	9
		29	33	10	5
		31	37	13	20
				22	22
				28	15
X= 31,3103448	X= 38,4827586	X= 26,1793103	X= 31,0344828	X= 15,7586207	X= 19,2758621
e.e.= 3,04	e.e.= 2,82	c.c.= 2,554	e.e.= 1,9229	e.e.= 1,02	e.e.= 0,9267

Prueba paramétrica t Student apareada de una cola.

LLCD3+/CD28+ 1 vs 2 $p < 0.01$ LLCD4+ 3 vs 4 $p < 0.07$ LLCD8+ 5 vs 6 $p < 0.1$ N.S.

FIGURA 3

Expresión de marcadores CD4 Y CD8 en linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa y sujetos sanos



* X + EE = media + error estándar

1 = linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa CD4+

2 = linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa CD8+

3 = linfocitos T de sujetos sanos CD4+

4 = linfocitos T de sujetos sanos CD8+

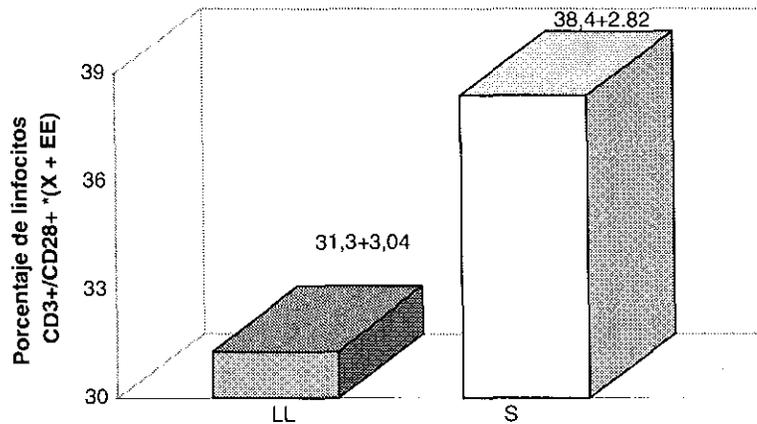
1 vs 3: $p < 0.07$ 2 vs 4: $p = N.S.$

Radio 1/2 vs 3/4: $p = N.S.$

Prueba paramétrica t de student apareada de una cola

FIGURA 4

Expresión de marcadores CD3/CD28 en linfocitos de pacientes con lepra lepromatosa y sujetos sanos



* X+EE = media + error estándar

LL = linfocitos de pacientes con lepra lepromatosa CD3+/CD28+

S = linfocitos de sujetos sanos CD3+/CD28+

LL vs S: $p < 0.01$

CUADRO 3

Proliferación de linfocitos T de pacientes LL e individuos control estimulados con PHA y los coestímulos CD28 y CD80

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
LLpha (I.E)	LLpha28 (I.E.)	LLpha80 (I.E)	Spha (I.E)
1	10	22	52
6	7	2	7
8	12	12	31
40	9	14	28
22	24	11	12
39	4	2	18
29	10	6	22
5	51	12	32
19	42	9	60
14	14	13	99
12	12	64	27
6	9	4	6
4	12	10	5
11	8	22	5
9	12	10	4
12	58	12	4
65	7	12	88
9	6	66	7
4	28	84	7
25	15	52	21
12	15	20	12
11	12	77	20
11	89	105	28
16	148	74	14
57	45	51	67
92	65	32	100
48	109	1	100
58	59	7	39
63	71	4	41
81	106		118
83	38		74
58	8		51
39	9		34
16	15		15
5			5
4			13
X=27,6111111	X=33.50	X=27,9310345	X=35,1666667
e.e. 4,34	e.e. 7,4	e.e. 5,49	e.e. 5,4

