



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Escuela Nacional de Estudios  
Profesionales Iztacala**

**Evaluación de Linfocitos T y sus  
Subpoblaciones con Anticuerpos  
Monoclonales en la Lepra**

**TESIS**

Que para obtener el título de :

**Biólogo**

**PRESENTA**

**Sergio Pastén Sánchez**

Octubre, 1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se desarrolló en el -  
Laboratorio de Inmunología de Micobacterias  
del Departamento de Investigaciones Inmuno-  
lógicas, ISET, DGE, SSA.

Bajo la dirección de la QBP Ma. Eugenia  
Amezcu Ch. y la asesoría del Dr. Alejandro  
Escobar Gutiérrez.

La investigación contó con la colaboración  
de la Dra. Obdulia Rodríguez y el Dr. Virgilio  
Santamaría del Centro Dermatológico "Dr. Ladis-  
lao de la Pascua".

A mis padres y hermanos,

por el cariño y apoyo

que me han brindado.

A mi esposa

por su comprensión y cariño

A Eduardo y Carlos

mis mejores amigos.

## A B R E V I A T U R A S

AcMo	Anticuerpo monoclonal.
BB	Limítrofe.
BL	Limítrofe lepromatoso.
BT	Limítrofe tuberculoide.
CD1	Glicoproteína de membrana de corticotimo <u>cit</u> os.
CD2	Glicoproteína de membrana de linfocitos T que sirve como receptor para glóbulos rojos de carnero.
CD3	Glicoproteína de membrana de linfocitos T asociada al receptor de reconocimiento antigénico.
CD4	Glicoproteína de membrana de la subpoblación de linfocitos T que principalmente son cooperadores e inductores.
CD8	Glicoproteína de membrana de la subpoblación de linfocitos T que principalmente son supresores y citotóxicos.
CD4/CD8	Relación entre las subpoblaciones de linfocitos T.
Con A	Lectina derivada del frijol que estimula linfocitos T.
D	Dimorfo.
DDS	Diaminodifenilsulfona.

DS	Desviación estándar.
ENL	Eritema nudoso leproso.
GRC	Glóbulos rojos de carnero.
HLA	Sistema principal de antígenos de histocompatibilidad en el humano (Antígenos - de leucocitos humanos).
I	Indeterminados.
IB	Índice bacteriológico.
IL-2	Interleucina-2, factor de proliferación de linfocitos T.
Is	Genes de supresión inmunológica.
Ir	Genes de respuesta inmunológica.
JRA <sup>+</sup>	Linfocitos T con actividad principalmente supresora.
JRA <sup>-</sup>	Linfocitos T con actividad principalmente cooperadora.
LLp	Lepra lepromatosa polar.
LLD	Lepra lepromatosa difusa.
LLN	Lepra lepromatosa nodular.
LL <sub>s</sub>	Lepra lepromatosa subpolar.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MHC clase I	Loci A, B y C.
MHC clase II	Loci DP, DQ y DR.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
RIC	Respuesta inmune celular.
Reacción tipo II	Eritema nudoso leproso

$TH_2^+$	Linfocitos T con función principalmente citotóxica.
$TH_2^-$	Linfocitos T con función principalmente cooperadora.
$TH_2^+JRA^-$	Linfocitos T con función principalmente supresora y citotóxica.
$TH_2^-JRA^+$	Linfocitos T con función principalmente inductora.
$TH_2^-JRA^-$	Linfocitos T con función principalmente cooperadora.
Ti-CD3	Complejo molecular en la membrana del - linfocito T que efectúa el <u>reconocimien</u> to para antígeno.
TT	Lepra tuberculoide.

## I N D I C E

	Pag.
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
MATERIAL Y METODOS .....	16
RESULTADOS .....	22
DISCUSION .....	36
CONCLUSIONES .....	44
BIBLIOGRAFIA .....	45

## R E S U M E N

En 49 pacientes leproso mexicanos se evaluó por el método de inmunofluorescencia indirecta el porcentaje de subpoblaciones de linfocitos T circulantes. Estos fueron definidos por los anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores presentes en todas las células T (CD3, CD2), en células cooperadoras/inductoras (CD4) y en células T supresoras/citotóxicas (CD8). Los resultados se compararon con un grupo testigo de individuos aparentemente sanos con las mismas características socioeconómicas y étnicas. En el grupo de pacientes lepromatosos nodulares (LLN) y en el de difusos (LLD) se vió un aumento de linfocitos CD8 y una disminución en la relación CD4/CD8, sugiriendo aumento de la actividad supresora. Los pacientes LLN con reacción tipo eritema nudoso (ENL) sin tratamiento con talidomida, manifestaron una relación CD4/CD8 mayor que la del grupo testigo por disminución de CD8 y en los LLN/ENL tratados con talidomida se encontraron cifras normales en la relación CD4/CD8 con respecto al testigo. Estos datos sugieren que hay un desequilibrio entre las células T cooperadoras/supresoras lo que posiblemente precipita el estado reaccional y que la talidomida actúa como un agente modulador de esta situación. En los casos indeterminados hay disminución en la relación CD4/CD8 por reducción de CD4, sin embargo el número de casos aun no permite llegar a conclusiones definitivas.

## I N T R O D U C C I O N

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por -- Mycobacterium leprae. Este es un bacilo con tropismo por las - partes del cuerpo con baja temperatura, por lo que se localiza - preferencialmente en tejido ectodérmico como son la piel, nervios y mucosa nasal. La enfermedad presenta una variedad de manifestaciones clínicas que se han clasificado a lo largo de un espectro que van desde una simple lesión localizada hasta una amplia infiltración difusa, cada una de estas manifestaciones parecen - estar determinadas por la interacción inmunológica entre el hués - ped y el parásito (59).

M.leprae fue descrito por Amauer Hansen en 1874 (20). Es un bacilo recto o ligeramente curvo, con extremos generalmente redondos, mide de 0.3 micras de ancho por 1.0 a 8.0 micras de largo, es un parásito intracelular obligado, no forma esporas, es - Gram positivo, resiste la decoloración con alcohol-ácido y en ocasiones muestra gránulos en su citoplasma. Por sus características antigénicas y presencia de ácidos micólicos en su pared ce - lular taxonómicamente se ha ubicado en el orden de los Actinomi - cetales, familia Mycobacteriaceae, y género Mycobacterium(15,65). Biológicamente se encuentran más relacionados al grupo de mico - bacterias de crecimiento rápido que a las de crecimiento lento. El tiempo de generación es de 10 a 20 días (44).

La lepra está mundialmente distribuída principalmente en re-

giones tropicales y subtropicales, aproximadamente veinte millones de individuos se encuentran afectados en Asia, en India, sur de China, centro de Africa, en algunas islas del Pacífico, sur de Europa y en América desde el sur de Estados Unidos hasta América del Sur (6, 22).

Los datos de 1980 y 1984, en México, indican que el estado de Sinaloa presenta el problema con mayor magnitud. Le siguen Colima, Nayarit, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Sonora y en las demás entidades el problema de la lepra tiene menos importancia (13, 14).

La transmisión de la lepra se efectúa por contacto íntimo y prolongado del individuo susceptible con el caso infectante, es decir bacilífero. Se presenta en todas las edades y principalmente en estratos socio-económicos bajos. La susceptibilidad del huésped es de gran importancia para entender la epidemiología, la historia natural y la clasificación clínica de la enfermedad.

Los productos de los genes del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) han demostrado ser marcadores genéticos íntimamente asociados o aun ligados a diversas enfermedades (41). En la lepra no existe asociación con los loci A, B y C (clase I), mientras que la participación de los productos clase II está totalmente confirmada (40). Así, un gene de susceptibilidad ligado a DR2 y/o DR3 predispone a la forma tuberculoide mientras que en la lepra lepromatosa, aunque no se ha identificado el producto particular, se sabe sin lugar a duda que también existe susceptibilidad ligada al

MHC, pues los estudios formulados han demostrado que la concor--  
dancia de segregación de los haplotipos juntos con la lepra le--  
promatosa es muy significativa. Más aun, se ha propuesto que la  
expresión de la lepra lepromatosa depende, por lo menos parcial--  
mente, de un gene Is (supresión inmunológica) que se localiza en  
la región DQ. Por otro lado, es bien conocido que los genes Ir--  
(respuesta inmunológica) y los Is están ubicados en la región D  
y los productos de estos son o están ligados a los antígenos DR  
y DQ (69). Estos últimos están involucrados en la no respues--  
ta de los linfocitos T periféricos de pacientes lepromatosos a --  
M.leprae (40).

Gorodezky y col. (19) sugieren que el control genético de la  
respuesta inmune a M.leprae depende, por lo menos en parte, a un  
gen Is ligado al DQw1 y que la presencia de esta molécula sobre  
la superficie de la célula presentadora de antígeno conduce a la  
infección persistente del macrófago, por M.leprae. Sasazuky y  
col. (60) demostraron la existencia de genes Is, que mapean den--  
tro de la subregión HLA-DQ, los cuales controlan la no respuesta  
a través de las células T supresoras a antígenos de pared de es--  
treptococos, de criptomera (polen), de esquistosoma y de ----  
M.leprae. Este hallazgo apoya la existencia de genes Is involu--  
crados en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Dado el gran polimorfismo genético presente en las poblacio--  
nes humanas, el cual se expresa de una forma característica de--  
pendiendo de la raza, región geográfica y hasta de cada indivi--

duo, es muy importante que los pacientes y testigos sean homogéneos en cuanto a su origen étnico y así poder buscar asociación entre los antígenos de HLA y susceptibilidad a enfermedades.

En México la clasificación de la lepra que se ha usado con mayor frecuencia es la propuesta por Rabello y Latapí bajo un criterio puramente clínico y que fue aprobada en el VI Congreso Internacional de la Lepra celebrado en Madrid en 1953 (42). Aquí se distinguen dos tipos polares que son estables; el tipo lepromatoso (L) y el tipo tuberculoide (T), y se consideran dos grupos inestables; el grupo indeterminado (I) y el grupo interpolar o dimorfo (D). Esta clasificación ha sido desplazada por la propuesta, por Ridley y Jopling, en el X Congreso Internacional de la Lepra celebrado en Bergen, Noruega en 1973 (56,57,64) que se basa en datos clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e inmunológicos, considerándose que la relación se manifiesta longitudinalmente a lo largo de un espectro, en donde se establece que entre el polo lepromatoso (LL) y el polo tuberculoide (TT) hay grupos intermedios que se han fijado convencionalmente de acuerdo a sus características y que son: el limítrofe lepromatoso (BL), el limítrofe (BB) y el limítrofe tuberculoide (BT). Posteriormente se dividió a los LL en sus formas polares (LLp) y subpolares (LLs), este último entre los BL y los LLp. En esta clasificación no se consideran los casos indeterminados que presentan manchas mal delimitadas, hipocrómicas y anestésicas y que varían en tamaño y número. Generalmente los estudios bacteriológicos son negativos y los histológicos de la lesión demuestran sólo reacción de tipo -

inflamatoria (58). Este último grupo es de especial importancia pues se considera como la forma inicial de la enfermedad por lo que no es posible ubicarla dentro del espectro y sólo con el tiempo se definirá.

