

---

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*

---

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**"NIVELES DE INTERLEUCINA-2 EN  
CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SUJETOS  
EN CONTACTO CON PACIENTES CON LEPRO-  
MATOSA DE LA JURISDICCIÓN IV DE LA  
SECRETARÍA DE SALUD LA BARCA, JALISCO"**

---

---

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA INMUNOBIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A  
MARÍA LUISA PITA LÓPEZ**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL. NOVIEMBRE DE 1999**

---

---



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**COORDINACION DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DR. MARCELINO VAZQUEZ GARCIA**  
COORDINADOR DEL POSGRADO DEL CENTRO UNIVERSITARIO  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
**PRESENTE**

Por medio de la presente informo a Usted que la Biol. MARIA LUISA PITA LOPEZ, estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, con la tesis intitulada: "NIVELES DE IL-2 EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SUJETOS EN CONTACTO CON PACIENTES CON LEPROMA LEPROMATOSA, DE LA JURISDICCION IV DE LA SECRETARIA DE SALUD, LA BARCA, JALISCO", reunió todos los requisitos para que se lleve a cabo su impresión. Así mismo, hemos acordado que, a propuesta del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, se designe a los siguientes profesores como miembros del jurado del examen de grado correspondiente:

<b>Dra. Galina Zaitseva Petrovna</b>	<b>Presidente</b>
<b>Dr. Arturo Orozco Barocio</b>	<b>Secretario</b>
<b>M. en C. Eduardo Vázquez Valls</b>	<b>1er. vocal</b>
<b>Dr. en C. Anne Santerre Lucas</b>	<b>2do. Vocal</b>
<b>M. en C. Alfonso Islas Rodríguez</b>	<b>3er. vocal</b>

Mismo que se verificará el 26 de Noviembre del presente año a las 10:00 horas. En la sala de tesis de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales, de este Centro Universitario.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal. 22 de Noviembre de 1999

**DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS**  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**C.U.C.B.A.**



DEPARTAMENTO  
DE  
ECOLOGIA

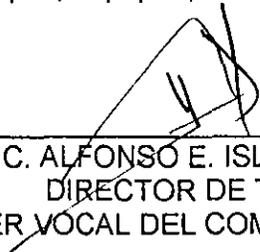
DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS  
COORDINADOR GENERAL DEL POSGRADO  
ENCIENCIA BIOLÓGICAS, CUCBA, U de G.  
P R E S E N T E.

Por este conducto, nos dirigimos a Usted para informarle que después de revisar el trabajo de tesis "Niveles de IL-2 en cultivos de linfocitos de sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa, de la Jurisdicción IV de la Secretaría de Salud, La Barca, Jalisco" realizado por la Biól. Maria Luisa Pita López aspirante al grado de Maestro en Ciencias Biológicas (Area Inmunobiología), consideramos que ha quedado debidamente concluido. Por lo que, autorizamos su impresión y programación de fecha de examen de grado correspondiente.

Agradeciendo de antemano las atenciones prestadas a la presente quedamos de Usted, aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopán, Jal. a 10 de Noviembre de 1999.



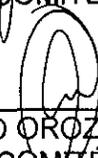
---

M. en C. ALFONSO E. ISLAS RODRÍGUEZ  
DIRECTOR DE TESIS Y  
TERCER VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR



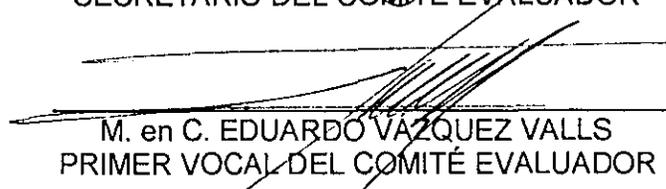
---

DR. en C. GALINA ZAITZEVA PETROVNA  
PRESIDENTE DEL COMITÉ EVALUADOR



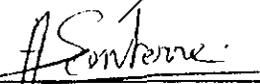
---

DR. en C. ARTURO OROZCO BAROCIO  
SECRETARIO DEL COMITÉ EVALUADOR



---

M. en C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS  
PRIMER VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR



---

Dr. en C. ANNE SANTERRE LUCAS  
SEGUNDO VOCAL DEL COMITÉ EVALUADOR

## RESUMEN

La respuesta inmune específica se manifiesta con la proliferación de determinados clones de linfocitos T y B específicas para el antígeno. Las señales de activación y división celular llegan al linfocito a través de distintas moléculas de su membrana. Para que la respuesta alcance el máximo de eficacia, las señales transmitidas por estas moléculas deben ser claras, lo que implica que cualquier problema al nivel de membrana plasmática contribuye al desarrollo de tasas de proliferación anómalas y a la producción deficiente de IL-2, la cual es fundamental para la función adecuada de los linfocitos T. En pacientes con lepra lepromatosa la respuesta inmune celular contra antígenos de *Mycobacterium leprae* esta suprimida, debido a que los linfocitos T producen bajas cantidades de IL-2. Los sujetos en contacto con un individuo con lepra lepromatosa (multibacilar) presentan más riesgo de desarrollar la enfermedad. Por lo que en el presente trabajo se valoró la capacidad de respuesta de proliferación *in vitro* de los linfocitos T de sujetos en contacto con pacientes con LL, a través del ensayo de blastotransformación ante estímulo mitógeno (PHA). Además, se determinaron por el método de ELISA los niveles de interleucina-2 en los sobrenadantes de los cultivos de los linfocitos T. Los índices de estimulación *in vitro* de los linfocitos T de controles (n=10) y sujetos contactos (n=10) fueron muy similares. Sin embargo en tres de diez sujetos en contacto con pacientes LL se encontró una baja producción de IL-2. Los resultados de índices de estimulación de los Infocitos en cultivo y de las concentraciones de IL-2 en las dos poblaciones estudiadas presentaron heterogeneidad y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

## ABREVIATURAS

**NOTA:** Para algunos de los términos, se han utilizado las siglas que se derivan del idioma inglés, debido a que constituyen abreviaturas científicas convencionales empleadas internacionalmente, las definiciones se presentan en español.

<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AP-1</b>	Proteína activadora-1
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta AMPc
<b>CTLs</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunosorbente enzimático
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular-1
<b>IE</b>	Índice de estimulación
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol Trifosfato
<b>Jak</b>	Cinasas Janus
<b>KDa</b>	kilodalton
<b>LFA-1</b>	Antígeno de función leucocitaria-1
<b>LT</b>	Lepra tuberculoide
<b>LL</b>	Lepra lepromatosa
<b>MB</b>	Multibacilares
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas

<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PB</b>	Paucibacilares
<b>PGL-1</b>	Glicolípido fenólico-1
<b>pg</b>	picogramos
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol bifosfato
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PMA</b>	Acetato de forbol miristato
<b>PTK</b>	Proteína tirosina cinasa
<b>RIC</b>	Respuesta inmune celular
<b>RIL-2</b>	Receptor de IL-2
<b>RPMI-1640</b>	Medio de cultivo (Roswell Memorial Park Institute-1640)
<b>STAT</b>	Transductores de señales y activadores de la transcripción
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th</b>	T cooperador
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la salud
<b><math>\mu</math>Ci</b>	Microcurie

## DEDICATORIA

A Alejandro por más de diez años de apoyo y comprensión.

A ti Nury por que tenerte significa seguir adelante.

A ti mamá te quiero.

**Esta tesis se realizó en el laboratorio de Inmunobiología  
del Departamento de Biología Celular y Molecular  
del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias,  
de la Universidad de Guadalajara.**

Gracias al Dr. Genaro Paredes Romero y al Dr. Marco A. Ricaño Puentes de la  
Jurisdicción IV de la Secretaría de Salud, La Barca Jalisco por las facilidades  
otorgadas para la toma de muestras sanguíneas utilizadas en la presente tesis.

## INDICE

Sección	página
I. ANTECEDENTES.....	1
1. Generalidades de la lepra.....	1
1.1 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	5
2. Generalidades de la respuesta inmune en lepra.....	8
2.1 Sistemas de señalización biológica.....	10
2.2 Linfocitos T.....	11
2.3 Citocinas y lepra.....	17
2.4 Inmunidad contra bacterias intracelulares.....	22
2.5 Regulación de la respuesta inmune.....	25
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
III. OBJETIVOS.....	28
IV. HIPOTESIS.....	29
V. MATERIAL Y METODOS.....	30
VI. RESULTADOS.....	35
VII. DISCUSION.....	41
VIII. CONCLUSIONES.....	43
IX. LITERATURA CONSULTADA.....	44
X. ANEXO.....	49

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- Fig. 1 Desarrollo de la lepra (Prescott, 1996).
- Fig. 2 Estructura morfológica de la pared celular de micobacterias (Barkdale, 1977).
- Fig. 3 Presentación antigénica (Arnaiz-Villena, 1995).
- Fig. 4 Transducción de la señal de activación en el linfocito T (Arnaiz-Villena, 1995).
- Fig. 5 Clasificación de las citocinas (Simard, 1998).
- Fig. 6 IL-2 y receptor de IL-2 (Simard, 1998).
- Fig. 7 Cooperación entre macrófagos activados y CTL en la Eliminación de bacterias intracelulares (Arnaiz-Villena, 1995).
- Fig. 8 Supresión de la respuesta Th1 por linfocitos Th2 y viceversa. (Arnaiz-Villena, 1995).
- Fig. 9 Índices de estimulación de los linfocitos T *in vitro* de controles sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa.
- Fig. 10 Diferencias en el índice de estimulación de linfocitos T *in vitro* de controles y sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa.
- Fig. 11 Niveles de IL-2 (pg/ml) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T de controles y sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa.
- Fig. 13 Diferencias en la concentración (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de controles y sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa.

Cuadro 1 Promedios de absorbancia expresadas en unidades de DO (405 nm), niveles de IL-2 (pg/ml) y los IE de linfocitos en cultivo de controles y sujetos en contacto con pacientes con LL.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Maestro Alfonso Islas por sus sugerencias y comentarios relacionados con la tesis.

Anne te agradezco el tiempo que le dedicaste a la realización de esta tesis y tu amistad.

Dra. Galina gracias por sus observaciones que enriquecieron esta tesis, no sin olvidar sus clases de la Maestría tan amenas.

Maestro Eduardo Vázquez Valls gracias por las correcciones realizadas al trabajo de tesis y por sus clases de Inmunología durante la Licenciatura que aumentaron mi gusto por la Inmunología.

Gracias Arturo por tu comprensión y por tus comentarios que mejoraron el trabajo de tesis.

Rosario gracias por tu tiempo que dedicaste asistiendo a la Jurisdicción IV de la Secretaría de Salud, La Barca Jal.

Gracias al Sr. Oswaldo y a la Sra. Catalina por cuidar a mi hija, cuando a mi no me era posible.

A mis amigos y compañeros de laboratorio.

# **ANTECEDENTES**

## I. ANTECEDENTES

### 1. Generalidades de la lepra.

La lepra o enfermedad de Hansen es una enfermedad, infecciosa crónica causada por el bacilo alcohol ácido resistente *Mycobacterium leprae*, tiene un período de incubación que se estima de 3 a 10 años según la respuesta clínico inmunológica del hospedero. La infección en la mayoría de los individuos se lleva al cabo por la inhalación de gotas nasales de pacientes multibacilares. Además, las condiciones de vida insalubres pueden incrementar el grado de diseminación dentro de una población. La lepra tiene un espectro amplio de manifestaciones clínicas: afecta la piel (lesiones y manchas), los nervios periféricos (perdida de sensibilidad), las mucosas, el tracto respiratorio, y los ojos, entre otras estructuras. Se diagnostica basándose en criterios clínicos, bacteriológicos e histológicos. Se presenta primero una forma inicial indeterminada, desde donde puede evolucionar a dos formas polares distintas; una lepra tuberculoide (LT) paucibacilar (PB), con una inmunidad celular eficaz, que conduce a la destrucción de los macrófagos, células epitelioides y células de Schwann (rodean los axones de los nervios periféricos) parasitadas por los bacilos, en este caso el paciente presenta títulos bajos de anticuerpos circulantes contra *M. leprae*. La lepra lepromatosa (LL) es multibacilar, grave, sistémica, con deterioro de la inmunidad retardada y gran cantidad de bacilos vivos en el interior de los macrófagos y células de Schwann. Por lo tanto la respuesta inmune celular (RIC) a *M. leprae* esta significativamente suprimida, aunque el paciente presenta títulos altos de anticuerpos circulantes contra una gran diversidad de antígenos de *M. leprae* (Ridley, 1966; Clark-Curtis, 1988). Se ha demostrado *in vitro* que *M. leprae* invade a las células de Schwann uniéndose al receptor de membrana  $\alpha$ -destroglicano, por medio de una proteína de la matriz extracelular llamada laminina-2 (Spear, 1999).