Prueba paramétrica t de student, apareada de una cola

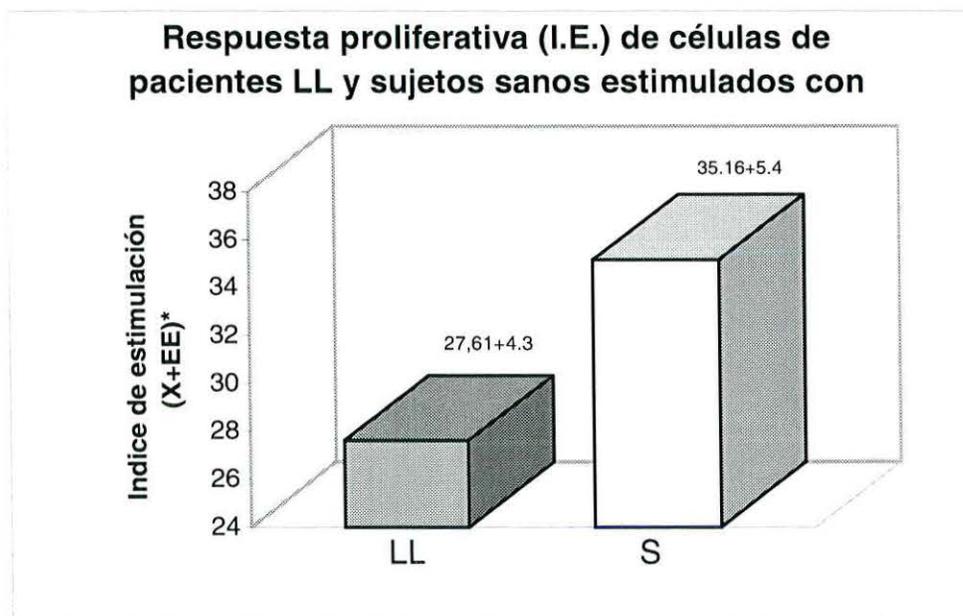
1 vs 2 $p < 0.05$; 1 vs 3 $p < 0.17$ N.S.; 1 vs 4 $p < 0.02$; 2 vs 4 $p < 0.21$ N.S.

Respuesta proliferativa de linfocitos T:

Estimulados con fitohemaglutinina (PHA)

Los índices de estimulación obtenidos en cultivo de linfocitos T de pacientes con LL en comparación con los obtenidos en linfocitos T de sujetos sanos, en presencia de PHA fueron menores significativamente con $p < 0.02$ (figura 5). En las figuras 6 y 7 respectivamente, se presenta el efecto que sobre la proliferación de linfocitos T de pacientes con LL ejercieron los agonistas de CD28 y CD80 (anti-CD28 y anti-CD80). Observe que el coestímulo del anti-CD28 normaliza la proliferación de los linfocitos T de pacientes con LL. Sin embargo la adición del anti-CD80 no ejerció ningún efecto significativo sobre la proliferación de linfocitos T de pacientes con LL.

FIGURA 5



*X+EE= media + error estándar

LL = pacientes con lepra lepromatosa

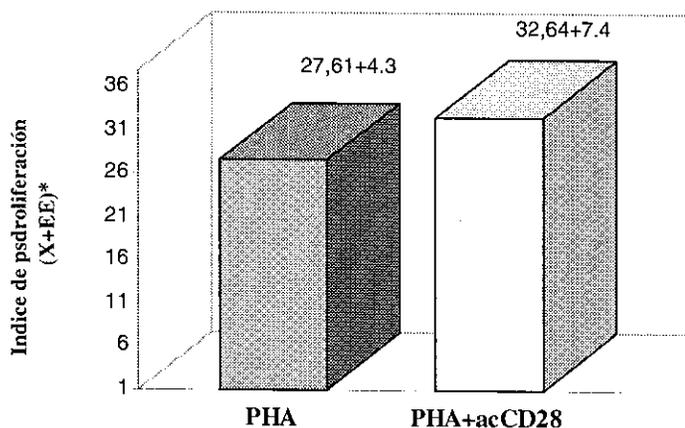
S = controles sanos

S vs LL: $p < 0.02$



FIGURA 6

Respuesta proliferativa (LE) de células de pacientes LL estimulados con PHA y PHA+ac. CD28



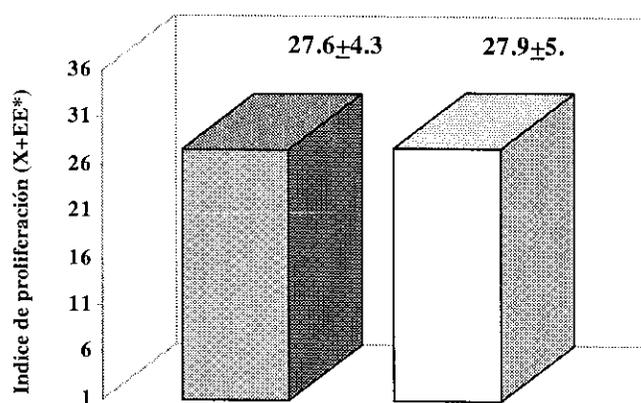
*X+EE = media + error estándar

PHA = Fitohemaglutinina

ac. CD28 = anticuerpo monoclonal anti CD28

FIGURA 7

Respuesta proliferativa (LE) de células de pacientes LL estimulados con PHA y PHA+ac. CD80



*X+EE = media + error estándar

PHA = Fitohemaglutinina

ac. CD80 = anticuerpo monoclonal anti CD80

PHA vs PHA ac.CD80: p = N:S.

