



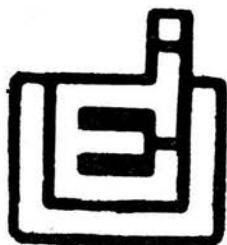
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
I Z T A C A L A

ANALISIS MOLECULAR DEL RECEPTOR DE  
LA CELULA T EN LA LEPROMATOSA

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
**P R E S E N T A :**  
**MONICA MORENO GALVAN**



MEXICO, D. F.

JUNIO, 1995



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOGENETICA BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. CLARA GORODEZKY LAUFERMAN JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOGENETICA Y LA COASESORIA DE LA M EN C ANGELICA OLIVO, JEFE DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOGENETICA.

**CON TODO MI AMOR**

**A MI MAMA POR HABERME DADO TODO SU APOYO Y CARIÑO  
DURANTE TODA MI VIDA.**

**A MIS HERMANOS JUAN MANUEL Y LUIS CARLOS**



DOY LAS GRACIAS A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE ALGUNA MANERA COLABORARON EN LA REALIZACION DE ESTA INVESTIGACION.

EN LA PARTE DE BIOLOGIA MOLECULAR:

M EN C.	ANGELICA OLIVO
QFB.	HECTOR DEBAZ
PAS EN BIOL.	VICTOR JUAREZ
TEC.	ARTURO HERNANDEZ
PROFESORA	M. TERESA PELLERANO
QFB.	DOLORES GOMEZ
QUIM.	CARMEN ALAEZ

POR LA TIPIFICACION DE LOS ANTIGENOS HLA:

BIOL.	GABRIELA DE LA ROSA
-------	---------------------

POR SU AYUDA EN LA REALIZACION DE FIGURAS Y DIBUJOS:

BIOL.	MARIO PERALTA
-------	---------------

QUIERO EXPRESAR MI PROFUNDA GRATITUD A LOS DRS. EDUARDO CASTRO Y OBDULIA RODRIGUEZ, QUIENES SELECCIONARON CUIDADOSAMENTE A LOS PACIENTES INCLUIDOS EN ESTE TRABAJO. ASI MISMO AGRADEZCO SINCERAMENTE A TODOS LOS DONADORES SANOS QUE SE INCLUYERON EN ESTE ESTUDIO.

MI SINCERO AGRADECIMIENTO AL DR. TAK W. MAK DE "THE ONTARIO CANCER INSTITUTE, UNIVERSITY OF TORONTO", TORONTO, CANADA POR LA DONACION DE LAS SONDAS DEL TCR AL DEPARTAMENTO DE INMUNOGENETICA. SIN ESTE MATERIAL HABRIA SIDO IMPOSIBLE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

CON MUCHO CARIÑO, DOY LAS GRACIAS A LA DRA. CLARA  
GORODEZKY POR BRINDARME SU PACIENCIA, APOYO Y SABIOS  
CONSEJOS. ES USTED UN GRAN EJEMPLO, POR ESO LA RESPETO.

**DE MANERA MUY ESPECIAL A ANGELICA OLIVO Y A TESI PELLERANO  
POR ESTAR SIEMPRE AHI.**

**A MIS COMPAÑEROS DE GENERACION:**

**TANIA MACOUZET**

**ALEJANDRA NIETO**

**FRANCISCO ANGUIANO**

**ENRIQUE MARTINEZ**

**MARIO PERALTA**

**JOSE LUIS VILLARREAL**

# INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
1. <u>Respuesta inmunológica</u>	2
1.1 Respuesta inmunológica humoral	3
1.2 Respuesta inmunológica celular	3
a) Los linfocitos T	3
a') Subpoblaciones de linfocitos T	5
b) El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el humano	6
c) Fase efectora de la respuesta inmunológica celular	7
1.3 Presentación del antígeno	9
1.4 Inducción de tolerancia	13
a) Teoría de selección clonal	14
b) Anergia clonal	14
c) Supresión mediada por células T	15
2. <u>Receptor de la célula T (TCR)</u>	15
2.1 Estructura de los genes del TCR	16
a) Región variable	16
b) Región de unión	18
c) Región de diversidad	18
d) Región constante	18
2.2 Organización genética	19
a) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\alpha$	19
b) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\beta$	19
c) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\gamma$	19