Clínicamente los pacientes TT se caracterizan por presentar pocas lesiones las que van a ser bien limitadas por la piel que las rodea, se localizan en piel y nervios periféricos. La característica común es la alteración de la sensibilidad, anestesia al dolor y a la temperatura, conservándose las sensaciones táctiles. Las características histopatológicas son la presencia de un gran infiltrado linfocitario alrededor de grupos de células epiteloides y gigantes, los bacilos son escasos, los nervios están completamente destruidos por la reacción inflamatoria. Hacia el polo lepromatoso del espectro la enfermedad es generalizada, progresiva e infectante con lesiones que se incrementan en número y tamaño, siendo poco limitadas por la piel que las rodea. Histológicamente hay una disminución del infiltrado linfocitario, el número de bacilos aumenta, los fagocitos mononucleares tienen un aspecto degenerativo o espumoso (células de Virchow). Dentro de la forma polar lepromatosa (LL) existen dos variedades clínicas que son; la nodular (LLN), la cual se caracteriza por la presencia de elementos circunscritos (nódulos, placas infiltradas y manchas) que se presentan en zonas expuestas y frías y la variedad difusa (LLD), que es la forma más grave de la enfermedad, en donde se observa una infiltración cutánea difusa generalizada y ausencia de nódulos durante toda su evolución, la piel aparece lisa -

brillante y turgente (fase succulenta) o plegada, seca y escamosa (fase atrófica terminal) (61).

En la patología de pacientes con lepra es de especial importancia la existencia de los llamados estados reaccionales que son episodios agudos o subagudos de repetición con síntomas generales, neurales, viscerales y cutáneos (24, 73). La sintomatología cutánea se ha dividido en tres síndromes que son: a) eritema nudoso leproso (ENL) este sólo se presenta en pacientes altamente bacilíferos LL, la característica clínica es la presencia de nódulos subcutáneos eritematosos, dolorosos y fiebre. Histológicamente la lesión es similar a una reacción de Arthus, es profunda, hay vasculitis, paniculitis e infiltrado de granulocitos, -- principalmente perivasculares: b) eritema polimórfico, clínicamente se caracteriza por la presencia de manchas eritematosas, pápulas y ampollas de bordes bien limitados. Hay infiltrado de polimorfonucleares, la lesión se produce en vasos de la dermis media y c) eritema necrosante o fenómeno de Lucio se presenta en pacientes con lepra lepromatosa difusa (LLD), se caracteriza por presentar al inicio manchas eritematosas, ardorosas y dolorosas-- después son lesiones necróticas y ulceradas y finalmente dejan una cicatriz atrófica. Histológicamente hay presencia de M.leprae en las células endoteliales, por la liberación de antígenos hay infiltrado superficial de polimorfonucleares y oclusión trombótica de los vasos por activación de la coagulasa por C6, la lesión es en los vasos terminales.

El origen de la reacción leprosa es variable y es desconocida la causa íntima. Todo lo que parece alterar el estatus establecido por la enfermedad provoca los estados reaccionales. Sin embargo, cabe la posibilidad que pueda deberse a reacciones alérgicas a sustancias del bacilo, de adaptación o de estados autoinmunes. A pesar de que el ENL puede desencadenarse por diversas causas se ha encontrado que hay depósitos de inmunoglobulinas y complejos inmunes como posible mecanismo inductor del estado reaccional (4, 62). Por otro lado, Mshana propone que el ENL es precipitado por un desequilibrio de linfocitos T, específicamente un decremento en la subpoblación de linfocitos T supresores (34). Sin embargo, la información disponible sobre los mecanismos etiológicos de los estados reaccionales es fragmentaria y requiere de estudios más detallados que permitan establecer hipótesis bien fundamentadas.

La respuesta inmunológica mediada por células frente a diferentes antígenos ha sido evaluada a través de pruebas in vitro e in vivo a lo largo del espectro de la enfermedad. Los resultados demostraron que en LL existe una anergia específica a antígenos de M.leprae y una respuesta disminuida a otros antígenos a diferencia de pacientes TT en donde la respuesta está dentro de los límites normales (25, 36, 37, 39).

La respuesta a M.leprae y a otros antígenos sugieren que las manifestaciones clínicas de la enfermedad van a estar determinadas, principalmente, por la capacidad de cada individuo a montar

una respuesta inmune mediada por células. Esta conclusión, además es apoyada por los estudios histopatológicos realizados en ganglios linfáticos de leproso. En casos tuberculoides las poblaciones celulares en las áreas paracorticales (timo-dependientes) es similar a las encontradas en testigos, en contraste, en los casos LL hay un importante predominio de macrófagos parasitados (68).

Hay subpoblaciones de linfocitos T y B (54), dentro de la población total de linfocitos T se ha demostrado la presencia de una heterogeneidad funcional (10, 11, 12). De especial interés es el hecho de que se ha encontrado una correlación entre los antígenos de diferenciación de superficie celular timo-dependientes y su función, lo cual ha permitido distinguir subpoblaciones de linfocitos T con diferentes funciones. Así Strelkausca y col. (66) demostraron la existencia de dos subpoblaciones de linfocitos T, los  $JRA^+$  con función supresora y los  $JRA^-$  con función cooperadora. Evans y col. (16) identificaron y caracterizaron funcionalmente dos subpoblaciones de linfocitos T, los  $TH_2^+$  con actividad citotóxica y los  $TH_2^-$  que amplifican la actividad citotóxica de los  $TH_2^+$ . Por otro lado, Reinherz y col. (53) unificando los sistemas anteriores identificaron subpoblaciones de linfocitos T con diferentes funciones, así tenemos, a los linfocitos  $TH_2^+JRA^-$  que presentan actividad efectora citotóxica y supresora y los  $TH_2^-$  que se dividen en  $TH_2^-JRA^+$  que presentan un papel crítico en la inducción de la síntesis de inmunoglobulinas y los  $TH_2^-JRA^-$  que específicamente participan en los mecanismos de cooperación para la síntesis de inmunoglobulinas.

De esta manera se demuestra que el programa genético de los linfocitos T humanos es complejo e incluyen funciones inmuno reguladoras, la capacidad de reconocer antígenos específicos y de realizar una función efectora determinada.

El desarrollo de la tecnología para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcMo) con una especificidad definida, ha sido de gran importancia pues a partir de los hallazgos de Köhler y Milstein (27), se ha permitido identificar y caracterizar subpoblaciones de linfocitos T involucrados en las funciones inmuno reguladoras y efectoras de la respuesta inmune.

Debido a la existencia de una múltiple nomenclatura para asignar a un solo antígeno de diferenciación de leucocitos humanos - el subcomité de nomenclatura adoptó, durante el V Congreso Internacional de Inmunología celebrado en Kioto, Japón en 1984, la nomenclatura propuesta en el Primer Taller de Antígenos de Diferenciación, celebrado en París en 1982. La nomenclatura consiste - en asignar a las células que son identificadas y caracterizadas por los diversos AcMo con las siglas CD ("Cluster of Differentiation") y un número que defina al antígeno de diferenciación. Por ejemplo los anticuerpos 9.6, T11 y 35.1 identifican a todas las células T formadoras de rosetas-E, en el nuevo sistema de nomenclatura se designan las células como CD2 (8, 9). Por esta razón se usará este sistema de nomenclatura para evitar ambigüedades - en la comunicación.

Reinherz y Kung (47,52) obtuvieron AcMo que reconocen el 10 % de timocitos y específicamente el 100 % de linfocitos T maduros en sangre periférica, siendo los siguientes: el anti-CD1, el anti-CD3 y el anti-CD2; este último específico para el receptor E para glóbulos rojos de carnero, como es sugerido por el hecho de que el anti-CD2 inhibe la formación de rosetas-E (23, 26). Los anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 son de primordial interés ya que han permitido diferenciar las subpoblaciones de linfocitos T que en estudios in vitro sugieren estar involucrados en las funciones reguladoras y efectoras de la respuesta inmune. El anti-CD4 identifica el 75 % de timocitos y aproximadamente del 55 al 60 % de linfocitos T maduros en sangre periférica. Esta subpoblación contiene las células cooperadoras capaces de inducir la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (48) y la generación de linfocitos T citotóxicos (46), responden a antígenos solubles y secretan factores cooperadores (linfocinas) para la proliferación de linfocitos B, T y células nulas (50). Estas evidencias indican que la subpoblación de linfocitos CD4 tienen las funciones cooperadoras e inductoras. El anticuerpo anti-CD8 reconoce el 80 % de timocitos y el 30 % de linfocitos T maduros en sangre periférica humana. Proliferan bien con concanavalina A (Con A), con aloantígenos y contiene las células efectoras citotóxicas. Estos resultados sugieren que es la población de linfocitos T con funciones citotóxicas y supresoras (49, 51).

En los estudios sobre lepra, por la gran variedad de manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunológicas, se han utilizado estos anticuerpos con el objeto de demostrar si existe un desequilibrio en la relación entre las células CD4 y CD8, principalmente en el caso de las formas lepromatosas y así, tratar de entender los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en el padecimiento.

En estudios en sangre periférica de pacientes con LL existe discrepancia en los resultados, que puede deberse a las diferentes técnicas usadas en la evaluación del porcentaje de células fluorescentes, microscopía o citometría de flujo, así como factores étnicos, geográficos y socio-económicos, tipo y tiempo de tratamiento etc. Van Voorhis y col. (70) y Bullok y col. (7) reportaron que no hay diferencias en la relación CD4/CD8 de pacientes LL, Rea y col. (43) no encontraron alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T en individuos LL con y sin ENL, Bach y col. (2,3) sólo encuentran alteraciones en pacientes LL con ENL donde hay aumento de la relación CD4/CD8 debido a la disminución de células CD8. Por otro lado, Mshana y col. (33) hallan que en pacientes LL se presenta una disminución en la relación CD4/CD8 por disminución de células CD4 y aumento de CD8. Wallach y col. (71,72) encontraron una correlación entre el índice bacteriológico (IB) y la relación CD4/CD8, en pacientes LL no reaccionales, es decir a mayor IB menor es la relación CD4/CD8 por aumento de CD8. En pacientes LL con ENL, bacteriológicamente positivos o negativos, presentaron una disminución de células

CD8 y un aumento en la relación CD4/CD8, estos hallazgos son apoyados por la observación de Garraud y col. (17) que reportaron - que en pacientes LL sometidos a poliquimioterapia presentan una disminución de la carga bacilar y una normalización progresiva, a través del tratamiento, de los porcentajes de células T.

Debido a la discrepancia de resultados y a la posible influencia del grupo étnico, así como de otros factores donde se haya - realizado la observación, se decidió evaluar las proporciones de linfocitos T así como de sus subpoblaciones en pacientes mestizos mexicanos con lepra y compararlos con un grupo testigo de - las mismas características genéticas.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

1. Población. Se estudiaron 49 pacientes con lepra; 24 con lepra lepromatosa nodular (LLN), 10 de estos fueron tratados con DDS (diaminodifenilsulfona) y 14 con politerapia (DDS, rifampicina y clofacimina); 6 con LLN en reacción tipo eritema nudoso (ENL) 2 recibieron DDS o clofacimina y 4 politerapia, el estado reaccional fue controlado con talidomida en todos los pacientes; 3 con LLN/ENL, de éstos 1 recibió DDS y el resto politerapia, sin tratamiento con talidomida; 11 con lepra lepromatosa difusa (LLD), 6 de éstos tratados con DDS y el resto con politerapia; y 5 casos indeterminados (I) 4 recibieron DDS y el resto DDS más rifampicina.

El lugar de origen tanto de pacientes como de testigos se encuentra distribuido en la mayoría de los estados de la República Mexicana.

Las características generales de la población estudiada como edad, sexo y tiempo de tratamiento se presentan en la tabla 1.

El número de casos estudiados estuvo sujeto a su disponibilidad, la selección de la población fue realizada por el personal del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" en donde se les practicó una historia clínica completa. El diagnóstico y clasificación fue de acuerdo a los criterios clínicos, histopatológicos, bacteriológicos e inmunológicos.