Estimulados con antígeno de *Mycobacterium leprae*:

La proliferación de linfocitos T de pacientes con LL estimulados con antígeno de *Mycobacterium leprae* fue significativamente menor que la presentada por los linfocitos T de sujetos sanos ante el mismo estímulo (cuadro 4 y figura 8). En el mismo cuadro se puede observar que la adición de los anticuerpos anti-CD28 y anti-CD80, no ejercieron ningún efecto sobre la proliferación de los linfocitos de pacientes con LL estimulados con antígeno. (figura 9)

CUADRO 4

Proliferación de linfocitos T de pacientes LL e individuos control estimulados con Ag y los coestímulos CD28 y CD80

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
LLAg (I.E)	LLag28 (I.E)	LLag80 (I.E)	Sag (I.E)
1.8	2.6	2	1.3
0.9	1.5	1.1	1.3
0.8	0.6	5.7	1
2.5	0.3	1.2	2.5
0.7	1.2	1.5	2.5
1.5	0.6	1	2.5
4	2	2	3
1.2	5.6	5.5	4.9
2.4	2.2	1.2	3
2	2	1	12
4	5	3	4
0.8	0.7	0.8	1
1	1	1	2
1	1	1	1
1	0.8	0.8	1
2	2	2	6
1	1	1	1.5
0.8	0.8	1	2
0.8	0.6	0.5	5
2	1	0.7	0.7
1.7	1.3	1.5	1
1	1	1	1
2	3	1	1
1	0.7	0.8	0.7
0.9	1.4	0.4	1.4
1	5	1.2	3
2	0.6	8	2
1	0.5	2	2
1	2		1
X=1,51034483	X=1,65517241	X=1,78214286	X=2.45862069
e.s. 0,1621	e.s. 0,26	e.s 0,3326	e.s.0,4269

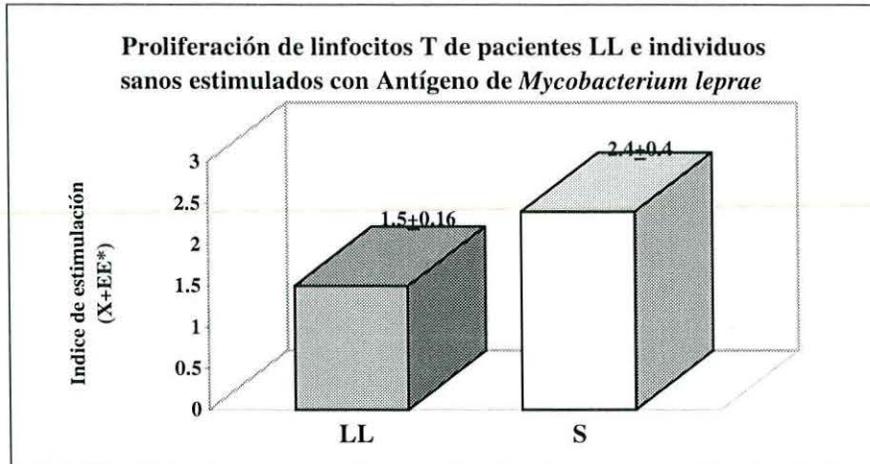
CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Prueba paramétrica t de student apareada de una cola. 1 vs 2 N.S. ; 1 vs 3 N.S. ; 1 vs 4 p<0.01; 2,3 vs 4 p< .01

GRAFICA 8



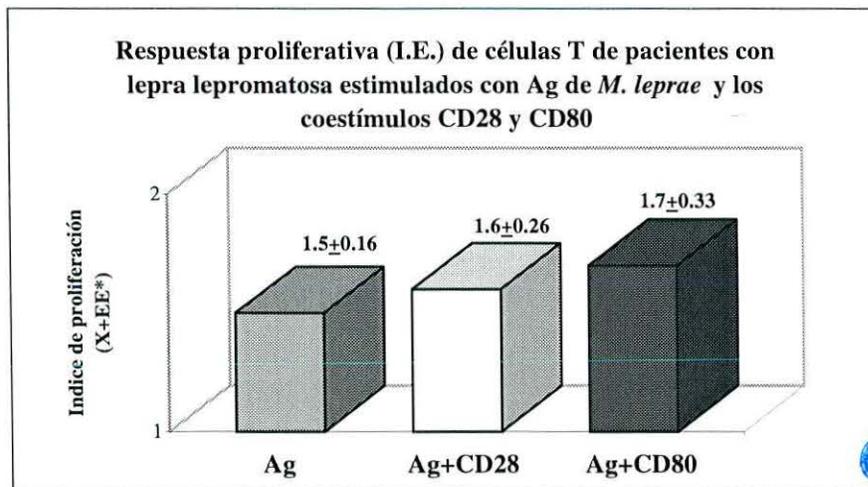
*X+EE = media + error estándar

LL = pacientes con lepra lepromatosa estimulados con Antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae*