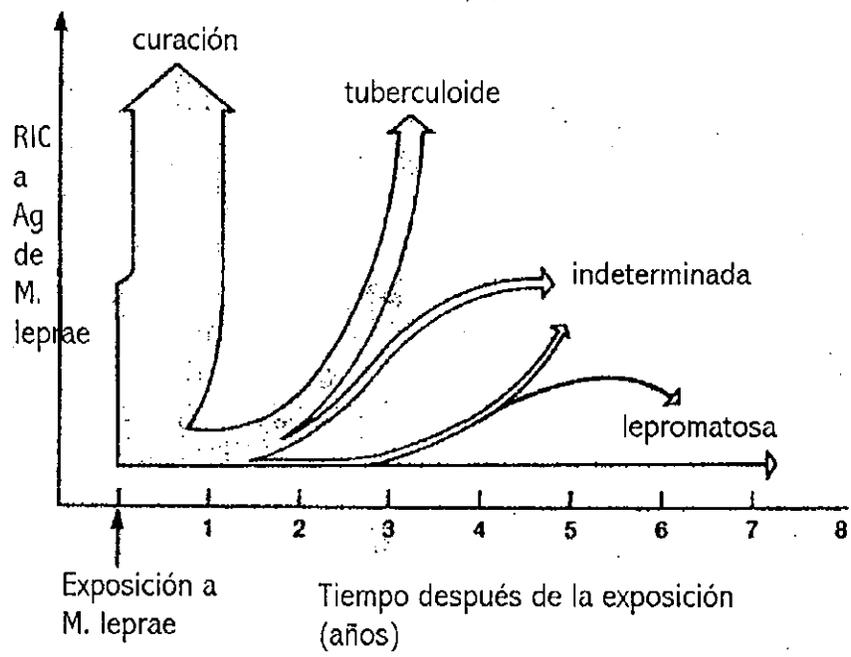


Fig. 1 Desarrollo de la lepra (Prescott, 1996).

El cuadro clínico de la lepra puede deberse a la reacción inmunológica del organismo (liberación de citocinas) y no tanto al daño directo de la bacteria; por lo tanto la polaridad de la enfermedad esta determinada por el tipo y la intensidad de la respuesta inmune (Terencio de las Aguas, 1992). A finales de los años 1940's se aplicaron los primeros tratamientos quimioterapéuticos para el control de la lepra, con la introducción del dapsona y sus derivados. El dapsona es un agente terapéutico ideal, porque su blanco es un enzima involucrada en el metabolismo del folato, el cual es esencial para el metabolismo de *M. leprae*, pero no es tóxico para el paciente humano, quien no sintetiza ácido fólico *de novo*. Años después en los años 1980's se introdujo la terapia de multidroga, que consiste en la administración de fuertes antibióticos (combinación de Dapsona, Rifampicina y Clofazimina). Los pacientes diagnosticados con lepra reciben la quimioterapia para contrarrestar la multiplicación de *M. leprae* en las células y para prevenir deformidades. La quimioterapia debe ser administrada por largos periodos de 5 a 10 años (Clark-Curtis, 1988).

La administración de la terapia de multidroga hace que la prevalencia de la lepra disminuya, pero la incidencia sigue aumentando, mientras persistan las condiciones de malnutrición (entre otras), de la población afectada, porque la terapia solo es para las personas que desarrollaron la enfermedad pero no se administra a los sujetos que viven en contacto con los pacientes multibacilares, que probablemente ya están infectados, así que no se ha podido erradicar totalmente la enfermedad (Vega López, 1999).

En 1998 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que existen cerca de dos millones de personas en el mundo afectadas por la enfermedad. En su mayoría, los casos de lepra se encuentran en la India, Bangladesh, Brasil, Indonesia (países más endémicos con 82% de los casos registrados). De los 80 países afectados, 25 reúnen el 93% de los casos, y más de 600,000 nuevos casos se detectan anualmente (OMS, 1998). En México se calcula que pueden existir entre 50 y 100 mil pacientes con lepra. Los datos muestran que en el estado de Jalisco se encuentran 1913 casos de lepra. En la Jurisdicción IV La Barca de la Secretaría de Salud, el mismo estudio indicó que se encontraron 174 casos en

1996 lo que representa una tasa de prevalencia de 0.81. Esto la ubica en el cuarto lugar de las 13 jurisdicciones de Jalisco (Secretaria de Salud en el Estado de Jalisco, Programa estatal de control de Lepra, Resumen estadístico, 1984-1996, numero 0249). La distribución geográfica económica de los países antes mencionados confirma que, sin duda alguna, la lepra es una enfermedad de la pobreza que no se controla, solo por la disposición de medicinas o por el aumento en el conocimiento de los procesos infecciosos, sino también con el mejoramiento de las condiciones socioeconómicas de la población. El progreso económico, aunado al estado de nutrición y prácticas de buena higiene han contribuido a la erradicación virtual de la lepra en Europa y el norte de América, mientras que permanece en los países en vías de desarrollo (Gillis, 1995). Se ha observado que toda alteración del estado de nutrición perturba el funcionamiento del sistema inmune y en tales condiciones, los agentes patógenos superan fácilmente los mecanismos de defensa y se multiplican. La malnutrición también provoca la atrofia del timo, el cual tiene funciones importantes en la inmunidad (Chevalier, 1997). La principal fuente de contagio de la lepra humana es a través 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 período de incubación tan largo y lo discreto de sus síntomas al inicio, ocasiona que se detecte con mayor frecuencia en los pacientes alrededor de los 30 años (Prescott, 1996).

Se ha observado que los niveles de IFN- $\gamma$  *in vitro* de sujetos en contacto con pacientes con LL es significativamente menor de aquella observada en personas controles quienes no se han expuesto regularmente a personas infectadas. Por lo tanto las personas en contacto con el individuo enfermo presentan más riesgo de desarrollar la enfermedad (Sarno, 1991). Por lo anterior es importante evaluar la respuesta de los linfocitos T *in vitro* de sujetos contacto de pacientes con lepra, así como medir la IL-2 en el sobrenadante de los cultivos. Con la finalidad de valorar

la RIC *in vitro* de dichas personas, los datos anteriores junto con un monitoreo y seguimiento médico podrían controlar una posible infección con *M. leprae*.

### **1.1. *Mycobacterium leprae*.**

Los primeros patógenos bacterianos descritos en el hombre, fueron las micobacterias (Hansen 1874; Koch, 1881), (Bloom, 1985). El *M. leprae*, llamado bacilo de Hansen es una bacteria Gram positiva y alcohol ácido resistente, es un parásito intracelular obligado. Este microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento de 34 °C y muestra una preferencia por las porciones frías del cuerpo humano. Mediante análisis químicos se ha demostrado que la pared celular de las micobacterias es muy compleja, rica en lípidos y posee una estructura común el peptidoglicano, el cual está unido covalentemente a arabinogalactanos y a ácidos micólicos (Hasting, 1988). Dicha pared celular esta formada por un sistema de 4 membranas (capas): la más interna (inmediata a la membrana plasmática), contiene ácido murámico en el peptidoglicano, el cual confiere rigidez a la pared celular; la capa L3 inmediata al peptidoglicano está constituida principalmente por micolatos; la siguiente capa L2 que es inmediata a la L3, está constituida básicamente por el lipopolisacárido micolil-glucosa y el peptidoglicano y tiene una apariencia más arrugada por el posible plegamiento del peptidoglicano. La capa L1 está formada por filamentos que están constituidos por un C-micósido (Barksdale, 1977).

Cabe destacar que el glicolípido fenólico (PGL-1) es el componente antigénico más activo, específico de especie y actúa como factor de virulencia. Este antígeno representa el 2 % de la masa del bacilo (Terencio de las Aguas, 1993). Los estudios de las bases bioquímicas, inmunológicas, de diagnóstico y de investigaciones terapéuticas de la lepra han sido limitados por que *M. leprae* es uno de los pocos patógenos del humano que no se han podido cultivar *in vitro*. Sin embargo, a principios de los años 1970's Storrs y Kirrcheemer demostraron que el armadillo de nueve bandas, *Dasypus novemcinctus* podía infectarse experimentalmente con *M. leprae* y que después de un período de incubación de

18 a 24 meses, los animales desarrollaban una infección sistémica similar a la lepra lepromatosa en humanos. Así a partir de los hígados y los bazo de estos armadillos ha sido posible contar con una gran cantidad de células y antígenos de *M. leprae* para diferentes investigaciones (Clark y Curtis, 1988). Además desde mediados de los años 1980's se han generado bibliotecas genómicas de DNA recombinante de *M. Leprae*, las cuales se construyen con la finalidad de proveer una fuente de genes que codifican proteínas relevantes para los estudios antes mencionados (Blomm, 1985). Se ha logrado conocer que el genoma de *M. leprae* es 50 veces más pequeño que el de *M. tuberculosis*, además contiene 300 genes de los cuales el 50% codifican para proteínas exportables y el otro 50 % son genes únicos de *M. Leprae*. Con el estudio de estos genes se podrá entender la biología de *M. leprae*, identificar factores de virulencia, posibles blancos de drogas y producción de vacunas (Dockrell, 1999). Además, desde hace 18 años se ha estudiado por muchos investigadores la inmunogenicidad de diferentes antígenos recombinantes y no recombinantes de *M. leprae* (Islas, 1993); con la finalidad de conocer los antígenos involucrados en la respuesta inmune desarrollada durante la evolución de la lepra.

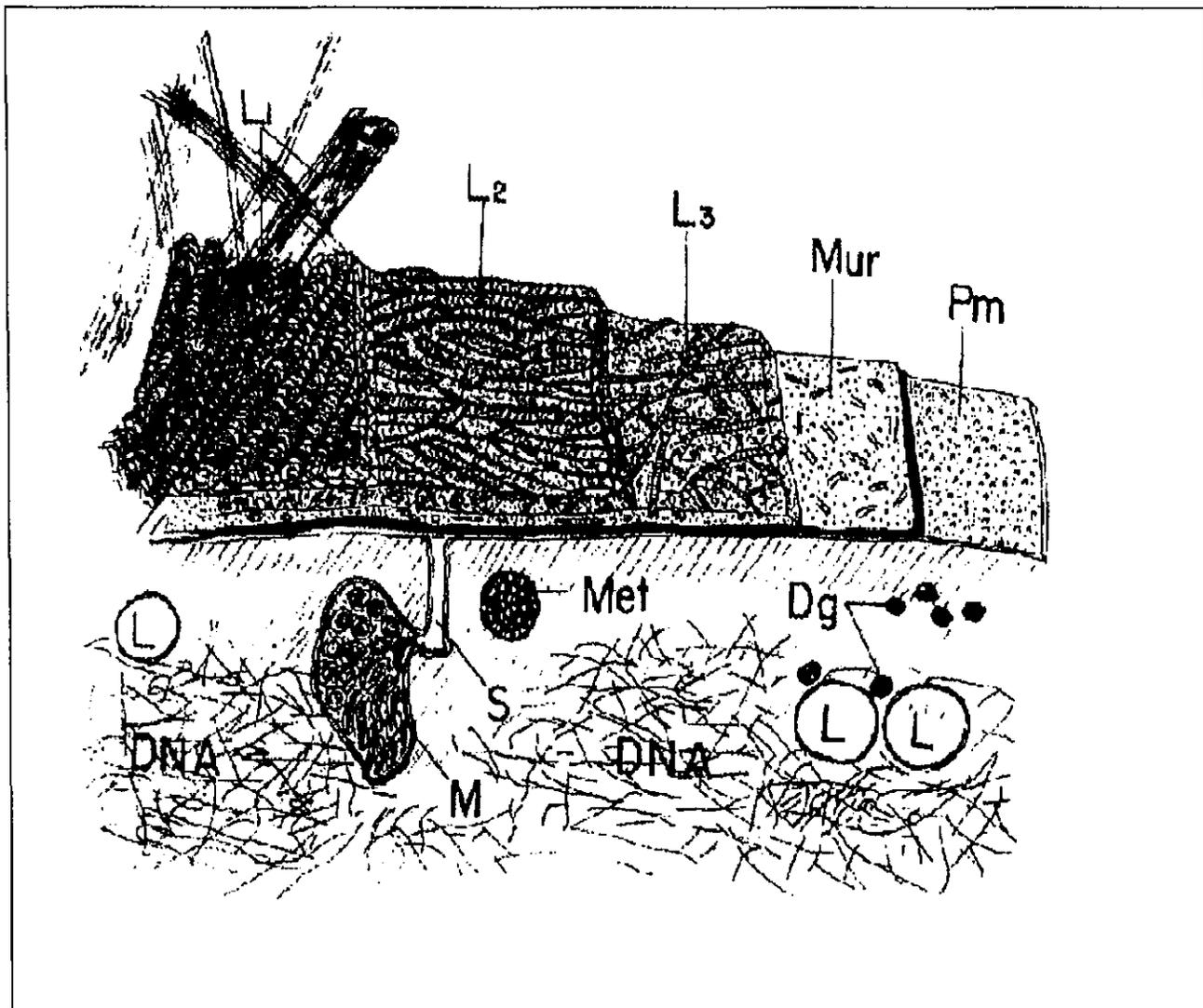


Fig. 2 Estructura morfológica de la pared celular de micobacterias  
(Barkdale, 1977).