T A B L A 1

## Características generales de los pacientes y testigos

Pacientes	Edad en años	Sexo	Número de pacientes tratados
Testigos (20)	25 - 50	10 M 10 F	-
LLN (24)	14 - 72	21 M 3 F	24 (9 meses a 41 años)
LLN/ENL tratados con talidomida (6)	40 - 86	5 M 1 F	6 (1 año a 39 años)
LLN/ENL sin tratamiento con talidomida (3)	47 - 82	2 M 1 F	3 (1 año a 38 años)
LLD (11)	16 - 53	5 M 6 F	11 (1 año a 42 años)
I (5)	16 - 36	2 M 3 F	5 (6 meses a 8 años)

2. Sangre. Se tomaron 10 ml de sangre periférica con anticoagulante (heparina 1 000 U ml<sup>-1</sup>) y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su llegada al laboratorio, no más de 24 horas.

3. Ficoll-hypaque, densidad 1.077 g cm<sup>-3</sup> (Sigma Chemical Co.)

4. Anticuerpos monoclonales, Ortho-mune OKT11 (CD2), OKT3 - (CD3), OKT4 (CD4), y OKT8 (CD8). (Ortho Diagnostic System Inc.).

5. Suero de cabra, anti-IgG de ratón, marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemical Co.).

6. Naranja de acridina (Sigma Chemical Co.).

7. Bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.).

8. Glóbulos rojos de carnero en solución de Alsever.

9. Solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$                     1.15 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$                     0.2 g

KCl                            0.2 g

NaCl                            8.0 g

Agua destilada, aforar a 1 000 ml.

10. Microscopio óptico (Zeiss).

11. Microscopio con iluminación de luz ultravioleta (Immunopan, American Optical).

## METODOS (Diagrama 1)

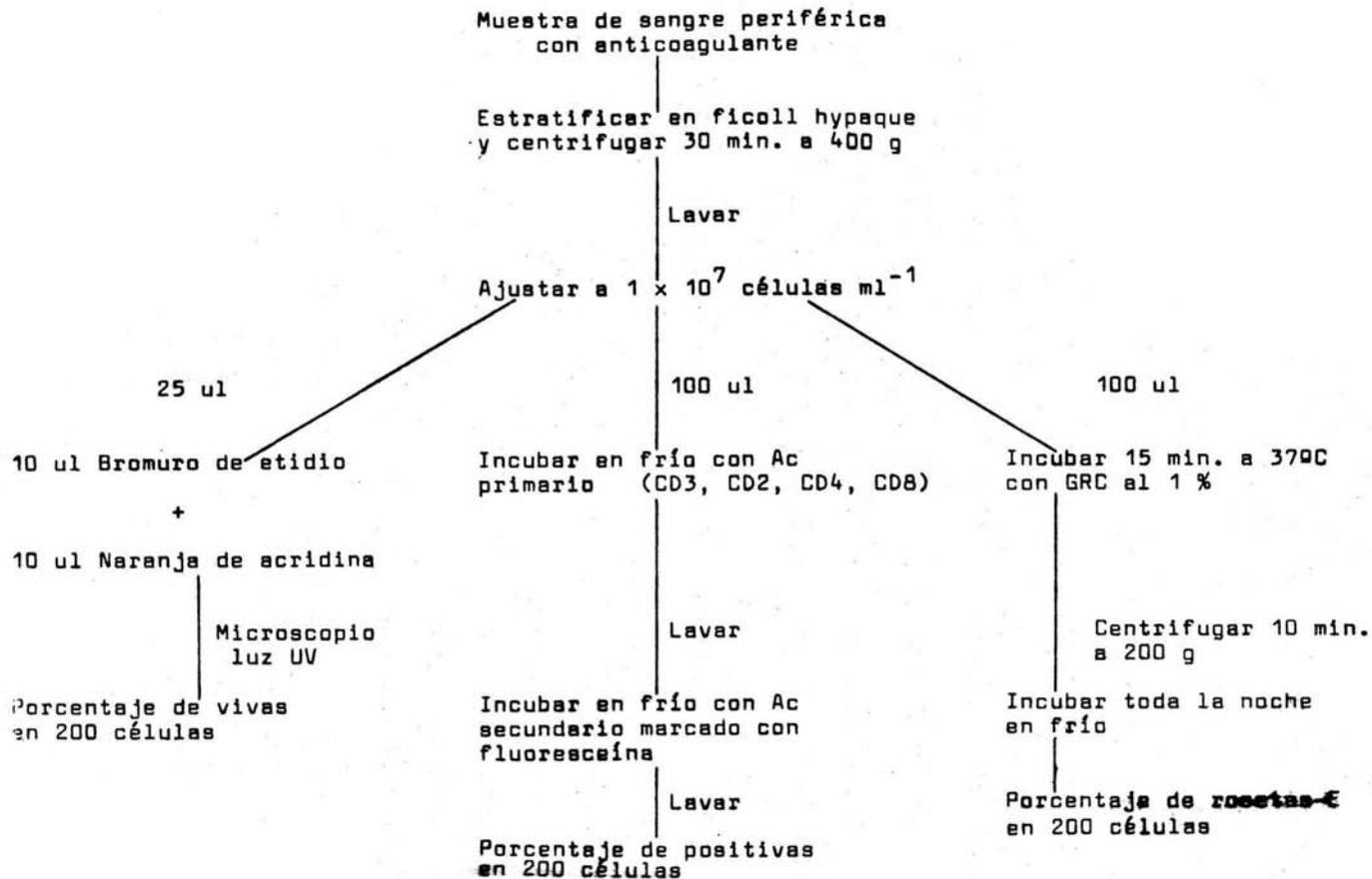
Separación de linfocitos totales por gradiente de flotación - en ficoll-hypaque (5).

1. La sangre con anticoagulante se diluye v/v y se estratifica - sobre 5 ml de ficoll-hypaque, se centrifuga a 400 g durante - 40 minutos al cabo de los cuales se separa la capa de linfocitos y se lava 3 veces con PBS.
2. Se suspenden las células en 1 ml de PBS y se cuentan en una - cámara cuenta glóbulos, se ajustan a  $1 \times 10^7$  células·ml<sup>-1</sup>.

Prueba de viabilidad para linfocitos totales (75).

1. Sobre un portaobjetos se depositan 25 ul de la suspensión de linfocitos ( $1 \times 10^7$  células·ml<sup>-1</sup>), se mezclan con 10 ul de bromuro de etidio a una concentración de 0.01 mg·ml<sup>-1</sup>, después - de 30 segundos se agregan 10 ul de una solución de naranja de acridina a una concentración de 0.005 mg·ml<sup>-1</sup>, se mezcla y la preparación se sella con parafina.
2. La evaluación se hace con un microscopio de luz ultravioleta con objetivo de 40X, se cuentan 200 linfocitos, las células - muertas o dañadas son de color rojo y las células vivas son - de color verde. El resultado se reporta como porcentaje.

DIAGRAMA 1



Identificación de linfocitos T y sus subpoblaciones con anticuerpos monoclonales por inmunofluorescencia indirecta.

1. Se agregan a 100  $\mu$ l de la suspensión de linfocitos ( $1 \times 10^6$  - células  $\text{ml}^{-1}$ ) 10  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal o PBS en el caso del testigo, se mezclan suavemente, se incuban en frío durante 30 minutos y se lavan 3 veces con PBS.
2. Se agrega a la suspensión de linfocitos 100  $\mu$ l del suero anti-IgG de ratón, marcado con isotiocianato de fluoresceína, diluído 1:20 en PBS, se incuba en frío durante 30 minutos y se lava 3 veces con PBS.
3. Se resuspenden las células en 100  $\mu$ l de glicerol al 30 % en PBS- $\text{NaN}_3$  al 1 %, se hacen las preparaciones con dos o tres gotas de la suspensión y se sellan con parafina.
4. Para la evaluación se usa microscopio con iluminación de luz ultravioleta con objetivo de 60X, las células se consideran positivas cuando se observa una tinción granular. El resultado se reporta como porcentaje.

Formación de rosetas-E (54, 55).

1. La suspensión de linfocitos se ajusta a  $1 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$ .
2. Se lavan glóbulos rojos de carnero con PBS, del paquete se prepara una suspensión al 1 % en PBS.

3. En un tubo de ensayo siliconizado o de plástico se adicionan 250 ul de la suspensión de linfocitos y 250 ul de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 1 %, se incubaba a 37°C durante 15 minutos con agitación cada 5 minutos al cabo de los cuales se centrifuga a 200 g durante 5 minutos y se incubaba en frío (4°C) toda la noche.
4. Al día siguiente se añade al tubo una gota de azul de tripano (0.3 %), las células son resuspendidas suavemente, las preparaciones se montan con una o dos gotas y se lee en microscopio óptico con objetivo de 40X.
5. Se cuentan 200 linfocitos y se clasifican como rosetas a aquellas que tengan tres o más glóbulos rojos de carnero adheridos a su membrana, las células que se tiñan de azul no deben considerarse, el resultado se expresa como porcentaje de rosetas-E.

#### Análisis estadístico (74).

Se determinó la media y desviación estándar de cada grupo. Se aplicó la prueba de F para aceptar o rechazar  $H_0: S_1^2 = S_2^2$  con una  $P < 0.05$ . Como estudio preliminar antes de aplicar la prueba de t de student, para pequeñas muestras. Siendo las hipótesis:  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$  contra  $H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$  hay o no diferencia entre las medias de los valores porcentuales.

El intervalo de confianza es del 95 %, el estadístico de prueba es:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(N_1-1)(S_1^2) + (N_2-1)(S_2^2)}{N_1 + N_2} (1/N_1 + 1/N_2)}}$$

La regla de decisión es; Región de rechazo de

$$H_0: \text{si } t \geq t_{\alpha/2} \quad \text{o} \quad t \leq -t_{\alpha/2}$$

Región de aceptación de

$$H_0: \text{si } -t_{\alpha/2} < t < t_{\alpha/2}$$

por lo tanto si la hipótesis alternativa es  $H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$  entonces la región de rechazo, definida como  $t \geq t_{\alpha/2}$  o  $t \leq -t_{\alpha/2}$  . es de dos colas.

Los valores de  $P < 0.05$  se consideran significativos.

## R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en sangre periférica se resumen de la siguiente manera; en la tabla 2 se muestra el valor porcentual y su desviación estándar de la viabilidad celular, de células formadoras de rosetas E y de células con el marcador CD2 y en la tabla 3 el valor porcentual y su desviación estándar de las células con los marcadores CD3, CD4, CD8 y la relación entre células CD4 y CD8 (CD4/CD8).