S = sujetos sanos estimulados con Antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae*

LL vs S: $p < 0.01$

FIGURA 9



*X+EE = media + error estándar

Ag = Antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae*

CD28 = Anticuerpo monoclonal anti CD28

CD80 = Anticuerpo monoclonal anti CD80

Ag vs Ag+CD28: $p = N.S.$

Ag vs Ag+CD80: $p = N.S.$

Ag+CD28 vs Ag+CD80: $p = N.S.$

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

DISCUSION

Como se mencionó en los antecedentes, los pacientes con lepra lepromatosa presentan una inmunodeficiencia caracterizada una disminución en la proliferación de los linfocitos T ante estímulos mitogénicos ó antigénicos (22,24)

Los resultados de nuestro estudio confirman estos datos, como se puede observar en los cuadros (3 y 4) y gráficas (5 y 8). Aunque los índices de estimulación de pacientes con LL, estimulados con PHA son significativamente menores que los correspondientes de los linfocitos de los sujetos sanos, se encuentran dentro de los límites normales bajos. Así mismo, en pacientes con LL observamos los parámetros normales en la cuantificación de las subpoblaciones de linfocitos T respecto a las células CD4+ y CD8+ (cuadro 2). Lo anterior probablemente se debe al tratamiento con dapsone (2,4,diaminodifenisulfona). Según estudios de nuestro laboratorio (memorias X congreso Internacional de Lepra 1994), este medicamento utilizado en la poliquimioterapia propuesta por la OMS, tiene un efecto inmunomodulador (69).

La causa de la disminución de la respuesta inmune celular en los pacientes con LL se ha atribuido principalmente a la deficiencia síntesis y o liberación de IL-2 (22,30) y a defectos en las CPA (70). En el presente trabajo se analizó la presencia de las moléculas CD28 y CD80 y la respuesta a los anticuerpos anti CD289 y antiCD80, las cuales como señalan estudios recientes están involucradas en la síntesis de IL-2 y en la activación de linfocitos T con la participación de las CPA(73,74).

Respecto a la expresión de la molécula CD80 en los linfocitos B (CD19+) y en los macrófagos (CD13+) activados de sangre periférica de pacientes con LL e individuos sanos no se encontraron diferencias significativas (graficas 1 y 2). Además, la inactivación de la molécula CD80 con el anticurpo anti-CD80 no disminuyó el I.E. de los linfocitos T de pacientes con LL bajo estimulación mitogénica o antigénica (gráfica 9). Sin embargo, en los linfocitos T de sujetos sanos, la adición de esta misma molécula inhibió su proliferación al estimular con mitógeno o antígeno (mediante bloqueo exógeno de la señal coestimuladora). Debido a lo anterior se puede descartar que la falla reside no tanto en la expresión (ya que la expresión tanto en macrófagos como en linfocitos B es igual que en los sujetos sanos) sino en la funcionalidad de la molécula CD80, porque cuando se activa su ligando específico CD28 en los linfocitos T con anticuerpo anti CD28 (que suple la función de CD80.), la proliferación de los linfocitos T de pacientes con LL ante un estímulo mitogénico, alcanza los niveles de I.E. de los linfocitos T de sujetos sanos sin

que medie la presentación del antígeno (tabla 2). Se plantea que la falla tal vez pudiera deberse a una alteración a nivel de la región N-terminal MYPPPY de la molécula CD80 que es el epitope mediante la cual interacciona con su ligando específico (75,76), y no el que reconoce el anticuerpo monoclonal anti CD80 con el que se reveló su presencia en la membrana de las células

En cuanto a la expresión de la molécula CD28 en los linfocitos T (CD3+) en la gráfica (4) se observa una disminución significativa de su expresión en los pacientes con LL en comparación con los sujetos sanos, lo que es de esperarse tomando en cuenta que el nivel de expresión de CD28 se incrementa con la activación celular (42) y esta no se da adecuadamente en los linfocitos de pacientes LL.

En relación a la funcionalidad de las moléculas CD28, como se mencionó anteriormente, se observa corrección de la falla en la señal coestimuladora bajo el efecto del anticuerpo anti-CD28 sólo en el caso de estimulación mitogénica (no así en el caso de la estimulación antigénica, con *Mycobacterium leprae* lo que confirma el reporte de (Salgame) sobre la especificidad de la anergia de las clonas de linfocitos T de pacientes con LL tratados con poliquimioterapia.