## 2. Generalidades de la respuesta inmune de lepra.

El estudio de la inmunología de la lepra es importante para entender la habilidad de pacientes con lepra o de otros individuos para resistir la invasión de organismos patogénicos y en particular de *M. leprae*. Es importante mencionar que la inmunidad tiene como finalidad el mantener la integridad de lo propio ("yo biológico"), es decir, de identificar como unidad propia e individual la pluralidad de las partes que constituyen a un ser vivo, reconociendo una a una las células, estructuras y la secuencia de las moléculas que forman parte del mismo, diferenciándolas de las ajenas (Terencio de las Aguas, 1992).

Los mecanismos de defensa del cuerpo inician en la piel, la cual es una cubierta protectora. La piel sana inhibe la entrada de gérmenes, excepto cuando esta dañada. Los fluidos del cuerpo son medianamente antisépticos, como las lagrimas, la saliva y los jugos gástricos, que funcionan junto con la piel, como una primera línea de resistencia contra los gérmenes que se asocian con enfermedad. Cuando los microorganismos invasores rompen la primera línea de defensa, se encuentran con varios tipos de "células de defensa", específicamente designadas para ingerir y digerir aquellos invasores extraños. De hecho la "batalla" toma lugar dentro del cuerpo, donde las células de defensa atacan las bacterias, produciéndose luego el proceso de inflamación que puede tomar el nombre de segunda línea de defensa del cuerpo.

Los mecanismos protectores de los organismos tienen dos aspectos – el ser no específicos y específicos. En el caso de los no específicos, las células grandes de defensa llamadas macrófagos que circulan por la sangre del cuerpo, llevan a cabo la fagocitosis. El segundo tipo de mecanismo protector es específico y es el tipo de defensa que puede "reconocer" a invasores extraños, una vez que ya tienen experiencia en la identificación de ciertos antígenos. Durante la infección con *M. leprae* este es reconocido y fagocitado por los macrófagos o es captado por células presentadoras de antígeno (CPA), que los reducen (degradan) para tener acceso a los determinantes antigénicos y luego presentarlos a los linfocitos T. Los macrófagos de los pacientes con LL, pueden ingerir al *M. leprae* pero no pueden

digerirlo porque no tienen suficientes linfocitos T que ayuden a los macrófagos a producir las enzimas necesarias para degradarlo, por lo tanto la micobacteria prolifera dentro de dichas células. Existen dos principales tipos de inmunidad, como son la inmunidad humoral o inmunidad mediada por anticuerpos y la inmunidad mediada por células. En el caso de la inmunidad humoral, moléculas proteicas (anticuerpos) son generados por el cuerpo cuando este es invadido por antígenos. Sin embargo, aunque la inmunidad humoral es muy efectiva para combatir muchas formas de infección, tiene un efecto muy disminuido contra *M. leprae*, en los pacientes con LL, de hecho puede causar mas daño.

A través de la RIC, algunos de los cuerpos invasores y sus Ag estimulan la producción de ciertas células de defensa pequeñas especializadas (linfocitos) las cuales se movilizan para atacar los Ag y al mismo tiempo establecen una reacción inflamatoria severa. La RIC es esencial para la defensa del cuerpo contra enfermedades como la tuberculosis y la lepra; en la cual los linfocitos colectan Ag acumulados en determinado sitios, en el caso de la lepra, estos sitios son principalmente los nervios periféricos y mas particularmente la células de Schwann de los nervios. Como ya se menciona *M. leprae* tiene preferencia por las áreas frías del cuerpo y esta característica esta relacionada con las deformidades que resultan de la invasión de *M. leprae*. La función de los linfocitos es la de secretar mediadores solubles (citocinas), los cuales atraen a los macrófagos al sitio donde se encuentran los Ag y cooperan con ellos para que lleven a cabo el engullimiento y digestión de *M. leprae* (Zanvil, 1991). El humano con LL presenta una progresiva pérdida de la RIC (dependiente de linfocitos T) ante los antígenos del *M. leprae*. Pero esto no evita que el hospedero responda con anticuerpos al mismo microorganismo. Por otra parte la producción de anticuerpos para la gran mayoría de antígenos exógenos resulta de las interacciones célula-célula que involucran la participación de células T cooperadoras. Esta paradoja tuvo una explicación hasta que Mossman estableció en el ratón, la existencia de dos tipos de células T cooperadoras, las cuales interaccionan (comunican) por medio de señales químicas llamadas citocinas (Arce- Paredes, 1994).

## 2.1 Sistemas de señalización biológica.

La señalización en los sistemas biológicos ocurre en múltiples niveles. El término de señalización se puede emplear para describir eventos desde interacciones entre moléculas hasta las interacciones entre especies en un sistema ecológico. Cabe destacar que la habilidad para responder a señales extracelulares es esencial para la sobrevivencia y para el apropiado desarrollo de todos los organismos. En particular en el sistema inmune una adecuada señalización química entre y dentro de las células inmunes permite al hospedero eliminar los agentes extraños (Lyengar, 1999). A continuación se describe la señalización (comunicación) a nivel intracelular, es decir, las llamadas señales de transducción. Una respuesta común a señales extracelulares involucra cambios en el programa y el grado de expresión génica. Las respuestas protectoras o adaptativas de organismos procariontes y eucariontes unicelulares han servido probablemente como precursores evolutivos de una diferenciación más compleja, de programas de organismos multicelulares, muchos de los cuales son controlados por señales extracelulares, como por ejemplo: hormonas, factores de crecimiento y antígenos. El mecanismo básico usado en la expresión de genes que son regulados por señales en organismos unicelulares, es idéntico al que opera en organismos multicelulares. Una evidencia de estas relaciones evolutivas puede establecerse en el grado alto de conservación de secuencias de aminoácidos de los transductores de las señales y los reguladores transcripcionales (factores de transcripción). Estos tipos de moléculas son los componentes básicos de los sistemas de señalización intracelular biológica que conectan la superficie celular con el núcleo, donde controlan la transcripción de genes y consecuentemente el desarrollo del ciclo celular. Cuando existen aberraciones o fallas en la vías de señalización intracelular se puede provocar una perturbación en la morfogénesis, en la diferenciación normal y en la respuesta inmune (Karin, 1992). En el humano con LL se sabe que existen fallas en la transducción de señales extracelulares (antígenos) por parte de los linfocitos T, dichas fallas consisten en la expresión disminuida de la cadena  $\zeta$  del receptor de células T (TCR) y del factor de

transcripción NF $\kappa$ B, lo cual contribuye en parte a que el linfocito T no responda a los antígenos del *M. leprae* (Zea, 1998). Además se ha investigado la influencia de los lípidos de la pared celular de *M. leprae* sobre las funciones de los linfocitos in vivo (por medio de la hipersensibilidad retardada e in vitro (proliferación celular) y se observó que inducen inmunosupresión sin causar cambios en las membranas de las células T (Vohra, 1997).

## 2.2 Linfocitos T

Los linfocitos son células que cumplen varias funciones, maduran en el timo y son células efectoras de la inmunidad retardada y de la citotoxicidad linfocitaria, algunas de ellas regulan y coordinan los distintos tipos de respuesta inmunitaria. Los linfocitos B se encargan de la producción de los anticuerpos. Las células T poseen moléculas de superficie celular comunes los CD2, CD3 y CD7. La presencia de antígenos CD4 y CD8, mutuamente excluyentes, permiten definir dos subpoblaciones:

- a) los CD4, inductores/cooperadores (*helper*), es decir, los Th1 y los Th2
- b) los CD8, supresores/citotóxicos (García Tamayo, 1997).

Los linfocitos T tienen un papel clave en la regulación de la respuesta inmune celular específica, se activan bajo una combinación de señales intracelulares consecuentes al estímulo antigénico, este reconocimiento induce su proliferación (expansión clonal) que genera suficientes células T específicas para ese antígeno y su diferenciación en células efectoras de la RIC (Abbas, 1997).

En los últimos trece años varios estudios han sugerido que en pacientes con LL si existen células T reactivas hacia *M leprae*, pero que el número podría ser muy bajo como para ser detectable en ensayos de inmunidad mediada por células, por lo que se ha sugerido que el enriquecimiento de células T preexistentes reactivas a *M. leprae*, podría contribuir a la restauración de respuesta de células T a *M. leprae*. El enriquecimiento consistiría en estimular a las células con Ag recombinantes de 65kDa, 36kDa, 28 kDa, y 12 kDa de la micobacteria (Mustafa, 1996). Existe un gran debate en cuanto a la naturaleza del estado anérgico de las

células T y su inducción en los humanos con lepra. Existen varios modelos que tratan de explicarlo. Uno de ellos se enfoca a una dicotomía presente en los linfocitos T *helper*, es decir a los Th1 y Th2, y a su perfil de citocinas protectoras o supresoras, en respuesta a la activación ocasionada por los antígenos micobacterianos. Otro modelo postula que un subtipo de célula T supresora es activada por epítopes supresores de *M. Leprae*, que a la vez específicamente inactivan subtipos de células T protectoras y reactivas a *M. Leprae* (Gillis, 1995).

Por otra parte la activación de las células T es un proceso complejo e indirecto que se inicia por la interacción entre el receptor específico para el antígeno, el TCR expresado sobre su superficie y un antígeno asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en combinación con señales accesorias (co-estimulación), ambos transmitidos por las CPA; lo que origina la producción e interacción de la IL-2 con su receptor dando lugar al crecimiento y activación autócrina de células T (Abbas, 1997). Esta interacción puede mimetizarse *in vitro*, utilizando mitógenos específicos para células T como la concanavalina (ConA) y la fitohemaglutinina (PHA) o por anticuerpos monoclonales dirigidos contra algunas moléculas en la superficie de las células T como CD2 y CD3. Lo anterior induce al linfocito T a que entre a la fase G1 del ciclo celular permitiéndole responder a señales adicionales para completar el ciclo celular (Cantrell, 1989). Es de destacar que los antígenos no peptídicos pueden ser presentados a células T por moléculas CD1b humanas, las cuales no son codificadas por el MHC. Se sabe que las células T activadas por lipoarabinomana (LAM) producen IFN- $\gamma$  y son citolíticas. Se ha sugerido que el fenotipo del complejo mayor de histocompatibilidad de células presentadoras de Ag podría modular la actividad de células Th1 versus Th2 contra *M. leprae* en la lepra y en individuos sanos (Mehra, 1997).

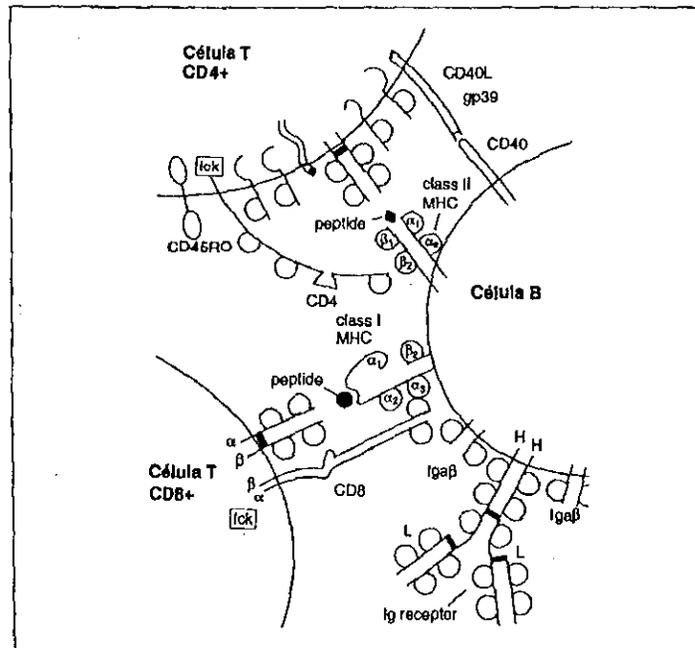


Fig. 4 Presentación antigénica (Arnaiz-Villena, 1995).