T A B L A 2

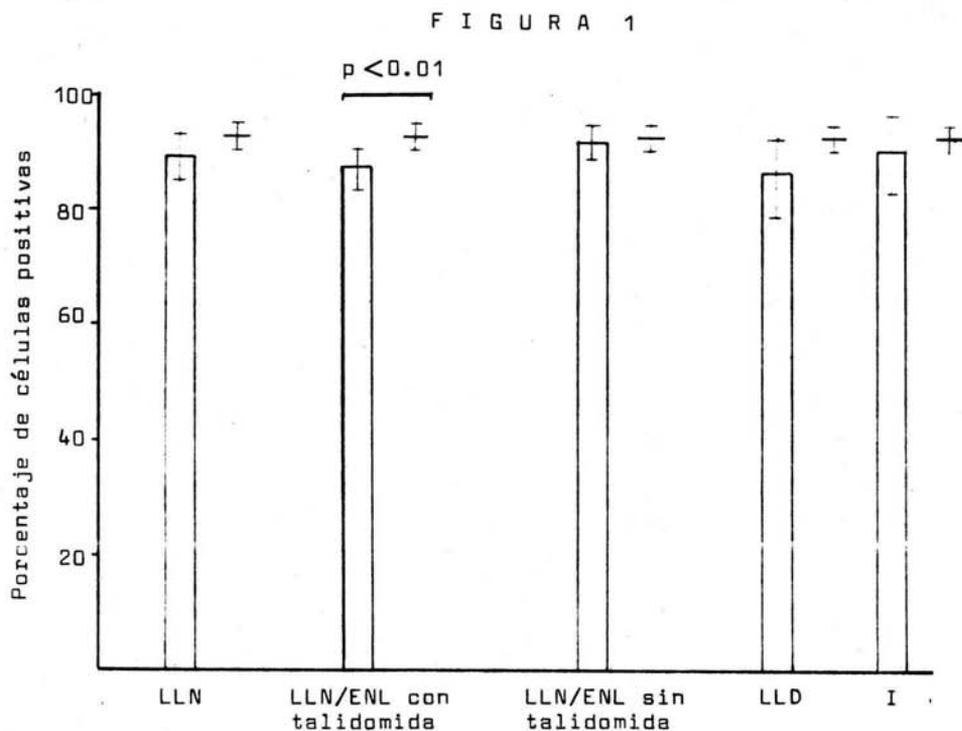
Grupo	Viabilidad	Rosetas-E	CD2
Testigo	92.92 ± 2.07 (12)	67.36 ± 10.07 (11)	70.50 ± 6.43 (10)
LLN	89.14 ± 4.10 (22)	62.81 ± 9.78 (21)	67.19 ± 7.90 (21)
LLN/ENL tratados con talidomida	86.83 ± 3.49 (6)	60.20 ± 9.58 (5)	63.00 ± 11.43 (6)
LLN/ENL sin tratamiento con talidomida	92.00 ± 2.83 (2)	-	-
LLD	86.67 ± 7.63 (6)	63.80 ± 11.99 (5)	73.82 ± 9.42 (11)
I	90.50 ± 6.61 (4)	63.25 ± 6.60 (4)	62.25 ± 3.30 (4)

T A B L A 3

Porcentaje de células positivas dentro de las células mononucleares, media  $\pm$  DS. (No. casos estudiados)

Grupo	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
Testigos	$\pm 62.69$ $\pm 7.43$ (19)	$\pm 50.15$ $\pm 6.63$ (20)	$\pm 23.90$ $\pm 4.40$ (20)	$\pm 2.15$ $\pm 0.38$ (20)
LLN	$\pm 59.67$ $\pm 9.16$ (12)	$\pm 46.21$ $\pm 8.10$ (24)	$\pm 30.75$ $\pm 7.46$ (24)	$\pm 1.60$ $\pm 0.47$ (24)
LLN/ENL tratados con talidomida	$\pm 53.25$ $\pm 7.23$ (4)	$\pm 40.67$ $\pm 7.03$ (6)	$\pm 20.50$ $\pm 4.04$ (6)	$\pm 2.00$ $\pm 0.22$ (6)
LLN/ENL sin tratamiento con talidomida	$\pm 56.67$ $\pm 9.45$ (3)	$\pm 46.67$ $\pm 5.86$ (3)	$\pm 15.67$ $\pm 4.93$ (3)	$\pm 3.13$ $\pm 0.75$ (3)
LLD	-	$\pm 48.55$ $\pm 6.99$ (11)	$\pm 31.82$ $\pm 7.41$ (11)	$\pm 1.58$ $\pm 0.35$ (11)
I	$\pm 49.25$ $\pm 6.50$ (4)	$\pm 29.60$ $\pm 10.29$ (5)	$\pm 26.60$ $\pm 9.40$ (5)	$\pm 1.17$ $\pm 0.44$ (5)

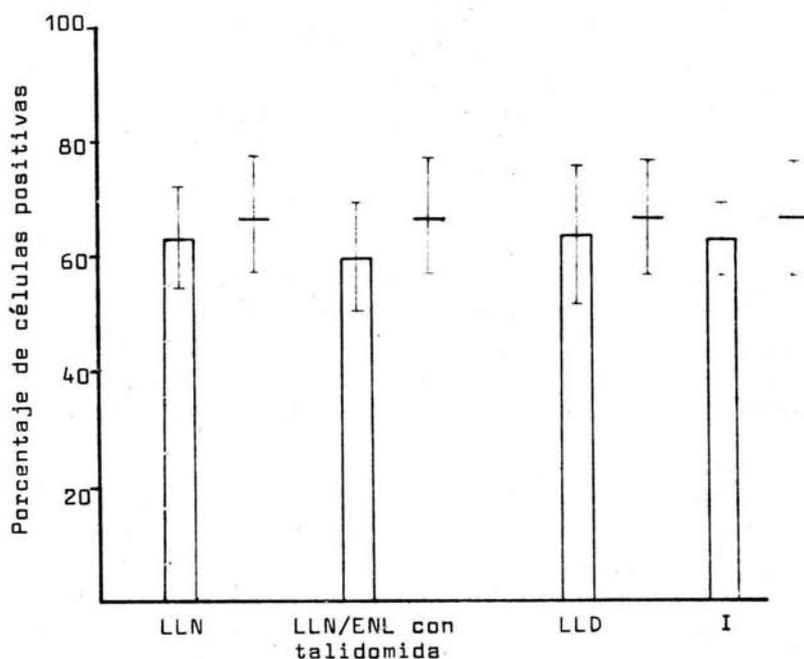
El análisis de viabilidad celular de los grupos problema mostró un porcentaje cercano al del grupo testigo. Sin embargo la prueba de F indicó que sólo en los grupos de pacientes con LLN/ENL con y sin tratamiento con talidomida se puede aplicar t de student la que advierte una disminución significativa en el primer grupo (figura 1).



Comparación del valor porcentual de la viabilidad celular entre grupos problema (barras) y el grupo testigo (  $\pm$  ). Media  $\pm$  DS.

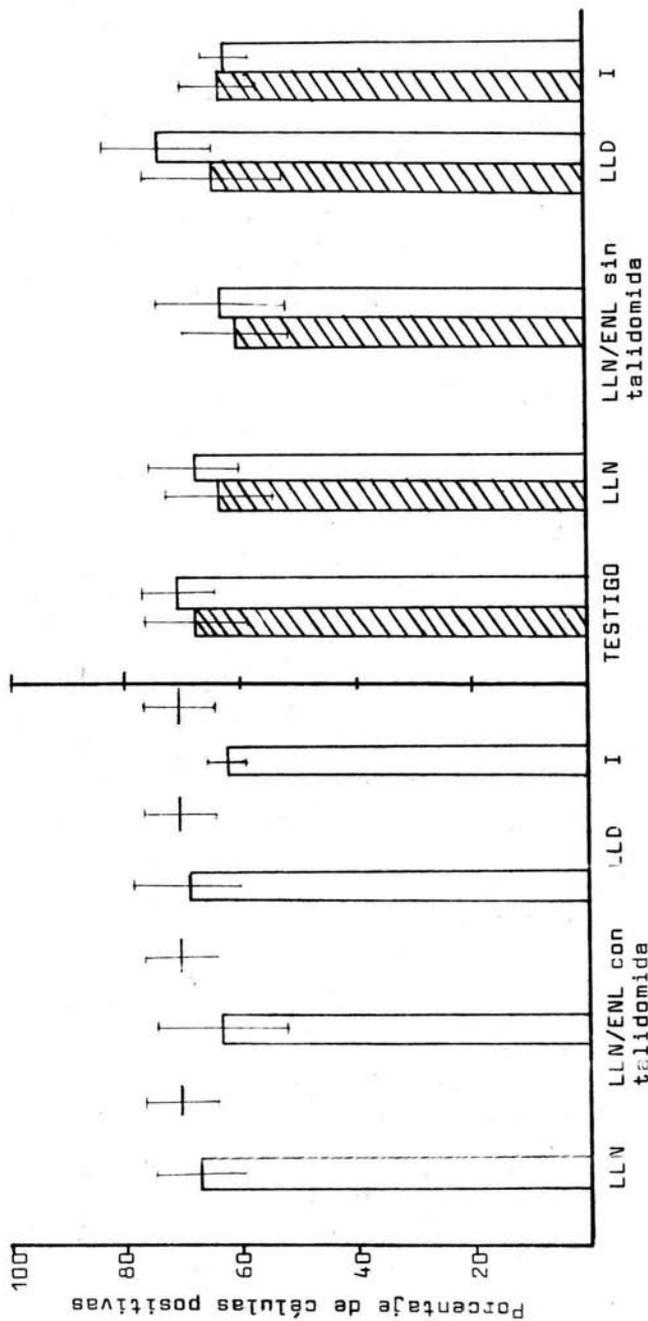
El valor porcentual de las células formadoras de rosetas-E y el de las células con el marcador CD2 no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo (figura 2 y 3). La relación entre células formadoras de rosetas-E versus linfocitos T - CD2 intragrupo mostró ser estadísticamente no significativo (figura 4).

F I G U R A 2



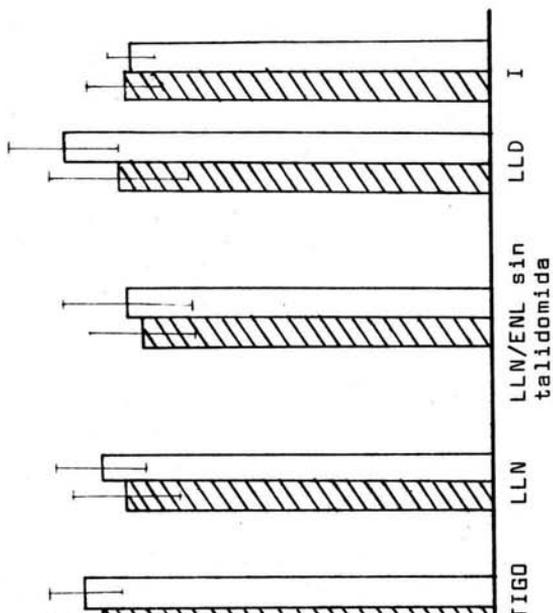
Comparación del valor porcentual de células formadoras de rosetas-E entre el grupo problema (barras) y el grupo testigo (—). — Media  $\pm$  DS.

FIGURA 3



Comparación del valor porcentual de células CD2 entre los grupos problema (barras) y el grupo testigo (†). Media  $\pm$  DS.

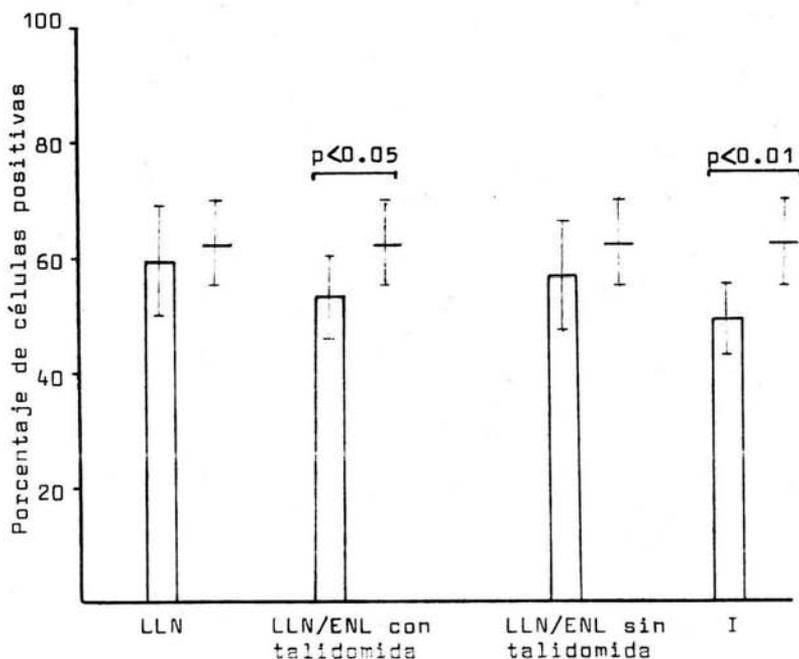
FIGURA 4



Comparación del valor porcentual entre células formadoras de rosetas-E (barras con diagonales) vs CD2 (barras vacías). Media  $\pm$  DS.