Se desconoce el mecanismo por el cual se inicia esta anergia, pero se han reportado alteraciones de los macrófagos tanto en el mecanismo de presentación de antígenos (70), su degradación. Así mismo una deficiencia en la activación de los linfocitos T (21,23).

Cabe mencionar que se han continuado los estudios respecto a la naturaleza del antígeno y su relación con la anergia (como lo ha reportado Islas 1993) (77). Se ha tratado de establecer el papel real del macrófago en el desarrollo de la lepra, a este respecto se han realizado estudio de las citocinas producidas por los macrófagos, principalmente IL-1 y su antagonista natural IL-1Ra (resultados preliminares del laboratorio), que coinciden con los hallazgos reportados por Ghiardian, E. (77), en la infección por *Mycobacterium avium* en ratones. También coinciden con los datos de Krewzer (78) en los que propone que el IL-1Ra, puede jugar un papel esencial en la regulación de la activación del macrófago.

Por otro, continuamos realizando estudios en linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa, con la finalidad de comprender un poco más el mecanismo que induce o inicia la anergia específica. A este respecto estamos estudiando señales de transducción como la proteína p21ras involucrada también en la activación y proliferación del linfocito T.

CONCLUSIONES.

- 1.- La expresión de las moléculas CD80 en los linfocitos B y macrófagos de sangre periférica activados con PHA de pacientes con lepra lepromatosa no presenta diferencias significativas con los de sujetos sanos.
- 2.- El porcentaje de linfocitos T CD28 + en sangre periférica de pacientes con lepra lepromatosa es significativamente menor que el de los individuos sanos.
- 3.- Las subpoblaciones CD4+ y CD8+ de linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa son iguales cuantitativamente a las subpoblaciones correspondientes de los sujetos sanos.
- 4.- La proliferación de linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa ante estímulo antigénico de *M. leprae* y mitogénico de PHA es menor significativamente que la que presentan los de sujetos sanos ante los mismos estímulos.
- 5.- Los anticuerpos anti-CD80 no modificaron los bajos índices de estimulación en linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa bajo estímulo antigénico o mitogénico.
- 6.- La adición del anticuerpo anti-CD28 incrementó significativamente el I.E. de los linfocitos T de pacientes con LL cuando se estimularon con mitógeno, sin embargo no corrigió esta deficiencia proliferativa cuando se estimularon con el antígeno específico.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL



BIBLIOTECA CENTRAL

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- WHO Weekly Epidemiological Record No.72,23 . 6 June 1997
- 2.- Kaufmann, A. Lepra y medios de comunicación. Dermatología Rev. Mex., 21: 217-230 . 1977
- 3.- Latapí, F.: Cincuenta años de lucha contra la lepra en México (1930-1980). Dermatología Rev. Mex., 24: 81-86, 243-246. 1980.
- 4.- Publicación Técnica del INDRE No. 15. Lepra: pasado, presente y perspectivas para el futuro. México, D.F., Edit. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. Instituto nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 1992.
- 5.- Saul, A. Lecciones de Dermatología. México, D.F., Edit. F. , Méndez Cervantes, 257-332, 1984.
- 6.- Jacobson, M.D. and Gillis, W. The face of leprosy in the United States today. Arch. Dermatol., 126: 1627-1630. 1990.
- 7.- Kirchheimer, W.F. and Storrs, E.E. An attempt to establish the armadillo (Dasypus novemcinctus) as a model for the study of leprosy. Int. J. Lepr. 39: 693-702. 1971.
- 8.- Stein, J.H. and Cooke, M. Medicina Interna. México, D.F., Salvat Editores, 1819-1823. 1989.
- 9.- Manual de Procedimientos Operativos para el Control de la Lepra. México, D.F., Edit. Dirección General de Medicina Preventiva. Secretaría de Salud. 1991.
- 10.- Sansonetti , P. , Lagrange, P.H. : The immunology of Leprosy Speculations on the Leprosy Spectrum. Infect. Dis. 3: 422-469. 1981.
- 11.-Engers, H. Results of a World Health Organization-sponsored workshop on monoclonal antibodies to Mycobacterium leprae . Infect. Immun. , 48: 603-605. 1985.