Las señales de transducción en el linfocito T inician una vez que se une el Ag al TCR se lleva a cabo la fosforilación, de la cadena  $\zeta$  del receptor del antígeno y del complejo CD3 asociado a este receptor, la cual es mediada por proteínas tirosina cinasas (PTK) (Janeway and Travers, 1997). Esto permite la unión y posterior activación de una tirosina cinasa citosólica llamada proteína-70 (ZAP-70) asociada a la cadena zeta del TCR. La activación de ZAP-70 conduce a 3 vías de señalización dos de las vías de comunicación se inician por la activación de la enzima fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC), que cataliza el rompimiento del fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol 4-5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) generando 2 productos, el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG) (Janeway and Travers, 1997). Por un lado, el inositol trifosfato estimula la liberación del calcio almacenado en compartimientos intracelulares y con esto la posterior activación de un canal de Ca<sup>2+</sup> independiente de voltaje en la membrana plasmática. Esto produce un rápido incremento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>, que es mantenido de manera oscilatoria, para la adecuada activación de la célula (Zweifach, 1995). La elevación de la concentración del Ca<sup>2+</sup> citoplásmico promueve, por una parte, la activación de una fosfatasa denominada calcineurina que desfosforila a la proteína citoplasmático NFAT (factor nuclear de células T activadas), permitiendo su entrada al núcleo donde en combinación con un NFAT nuclear, participa como factor de transcripción de algunos genes. Por otro lado, el DAG actúa junto con el Ca<sup>2+</sup> para activar ciertas isoformas de la proteína cinasa C (PKC), enzima que cataliza la fosforilación de residuos de serina y treonina y activa distintos sustratos, uno de los cuales es el factor de transcripción NF $\kappa$ B ( Janeway, 1997; Abbas, 1997).

La tercera vía de comunicación es iniciada por la activación de cinasa ZAP-70 es la activación de la GTPasa Ras que inicia una cascada de cinasas que culmina con la activación tanto del gen Fos como del Jun, cuyos productos proteicos juntos conforman el factor de transcripción AP-1. Los 3 factores de transcripción inducidos, NF $\kappa$ B, NFAT y AP-1, entre otros, regulan la transcripción de genes específicos y comunes que conducen a la proliferación y diferenciación de los

linfocitos T, a través de la expresión de genes, tales como los que codifican para la mayoría de las interleucinas (Janeway, 1997; Abbas, 1997).

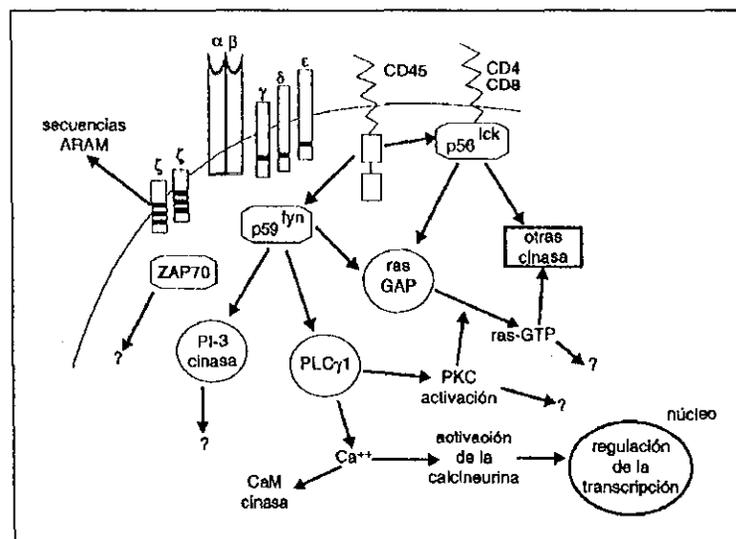


Fig. 4 Transducción de la señal de activación en el linfocito T (Arnaiz-Villena, 1995).

Una de las interleucinas sintetizadas durante la activación de los linfocitos T es la IL-2, el principal factor de crecimiento de células T que juega un papel importante en la mitogénesis y diferenciación de estas células. Así, la producción de IL-2 determina si una célula proliferará y se convertirá en una célula con funciones efectoras (Janeway, 1997). Se ha observado que los linfocitos T con LL presentan in vitro una respuesta proliferativa disminuida ante estímulo mitogénico de PHA (Fafutis, 1991), lo que se relaciona con la baja cantidad de linfocitos en dichos pacientes. También se ha determinado que los linfocitos T en cultivo de pacientes con LL recuperan la respuesta proliferativa si al medio de cultivo se le adiona el ionoforo A12327 más el PMA, un análogo del DAG, importante en la transducción de la señal extracelular, se decir, el antígeno (Alfaro, 1997). Para entender el mecanismo de la no respuesta hacia los Ag de *M. leprae* en los pacientes con LL se ha evaluado también la función (efecto) de Ag sonicados del microorganismo, en la regulación de la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1, CD28, moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), LFA-1 $\alpha$ , LFA-1 $\beta$  y Mac-1 sobre los linfocitos de pacientes con lepra y sujetos sanos. Se observó que la expresión de B7-1 y CD28 estuvo significativamente disminuida pero los niveles de ICAM-1 y LFA-1 $\alpha$  estuvieron incrementados en pacientes LL sin tratamiento. Fue sorprendente que los linfocitos de sujetos sanos cultivados con Ag de *M. leprae* tuvieron una baja regulación en la expresión de las moléculas B7 y CD28, pero una regulación alta del ICAM-1 y del LFA-1  $\alpha$ . Además la proliferación inducida por Ag de *M. leprae* fue inhibida sólo por el anticuerpo anti-B7. La regulación baja de B7-1 y CD28 en los pacientes LL podría ser responsable de una señalización defectuosa en las células T por las vías B7-1/CD28 causada por Ag de *M. leprae*. Esto podría originar una inactivación clonal de células T reactivas a *M. leprae*, consecuentemente el bacilo crece sin restricción en los macrófagos (Vohra, 1998). Esto podría originar una inactivación clonal de células T reactivas a *M. leprae*, consecuentemente el bacilo crece sin restricción en los macrófagos. Por otro lado Fafutis y colaboradores encontraron también que la expresión de CD28 estaba disminuida en los linfocitos de los pacientes con LL comparados con la de los controles (Fafutis, 1998).

### 2.3 Citocinas y lepra.

La elaboración de una respuesta inmune a infección o a daño a tejido, esta dirigida por diferentes tipos de células y su activación se encuentra bajo control espacial y temporal, lo que significa que se requieren mecanismos eficientes de autorregulación de la activación de programas y las actividades de comunicación entre las células (Mak y Simard, 1998).

Las citocinas son proteínas producidas por distintos tipos celulares del sistema inmune es respuesta a una activación celular. Su función fundamental es la regulación de la respuesta inmune y de la respuesta inflamatoria. Cada citocina induce múltiples actividades en su célula blanco *in vivo* y muchas citocinas parecen tener funciones redundantes. Se agrupan bajo este nombre genérico las proteínas denominadas linfocinas, monocinas, interleucinas e interferones (Arnaiz-Villena, 1995).

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (<80kDa). Los niveles basales de la expresión de citocinas son típicamente muy bajos, además de ser transitorios y estar bajo regulación en respuesta a los estímulos antigénicos. Aunque las acciones de las citocinas son locales, ejercen efectos autócrinos y parácrinos, tienen efectos extremadamente potentes y son activas en concentraciones picomolares con una afinidad alta de sus receptores específicos. La acción particular en su célula blanco es altamente dependiente del medio, de la historia de la célula blanco, de la concentración de la citocina y otros contextos en los cuales ellas operan. En suma las diferentes porciones de las moléculas de citocinas pueden ser responsables de efectos biológicos específicos. Las citocinas pueden ser agrupadas de acuerdo a sus principales funciones biológicas, aun a pesar de sus efectos pleiotrópicos y traslapados (Simard, 1998).

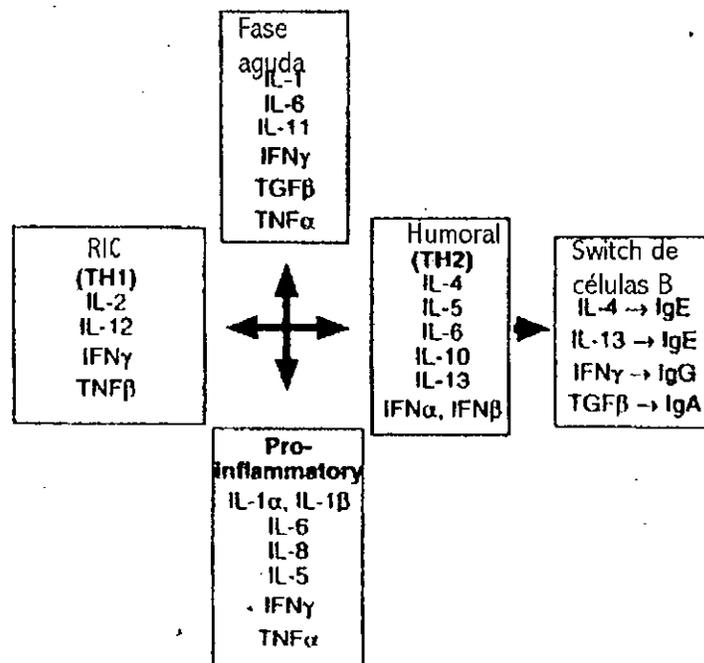


Fig. 5 Clasificación de las citocinas (Simard, 1998).

La IL-2 humana es una glicoproteína de 15.5 kDa con una secuencia primaria de 133 aminoácidos y un solo puente disulfuro intracadena, es codificada por un gene que se encuentra en el cromosoma 4q26. La proteína de la IL-2 esta organizada en cinco dominios alfa-helice hidrofóbicos y dos cadenas cortas beta y la estructura terciaria permanece bajo investigación. La estructura secundaria y terciaria de la IL-2 parece crucial para su función y depende de los aminoácidos Leu17, Trp121 y el puente disulfuro entre la Cys58 y la Cys105 (Smith, 1998). La IL-2 es predominantemente secretada por células T cooperadoras (CD4<sup>+</sup>) activadas. Sin embargo la expresión de la IL-2 también ha sido reportada en eosinófilos, en células B esplenicas murinas estimuladas, en líneas de células B, en linfomas de células B y células B transformadas por virus. La expresión de la IL-2 en linfocitos puede ser en parte regulada por las isoformas del CD45. La activación óptima del gene de la IL-2 en linfocitos requiere señales del receptor del Ag y de señales cosestimulatorias las cuales inducen la activación del factor de transcripción CREB y el incremento de la estabilidad del RNAm de la IL-2. La IL-2 promueve la proliferación y la diferenciación respectiva de funciones efectoras en linfocitos T y B. La coestimulación de los linfocitos T (CD4<sup>+</sup>) por medio de la IL-2, es importante para su diferenciación de la función secretoria de IL-4 e IFN- $\gamma$ . La producción subóptima de IL-2 durante la activación puede ser responsable de la no respuesta o anergia de linfocitos T. La regulación de la producción de IL-2 durante la inducción de la anergia puede reflejar un bloqueo translacional. La inhibición de la síntesis de IL-2 durante la proliferación de las células T puede también reflejar una regulación negativa a través de la señalización de las CTLA-4. Además de los efectos sobre las células T y B, la IL-2 facilita la diferenciación de respuestas citóticas de las células *Killers* y de monocitos. Se ha sugerido que la deficiencia de IL-2 enciende las vias apópticas en células T activadas y además origina una acumulación de células T "sin experiencia" (Simard, 1998). En 1987 Islas et al., demostraron que los linfocitos in vitro de pacientes con LL presentaban una deficiencia en la síntesis de IL-2 y sin embargo encontraron que su receptor estaba intacto. Luego se observó que la adición de IL-2 a los medios de cultivo de dichos linfocitos, hizo que se reestableciera la respuesta proliferativa

a Ag de *M. leprae* por lo que la RIC disminuida en los pacientes LL podría ser el resultado de una producción inadecuada de la IL-2 (Islas, 1987; Kim,1991). Además se ha demostrado que la inyección de IL-2 en lesiones de pacientes con LL incrementa la RIC, confiriendo protección a *M. leprae* y otras micobacterias (Gillis, 1995).

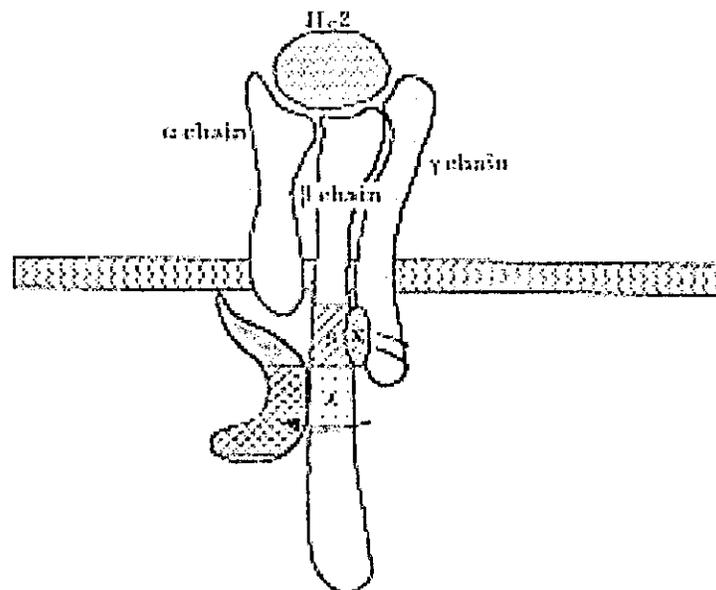


Fig. 6 IL-2 y receptor de IL-2. (Simard, 1998).