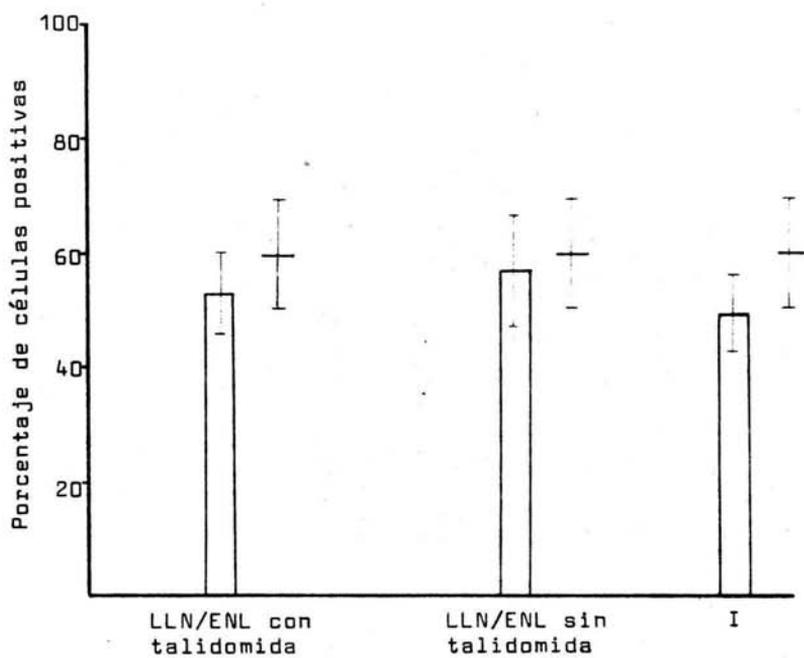
El anticuerpo anti-CD3 marcó cerca del 63 % de células mononucleares en sangre periférica de individuos aparentemente sanos, grupo testigo. En el grupo de pacientes con LLN/ENL tratados con talidomida así como en el de I registró una disminución significativa al confrontarse con el testigo (figura 5). Al comparar con el grupo de LLN no se encontraron diferencias significativas (figura 6).

F I G U R A 5



Comparación del valor porcentual de células CD3 entre grupos problema (barras) y el grupo testigo (†). Media ± DS.

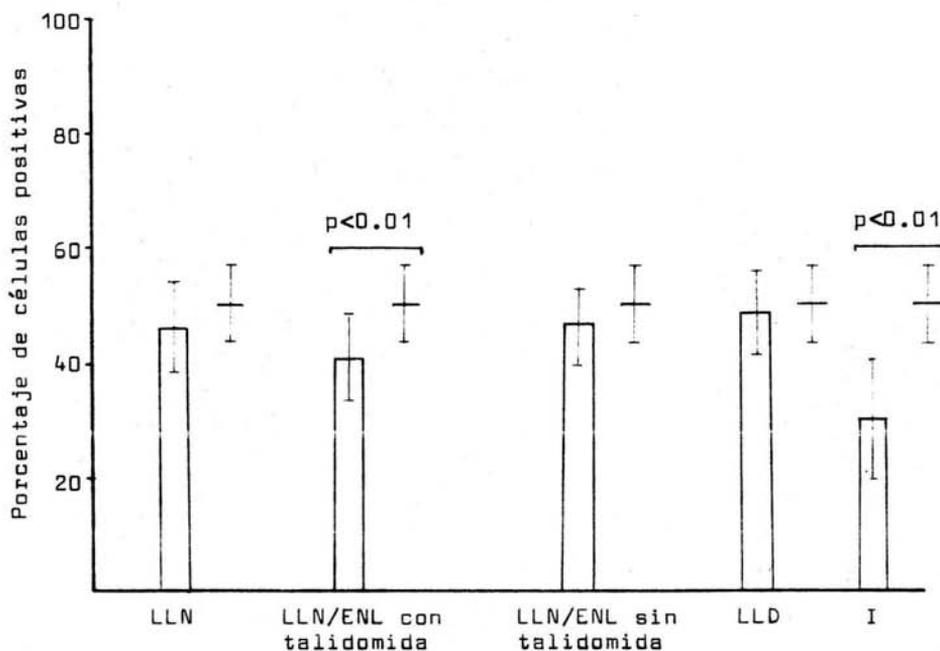
F I G U R A 6



Comparación del valor porcentual de células CD3 entre los grupos problema (barras) y el grupo de pacientes LLN ( $\pm$ ). Media  $\pm$  DS.

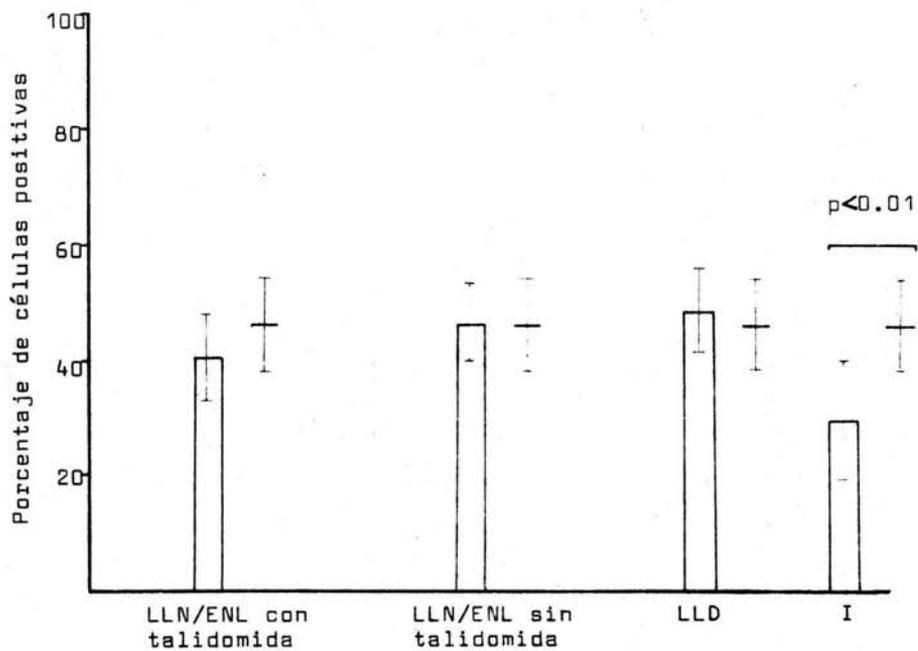
En el grupo testigo cerca del 50 % de células mononucleares - fueron CD4, al hacer el análisis estadístico equiparando contra éste se registró que en el grupo con LLN/ENL bajo tratamiento - con talidomida y en el de I hay una disminución significativa - (figura 7). Al relacionar con el grupo de LLN sólo se encontró diferencia significativa en el grupo de I en donde se manifestó una disminución de T cooperadores/inductores (figura 8).

F I G U R A 7



Comparación del valor porcentual de células CD4 de los grupos problema (barras) y del grupo testigo (±). Media ± DS.

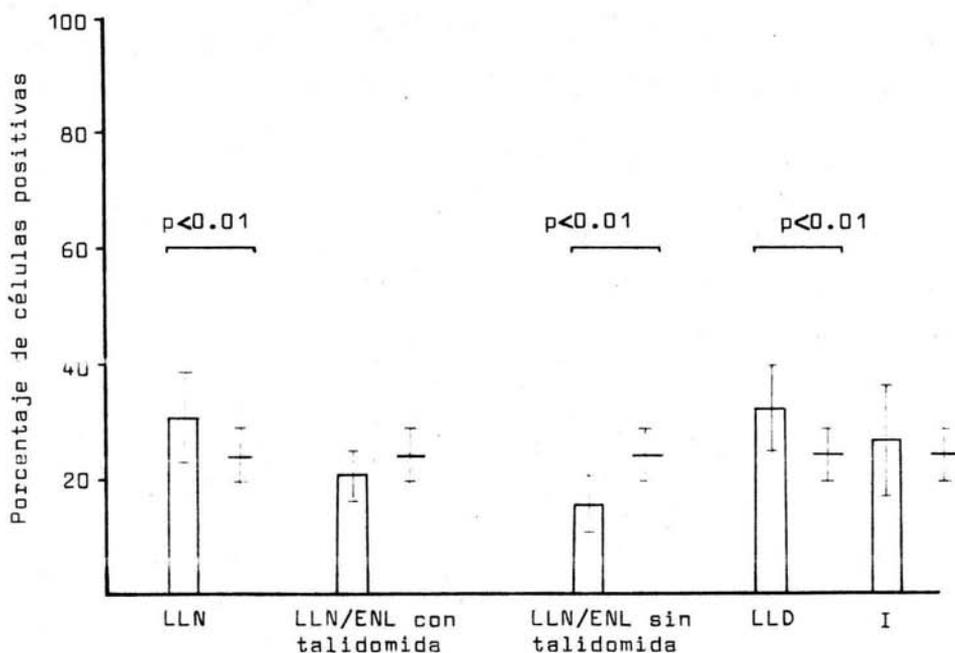
FIGURA 8



Comparación del valor porcentual de células CD4 entre los grupos problema (barras) y el grupo de pacientes LLN (  $\pm$  ). Media  $\pm$  DS.

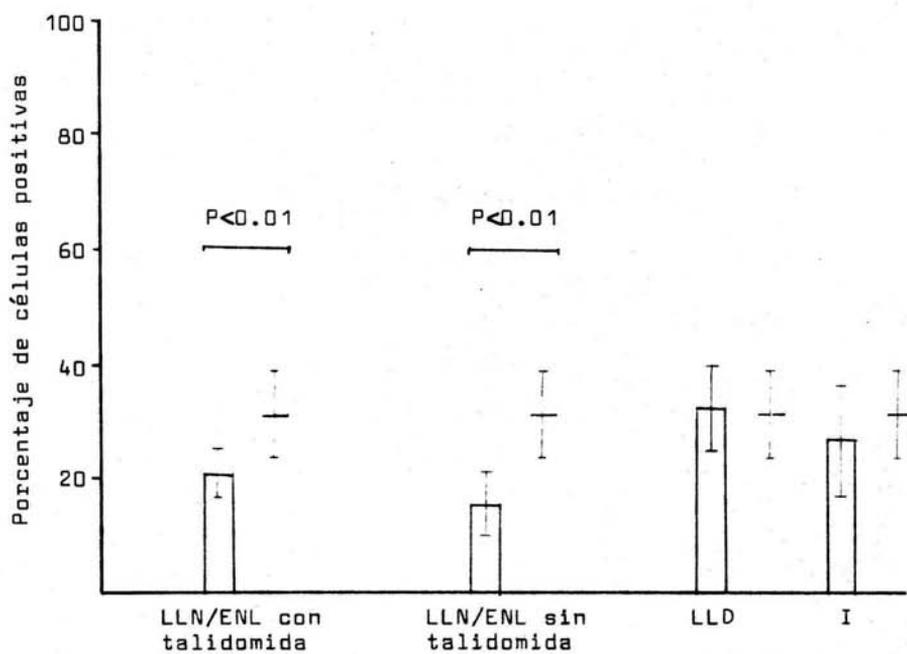
En los grupos de pacientes con LLN y LLD se encontró un aumento significativo en relación con el testigo, de células CD8 y en el grupo de LLN/ENL sin tratamiento con talidomida una disminución significativa. La prueba de F indicó que en el grupo de I no se pueden aplicar t de student (figura 9). Con respecto al grupo de pacientes lepromatosos nodulares no reaccionales se encontraron diferencias significativas en los linfocitos CD8 de los grupos LLN/ENL con y sin tratamiento anti-reacción leprosa en los cuales el valor está disminuido (figura 10).