d) Genes que codifican para la síntesis de la cadenas $\delta$	19
e) Mecanismos de recombinación de los genes del TCR	20
2.3 Generación de la diversidad. Repertorio de reconocimiento antigénico	24
2.4 Estructura de las cadenas del TCR	24
a) Estructura primaria	24
b) Estructura secundaria y terciaria	26
c) Heterodímero $\alpha\beta$	26
d) Heterodímero $\gamma\delta$	27
2.5 El TCR y las enfermedades	27
<b>3. La lepra</b>	31
3.1 Aspectos epidemiológicos	31
3.2 Características clínicas e inmunológicas	31
3.3 Marcadores genéticos que determinan la susceptibilidad a la lepra	36
3.4 Alteraciones del TCR en la lepra y otras infecciones	37
<b>III. OBJETIVOS</b>	40
1. General	40
2. Particulares	40
<b>IV. HIPOTESIS</b>	41
<b>V. METODOS</b>	42
<b>VI. RESULTADOS</b>	50
<b>VII. DISCUSION</b>	71
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	79
<b>IX. APENDICE</b>	81
<b>X. BIBLIOGRAFIA</b>	84

## I. RESUMEN

La inmunosupresión en la lepra lepromatosa (LL) se debe parcialmente a defectos en el uso del receptor de la célula T (TCR), particularmente de variantes de los genes  $\gamma$ ,  $\delta$  aunque se han descrito rearrreglos en los genes del TCR- $\beta$ . Más aún, existe una mayor densidad de células  $\gamma\delta$  en los pacientes con lepra tuberculoide (TT) que en los lepromatosos (LL). Además, nuestro grupo y otros han descrito también un gen Is (de supresión inmunológica) ligado al DQ1 que condiciona la expresión de la LL. Con estos datos, hemos analizado los genes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  del TCR utilizando el método RFLP. Todos los individuos se tipificaron para antígenos HLA clase I y II. Se incluyeron 22 pacientes y 22 testigos. Se obtuvo DNA genómico a partir de leucocitos, el cual se digirió con diferentes enzimas de restricción (Eco RV, Eco RI y Hind III) y se hibridó con las sondas específicas para  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . A continuación se muestran las asociaciones significativas.

SONDA	REGION	ENZIMA	ASOCIACION/TCR	HLA
$\alpha 2$	VJC	Eco RI	Disminuída en LL	-
$\gamma 1$	V $\gamma$ 1	Eco RI	Disminuída en LL	DQ1,DQ3
$\gamma 3$	C $\gamma$ 2	Eco RI	Disminuída en LL	DQ1,DQ3
$\delta 1$	V $\delta$ 2	Eco RI	Disminuída en LL	DQ1
$\delta 2$	J $\delta$ 2	Eco RI	Disminuída en LL	DQ1

Los resultados muestran claramente un defecto importante en el polimorfismo de los genes del TCR  $\gamma\delta$  aunque también  $\alpha\beta$ , posiblemente originado en la línea germinal, el cual contribuye a la inmunosupresión en LL. La ausencia de bandas en los mismos individuos indica que el defecto probablemente se hereda de forma homocigótica. Ambos subtipos de la molécula DQ1, es decir, DQ5 y DQ6 están ligados a la inmunosupresión en la lepra, sugiriendo que los aminoácidos conservados en el nicho de DQ1 son críticos en el reconocimiento del péptido de *M. leprae*. Los residuos libres del péptido bacteriano accesibles al TCR, pueden unirse a las cadenas  $\gamma\delta$  expresadas en las células Th2, capaces de disparar una respuesta de supresión que favorece el desencadenamiento del polo maligno de la lepra. Los hallazgos son relevantes para el diseño de un posible método de terapia génica.