El RIL-2 contiene tres cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La cadena  $\beta$  y  $\gamma$  se expresan constitutivamente en muchos linfocitos maduros, mientras que la cadena  $\alpha$  se expresa solo bajo activación. Las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  forman un receptor de baja afinidad y la adición de la cadena  $\alpha$  resulta en un receptor de alta afinidad. La unión de IL-2 a su receptor resulta en una compleja señalización interna y en la inducción de varios programas de activación celular. Tanto la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del

RIL-2 son requeridas para la inmunoregulación de linfocitos T y B. Durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo y los linfocitos B en la médula ósea, se expresa la cadena  $\alpha$ , en la ausencia de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ . La cadena  $\beta$  del RIL-2 es parte del RIL-15 y tanto el receptor de la IL-2 y de la IL-15 ejercen efectos biológicos traslapados, como es la rápida inducción de cinasas STAT y Jak. La cadena  $\gamma$  del RIL-2 es un importante componente de receptores de citocinas como la IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 y las mutaciones en dicha cadena resultan en una inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (XSCID) en humanos (Mak and Simard, 1998).

La IL-7 es producida mas en lesiones de LT que de LL; la IL-7 y el IFN- $\gamma$  son producidos por monocitos y queratinocitos estimulados por Ag lo que significa que la IL-7 producida en el sitio de la enfermedad, contribuye a la respuesta inmune celular mediada a patógenos que afectan humanos (Modlin, 1995).

La IL-10 derivada de monocitos infectados con *M. leprae* está asociada con la ausencia de células Th1 y además *in vitro* induce la supresión de célula T en los pacientes con LL, por lo que los monocitos podrían contribuir al desarrollo de la anergia de las células T por la liberación de factores que afectan citocinas regulatorias y la diferenciación de subtipos de células T en la LL (Nath, 1995).

La secreción de IL-12 por CPA es crítica para el desarrollo de la respuesta inmune tipo Th1 protectora a infecciones micobacterianas, se ha observado que la IL2 y la IL-12 sinergizan para estimular la producción de IFN $\gamma$  y la proliferación de células Th1 reactivas a *M. leprae* (Ottenhoff, 1997). También se ha investigado como es que la IL-12 regula la respuesta de células Th1 en las enfermedades infecciosas humanas, particularmente en los diferentes tipos de lepra. Los pacientes con lepra tuberculoide en respuesta a *M leprae*, producen citocinas tipo Th1 como la IL-2 e IFN- $\gamma$ , en lesiones mientras que los pacientes LL manifiestan respuestas por parte de las células T a *M. leprae* con producción de citocinas tipo Th2 como la IL-4 y la IL-10 en lesiones, mientras que la IL-12 se ha encontrada 10 veces mas elevada en lesiones de LT que de LL (Yogi, 1994). Otra citocina que está presente en lesiones de individuos LT y no en los LL es la IL-15, la cual incrementa la respuesta local de células T a patógenos intracelulares que afectan

El daño tisular y la enfermedad consecuencia de una infección pueden ser causados por la respuesta inmunológica y no por la acción directa del microorganismo.

#### a) Inmunidad natural

El principal mecanismo de defensa frente a bacterias intracelulares es la fagocitosis. Sin embargo, hay microorganismos extremadamente resistentes a su degradación por fagocitos; y por lo tanto los mecanismos inmunes innatos no resultan demasiado efectivos para su erradicación. La resistencia a la fagocitosis de algunas bacterias, causa infecciones crónicas de muchos años de duración, con aparentes curaciones y recaídas y son difíciles de erradicar.

Las bacterias intracelulares también activan a las células *Killers*, directamente o estimulando la secreción de interleucina-12 (IL-12) por parte de los macrófagos. La IL-12 es un potente estimulador de la actividad de células *Killers*. Dichas células activadas producen IFN- $\gamma$  que activa a macrófagos y promueve la muerte de las bacterias fagocitadas.

#### b) Inmunidad adquirida

La principal respuesta inmunológica frente a bacterias intracelulares es la mediada por células. La inmunidad celular abarca dos tipos de reacciones: 1) muerte de los microbios fagocitados como resultado de la activación de macrófagos por citocinas producidas por linfocitos T, fundamentalmente IFN- $\gamma$ , y 2) lisis de las células infectadas por la acción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs). Se cree que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> responden a antígenos que se han procesado en los macrófagos y presentados en el contexto MHC de Clase II. Así el PPD (*purified protein derivative*) de *M. tuberculosis* es un potente inductor de linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> del subtipo Th1. Estas células secretan IFN- $\gamma$ , que activa la producción de anticuerpos IgG2, que a su vez activa el complemento y opsoniza a las bacterias para su fagocitosis. Las células Th1, producen también TNF que induce la inflamación local. Si las bacterias sobreviven en las células y liberan sus antígenos en el citoplasma, estos antígenos van a ser presentados por las moléculas MHC de clase I y van a estimular a CTLs CD8<sup>+</sup>, que producen IFN- $\gamma$  y van a ser capaces de lisis a las células infectadas. Por lo tanto las dos células

efectoras principales: CTLs y macrófagos, actúan de manera concertada y complementándose una a la otra.

### c) Mecanismos de escape

El principal mecanismo de escape de las bacterias intracelulares es su resistencia a ser eliminada por los fagocitos. Las micobacterias, por ejemplo, inhiben la actividad de los fagolisosomas; *M. Leprae*, a través de un glicolípido fenólico de membrana, rapta a los metabolitos activos del oxígeno

(Arnaiz-Villena, 1995).

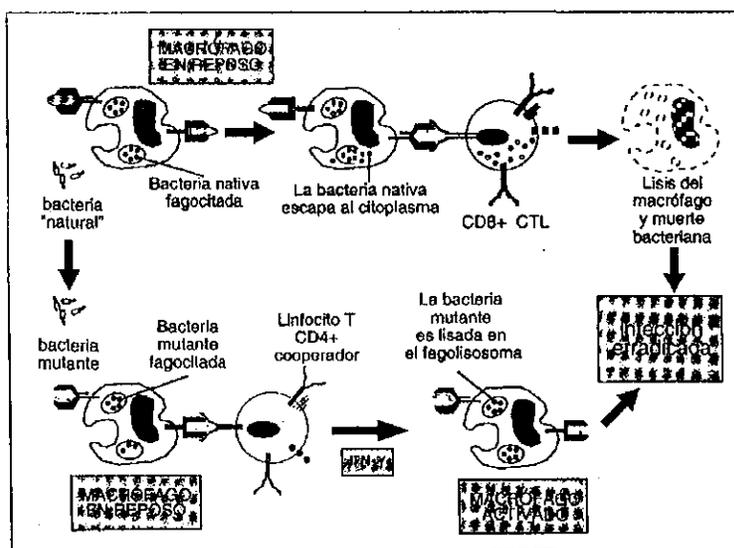


Fig. 7 Cooperación entre macrófagos activados y CTL en la eliminación de bacterias intracelulares (Arnaiz-Villena, 1995)

## 2.5 Regulación de la respuesta inmune: el concepto de Th1 / Th2.

El sistema inmune tiene diferentes maneras de reaccionar a un antígeno (Ag). La elección de una apropiada respuesta esta determinada por la manera en que se presenta el Ag, la cantidad de Ag, la localización de la toma del Ag, el tipo de célula presentadora de Ag, la predisposición genética del individuo y la presencia de ciertas citocinas liberadas por la presentación del Ag o por otras células inflamatorias. Si una respuesta inmune no es apropiada puede originar síntomas clínicos o insuficiente eliminación de un agente infeccioso. Este ejemplo esta bien ilustrado en la LL (insuficiencia a pesar de que existe una respuesta inmune humoral al agente intracelular) o en la LT (completa eliminación de *M. leprae*). Un paso decisivo para la elección del tipo de respuesta inmune es la estimulación de diferentes subpoblaciones de células T. Las células CD4 y CD8 pueden además ser subdivididas por una producción distinta de citocinas. Las células llamadas Th1 predominantemente producen citocinas que estimulan la respuesta inmune celular (IFN $\gamma$ , IL-12, IL-2). En contraste las células Th2 predominantemente producen IL-4 e IL-5. Estas citocinas estimulan las reacciones alérgicas mediadas por IgE y la inflamación. Aunque con frecuencia la distinción entre Th1 y Th2 no es absoluta, por que se puede observar con frecuencia un traslape, esta clasificación es útil para el mejor entendimiento de las reacciones inmunes en varias enfermedades. Sin embargo desde que las citocinas relacionadas con Th1 y Th2 se les atribuyo un antagonismo, las estrategias terapéuticas están en desarrollo como por ejemplo: las respuestas de Th2 en enfermedades dominadas por TH1 y viceversa (Pichler, 1997).

Las células T CD4 y CD8 contribuyen a la actividad citotóxica inducida por *M. leprae*, observandose diferencias en pacientes paucibacilares (PB) y multibacilares (MB). La actividad citotóxica mediada por CD8 es mas alta que la mediada por CD4 en los pacientes PB, mientras que en pacientes MB la citotoxicidad mediada por los CD4 es predominante. La generación de linfocitos T citotóxicos CD4 Y CD8 puede ser modulada diferencialmente por la IL-4, IL-6, IFN $\gamma$  o IL-2. Aunque los pacientes MB desarrollan respuestas disminuidas de CTL,

dichas citocinas son capaces de generar tanto CTL CD4 Y CD8 de pacientes MB. En pacientes PB la IL-6 mas el IFN $\gamma$  ocasionan una estimulación alta sobre células efectoras CD8. Asi se podría asignar una función a la IL6 y a la IL-2 o el IFN $\gamma$  en la diferenciación de CTL efectoras específicas a *M. Leprae* (Sasiain, 1997).

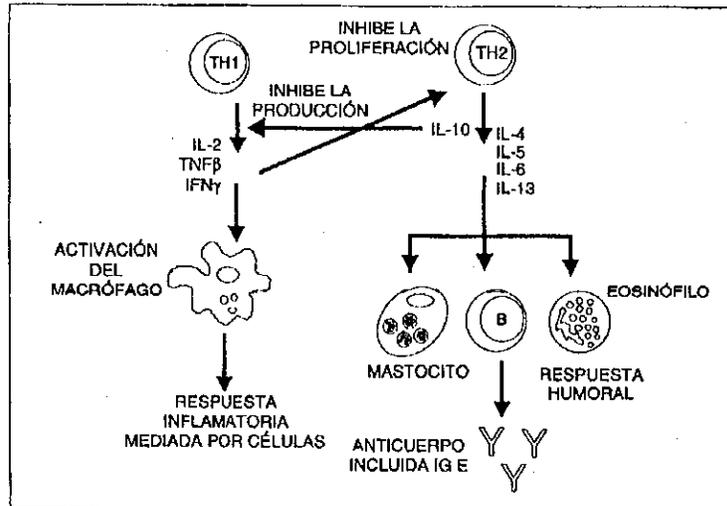


Fig. 8 Supresion de la respuesta Th1 por linfocitos Th2 y viceversa (Arnaiz-Villena, 1995).

# **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La lepra es un problema de salud pública a nivel mundial. La Jurisdicción IV de la Secretaría de salud La Barca, esta ubicada en el cuarto lugar de prevalencia de las 13 jurisdicciones de Jalisco. Los pacientes con lepra lepromatosa no producen cantidades suficientes de IL-2, por lo tanto los linfocitos T no proliferan adecuadamente, tanto *in vivo* como *in vitro*. Las personas que viven en contacto con los pacientes presentan más riesgo de desarrollar la enfermedad. Es muy probable que el *M. leprae* se adquiriera en las primeras décadas de la vida, pero su período de incubación tan largo y lo discreto de los síntomas de la lepra al inicio, ocasiona que se detecte con mayor frecuencia en los pacientes alrededor de los 30 años.

Por lo anterior, en el presente trabajo se valoró la respuesta inmune celular de sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa, mediante la determinación de la respuesta proliferativa de linfocitos T a PHA y la producción de IL-2 *in vitro*. La detección de la baja producción de IL-2 de linfocitos *in vitro* de personas expuestas al agente infeccioso, permitirá realizar un monitoreo y seguimiento médico para controlar una posible infección temprana con *M. leprae*.

# **OBJETIVOS**

## **IV. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

1.- Determinar la respuesta inmune celular de sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa en edades entre 4 y 22 años, de la Jurisdicción IV de la Secretaria de salud, La Barca, Jalisco.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Valorar la respuesta proliferativa de los linfocitos T ante mitógeno en cultivo de sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa, de la Jurisdicción IV de la Secretaria de salud, La Barca, Jalisco.

2. Cuantificar los niveles de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos, de sujetos contacto con pacientes con lepra lepromatosa, de la Jurisdicción IV de la Secretaria de salud, La Barca, Jalisco.