- 12.- Ridley, D.S. and Jopling, W.H. Classification of leprosy according to immunity; a five group system. *Int. J. Lepr.* 34: 255-273. 1966.
- 13.- Wesley, C., Van Voorhis, S.B., Kaplan, G., & Cols. The Cutaneous Infiltrates of Leprosy. Cellular Characteristics and the Predominant T-cell Phenotypes. *N. Engl. J. Med.* 307 (26): 1593-1597. 1982.
- 14.- Ivanyi J. Pathogenic and Protective Interactions In Mycobacterial Infections. *Clinics in Immunology And Allergy.* 6 (1): 127-154. 1986.
- 15.- Nath, I., Singh, R.: The suppressive effect of M. leprae on the in vitro proliferative response of lymphocytes from patients with leprosy. *Clin Exp. Immunol.* 41: 406-414, 1980.
- 16.- Male, D., Champion, B., Cooke, A., Owen, M. *Advanced Immunology.* London, England., Edit. Gower Medical Publishing. 10.1-10.5 1991.
- 17.- Walach, D., Cottenot, F. and Bach, M.A., Imbalances in T cell subpopulation in lepromatous leprosy. *Int.J. Lepr.* 50 282-9 .1983
- 18.- Myrvang, B., Godal, T., ridley, D.S., Froland, S.S. and Song, Y.K.: Immune responsiveness to M. leprae and other Mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 14: 541-553. 1973.
- 19.- Mehra, V., Mason, L.H., Rothman, W., Reinjerz, E., Scholossman, S.F., Bloom, B.R.: Delineation of a human T cell subset responsible for lepromine induced suppression in leprosy patients. *J. Immunol.*, 125: 1183-1188 1980.
- 20.- Nogueira, N., Kaplan, G., Levy, E., Sarno, E.N., Kushner, P., Granelli-Piperni, A., Vierira, L., Colomer, Gould, V., Levis, W., Steinman, R., Yip, Y.K. Cohn, Z.A.: Defective low Interferon production in leprosy reversal with antigen and interleukin 2. *J. Exp. Med.* , 158: 2165-2170 1983.
- 21.- Mohaghepour , N., Gelber, R.H., Engelman, E.T.: T cell defect in lepromatous leprosy is reversible in vitro in the absence of exogenous growth factors. *J. Immunol.*, 138: 570-574 1987.

- 22.- Islas, R.A.E., Morales, O.R., Fafutis, M. M., González, M. A., Ortiz, O.L. Deficiency en the Biosynthesis of Interleukin 2 (IL-2) and Functional Preesence of the IL-2 Receptor in Lepromatous Leprosy. *Inter. J. of Lepr.* 55 (3): 566-569 1987.
- 23.- Munno, I., Pellegrino, N.M., Fumo, G., Barbieri, G. & Jirillo E. Studies on lymphokine production in lepromatous leprosy patients — *Cytobios* 62: 141-147 1990.
- 24.- Ochoa, M.T., Valderrama, L., Ochoa, A., Zea, A. Escobar, C.E. Moreno, E.H. Falabela, R. Lepromatous and tuberculoid leprosy: clinical presentation and cytokine responses. *Inter. J. of Dermatol.* 35 (11): 786-790. 1996.
- 25.- Fafutis, M.M., Alfaro, B.F., González, M.A., Morales, O.R., Islas, R.A.E. Response to Phytohemagglutinin of LL Patients' Lymphocytes Preincubated in Culture Media. *Inter. J. of Lepr.* 59 (3): 480-482 1991.
- 26.- Schwartz, R.H. Anergia de células T. *Scientific American.* Octubre 24-31. 1993.
- 27.- Bretscher, P. & Cohn, M. A theory of self-nonsel discrimination. *Science* 169: 1042 1970.
- 28.- Rudd, C.E., Janssen, O., Cai, Y-C., da Silva, A.J., Raab, M. & Prasad K.V.S. Two-step TCR ζ /CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. 15 (5) 225-234 1994.
- 29.- Letouneur, F. & Klausner, R.D. Activation of t Cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ . *Science* 255: 79 1992.
- 30.- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Gribben, J.G. & Nadler, L.M. The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the Prevention of Anergy, Induction of Productive Immunity and Down. Regulation of the Immune Response. *Immunological Reviews* 153: 5-25, 1996.
- 31.- Tsygankov, A. Y., Spana, C., Rowley, B.R., Penhallow, R.C., Burkhardt, A.L. & Bolen, J.B. Activation-dependent tyrosine phosphorylation of fyn-associated proteins in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 7792, 1994.