FIGURA 9



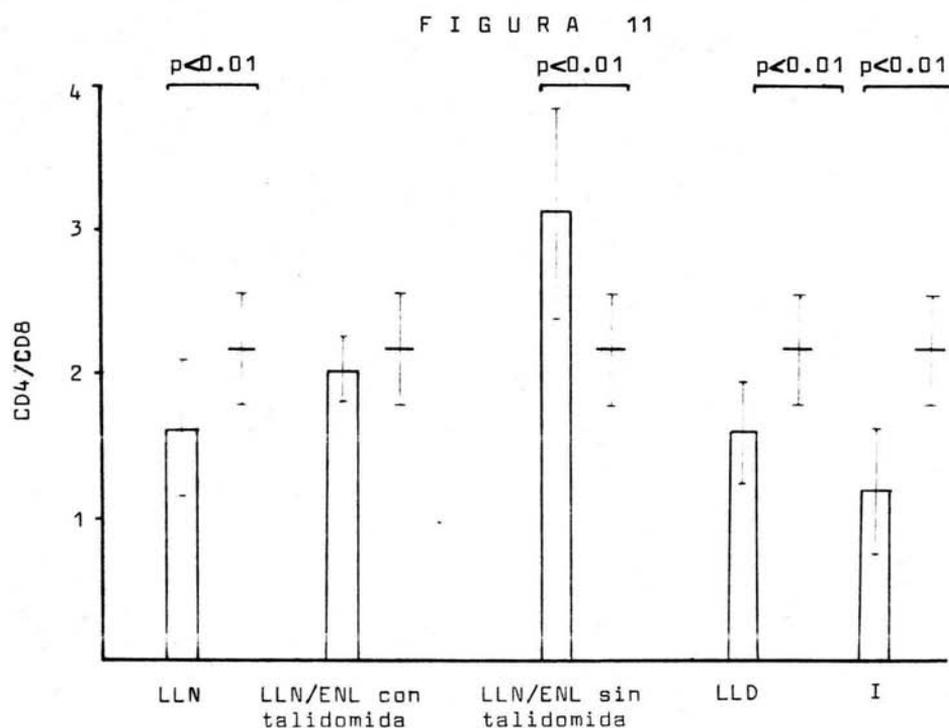
Comparación del valor porcentual de CD8 de los grupos problema (barras) con respecto al grupo testigo (I).  
Media ± DS.

FIGURA 10



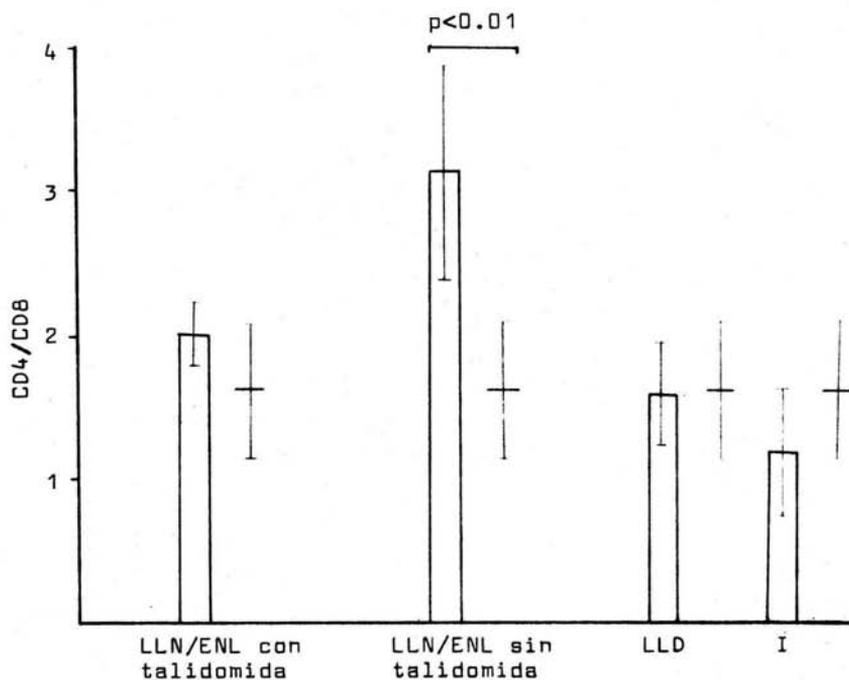
Comparación del valor porcentual de CDB de los grupos problema (barras) con respecto al grupo de LLN (†). Media  $\pm$  DS.

Los resultados obtenidos en cuanto a la relación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4/CD8) con respecto al grupo testigo, se encontró una disminución significativa en los grupos de pacientes con LLN, LLD e I mientras que en el grupo de pacientes LLN/ENL sin talidomida hubo un aumento en esta relación (figura 11). Al confrontar con el grupo de LLN sólo se registró un aumento significativo en la relación de los pacientes con LLN/ENL sin tratamiento con talidomida (figura 12).



Comparación de la relación CD4/CD8 de los grupos problema (barras) con respecto al testigo ( $\pm$ ).  
Media  $\pm$  DS.

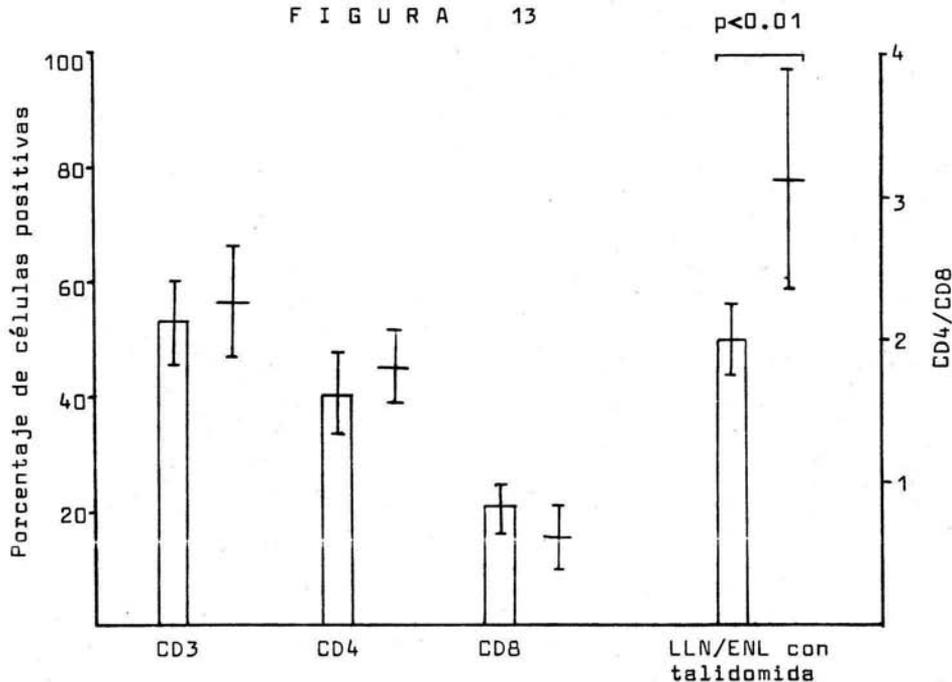
FIGURA 12



Comparación de la relación CD4/CDB de los grupos problema (barras) con respecto a los LLN (†). Media  $\pm$  DS.

Cuando el grupo de pacientes con LLN/ENL con tratamiento anti reacción leprosa se comparó con el grupo de LLN/ENL sin tratamiento anti-reacción leprosa, no se encontraron diferencias significativas en los valores de CD3, CD4 y CD8. Sin embargo en la relación CD4/CD8 se registró un valor menor por disminución de células CD4 y aumento de células CD8 aunque estadísticamente no significativo (figura 13).

F I G U R A 13



Comparación de lepromatosos reaccionales tratados con talidomida (barras) con respecto a lepromatosos reaccionales no tratados (  $\pm$  ).  
Media  $\pm$  DS.

## D I S C U S I O N

La deficiente respuesta inmunológica celular (RIC) específica para M.leprae conduce a una baja en la resistencia a la lepra - (18). Esta deficiencia no ha sido explicada claramente, pero - hay evidencias que apoyan la existencia de mecanismos supresores. En este sentido, Mhera y col. (29) demostraron la capacidad de - antígenos de M.leprae (lepromina de Dharmendra) para inducir su - presión de la respuesta a Con A en pacientes lepromatosos y limí - trofe lepromatosos, pero no en pacientes tuberculoides, contac - tos lepromino-positivos o en donadores normales. Además, pusie - ron en evidencia que las células no adherentes (linfocitos) prin - cipalmente están involucradas en la supresión, así como una pe - queña parte de las células adherentes, presumiblemente macrófa - gos. En un trabajo posterior, los mismos (30) demostraron que - las células no adherentes inductoras de supresión están compren - didas dentro del 20 al 30 % de células T identificadas por los - anticuerpos OKT5, OKT8 y por un suero de caballo anti-células T denominado TH<sub>2</sub>. La existencia de macrófagos supresores ha sido - propuesta por Nath y col. (38) entre otros investigadores, sugi - riendo que la supresión presente en la lepra lepromatosa puede - ser debida a la incapacidad de los macrófagos para manejar y pre - sentar el antígeno o por una activa supresión inmune mediada por - factores liberados por el macrófago, sin embargo los macrófagos - con apropiada activación son capaces de digerir a M.leprae (18).

Los resultados de viabilidad linfocitaria en muestras de pacientes sólo manifestaron una disminución estadísticamente significativa en los casos lepromatosos nodulares con ENL bajo régimen de talidomida, la determinación de la viabilidad de los linfocitos circulantes presentes en una muestra, no distinguen los que corresponden a las diferentes poblaciones de ellos, T, B y -nulos, por lo cual una disminución en la viabilidad de una de tales poblaciones no necesariamente se puede reflejar en los resultados obtenidos, debido a que es diferente la proporción de cada uno de ellos en la circulación. No obstante, los más abundantes son los linfocitos T y una disminución de su viabilidad podría reflejarse en los resultados obtenidos. Estos resultados pueden interpretarse como una manifestación de la alteración de alguna subpoblación de los linfocitos T en la lepra. La comprobación de esta hipótesis requiere de la separación de las células T y sus subpoblaciones y determinar su viabilidad lo que podría ayudar a entender los procesos inmunológicos involucrados en la lepra. Sin embargo, la prueba sólo se realizó con el propósito de determinar si la mayoría de las células estaban vivas en el momento de evaluar los marcadores de superficie ya que la muerte, por definición, tiende a alterar las estructuras internas como de superficie celular. Las viabilidades celulares fueron superiores al 80 %, un porcentaje cercano al del grupo testigo. Sin embargo, se tendría que aumentar el valor de n de cada grupo en estudio para que los parámetros de tendencia central y dispersión tiendan a una distribución normal y así poder usar el esta-

dístico de prueba apropiado para poder dar una conclusión.

Los diferentes sucesos que conducen a una respuesta específica exige la realización sucesiva de varias etapas poniendo en juego diversos tipos celulares en el que las subpoblaciones de linfocitos T tienen un papel importante en la activación y modulación de la RIC.

Los anticuerpos anti-CD2 y anti-CD3 son mitógenos para los linfocitos T lo cual implica, de una manera indirecta, que son las moléculas involucradas en el proceso normal de activación, aumento de la expresión del receptor de interleucina 2 (IL-2) y también la respuesta a IL-2 (67).