# **HIPOTESIS**

## V. HIPOTESIS

El nivel de la IL-2 esta disminuido en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa.

# **MATERIAL Y METODOS**

## VI. MATERIAL Y METODOS.

### 1. Descripción del estudio

#### 1.1 Tipo de estudio

Comparativo, experimental y transversal.

#### 1.2 Universo de trabajo

El presente estudio se realizó en los siguientes municipios: Jamay, Ocotlán y La Barca, adscritos a la Jurisdicción IV de la Secretaría de Salud, La Barca, Jal.

#### 1.3 Criterios de inclusión

En el presente estudio se incluyeron a los siguientes sujetos:

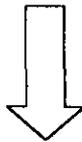
- a.- Niños y jóvenes sanos según diagnóstico médico que no vivieron en contacto con los pacientes con lepra lepromatosa, apareados en edad y sexo (mas menos 5 años) con los sujetos de estudio (sujetos controles).
- b.- Niños y jóvenes de entre 4 y 22 años de edad, de ambos sexos, sanos (según el diagnóstico del médico) que convivieron con un paciente con lepra lepromatosa (sujetos contactos).
- c.- Niños y jóvenes que tuvieron el consentimiento por escrito de sus padres para participar en el estudio (ver formato anexo formato).

#### 1.4 Criterios de exclusión

Fueron excluidos del presente estudio los niños y jóvenes menores de 4 y mayores de 22 años, que vivieron en contacto con los paciente con LL y las personas que cursaron con una u otras enfermedades, según diagnóstico médico, en especial las personas portadoras del virus VIH. Además de los sujetos en contacto con pacientes con LL que no tuvieron completo su expediente médico con el diagnóstico de LL.

## 2. Diseño metodológico.

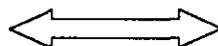
Realización de la encuesta socioeconómica.



Obtención de 10 ml de sangre periférica de 10 sujetos en contacto con pacientes con LL y de 10 sujetos controles de la misma localidad.



Separación de los linfocitos por gradientes de densidad.



Cultivo de linfocitos durante 72 hrs

Cultivo de linfocitos durante 72 hrs



Cuantificación de la  
Proliferación celular



Cuantificación de la  
concentración de la IL-2

### **3. Descripción del método**

#### **3.1 Obtención de muestras de sangre periférica**

Se tomaron 10 ml de muestra sanguínea (punción venosa) en tubos que contenían heparina como anticoagulante de cada uno de los sujetos de estudio, para lo cual se acudió a sus domicilios particulares. Luego las muestras se trasladaron en hielera a 15 °C, al laboratorio donde al día siguiente se analizaron.

#### **3.2 Obtención de células mononucleares**

Para la separación de las células mononucleares, la sangre fué diluida v/v con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma). Luego se realizó un gradiente de densidad colocando v/v la sangre diluida sobre Lymphoprep (Nycomed) en un tubo. Luego el tubo se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente. Las células mononucleares se obtuvieron con una pipeta Pasteur de la interfase de la mezcla centrifugada. Las células se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma), centrifugando 10 minutos a 15000 rpm. Las células lavadas se resuspendieron en un ml del mismo medio, suplementado con 5 % de suero fetal de ternera inactivado (Gibco), la viabilidad y el número de las células se determinó utilizando el colorante de exclusión, azul de tripano.

#### **3.3 Cultivo de células para la cuantificación de la proliferación celular**

Se sembraron 200,000 células / pozo (0.1 ml) en una placa de cultivo de 96 pozos (Corning) y se les adicionó, por triplicado ya sea RPMI-1640 (0.1 ml) suplementado con suero fetal bovino (células no estimuladas) o bien el mitógeno policlonal PHA (Sigma) (0.1 ml) a una concentración final de 5 µg/ml (células estimuladas). Se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas de incubación, a las células se les dió un pulso de 1 µCi/pozo de timidina tritiada (actividad específica de 6.7 Ci/µmol; New England Nuclear, Boston, MA. U.S.A) y 24 horas después se cosecharon.

La proliferación celular se cuantificó por la medición de la incorporación de la timidina tritiada en un contador de emisiones beta (Beckman). Los resultados se obtuvieron en cuentas por minuto (cpm) y se expresaron como índices de estimulación (IE) (Islas, 1987).

$$IE = \text{cpm de células no estimuladas} / \text{cpm en células estimuladas} .$$

### **3.4 Cultivo de células para la cuantificación de la Interleucina-2**

Después de 48 horas de incubación a 37 °C, de otro grupo de células en cultivo en las mismas condiciones anteriormente descritas, se colectó el líquido sobrenadante para la medición de la IL-2 secretada al medio extracelular por los linfocitos en cultivo. La cuantificación se realizó por medio de la técnica de ensayo de inmunoabsorción enzimático, ELISA (Kit para la cuantificación de IL-2 humana, Lakeside). Los sobrenadantes se diluyeron v/v con el buffer proporcionado por el fabricante y luego se colocaron 20  $\mu$ l a la mezcla de los inmunorreactivos. A la placa para ELISA ya cubierta en el fondo con estreptavidina, se le colocó simultáneamente el complejo molecular formado por la IL-2, (ya sea 20  $\mu$ l del standard o 20  $\mu$ l de la muestra), el Ac de captura marcado con biotina y el anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa. Se dejó incubando 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación constante. Se removió la solución y se lavó tres veces. Se adicionó el substrato tetrametilbenzidina para la peroxidasa que al reaccionar permitió el desarrollo de color. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente las muestras se leyeron en un espectrofotómetro EIGEN EL301 a una longitud de onda de 405 nm. Lo anterior se realizó según indicaciones del fabricante del Kit. La cantidad de la citocina en las muestras se determinó por medio del análisis de regresión lineal utilizando los datos de Densidad óptica (DO) y las concentraciones conocidas de IL-2 estándar (0, 34, 88, 183, 350 y 673 pg/ml).

### **3.5 Análisis estadístico**

Los resultados de los IE y de las concentraciones de IL-2 (pg/ml) en los sobrenadantes de los cultivos de los controles y de los contactos del presente estudio se compararon utilizando la prueba del rango con signo de Wilcoxon para muestras apareadas; con la finalidad de establecer la significancia estadística entre las poblaciones analizadas. Para capturar los datos se utilizó un ordenador Pentium y el programa estadístico de Microsoft Excel.

**NOTA:** La expresión de los resultados se refiere a pares de datos, es decir, a los resultados de los controles comparados con los resultados de los contactos con pacientes lepromatosos.

## VII. RESULTADOS

En el cuadro 1 se resumen los datos de lecturas de DO por duplicado, luego los promedios de estas y las concentraciones de IL-2 (pg/ml) en los sobrenadantes del cultivo de linfocitos y por último se indican los IE.

**Respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos estimulados con PHA de controles y sujetos en contacto con pacientes lepromatosos.** Se valoró la respuesta proliferativa de los linfocitos T *in vitro* a PHA en 10 pares de controles con sus respectivos sujetos en contacto con pacientes LL, de edades entre 4 y 22 años. Al comparar los resultados por medio de la prueba del rango con signo de Wilcoxon para muestras apareadas, se encontró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los IE de los dos grupos de estudio. Aunque en seis controles el IE fué ligeramente mayor con respecto al IE de los sujetos contactos como se presenta en la Fig. 10. En la Fig.11 se presentan las diferencias entre el IE de los controles y los sujetos contactos. Se observó que las diferencias entre los IE de los linfocitos en cultivo son muy pequeñas, lo que significa que los IE entre controles y sujetos contacto fueron muy similares.

**Producción *in vitro* de IL-2 en cultivo de linfocitos de controles y sujetos en contacto con pacientes lepromatosos.** De los 10 pares formados por los controles y los sujetos contactos en tres casos se observó que los controles presentan una concentración (pg/ml) de IL-2 mas alta con respecto a la encontrada en los sujetos contactos. De nuevo aplicando la prueba del rango con signo de Wilcoxon para muestras apareadas, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos, como se presenta en la Fig 12. En la Fig. 13 se presentan las diferencias entre la concentración de IL-2 (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo, de linfocitos de los controles y los sujetos contactos. Se observó que existe una diferencia muy marcada en la concentración de la IL-2 en los sobrenadantes de los linfocitos en cultivo, de 3 de los controles con respecto a los contactos.

Cuadro 1. Promedios de la absorbancia expresadas en unidades de DO (405 nm), niveles de IL-2 (pg/ml) y los IE de linfocitos en cultivo de controles y sujetos en contacto con pacientes con LL.

		Controles		Contactos	
		Medio	PHA	Medio	PHA
Par 1		femenino 14 años		femenino 13 años	
	Promedios DO	0.301	0.601	0.212	0.229
	IL-2 pg/ml	44.401	173.236	6.18	13.481
	IE		3.6		1.9
Par 2		masculino 17 años		masculino 16 años	
	Promedios DO	0.201	0.231	0.197	0.230
	IL-2 pg/ml	1.456	14.125	-0.262	13.91
	IE		2.2		2.4
Par 3		masculino 18 años		masculino 13 años	
	Promedios DO	0.234	0.589	0.212	0.203
	IL-2 pg/ml	14.77	168.297	6.18	2.315
	IE		1.2		1.5
Par 4		femenino 18 años		femenino 13 años	
	Promedios DO	0.193	0.192	0.193	0.297
	IL-2 pg/ml	-2.194	-22.693	-2.194	42.898
	IE		1		1.2
Par 5		femenino 5 años		femenino 6 años	
	Promedios DO	0.217	0.825	0.204	1.093
	IL-2 pg/ml	8.113	269.217	2.745	384.524
	IE		11		16
Par 6		femenino 14 años		femenino 13 años	
	Promedios DO	0.217	1.960	0.211	0.284
	IL-2 pg/ml	8.327	756.641	55.751	13.481
	IE		9.5		2.4
Par 7		masculino 9 años		masculino 10 años	
	Promedios DO	0.300	0.195	0.193	0.204
	IL-2 pg/ml	43.757	-1.385	-2.194	2.53
	IE		2.2		1.8
Par 8		masculino 20 años		masculino 20 años	
	Promedios DO	0.196	0.221	0.197	0.231
	IL-2 pg/ml	-0.906	10.045	-0.262	14.554
	IE		2.3		1
Par 9		femenino 18 años		femenino 13 años	
	Promedios DO	0.237	0.261	0.216	0.234
	IL-2 pg/ml	16.702	27.223	7.683	15.413
	IE		1.9		1.6
Par 10		femenino 5 años		femenino 6 años	
	Promedios DO	0.195	0.215	0.204	1.093
	IL-2 pg/ml	0.195	7.254	-3.053	2.959
	IE		1.4		1

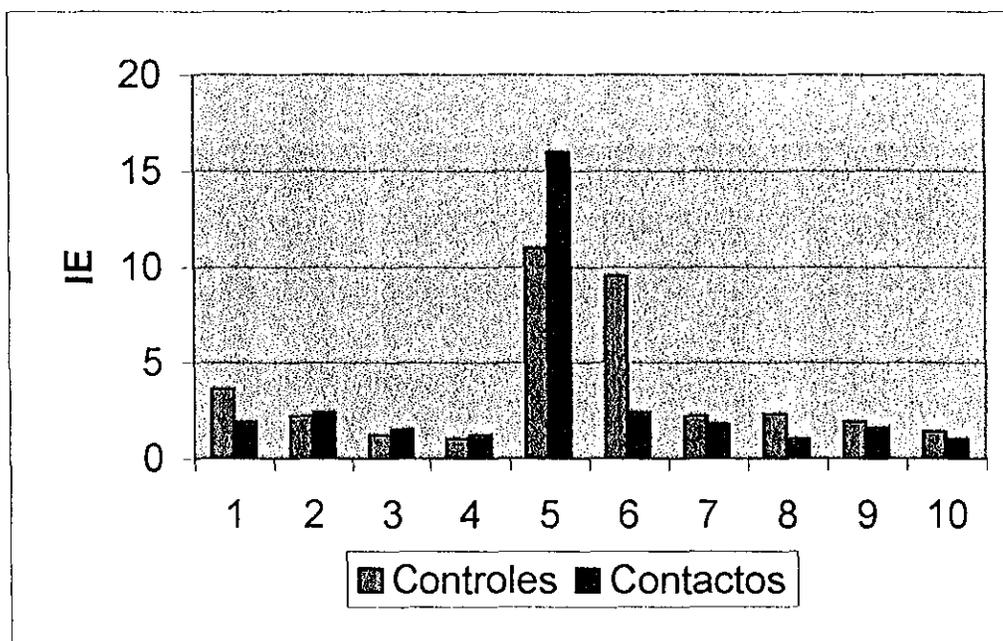


Fig. 9 Indices de estimación *in vitro* de los linfocitos T de controles y sujetos en contacto con pacientes con lepra lepromatosa.