## II. INTRODUCCION

### 1. *Respuesta inmunológica*

El cuerpo humano se encuentra en una lucha constante contra agentes que lo invaden, los cuales son eliminados o neutralizados por los componentes del sistema inmunocompetente que se encarga de la defensa del organismo. La respuesta inmunológica se inicia con el reconocimiento del antígeno extraño o propio modificado, lo que conlleva a la activación y proliferación de linfocitos (fase inductora), que sintetizan y secretan sustancias y moléculas capaces de eliminar al agente inductor (fase efectora).

En el primer contacto del organismo con un agente extraño, actúan los mecanismos inespecíficos de protección, que detienen o neutralizan al agente extraño mediante las "barreras de primer contacto" o mediante moléculas y células inespecíficas. (Estos mecanismos reciben el nombre de "inmunidad innata"). El agente extraño también puede provocar la activación de células específicas que tienen capacidad de "memoria", por lo que ante un segundo contacto con el antígeno se despierta una respuesta secundaria que incrementa la respuesta inmunológica específica. Este tipo de inmunidad recibe el nombre de "inmunidad adquirida o específica" [1,2].

En los mecanismos de inmunidad innata participan la piel, las mucosas, sustancias liberadas por los macrófagos como el interferon  $\alpha$  y  $\beta$  (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), componentes del complemento, células NK (natural killer), células fagocíticas como los macrófagos y polimorfonucleares, cuyas funciones primordiales son las de quimiotaxis, de opsonización y de endocitosis entre otras [1,2].

La inmunidad específica se caracteriza por la participación de las subpoblaciones de los linfocitos B y T [1,2]. La respuesta inmunológica específica, se divide en 2 tipos: 1) La inmunidad humoral y 2) La inmunidad celular.

### 1.1 La respuesta inmunológica humoral

Puesto que la respuesta inmune humoral no es central para este trabajo, sólo se menciona brevemente.

Entre las funciones de los linfocitos B se encuentra la síntesis y secreción de anticuerpos que intervienen en la fase efectora de la respuesta inmunológica llamada respuesta humoral. Cuando los anticuerpos se hallan unidos a la membrana del linfocito B, actúan como receptores específicos reconociendo al antígeno para que sea internalizado y procesado, promoviendo que la célula B se transforme en una célula plasmática que es la célula terminal efectora que sintetiza y secreta los anticuerpos al micromedio ambiente del organismo. En el cuadro 1 se resumen las actividades biológicas de las inmunoglobulinas o anticuerpos.

### 1.2 Respuesta inmunológica celular

#### a) Los linfocitos

Las células o linfocitos T son el resultado del desarrollo y maduración de una célula precursora que viene de la médula ósea y que se deposita en el timo, donde se producen, desarrollan y diferencian los linfocitos T, que después migran hacia la periferia. Los linfocitos T son células primordiales en la respuesta inmunológica celular y ejercen en su fase efectora funciones de inducción, regulación, destrucción de patógenos y de elementos nocivos. La respuesta inmune celular es de gran importancia en muchas



### **CUADRO 1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS Igs**

	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>IgM</b>	<b>IgD</b>	<b>IgE</b>
<b>Características principales</b>	Es la más abundante; combate a los microorganismos y sus toxinas; es la más importante en los tejidos, y la más importante en la respuesta secundaria.	Es la Ig principal en las secreciones y en las mucosas y la primera barrera de protección específica.	Es la primera en producirse durante la activación de la respuesta inmunológica. Tiene gran actividad aglutinante. Es intravascular, es la más importante en la respuesta primaria.	Se encuentra en la superficie de la mayoría de los linfocitos.	Es la responsable de los síntomas de alergia. Se eleva durante las infecciones parasitarias, 1ª barrera de protección externa del organismo junto con la IgA.
<b>Fija complemento</b>					
<b>via clásica</b>	<b>++</b>	-	<b>+++</b>	-	-
<b>via alterna</b>	-	<b>+</b>	-	-	-
<b>Atraviesa placenta</b>	<b>++</b>	-	-	-	-
<b>Fijación de basófilos</b>	-	-	-	-	<b>++</b>
<b>Se une a macrófagos y polimorfo nucleares</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	-	-	<b>+</b>