- 32.- Isakov, N., Malley, M.I., Scholz, W., & Altman, A. T lymphocyte activation: the role of protein kinase c and the bifurcating inositol phospholipoid signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* 95: 89, 1987.
- 33.- Hoyos, B., Ballard, D.W., Böhnlein, E., Siekevitz, M. & Greene, W.C. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin 2 gene expression. *Science* 244: 457, 1989.
- 34.- Kondo, S., Kooshesh, F., Wang, B., Fujisawa, H. & Sauder, D.N. Contribution of the CD28 Molecule to Allergic and Irritant-Induced Skin Reactions in CD28^{-/-} Mice. *J. of Immunol.* 157: 4822-4829, 1996.
- 35.- Turka, L.A., Ledbetter, J.A. Lee, K, June, CH., Thompson, C.B. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3⁺ mature thymocytes. *J. Immunol.* 144: 1646-1653, 1990.
- 36.- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L, Aruffo, A., Damle, N.K. & Ledbetter, J.A. Binding of the B cell activation B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173: 721. 1991.
- 37.- June,CH., Ledbetter, J.A., Linsley, P.S., Thompson, C.B. Role of the CD28 receptor in T cell activation. *Immunol. Today* 11: 211-216 1990.
- 38.- June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. & Thompson, C.B. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* 15: 321. 1994a.
- 39.- Gross, J.A., St. John T., Allison, J.P. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J.Immunol.* 144: 3201-3210. 1990.
- 40.- June, C.H., Vanderberghe, P. & Thompson, C.B. The CD28 and CTLA-4 receptor family. *Chem. Immunol.* 59: 62, 1994b.
- 41.- Gross, J.A., Callas, E., Allison,J.P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* 149: 380- 388, 1992.

- 42.- Linsley, P.S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L., Ledbetter, J.A. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J. Immunol.* 150: 3161-3169. 1993.
- 43.- Yokochi, T, Holly R.D. lark, E.A. B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blast, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J. Immunol.* 128: 823-27. 1982.
- 44.- Nabavi, N., Freeman, G.J., Gault, A., Godfrey, D. Nadler, L.M., Glimcher, L.H. Signaling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360: 266-68. 1992.
- 45.- Freeman, G.J., Freedman, A.S., Segil, J.M.-, Lee, G., Whitman, J.F., Nadaler, L.M. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cell. *J. Immunol.* 143: 2714-22. 1989.
- 46.- Freeman, G.J., Gray, G.S., Gimmi, C.D., Lombard, D.B., Zhou, L.J., White, M., Fitzeroth, J.D., Gribben, J.G., Nadler, L.M. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174: 625-31. 1991.
- 47.- Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser H., Gribben, J.G. Ng, J.W. Kim, J., Goldberg, J.M., Hathcock, K., Laszlo, G., Lombard, L.A., Wang, S. Gray, G.S. Nadler, L.M., Sharpe, A.H. Murine B7-2, an alternative CTLA-4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Erxp. Med.* 178: 2185-92. 1993.
- 48.- Chen, C., Gault, A., Shen, L., Nabavi, N. Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule. *J. Immunol.* 152: 4929-36. 1994.
- 49.- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmare, L., Aruffo, A., Damle, N.K., Ledbetter, J.A. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 m RNA accumulation. *J.Exp. Med.* 173: 721-30. 1991.



BIBLIOTECA CENTRAL

- 50.- Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Sugita, K., Freedman, A.S. Morimoto, C., Nadler, L.M. B cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* 88: 6575-79. 1991.
- 51.- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Somoza, C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366: 76-79. 1993.
- 52.- Ranheim, E.A., Kipps, T.J. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J. Exp. Med.* 177: 925 1993.
- 53.- Roy, M., Aruffo, A., Ledbetter, J., Linsley, P., Kehry, M., Noelle, R. Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur. J. Immunol.* 25: 596-603. 1995.
- 54.- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., Hodes, R.J. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180: 631-40. 1994.
- 55.- Stack, R.M., Lenschow, D.J., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Fitch, F.W. IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J. Immunol.* 152: 5723-33. 1994.
- 56.- Su, B., Jacinto, E., Hibi, M., Kallunki, T., Karin, M., & Ben-Neriah, Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77: 727. 1994.
- 57.- Scheider, H., Prasad, V.S., Shoelson, S.E. & Rudd, C.E. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J. Exp. Med.* 181: 351. 1995b.
- 58.- Migita, K., Eguchi, K., Kawabe, Y., Tsukada, T., Ichinose, Y. & Nagataki, S. Defective TCR-mediated signaling in anergic T cells. *J. Immunol.* 155: 5083. 1995.