En cuanto a nuestros resultados, el porcentaje de células formadoras de rosetas-E como el de células CD2, de los grupos en estudio, no son diferentes al grupo testigo. Este marcador es una glicoproteína de 50 kd que es expresada a través de la ontogenia temprana de los linfocitos T y parece que juega un papel fisiológico importante como vía alterna de activación (45,63), en este sentido Muthukkaruppan (35) propone que producto (s) de M.leprae o material procesado por el macrófago derivado del bacilo, son capaces de interaccionar con el receptor-E (CD2) y de esta manera suprimir la respuesta proliferativa de las células T a antígenos y mitógenos resultando una inmunosupresión generalizada o específica dependiendo de la carga bacteriana. Nuestros resultados no sugieren un bloqueo de este receptor, pues no hay diferencias

significativas con respecto al testigo posiblemente porque sólo se registró el valor porcentual y no el número absoluto de linfocitos T y también puede ser atribuido al efecto de la quimioterapia. El análisis intragrupo no mostró diferencias entre las células formadoras de rosetas-E y las células CD2 lo que indica -- que no hay alteraciones en el marcador por efecto de productos solubles, al menos esto sugiere el hecho de comparar estos dos métodos para identificar este marcador.

El marcador CD3 forma parte de la unidad de reconocimiento antígeno/productos del complejo principal de histocompatibilidad (complejo T3-Ti) en los linfocitos T maduros, está comprendido por un heterodímero (Ti) con una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$  asociada no covalentemente con tres moléculas monomórficas pero distintas que conforman al receptor CD3 (1) sin embargo, hay evidencias de la existencia de una cuarta molécula componente del CD3 (76).

Al evaluar el marcador CD3 encontramos una disminución significativa, con respecto al grupo testigo, en los pacientes LLN con ENL tratados con talidomida como es reportado por Bullock y col. (7) y Rea y col. (43) y en desacuerdo con Bach y col. (2, 3) y Mshana y col. (33). Una disminución de este marcador también fue patente en el grupo de casos indeterminados. Considerando los reportes previos, nos damos cuenta de la gran heterogeneidad étnica de los grupos estudiados y también de la falta de datos con respecto al control del estado reaccional, de esta manera no se puede aseverar si el efecto es por causa del tratamiento o --

por otras diferencias. En los casos indeterminados la disminución posiblemente se debe a un fuerte desequilibrio en su estatus inmunológico como producto de la progresión de la infección leprosa. En el grupo de lepromatosos nodulares no reaccionales como en los reaccionales, sin régimen de talidomida, no hay cambios como reporta Bach y col. (2, 3) y Mshana y col. (33). Esto sugiere que la talidomida induce modulación de linfocitos T en pacientes LLN/ENL posiblemente inhibiendo la activación celular inducida por el estado reaccional. Cuando se compararon los grupos en estudio con respecto a LLN no se encontraron diferencias en CD3 lo que posiblemente indica que la infección mantiene un desequilibrio per se en las relaciones celulares involucradas en la forma polar lepromatosa de la enfermedad.

Las moléculas CD4 y CD8 son importantes en el reconocimiento y aumento en la interacción célula-célula a través de la unión específica a ligandos no polimórficos (para CD4 y CD8 son moléculas del MHC de clase II y I, respectivamente) de superficie celular. Este mecanismo de aumento en la interacción celular puede ser sólo necesario cuando el receptor de la célula T tiene baja afinidad por su ligando (MHC polimórfico/antígeno) en la activación (67), por lo que una evaluación de CD4 y CD8 ayudará a entender parte de un proceso dinámico en la interacción inmunológica huésped-parásito. Nuestros datos mostraron una disminución en la relación CD4/CD8 por aumento de CD8, como es reportado para LL por Wallach y col. (71,72) y Mshana y col. (33) y que están

en desacuerdo con los hallazgos de Van Vhooris y col. (70), Bach y col. (3), Rea y col. (44) y Bullock y col. (7). Así, nuestros resultados sugieren una mayor actividad de células T supresoras posiblemente específicas para antígenos de M.leprae como es reportado por Mhera y col. (28). Esos autores demostraron que las células CD8 supresoras de lepromatosos tienen una especificidad por el trisacarido terminal del glicolípido fenólico (antígeno específico de M.leprae) lo que posiblemente conduce a la falta de producción de IL-2 (21). Sin embargo, existe la posibilidad de que participen otros factores ya que se debe tener en cuenta que no todas las células CD8 identificadas van a ser específicas para antígenos de M.leprae, por lo que la interpretación de estos y otros resultados deben tomarse con cautela para dar una explicación de la patogénesis de la lepra.

En pacientes lepromatosos nodulares reaccionales sin tratamiento con talidomida, se registró una disminución de CD8 y aumento en la relación CD4/CD8 con respecto al testigo y LLN, como es reportado por Bach y col. (2,3), Mshana y col. (33), Wallach y col. (71,72) y Garraud y col. (17) y en desacuerdo con los resultados de Rea y col. (42) y Modlin y col. (31). En pacientes LLN/ENL tratados con talidomida se encontró una disminución de CD4 al confrontar con el testigo y disminución de CD8 con respecto a LLN, encontrándose la relación CD4/CD8 semejante al grupo testigo. Estos hallazgos sugieren que en el estado reaccional tipo II (ENL) hay un desequilibrio entre cooperación y supresión, es-

pecíficamente una baja en la actividad supresora (disminución de CDB), lo que se refleja en la relación CD4/CDB. La relación CD4/CDB de los pacientes tratados con talidomida tiende hacia los valores normales y clínicamente hay mejoría, esto hace suponer que la talidomida actúa como agente modulador de la RIC bloqueando a los linfocitos T activados. La disminución de CD3 y CD4 posiblemente amortigua la baja de actividad supresora, ya que hay disminución de CDB con respecto a lepromatosos nodulares no reaccionales.

Los pacientes LLN con ENL bajo régimen de talidomida presentaron una disminución en la relación CD4/CDB con respecto a los lepromatosos nodulares reaccionales no tratados, por efecto de la disminución de CD4 y aumento de CDB, aunque estadísticamente no significativo. Quizá por efecto del fármaco hay una tendencia hacia los valores encontrados en el grupo de LLN.

Esto sugiere que las células más involucradas en la reacción tipo II son CDB y que la talidomida induce regulación en la expresión de las moléculas CD3 y CD4 para contrarrestar la pérdida de actividad supresora, inducida por CDB, y la inducción de células cooperadoras/inductoras posiblemente modera el efecto de la respuesta inmunológica contra el individuo. Sin embargo Moncada y col. (32) reportan un aumento de CD4 por efecto de la talidomida. Esta discrepancia de resultados posiblemente se debe a que se registraron eventos diferentes en la evolución del estado reaccional y al número de casos estudiados.

De especial interés es el hecho de comprender las relaciones celulares involucradas en los casos indeterminados pues estos -- presentan los primeros estadios de la enfermedad y da la posibilidad de comprender mejor los procesos inmunológicos relacionados en la lepra. En este grupo a pesar del número limitado de casos estudiados debido a su difícil diagnóstico y disponibilidad, se encontró que hay una reducción en la relación CD4/CDB -- con respecto al testigo. Esta disminución de CD4 fue significativa tanto para el grupo testigo como para los LLN, lo que indica un fuerte desequilibrio en las proporciones celulares óptimas para montar una respuesta inmunológica adecuada, lo cual conduce al establecimiento de una infección por M.leprae, su progresión, la ausencia de una respuesta inmunológica limitante y la aparición de signos clínicos.

## C O N C L U S I O N E S

1. En el polo lepromatoso de la enfermedad (LLN y LLD) hay un desequilibrio de las relaciones celulares involucradas en la RIC, específicamente un aumento de linfocitos T supresores (CDB) lo que probablemente participa importantemente en la falta de respuesta específica para antígenos de M.leprae.

2. El estado reaccional tipo II parece que es precipitado por una alteración de los mecanismos cooperadores/supresores y que la talidomida actúa como un agente modulador de esta situación.

3. Los casos indeterminados presentan un fuerte desequilibrio en las poblaciones celulares comprometidas. Esto posiblemente sea un indicio de su futura tendencia hacia la forma polar lepromatosa.

## B I B L I O G R A F I A

1. Acuto, O. y Reinherz, E. L. (1985). The human T-cell receptor. Structure and function. *N. Engl. J. Med.* 312: 1100 - 1111
2. Bach, M. A. y Bach, J. F. (1981). The use of monoclonal anti-T cell antibodies to study T cell imbalances in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 45: 449 - 456
3. Bach, M. A.; Chatenoud, L.; Wallach, D.; Phan Dinhtuy, F. y Cottenot, F. I. (1981). Studies on T cell and functions in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 44: 491 - 500
4. Bjarvart, B.; Barnetson, F. S.; Kronvall, G. K.; Zurler, R. H. y Lambert, P. H. (1976). Immune complexes and complement hypercatabolism in patients with leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 26: 388 - 396
5. Böyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. S. Clin. Lab. Invest.* 21 (Suppl. 97): 77
6. Broune, S. G. (1976). *Acta clinica documenta geigy la lépre.* Ciba Geigy Switzerland, pp. 9 - 85
7. Bullock, W. E.; Watson, S.; Nelson, K. E.; Schaut, V.; Makonkawkeyoon, S. y Jacobson, R. R. (1982). Aberrant immunoregulatory control of B lymphocyte function in lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 49: 105 - 114

8. Committee on human leukocyte differentiation antigens: IUIS-WHO nomenclature subcommittee. (1984). Differentiation human leukocyte antigens: a proposed nomenclature. *Immunology today* 5: 158 - 159
9. Committee on human leukocyte differentiation antigen: IUIS-WHO nomenclature subcommittee. (1984). Proposed nomenclature for human leukocyte differentiation antigens a correction. *Immunology today* 5: 280
10. Chess, L.; MacDermott, R. P. y Schlossman, S. F. (1974). Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulation. I Quantitative isolation of human T and B cell and response to mitogens. *J. Immunol.* 113: 1113 - 1121
11. Chess, L.; MacDermott, R. P. y Schlossman, S. F. (1974). Immunologic function of isolated human lymphocytes subpopulation. II Antigen triggering of T and B cell in vitro. *J. Immunol.* 113: 1122 - 1127
12. Chess, L.; MacDermott, R. P. y Schlossman, S. F. (1975). Immunologic function of isolated human lymphocytes subpopulation. III Specific allogenic lympholysis mediated by human T cell alone. *J. Immunol.* 114: 982 - 987
13. Dirección General de Epidemiología, SSA (1981). Comportamiento de la endemia de la lepra en México durante 1980. *Bol. Epidem. año 1, No. 13*; 1 - 10
14. Dirección General de Epidemiología, SSA (1984). Informe epidemiológico anual 1982, Lepra/ *Bol. Epidem.* 4: 12 - 13

15. Draper, N. (1976). Cell walls of Mycobacterium leprae.  
Int. J. Lepr. 44: 95 - 98
16. Evans, R. L.; Lazarus, H.; Penta, A. G. y Schlossman, S. F.  
(1978). Two functionally distinct subpopulations of human  
T cells that collaborate in the generation of cytotoxic  
cells responsible for cell-mediated lympholysis. J. Immunol.  
120: 1423 - 1428
17. Garraud, O.; Ribierre, O. y Bach, M. A. (1986). A follow  
up of T-cell subsets and of anti-M.leprae antibody titer as  
measured by the FLA-ABS test in melanesian leprosy patients  
under polychemo therapy. Int. J. Lepr. 54: 38 - 45
18. Godal, T. (1978). Immunological aspects of leprosy:  
presents status. Prog. Allergy 25: 211 - 242
19. Gorodezky, C.; Granados, G. y Flores, J. (1986). Role of  
class II MHC products in the ability of monocytes to eliminate  
M.leprae. (Abstracts). 6th International Congress of  
Immunology, Toronto, Canadá pp. 579
20. Hansen, G. N. A. (1874). Investigations concerning the  
etiology of leprosy. Norsk Magazin for Laegevidenskaben 4:  
76 - 79
21. Haregewoin, A.; Godal, T.; Mustafa, A. S.; Belehay, A. y  
Yemaneberham, T. (1983). T-cell conditioned media reserve  
T-cell unresponsiveness in lepromatous leprosy. Nature 303:  
342 - 344
22. Hunter, G. W.; Frye, W. W. y Swartzwelder, S. C. (1973).  
Manual de medicina tropical. 3a. ed. México, La Prensa Médi  
ca Mexicana pp. 223 - 239