situaciones fisiológicas y patológicas, tales como la eliminación específica de células infectadas por virus o células tumorales, la síntesis y secreción de sustancias llamadas linfocinas que actúan sobre diferentes células, incluyendo al mismo linfocito T que se activó originalmente, también estimulan otras células para amplificar y hacer más eficiente a la respuesta inmunológica. La respuesta inmunológica celular juega un papel fundamental en la protección contra las infecciones intracelulares y el cáncer [3,4,5].

a`) Subpoblaciones de linfocitos

En la actualidad se conocen dos tipos o subpoblaciones de linfocitos T que se identifican por los marcadores que expresan en la superficie: las células citotóxicas (Tc) que expresan al CD8 y las células cooperadoras (Th) que expresan al CD4. Las células Tc y Th se han dividido en subgrupos, que se diferencian por su función y el tipo de linfocina que secretan. La célula Th se divide en Th1 productora de IFN- $\gamma$  e IL-2; y la Th2 productora de IL-4, IL-5 e IL-10. Las células Tc1 producen principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2, mientras que las Tc2 secretan IL-4. A esta última célula Bloom y col, [6] la llamaron supresora porque se le ha encontrado presente en las lesiones en pacientes con lepra lepromatosa, en los que se sabe que hay una supresión específica de la respuesta inmunológica celular. Además han logrado clonar estas células *in vitro* y las clonas son capaces de suprimir la respuesta específica de células normales cuando se agregan a cultivos celulares normales.

Las Tc reconocen al antígeno (extraño o propio modificado) en general en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad clase I, los cuales están presentes en todas las células y por lo tanto en células infectadas por virus o alteradas por ser células

tumorales. Una vez que las Tc reconocen al antígeno, son capaces de destruir a la célula. Las células Th reconocen al antígeno generalmente en el contexto de los antígenos clase II que se encuentran en la superficie de linfocitos B, de las células presentadoras de antígeno (CPAs), los Th y las células activadas. Una vez que reconocen al antígeno sobre la CPA, los linfocitos Th interactúan con los linfocitos B para estimular su proliferación y la producción de los anticuerpos específicos. Además, cooperan con los Tc para que desarrollen su función de citotoxicidad [3,4,5].

b) El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el humano

El MHC en el humano está conformado por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma #6. Esta unidad funcional se denomina complejo HLA (antígenos de leucocitos humanos).

Dentro del MHC se hallan los genes que codifican para la síntesis de los antígenos clase I, clase II y clase III. Los clase I comprenden a los loci clásicos A, B y C que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo. Los genes clase I no-clásicos incluyen a los loci E, F, G, H y X, que son muy importantes en el desarrollo y la maduración fetal y en las interacciones para lograr que el feto no sea reconocido como extraño y por lo tanto rechazado. Los genes clase III codifican para la expresión del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  TNF- $\alpha$ , HSP-70 (proteína de choque térmico 70), Cyp21A, Cyp21B, (genes que codifican para la síntesis de la enzima 21 hidroxilasa) y para la síntesis de los componentes del complemento C2, C4A, C4B de la vía clásica y BF de la vía alterna. La región clase II abarca a los genes DR, DQ, DP, DOB, DMB, DNA, TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7. Los antígenos clase II, que también son producto de los genes de

respuesta inmunológica y de supresión inmunológica o genes Ir e Is DR, DQ y DP se expresan sobre la membrana de los monocitos, linfocitos B, macrófagos, células Th, T activadas, células endoteliales y epiteliales [8].