- 59.- Boussiotis, V.A., Barber, D.L., Lee, B.J., Freeman, G.J., Gribben, J.G. & Nadler, L.M. Differential association of protein tyrosine kinases with T-cell receptor is linked to the induction of anergy and its prevention by B7 family-mediated costimulation. *J.Exp. Med.* 184: 365. 1996.
- 60.- Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gibson, M.G., Greene, J.L., Ledbetter, J.A., Singh, C. & Tepper, M.A. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257: 792. 1992b.
- 61.- Lanier, L.L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J. H., Linsley, P. S., Okumura, K., Ito, D. & Azuma, M. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154. 97. 1995.
- 62.- Deborah J. Lenschow, Theresa L. Walunas, and Jeffrey A. Bluestone. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233-58. 1996.
- 63.-Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J.A., Raulat, D. H.& Allison, J. P. Cd28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature* 356, 607. 1992.
- 64.- Anne I. Sperling & Jeffrey A. Bluestone. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and Beyond. *Immunological Reviews* No. 153. 1996.
- 65.- Boyüm, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation, and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 suppl. 97: 77-89. 1968.
- 66.- Sansom - DM; Wilson-A; Boshell-M; Lewis- J; Hall-ND. B7/CD28 but not LFA-3/CD2 interactions can provide 'third-party' co-stimulation for human T-cell activation. *Immunology.* 80 (2):242-7. 1993. Oct.
- 67.- Jeffrey A. Bluestone. Is CTLA-4 a Master Switch for Peripheral T Cell Tolerance. *The Journal of Immunology:* Vol. 158. No. 05. 1989-93. 1997 March 1.

- 68.- Mehra, U.V., Brennan, P. J., Rada. E. , Convit, J. , Bloom, B.R., Lymphocytes suppression in leprosy is induced by unique M. leprae glycolipid . Nature. , 308: 194-196. 1984.
- 69.- Ghei, S. K. , Sengupta, U. , Desikan, K. V. In vitro Effect of DDS on phytohemagglutinin (PHA) induced lymphocyte transformation. Hansen. Int., 5(2): 112-118, 1980.
- 70.- Padmini R. Salgame, Tannaz J. Birdi, P.R., Mahadevan, and Noshir H. Antia. Role of macrophages in defective cell mediated immunity in Lepromatous Leprosy. I. Factor (s) from macrophages affecting protein syntesis and lymphocyte transformation. International Journal of Leprosy. Vol.48. No. 2. 172-177. 1980.
- 71.- Janeway, C. A., Jr. And K. Bottomly. Signals and signs for lymphocytes responses. Cell. 76: 275. 1994.
- 72.- Seder, R. A., Germain, R.N., Linsley, P. S. & Paul, W.E. CD28-mediated coestimulation of Interleukin-2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and IFN- γ production . J. Exp. Med. 179, 299. 1994.
- 73.- Ben-Neriah Y. Alkalai I. Yaron A. Hatzubai A. Jung S. Signalling intermediates of CD28. Research in Immunology. 146(3): 149-54.1995.
- 74.- Civil A. Verweij CL. Regulation of IL-2 gene transcription via the T-cell accesory molecule CD28. Research in Immunology. 146(3): 158-64. 1995.
- 75.-Morton PA. Fu XT. Sewart JA. Giacoletto KS. White SL. Leysath CE. Evans RJ. Shieh JJ. Karr RW. Differential effects of CTLA-4 substitution on the binding of human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2). Journal of Immunology. 156(3) : 1047-54, 1996.
- 76.- Truneh A. Reddy M. Ryan P. Lyn SD. Eichman C. Couez D. Hurl MR. Sekaly RP. Olive D. Sweet R. Differential reconigtion by CD28 of its cognate counter receptors CD80 (B7-1) and B70 (B7-2) : analysis site directed mutagenesis. Molecular Immunology. 33(3): 321-34, 1996.

77.-Alfonso E. Islas- Rodríguez, Cecilia M. Guillén- Vargas, Mary Fafutis-Morris, Fernando Alfaro-Bustamante, Roberto Morales-Ortíz, Amado González- Mendoza, And Iris Estrada-Parra. Recognition of Mycobacterium leprae _Antigens with Antibodies Present in sera from Patients with Lepromatous Leprosy. International Journal of Leprosy. Vol. 61 No.2 245-249. 1993.

78.- Denis M. Ghadirian E. Interleukin-1 is involved in mouse resistance to Mycobacterium avium . Infection & Immunity. 62(2): 457-61. 1994.

79.- Kreuzer KA. Daver JM. Rockstroh JK. Sauerbruch T. Spengler U. The IL-1 system in VIH infection: peripheral concentrations of IL-1 beta . IL-1 receptor antagonist and soluble IL-1 receptor type II. Clinical & Experimental Immunology. 109(1):54-8, 1997 Jul.

CUCE



BIBLIOTECA CENTRAL