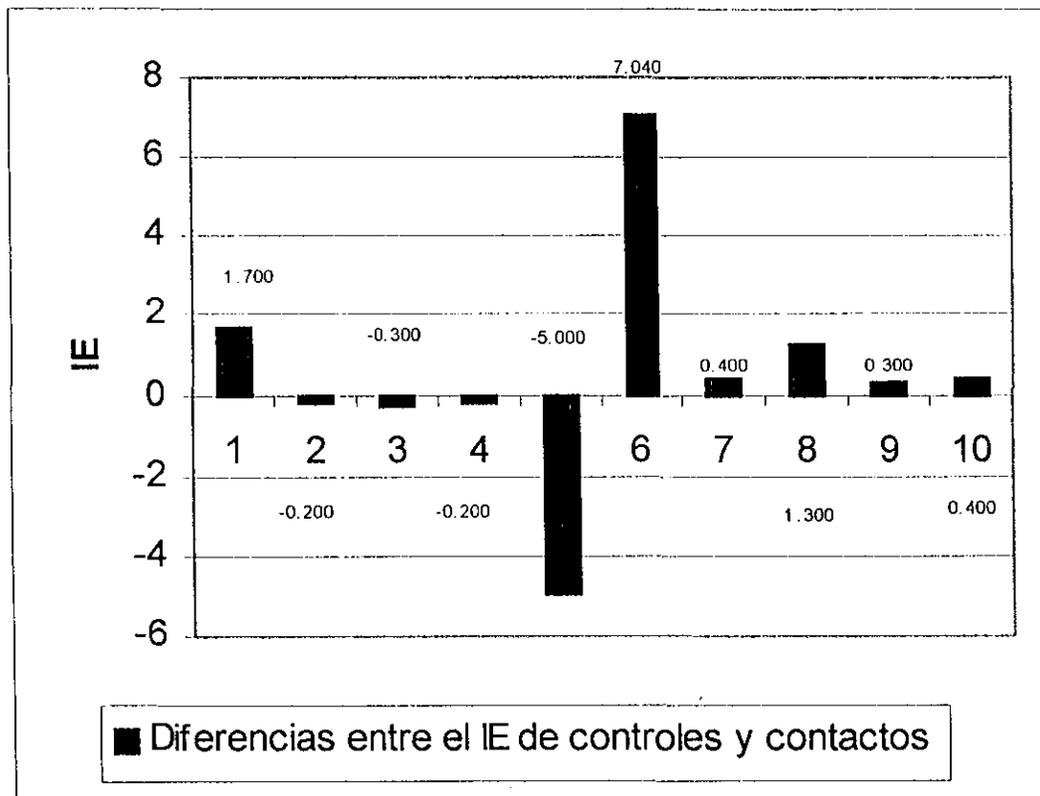


Fig. 10 Diferencias en el índice de estimulación *in vitro* de linfocitos T de controles y sujetos en contacto con pacientes con LL.

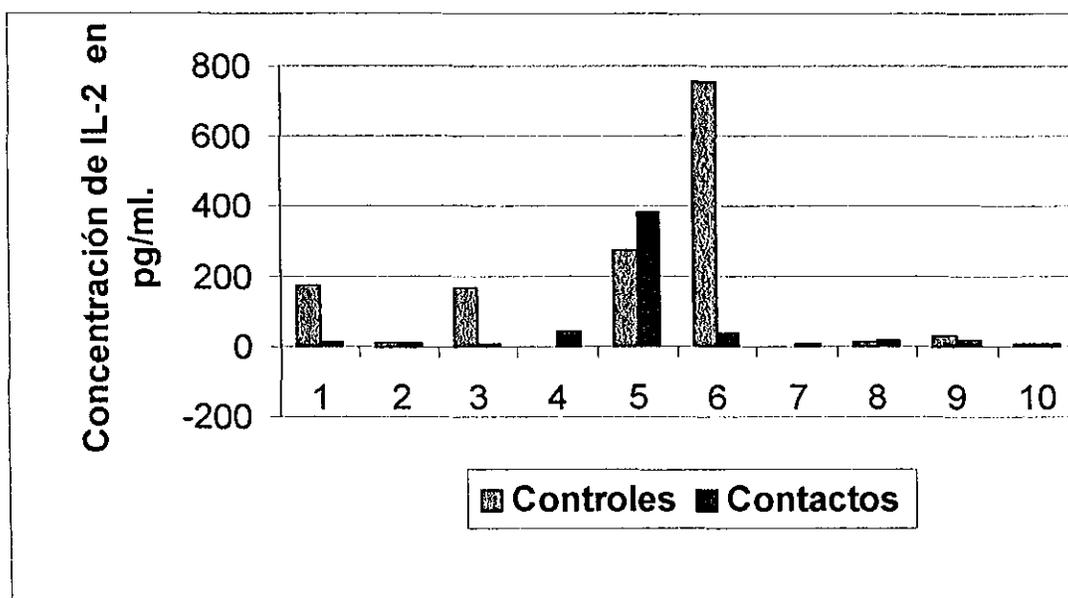


Fig. 11 Niveles de IL-2 (pg/ml) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T de controles y sujetos en contacto con pacientes con LL.

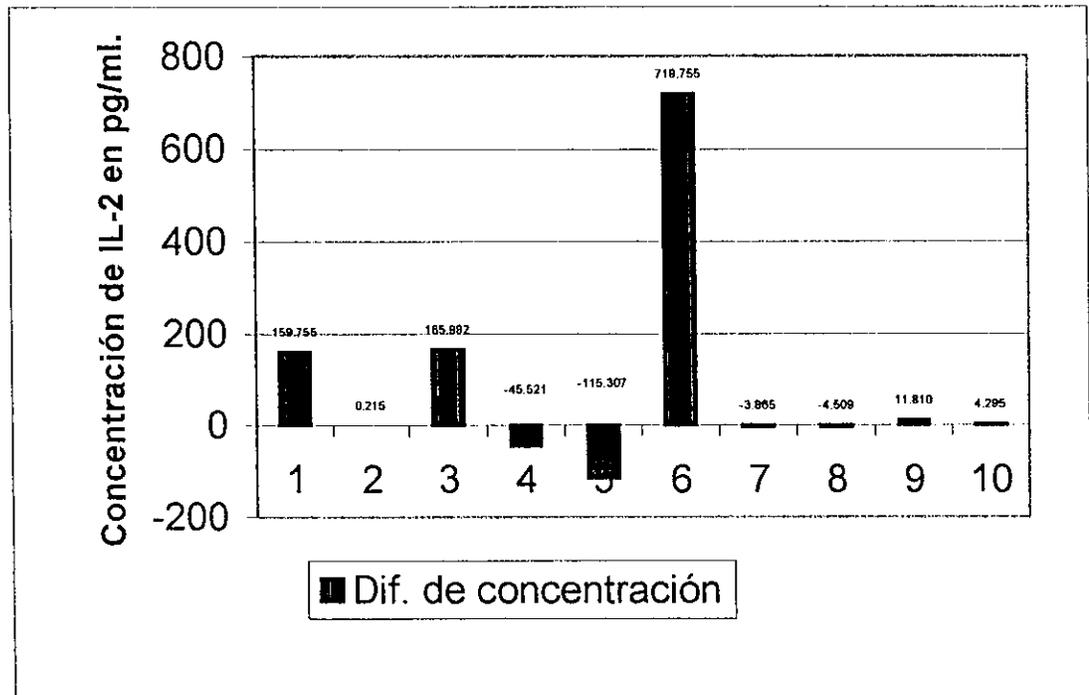


Fig. 12 Diferencias en la concentración (pg/ml) de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T de controles y sujetos en contacto con pacientes con LL.

# **DISCUSSION**

## VIII. DISCUSION

Se ha establecido que los sujetos que viven en contacto con pacientes con LL multibacilares tienen un alto riesgo de desarrollar la enfermedad comparados con aquellos individuos que no están en contacto (Sarno, 1991). En el presente estudio se valoró la RIC, por medio de la determinación del índice de estimulación y de los niveles de IL-2 producidos por los linfocitos en cultivo de controles y sujetos en contacto con pacientes con LL en edades de entre 4 y 22 años; por que en general se considera que es en las primeras décadas de la vida cuando se infectan las personas en contacto con pacientes con LL, ya que los sujetos adultos infectados pudieron haber estar incubando al bacilo *M. leprae* a lo largo de 3 - 10 años (Prescott, 1996). De acuerdo a experimentos previos donde se determinó la baja producción de IL-2 *in vitro* de linfocitos de pacientes con LL (Islas, 1987; Haregewoin, 1994 y otros grupos de trabajo), se planteó la pregunta esencial que motivo el presente trabajo; los sujetos en contacto con pacientes con LL tienen disminuida la producción de IL-2 por la posible "manipulación" de la respuesta inmune llevada a cabo por el *M. leprae* o bien puede ser que el sujeto contacto de por si ya tiene disminuida la producción de IL-2 y esto lo hace susceptible a la infección por el *M. leprae*. Lo anterior se podría saber una vez que a los tres sujetos contactos con bajos niveles de IL-2 *in vitro* (dos de 13 años y uno de 22 años de edad), se les llevara a cabo un monitoreo y seguimiento médico, realizándoles la prueba de la lepromina para evaluar su capacidad de RIC ante Ag de *M. leprae* y si resultan negativos a la lepromina sería recomendable darles más atención médica. También se les podría determinar el nivel de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo ya que es otra de las citocinas secretadas por las Th1, las cuales son esenciales para el control de las infecciones micobacterianas, además de la determinación del receptor de IFN- $\gamma$ , por que se ha demostrado que una deficiencia en dicha molécula origina una predisposición a la ya mencionada infección micobacteriana (Casanova, 1998). Por lo que la determinación del índice de estimulación y el nivel de producción de IL-2 de linfocitos de sujetos en contacto con pacientes con LL serían complementarios a los estudios antes mencionados.

Por lo que sería importante realizarlos no solo en la jurisdicción IV de la Secretaría de Salud en la Barca Jalisco, si no también en todos los lugares donde se presentan casos de lepra lo que permitiría detectar infección temprana del *M. leprae* y con esto se contribuiría al control de la lepra, además de la terapia de multidrogas ya empleada.

Es importante destacar que la IL-2 es fundamental para la RIC y juega un papel central en la regulación de la respuesta inmune, por lo tanto su producción disminuida contribuye al desarrollo de la LL y así *M. leprae* crece sin control en los macrófagos. En los resultados del presente trabajo se encontró que de los 10 sujetos en contacto con pacientes con LL tres tuvieron una producción *in vitro* disminuida de IL-2, dos se encuentran entre los 10-20 años y uno entre los 20-30 años. Se podría pensar que tales individuos presentan fallas en la activación del linfocito T, debido quizá a una incorrecta señalización molecular entre células del sistema inmune; por lo que podrían ser más susceptibles a infectarse y a desarrollar la lepra, sobre todo si viven en un medio hacinado y poco higiénico. El análisis de la prueba con signo de Wilcoxon para muestras apareadas, mostró que estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los resultados de índice de estimulación y nivel de producción de IL-2 por parte de los linfocitos de las 2 poblaciones estudiadas. Lo anterior puede relacionarse con el hecho de que no todas las personas que conviven con un paciente con lepra lepromatosa tienen el mismo riesgo de contagiarse. No se descarta la posibilidad de que los contactos antes mencionados pudieran haber tenido una baja producción de IL-2 debida tal vez a una infección asintomática (de otro microorganismo diferente al *M. leprae*) del individuo en el momento de tomar la muestra sanguínea. Y por último es importante mencionar que se considera a la rivera de Chapala como una zona endémica de lepra. Además se confirmó que las familias de los pacientes con LL viven en condiciones socioeconómicas deficientes (datos no mostrados), lo que podría influir en la diseminación del *M. leprae* y por consiguiente en el desarrollo de la enfermedad.

# **CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES.

- 1.- Los índices de estimulación y los niveles de producción de IL-2 de linfocitos (*in vitro*), en las dos poblaciones presentaron heterogeneidad y sin diferencias estadísticamente significativas entre éstas.
- 2.- En seis controles y contactos se encontró relación entre el IE y las concentraciones de IL-2, es decir, que a mayor IE mayor concentración de IL-2.
- 3.- Tres sujetos en contacto con pacientes con LL tuvieron una producción *in vitro* disminuida de IL-2, dos se encuentran entre los 10-20 años y uno entre los 20-30 años
- 4.- La determinación del índice de estimulación y el nivel de producción de IL-2 de linfocitos (*in vitro*) de sujetos en contacto con pacientes LL, es complementaria a otros estudios para evaluar una posible infección temprana de *M. leprae*.

# **LITERATURA CONSULTADA**

## IX. LITERATURA CONSULTADA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. 1997 Cellular and molecular immunology. Saunders Co. Third Edition.

Alfaro, F., Ramirez G., Islas A., Fafutis M. 1997 Effect of PMA and ionophore A23187 on the IL-2 mediated activation of T lymphocytes from patients with LL. Int. J. Leprosy 65(1):73-79.