Las moléculas clase I están formadas por una cadena pesada llamada  $\alpha$  constituida por 3 dominios ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ). Esta se une no covalentemente a una  $\beta_2$  microglobulina, que le confiere estabilidad al antígeno y que le ayuda a su exportación. En los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se encuentra el nicho de unión al péptido, donde se adhiere un fragmento del antígeno procesado en el retículo endoplásmico de la CPA, compuesto de 8 a 10 aminoácidos. Este péptido es presentado a las células Tc CD8<sup>+</sup> [7,8,9]. Se ha observado que dentro de los aminoácidos que conforman el nicho, algunos son esenciales para la unión de péptidos. Además, la alteración del nicho por substitución de aminoácidos puede influenciar la unión del péptido y por lo tanto el reconocimiento de las células T [8,9]. Las moléculas clase II están compuestas por dos cadenas,  $\alpha\beta$ , formando un heterodímero de ~ 60 Kda. Recientemente se obtuvo la cristalografía de la molécula clase II cuya estructura y función es similar a la de clase I, sólo que el nicho de clase II es más abierto y une fragmentos más largos que pueden ser de 10 a 22 residuos de aminoácidos [10,11]. Así, las moléculas clase I y clase II presentan fragmentos de antígenos endógenos o exógenos a las subpoblaciones de linfocitos T, las cuales reconocen y unen a diferentes moléculas HLA dependiendo de los marcadores HLA que tenga ese individuo. Si se trata de una célula Th CD4<sup>+</sup>, generalmente reconoce a clase II, mientras que si se trata de una célula Tc CD8<sup>+</sup>, reconoce casi siempre a los clase I [3,5].

c) Fase efectora de la respuesta inmunológica celular

Una vez unida la célula T al complejo Ag/MHC, ésta se activa y comienza con la producción y secreción de proteínas, conocidas como linfocinas, entre las que se encuentra la IL-2, que es producida por la célula Th y en menor cantidad por la célula Tc. La IL-2 actúa como factor de crecimiento y de diferenciación autócrino (actividad sobre la misma célula) y parácrino (actividad sobre células cercanas), así como en la inducción de la expresión del receptor para IL-2.

Entre otras interleucinas, también se produce IL-6 que actúa sobre la célula Tc la cual a su vez secreta los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF $\alpha$  y  $\beta$ ) y el interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Además de otras muchas funciones, el TNF- $\alpha$  es el principal mediador de los mecanismos de defensa contra infecciones por bacterias gram negativas y contra otros organismos infecciosos, ya que activa la capacidad microbicida de los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. El TNF- $\beta$  activa células fagocíticas, actúa sobre linfocitos T para producir IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-6 entre otras. El IFN- $\gamma$  es el principal inductor de la respuesta celular protectora por su papel en la activación de macrófagos, es un potente activador de las células NK, induce la expresión de moléculas MHC clase I y II y promueve la diferenciación de células T y B, los macrófagos, a su vez, producen TNF- $\alpha$  e IL-1.

Las células Th también producen IL-3, que funciona como un factor estimulador de crecimiento y diferenciación; en caso de ser Th1, secretan IL-4, IL-5, IL-6, los factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF-GM), en el caso de ser Th2 lo que se produce es IL-4 e IL-10. Dichas linfocinas actúan sobre otras células y otros componentes del sistema inmunológico induciendo en la mayoría de los casos una respuesta protectora, aunque la respuesta inmunológica es también responsable del daño