23. Howard, F. D.; Ledbetter, J. A.; Wong, J.; Bieber, C. P.; Stinson, E. B. y Herzenberg, L. A. (1981). A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation. *J. Immunol.* 126: 2117 - 2122
24. Jopling, W. H. (1978). *Handbook of leprosy*. 2nd ed. London Heineman pp. 68 - 74
25. Kaklamain, E.; Drouga, M.; Konzoutzakoglou, K.; Keralis, D.; Trichoupoulos, D. (1977). Cellular immunity in patients with leprosy. Circulating T lymphocytes and their response to PHA in leprosy. *Int. J. Lepr.* 45: 241 - 247
26. Kamoun, M.; Martin, P. J.; Hansen, J. A.; Brown, M. A.; Siadak, A. M. y Nowinski, R. C. (1981). Identification of a human T lymphocyte surface protein asociate with the E-rosette receptor. *J. Exp. Med.* 153: 207 - 212
27. Köhler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495 - 497
28. Mehra, V.; Brennan, P. J.; Rada, E.; Convit, J. y Bloom, B. R. (1984). Lymphocyte suppression in leprosy induced by unigue *M.leprae* glicolipid. *Nature* 308: 194 - 196
29. Mehra, V.; Mason, L. H.; Fied, J. P. y Bloom, B. R. (1979). Lepromin-induce suppressor cell in patients with leprosy. *J. Immunol.* 123: 1813 - 1818
30. Mehra, V.; Mason, L. H.; Rothman, W.; Reinherz, E.; Schlossman, V. L. y Bloom, B. R. (1980). Delineation of a

- human T cell subset responsible for lepromin-induced suppression in leprosy patients. *J. Immunol.* 125: 1183-1188
31. Modlin, R. Z.; Bakke, A. C.; Vaccaro, S. A.; Horwitz, D. A.; Taylor, C. R. y Rea, T. H. (1985). Tissue and blood T- lymphocyte subpopulations in eritema nodosum leprosum. *Arch. Dermatol.* 121: 216 - 219
32. Moncada, B.; Baranda, M. L.; González-Amaro, R.; Urbina, R. y Loredó, C. E. (1985). Thalidomide-effect on T cell subsets as a possible mechanism of action. *Int. J. Lepr.* 53: 201-205
33. Mshana, R. N.; Haregewoin, A.; Harboe, M. y Belehú, A., (1982). Thymus dependent lymphocytes in leprosy. I. T lymphocytes subpopulations defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Lepr.* 50: 291 - 296
34. Mshana, R. N. (1983). Hypothesis: Erythema nodosum leprosum is precipitated by an imbalance of T lymphocytes. *Lepr. Rev.* 53: 1 - 7
35. Muthukkaruppan, V. R. (1986). A possible role for E-receptor in immunosuppression in leprosy. *Indian J. Lepr.* 58: 389-394
36. Myrvang, B.; Godal, T.; Ridley, D. S.; Folland, S. S. y Song, Y. K. (1973). Immune responsiveness to mycobacterium leprae and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 14: 541 - 553
37. Nath, I.; Curtis, J.; Sharma, A. K. y Talwar, G. P. (1977). Circulation T-cell numbers and their mitogenic potential in leprosy-correlation with mycobacterial load. *Clin. Exp. Immunol.* 29: 393 - 400

38. Nath, I.; Van Rood, J. J.; Mehra, N. K. y Vaidya, M. C. (1980). Natural suppressor cell in human leprosy. The role of HLA-D identical peripheral lymphocytes and macrophages in the in vitro modulation of lymphoproliferative response. Clin. Exp. Immunol. 42: 203 - 210
39. Nelson, D. S.; Nelson, M.; Thurston, J. M.; Waters, M. F. R. y Pearson, D. M. H. (1971). Phytohemagglutinin induce lymphocyte transformation in leprosy. Clin. Exp. Immunol. 9: 33 - 43
40. Ottenhoff, T. H. M.; Elferink, B. G. y DeVries, R. (1986). HLA class II immune response genes regulating leprosy type. (Abstracts). 6th International Congress of Immunology. Toronto, Canadá, pp. 579
41. Pollack, M. S. y Rich, R. R. (1985). The HLA complex and the pathogenesis of infectious diseases. J. Infect. Dis. 151: 1 - 8
42. Robello, F. E. y Latapí, F. (1953). Reports of advances in immunopathology. VI International Leprosy Congress. Int. J. Lepr. 21: 504
43. Rea, T. H., Bakke, A. C., Parker, J. W., Modlin, R. L. y Horwitz, D. A. (1984). Peripheral blood T lymphocyte subsets in leprosy. Int. J. Lepr. 52: 311 - 317
44. Rees, R. F. W. (1971). Introductory review of leprosy research the impact of experimental human leprosy in the mous on the leprosy research. Int. J. Lepr. 39: 201 - 215

45. Reinherz, E. L. (1985). A molecular basis for thymic selection: regulation of T11 induced thymocyte expansion by the T3-Ti antigen/MHC receptor pathway. *Immunol. today* 6: 75 - 79
46. Reinherz, E. L.; Kung, P. C.; Goldstein, G. y Scholssman, S. F. (1979). Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4061 - 4065
47. Reinherz, E. L.; Kung, P. C.; Goldstein, G. y Scholssman, S. F. (1979). A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cell. *J. Immunol.* 123: 312 - 317
48. Reinherz, E. L.; Kung, P. C.; Goldstein, G. y Scholssman, S. F. (1979). Further characterization of the human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 123: 2894 - 2896
49. Reinherz, E. L.; Kung, P. C.; Goldstein, G. y Scholssman, S. F. (1980). A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic suppressor T cell subset previously defined by a hetero antiserum termed TH<sub>2</sub>. *J. Immunol.* 124: 1301 - 1307
50. Reinherz, E. L., Kung, P. C.; Bread, J. M.; Golstein, G. y Scholssman, S. F. (1980). T cell requirements for generations of helper factor(s) in man: analysis of the subsets involved. *J. Immunol.* 124: 1883 - 1887
51. Reinherz, E. L., Kung, P. C.; Goldstein, G., Levey, R. H. y Scholssman, S. F. (1980). Discrete stages of human

- intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 1588 - 1592
52. Reinherz, E. L. y Schossman, S. F. (1980). The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell.* 19: 821 - 827
53. Reinherz, E. L.; Strelkauska, A. J.; O'Brien, C. y Schollesman, S. F. (1979). Phenotypic and functional distinctions between the  $TH_2^+$  and  $JRA^-$  T cell subsets in man. *J. Immunol.* 123: 83 - 86
54. Report of WHO/LARC sponsored Workshop on Human B and T cell (1974). *Scand. J. Immunol.* 3: 521 - 532
55. Report of WHO/IMM. TECH/79.1. WHO (1979). Handbook of immunological techniques. pp. 1 - 14
56. Ridley, D. S. y Jopling, W. H. (1962). A clasification of leprosy four research purposes. *Lepr. Rev.* 33: 119 - 128
57. Ridley, D. S. y Jopling, W. H. (1966). A clasification of leprosy according to immunity. A five group sistem. *Int. J. Lepr.* 34: 255 - 273
58. Ridley, D. S. (1971). Pathology and bacteriology of early lesion in leprosy. *Int. J. Lepr.* 39: 216 - 224
59. Sansonett, P. y Lagrange, P. H. (1981). The immunology of leprosy: speculations on the leprosy spectrum. *Rev. Infect. Dis.* 3: 422 - 469
60. Sasazuki, T.; Tsukamoto, K.; Kikuchi, I.; Hirayama, K.; Matsuchita, S. y Yusunami, M. (1986). HLA linked immune suppression gene maps within HLA-DQ subregion. (Abstracts).

6th International Congress of Immunology. Toronto, Canadá  
pp. 584

61. Saul, A. (1975). Lecciones de dermatología. 4a ed. México. Francisco Méndez Cervantes, pp. 149 - 191
62. Sharma, V. K.; Saha, K. y Sehgal, V. N. (1982). Serum immunoglobulins and auto-antibodies during and after erythema nodosum leprosum (ENL). Int. J. Lepr. 50: 159 - 163
63. Siliciano, R. F.; Pratt, S. C.; Schmidt, R. E.; Ritz, J. y Reinherz, E. L. (1985). Activation of cytolytic lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. Nature 317: 428 - 430
64. Skinsnes, O. K.; Godal, T.; Abe, M.; Job, C. K.; Pearson, J. M. H.; Ridley, D. S.; Ulrich, M. y Weiser, R. S. (1973). Reports of advances in immunopathology. X International Leprosy Congress. Int. J. Lepr. 41: 456 - 461
65. Stanford, J. L.; Rook, G. A. W.; Convit, J.; Godal, T.; Kronvall, G.; Rees, R. J. W. y Walsh, G. P. (1975). A preliminary taxonomic studies on the leprosy bacillus. Br. J. Exp. Path. 56: 579 - 583
66. Strelkauska, A. J.; Schauf, V.; Wilson, B. S.; Chess, L. y Schlossman, S. F. (1978). Isolation and characterization of naturally occurring subclasses of human peripheral blood T cells with regulatory functions. J. Immunol. 120: 1278 - 1282
67. Townsend, A. (1985). Molecules at work on the T cell surface. Immunol. today 6: 68 - 70

68. Turk, J. L. y Waters, M. F. R. (1971). Immunological significance of changes in lymph nodes across the leprosy spectrum. *Clin. Exp. Immunol.* 8: 363 - 376
69. Van Eden, E.; González Nieves, M.; DeVries, R. R. P.; Convit, J. y Van Rood, J. J. (1985). HLA-like control of predisposition to lepromatous leprosy. *J. Infects. Dis.* 151: 9 - 14
70. Van Voorhis, W. C.; Kaplan, G.; Sarho, E. N.; Horwitz, M. A.; Steinman, R. M.; Levis, W. R.; Nogueira, N.; Hair, L. S.; Gattas, C. R.; Arrich, B. A. y Cohn, Z. A. (1982). The cutaneous infiltrates of leprosy. Cellular characteristics and the predominate T-cell phenotype. *N. Engl. J. Med.* 307: 1593 - 1597
71. Wallach, D.; Cottenot, F. y Bach, M. A. (1982). Imbalances in T cell subpopulations in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* 50: 282 - 290
72. Wallach, D.; Flageul, B.; Bach, M. A. y Cottenot, F. (1984). The cellular content of dermal leprous granuloma: An immuno-histological approach. *Int. J. Lepr.* 52: 318 - 325
73. Wemambu, S. N. C.; Turk, S. L.; Waters, M. F. R. y Rees, R. J. W. (1969). Erythema nodosum leprosum. A clinical manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet* 2: 933 - 935
74. Weir, D. M. (1967). *Handbook of experimental Immunology*. London, Blackwell, pp. 1163 - 1206
75. Weir, D. M. (1979). *Handbook of experimental Immunology*. 3rd. ed. London, Blackwell 2: 2310

76. Weissman, A. M.; Samelson, L. E. y Klausner, R. D. (1986).  
A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex.  
Nature 324: 480 - 482