Arce-Paredes P., Espinosa-Rojas O., Jimenez-Zamudio L. 1994. Rev. Latinoam. Microbiol. 36:213-9.

Arnaiz-villena A., Regueiro, J.R., López Larrea C. 1995 Inmunología. Editorial Complutense. Pags. 151-153.

Barksdale, L. And Kim, K.S. 1977. "*Mycobacterium*". Bacteriol. Rev. 41:217-223.

Blomm B. R., Young R. A., Mehra V. 1985 Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. Nature 316: 450-452.

Casanova J. L, Altare F. 1998. Impairment of micobacetril immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. Science 280:1432-1435.

Cantrell, D.A., Lucas, S.C., Ward, S., Westwick, J. and Gullberg, M. 1989 Phorbol esters regulated CD2- and CD3-mediated calcium responses in peripheral blood derived human T cells. J. Immunol. 143(11):3653-3658 .

Clark-Curtis, J. E. 1988 Benefits of recombinant DNA technology for the study of *Mycobacterium leprae*. Curr. Tops. Microbiology and Immunol. 138:61-79.

Chevalier P. 1997 Malnutrición y sistema inmunitario. Mundo Científico. No. 177:217-219.

Deo M.G., Chiplunkar S.V., Deshmukh M.A., Kode J.A., Gangal S.G. 1997 Acta Leprol 10:203-8.

Dockrell H. 1999. Primer Simposium Internacional de micobacterias, Guadalajara, Jalisco. Comunicación personal.

Fafutis M.M., Islas A., Gonzalez M.A. 1991 Response to PHA of LL patients lymphocytes preincubated in culture media. Int. J. Leprosy, 59(3):480-482

Fafutis M. M., Islas A., Gonzalez mendoza A. 1990 Deteccion of IL-2 receptor by indirect immunofluorescence with antiTac monoclonal antibody on the surface of T lymphocytes from patients with LL. Int. J. of leprosy. 58:126-128.

Fafutis M. 1998 Cambios en la expresión del CD28 y B7 en linfocitos de pacientes con Lepra Lepromatosa. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas (Area Inmunobiología) Universidad de Guadalajara.

García – Tamayo Fernando. 1997. Fundamentos de Inmunobiología. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Pags.213-214.

Gillis W. Long 1995 The immunology of Leprosy: unraveling an enigma. Int. J. Leprosy. 63(3):430-447.

Hasting, C., Gillis P. T. 1988 Leprosy. Clinical Microbiology Reviews. 1: 330-348.

Reversal by IL-2 of the T cell unresponsiveness of LL to M lepremurium. Immunol Rev. 80:77-86.

Islas A., Guillen C., Fafutis M., Alfaro F. 1993 Recognition of *M. leprae* antigens with antibodies present in sera from patients with LL. Int. J. Leprosy. 61(2):245-249

Islas, R. A., Morales, O. R., Fafutis, M. M., González, M. A., and Ortiz, O. L. 1987 Deficiency in the biosynthesis of interleukin-2 and functional presence of the receptor in lepromatous leprosy. *Int. J. of Leprosy* 55:566-569.

Janeway, C.A. and Travers, P. 1997 *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Publishing Inc. Third Edition.

Karin, M. 1992 Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J*: 6:2581-90.

Kim, S.J. 1991. In vitro effect of interleukin-2 in proliferative responses of peripheral blood T cells from leprosy patients. *Yonsei Med. J.* 32:237-242.

Lyengar R., Weng G., Bhalla U. 1999. Complexity in biological signaling systems. *American Association for the advancement of Science*. 284: 92-96.

Mak T. W. And Simard J.S.L. 1998. *Handbooks of immune response genes*. Plenum Press New York and London. pags. 383.

Mariano M., Moura A.C. 1997. Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall suppress T cell activation *in vivo* and *in vitro*. *Immunology*. 92:429-36.

Mehra N. K., Mitra D. K., Taneja V. 1997. HLA-DR polymorphism modulates the cytokines profile of *Mycobacterium leprae* HSP-reactive CD4 T cell. *Clin ImmunoPathol*. 82:60-7.

Modlin R. L., Sieling P.A., Sakimura L., Uyemura K., Yamamura M., Oliveros J. 1995. IL-7 in the cell-mediated immune response to human pathogen. *J. Immunol*. 154:2775-83.

Modlin R.L., Jullien D., Sieling P.A., Uyemura K., Mar N.D., Rea T.H. 1997 IL-15 an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J. Immunol*. 158:800-6.

Mustafa A. S.. 1996. Restoration of proliferative response to *M. leprae* antigens in lepromatous T cells against candidate antileprosy vaccines. *Int. J. of leprosy other Mycobac Dis.* 64:257-67

Nath I, Misra N., Selvakumar M., Singh S., Ramesh V., Misra R. S. 1995. Monocytes derived IL-10 and PGE2 are associated with the absence of Th1 cell and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* 48:123-128.

Ottenhoff T.H., de Jong R., Janson A.A., Faber W.R. 1997. IL-2 and IL-12 act synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. *J. Immunol.* 159:786-93.

Pichler W. 1997. Regulation of the immune response: The Th1/Th2 concept. *Shweiz Med Wochenschr.* 127:3411-8

Prescott Harley Klein. 1996 *Microbiology.* Ed. WCB Wm Brown Publishers. Third edition. Pags. 450-451

Ridley, D.S. and Jopling, W.H. 1966 Classification of leprosy according to immunity; a five-group systems. *Int. J. Of leprosy.* 31: 255-273ñ

Sarno E., N., Sampaio E. P., Moreira A. L., Kaplan G., Duppre N.D., Miranda C. F. (1991) *Mycobacterium leprae* Induced interferon- $\gamma$  production by household contacts of leprosy patients: Association with the development of active disease. *The Journal of infectious diseases.* 164: 990-993.

Sasiain M.C., De la Barrera S., Finiasz D.M., Fink S., Valdez R. 1997. Differential development of CD4 y CD8 cytotoxic T cell in PBMC across the leprosy spectrum. *Int. J. Leprosy Other Mycobact. Dis.* 65:45-55

Secretaria de Salud en el Estado de Jalisco, Programa estatal de control de Lepra, Resumen estadístico, 1984-1996, numero 0249.

Smith K. A. 1988 Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science* 240: 1169-1176.

Spear G. Patricia. 1999 A welcome mat for leprosy and lassa fever. *Science*. 282: 1999- 2000.

Terencio de las Aguas J., Castell P.M., Castells R.A. 1992 Inmunología de la lepra. *Revista de leprología. FONTILLES*. 19: (1)357-393.

Vega López F. 1999. Primer Simposium Internacional de micobacterias, Guadalajara, Jalisco. Comunicación personal.

Vohra H., Agrewala J.N., Kumar B. 1998. Potential role of B7 and CD28 molecules in Immunosuppression in leprosy. *Clin Exp. Immunol*. 111:56-63.

WHO, World Health Organization, Action Programme for the elimination of Leprosy. 5/10/1998 <http://www.who.ch/programmes/lep/lep@ome.htm> y [daunmeri@who.ch](mailto:daunmeri@who.ch)

Yogi m., Sieling P.A., Wang X.H., Gately H.H., Oliveros J. L., MCHugh T. 1994. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious diseases. *J. Immunol* 153(11):5347.

Zanvil A. And Gilla Kaplan. 1991. Hansen's disease, cell mediated, and recombinant lymphokines. *The Journal of Infectious Diseases*. 163: 1195-1200.

Zea, A.H. 1998 Changes in expression of signal transduction protein in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infection and Immunity*. 66:499-504

Zweifach, A. and Lewis, R.S. 1995b Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol*. 105:209-226

**ANEXO**

## X. ANEXO

### SECRETARIA DE SALUD DEL ESTADO DE JALISCO CENTRO DE INVESTIGACION DIVISIONES DE GENETICA Y MEDICINA MOLECULAR

#### CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACION

- 1) Por medio de la presente autorizo al Dr. \_\_\_\_\_ a realizar los siguientes procedimientos. a) Extraer \_\_\_\_ ml de sangre de mi brazo. b) Si es necesario, repetir el procedimiento anterior en un período de no menor de tres meses a fin de realizar nuevos estudios.

- 2) El propósito de la toma de muestra es el de realizar estudios de:

\_\_\_\_\_

Así como estudios genéticos de tipo poblacional, siempre y cuando se mantenga la confidencial de mis datos personales.

- 3) Yo entiendo que el procedimiento descrito en el párrafo 1 puede implicar cierta molestia en el sitio de la punción para la extracción de sangre.
- 4) En caso de algún daño físico resultante de la investigación, el Dr. \_\_\_\_\_ no estará obligado a ofrecer compensación económica ni a absorber los costos del tratamiento médico. No obstante las facilidades necesarias, tratamiento de emergencia y servicios profesionales estarán disponibles tal como lo están para la comunidad en general.
- 5) Mi firma en este documento manifiesta mi participación voluntaria en este proyecto de investigación. Tal participación no libera a los investigadores, la institución y agencias patrocinantes de sus responsabilidades éticas para conmigo.
- 6) La información anterior me fue explicada por el Dr. \_\_\_\_\_ y/o la persona designada por él. Entiendo que el Dr. \_\_\_\_\_ contestará cualquier pregunta que yo pueda tener en relación de pruebas a realizarse. Yo puedo localizar al en el teléfono \_\_\_\_\_.
- 7) Yo entiendo que mi participación en esta investigación puede terminar en cualquier momento sin que esto perjudique mi futura atención. La confidencialidad de los datos será mantenida dentro de los límites legales.

\_\_\_\_\_  
NOMBRE DE LA PERSONA  
QUE TOMO LA MUESTRA

\_\_\_\_\_  
CONSENTIMIENTO DE LA PERSONA

\_\_\_\_\_  
TESTIGO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE DE LA PERSONA

\_\_\_\_\_  
FECHA

\_\_\_\_\_  
FECHA DE NAC. DE LA PERSONA

SECRETARIA DE SALUD DEL ESTADO DE JALISCO  
 JURIDICCION SANITARIA N° IV REGION LA BARCA

COLECCIÓN DE DATOS

I.D.
N° IMSS

FECHA \_\_\_\_\_

ESTUDIO \_\_\_\_\_

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE \_\_\_\_\_

FECHA DE NACIMIENTO \_\_\_\_\_ LUGAR NACIMIENTO \_\_\_\_\_

SEXO \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_

DOMICILIO \_\_\_\_\_

CIUDAD/MUNICIPIO \_\_\_\_\_ ESTADO \_\_\_\_\_

TELEFONO \_\_\_\_\_

PADRES O TUTORES

NOMBRE DEL

PADRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_

FECHA DE NACIMIENTO \_\_\_\_\_ LUGAR DENACIMIENTO \_\_\_\_\_

ORIGEN ABUELO PATERNO \_\_\_\_\_ ORIGEN ABUELA MATERNA \_\_\_\_\_

CONTACTO

NOMBRE \_\_\_\_\_

DOMICILIO \_\_\_\_\_

CIUDAD/MUNICIPIO \_\_\_\_\_ ESTADO \_\_\_\_\_

TELEFONO ( ) \_\_\_\_\_

ENVIADO POR \_\_\_\_\_

MUESTRA TOMADA POR \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_




--	--	--

TOTAL DE INGRESOS MENSUALES		
-----------------------------	--	--

## 5.-EGRESOS FAMILIARES

CONCEPTO	CANTIDAD
RENTA	
LUZ	
COMBUSTIBLE	
TRANSPORTE	
GASTOS ESCOLARES	
ALIMENTACION	
VESTIDO	
DEUDAS	
OTROS	
TOTAL	

6.-TOTAL DE INGRESOS:

CLASIFICACION: E B M ME A

## 7. - VIVIENDA

1.-CONDICION	_____	5.- CARÁCTERISTICAS	
PROPIA	_____	PISOS:	
EN PAGO	_____	TIERRA	_____
RENTA	_____	OTROS	_____
2.- SERVICIO:		MUROS:	
AGUA:		ENJARRE	_____
ENTUBADA:	_____	MADERA	_____
POZO	_____	CARTON	_____
OTRO	_____	TECHO:	
3.-DESECHOS:		BOVEDA	_____
DRENAJE	_____	TEJA	_____
POZO O FOSA	_____	OTRO	_____
FECALLISMO	_____	6.-VENTILACION:	
4.-HABITACION		BUENA	_____
COCINA	_____	MALA	_____
BAÑO	_____		
No. DE DORMITORIO	_____		

## 8.- ALIMENTOS

ALIMENTO	CANTIDAD	FRECUENCIA	TIPO

TIPO DE COMIDA : 1= DESAYUNO, 2=COMIDA, 3=CENA, 4=ENTRE COMIDA

9.OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y CARGO  
DEL ENTREVISTADOR

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE  
DE LA UNIDAD APLICATIVA