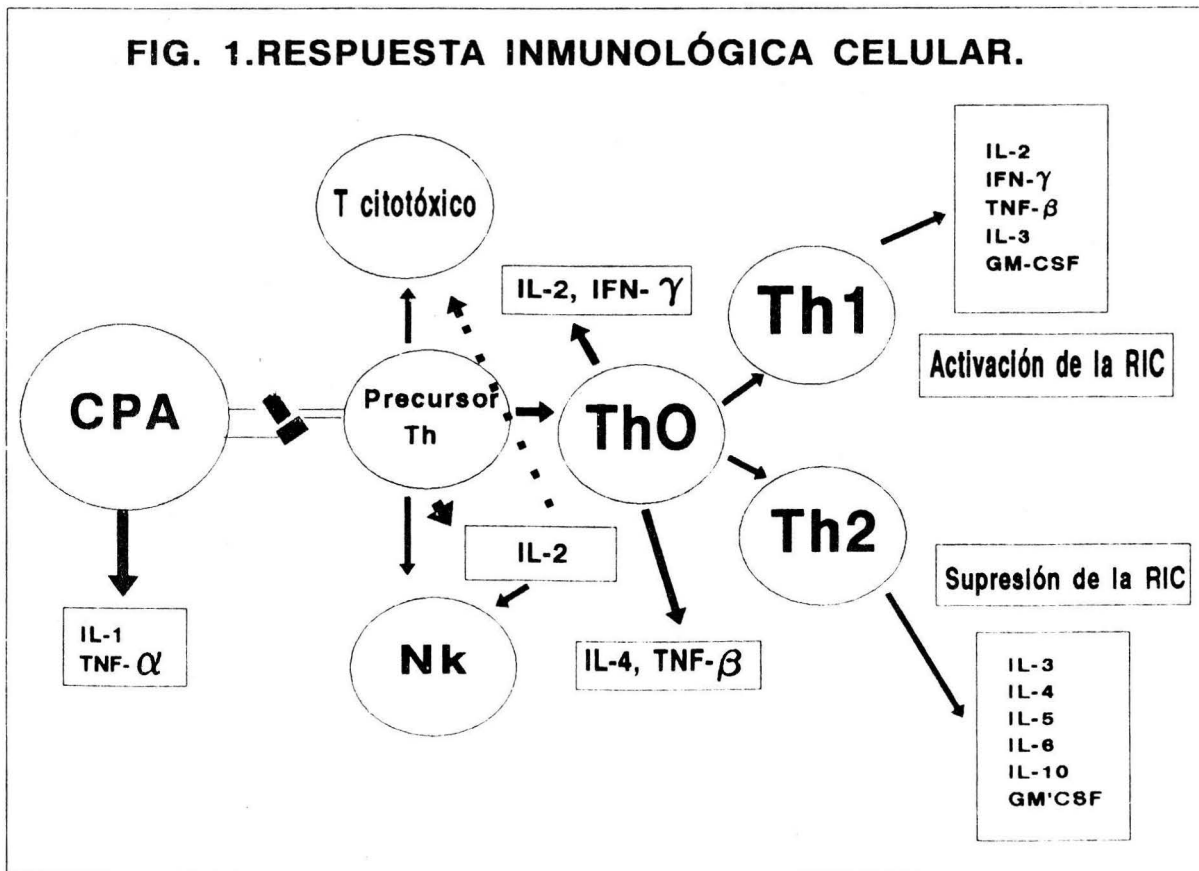
en muchas situaciones, como son las enfermedades autoinmunes, los padecimientos debidos al depósito de complejos inmunes o producen un daño secundario en ciertas infecciones como las micobacterianas u otras. En la figura 1 se señalan los mecanismos más importantes de activación de la respuesta inmunológica celular [1,2,12,36]. Cabe mencionar que las interleucinas son pleiotrópicas (no actúan sobre una única célula ni tienen una sola función), por lo que sólo se ha dado un esquema general de la respuesta inmunológica celular para localizar fácilmente las alteraciones en la lepra de las cuales se hablará más adelante. En el cuadro 2 se muestra un resumen que contiene a las diferentes linfocinas que se producen y sus funciones.

### 1.3 Presentación del antígeno

La presentación del antígeno es el resultado de una serie de acontecimientos intracelulares que involucran la fragmentación del antígeno, la unión de los fragmentos a las moléculas MHC y el transporte del MHC/péptido hacia la superficie. La presentación del antígeno está relacionada con la síntesis de las moléculas MHC.

Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas clase II se asocian en el retículo endoplásmico, y una vez sintetizadas, se asocia a ellas la cadena invariable (Inv) que evita que se unan péptidos al nicho de clase II mientras este antígeno no llega a la vacuola llamada endosoma donde se encuentra con los péptidos. La molécula clase II con la cadena Inv cubriendo el nicho, viaja a través del aparato de Golgi hasta llegar al endosoma donde la cadena invariable es digerida dejando libre el nicho para que se una el péptido antigénico. Las moléculas clase II presentan antígenos exógenos que son introducidos a la célula por endocitosis y fragmentados en endosomas donde se unen a

**FIG. 1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA CELULAR.**



## **CUADRO 2. FUNCION DE INTERLEUCINAS**

CITOCINA	CELULA PRODUCTORA	FUNCION EFECTORA
		<b>FACTORES REGULADORES DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA</b>
IL-1	FIBROBLASTOS Y MO	ACTIVACION DE PROLIFERACION DE CELULAS T Y B INDUCCION DE NEUTROFILOS Y MOLECULAS DE ADHESION A T EN CELULAS ENDOTELIALES INDUCCION DE IL-6, IFN-B1 Y GM-CSF INDUCCION DE FIEBRE, PROTEINAS DE FASE AGUDA
IL-2	T	ACTIVACION DE CRECIMIENTO DE CELULAS T Y B, ACTIVACION DE CELULAS NK
IL-3	T, MC	MADURACION Y DIFERENCIACION DE PRECURSORES HEMATOPOIETICOS MADURACION DE LA CELULA PROGENITORA
IL-4	T CD4, MC, ESTROMA BM	ACTIVACION DE LA PROLIFERACION DE CELULA T, B Y PRECURSORES HEMATOPOIETICOS INDUCCION DE EXPRESION DE MHC CLASE II Y RECEPTOR Fc EN CELULAS B ACTIVACION DE MO Y SU FUNCION CITOTOXICA, INHIBICION DE MIGRACION
IL-5	T CD4, MC	PROLIFERACION DE CELULAS B, PRODUCCION DE IgM E IgA PROLIFERACION DE EOSINOFILOS, EXPRESION DE IL-2R
IL-6	T CD4 MO, MN FIBROBLASTOS	CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE CELULAS T, B Y PRECURSORES HEMATOPOIETICOS INDUCCION DE PROTEINAS DE FASE AGUDA
IL-7	CELULAS DE MEDULA OSEA	PROLIFERACION DE CELULAS PRE-B, TCD4, CD8 Y ACTIVACION DE CELULA T MADURA
IL-8	MONOCITOS	QUIMIOTAXIS Y ACTIVACION DE NEUTROFILOS QUIMIOTAXIS DE CELULA T
IL-9	T	CRECIMIENTO Y PROLIFERACION DE CELULA T
IL-10	T CD4, B, MO	INHIBICION DE SECRECION DE IFN- $\gamma$ INHIBICION DE CELULAS MONONUCLEARES INFLAMATORIAS
IL-11	CELULAS DE MEDULA OSEA	INDUCCION DE PROTEINAS DE FASE AGUDA
IL-12	T	ACTIVACION DE CELULAS NK
IL-13	T	INHIBICION DE INFLAMACION DE FAGOCITOS MONONUCLEARES



<b>FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS</b>		
GM-CSF	T, MO, FIBROBLASTOS MC, ENDOTELIO	CRECIMIENTO DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MO ACTIVACION DE MO, NEUTROFILOS, EOSINOFILOS
G-CSF	ENDOTELIO, FIBROBLASTO	CRECIMIENTO Y MADURACION DE GRANULOCITOS
M-CSF	FIBROBLASTOS, ENDOTELIO, EPITELIO	CRECIMIENTO DE COLONIAS DE MO
FACTOR	CELULAS DE MEDULA OSEA	DIVISION CELULAR
<b>FACTORES DE NECROSIS TUMORAL</b>		
TNF- $\alpha$	MO, T	CITOTOXICIDAD TUMORAL INDUCCION DE PROTEINAS DE FASE AGUDA
TNF- $\beta$	T	ACTIVIDAD ANTI-VIRAL Y ANTI-PARASITARIA ACTIVACION DE CELULAS FAGOCITICAS INDUCCION DE IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, GM-CSF E IL-6
<b>INTERFERONES</b>		
IFN- $\alpha$	LEUCOCITOS	ANTI-VIRAL, EXPRESION MHC CLASE I
IFN- $\beta$	FIBROBLASTOS	
IFN- $\gamma$	T	ANTI-VIRAL, ACTIVACION DE MO EXPRESION MHC CLASE I Y II EN MO Y OTRAS CELULAS DIFERENCIACION DE CELULAS T CITOTOXICAS SINTESIS IgG POR CELULAS B ACTIVADAS
<b>OTROS</b>		
TGF-B	T, B	INHIBICION DE IL-3 + CSF INDUCIDA POR HEMATOPOIESIS
LIF	T	QUIMOATRACCION Y ACTIVACION DE EOSINOFILOS

MC=CELULA PRECURSORA  
 IL=INTERLEUCINA  
 GM-CSF=FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS  
 TGF- =FACTOR DE CRECIMIENTO Y TRANSFORMACION  
 LIF=FACTOR INHIBIDOR  
 MO=MACROFAGO

Tomado de Roitt 1994 [1]

ella para transportarse a la superficie celular y ser reconocidos por la célula T [13,14].

Cuando una célula se infecta por un agente viral, una vez que éste se internaliza por diferentes mecanismos, pierde su cápside formada por una cubierta proteica y queda libre el material genético en el interior. La cubierta proteica se degrada por las moléculas LMP2 y LMP7 (del inglés **L**ow **M**olecular **W**eight **P**roteosome), y los péptidos son transportados por las moléculas TAP1 y TAP2 (del inglés **T**ransporter **A**ntigen **P**eptides), para posteriormente ser incorporados a la molécula clase I recién sintetizada, estabilizando de esta manera a la cadena  $\alpha$  que se une a la  $\beta$ 2 microglobulina, para después transportarse a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática y ser reconocidos por la célula T. Las moléculas clase I presentan antígenos de origen endógeno (virales o tumorales) que son fragmentados en el citosol y se unen a clase I en el retículo endoplásmico [13,14,15].

A la unión de MHC/péptido/TCR se le conoce como el complejo trimolecular que es central para desencadenar una respuesta inmunológica celular. En el MHC hay 2 sitios funcionalmente distintos, el sitio de interacción de las cadenas con el TCR llamado "histotopo" y las regiones donde se une el péptido con el nicho denominado "desotopo". El determinante antigénico del péptido recibe el nombre de "agretopo" [11,15].

#### 1.4 Inducción de tolerancia

Las células del sistema inmunológico tienen un gran repertorio de diversidad para el reconocimiento de antígenos lo que permite reconocer a los antígenos extraños, para montar una respuesta inmunológica adecuada en contra de ellos con el objeto de eliminarlos. Además, en condiciones normales dichas células no reconocen a los

antígenos propios con alta afinidad o desaparecen en etapas inmaduras lo que conlleva al establecimiento de lo que se conoce como "Tolerancia a los antígenos propios". Esto no permite el reconocimiento y destrucción de células propias que puede desencadenar padecimientos autoinmunes. Los mecanismos involucrados en la tolerancia se describen a continuación:

a) Teoría de la selección clonal.

La población de linfocitos T se origina en la médula ósea migrando posteriormente al timo en donde algunas células maduran bajo el estímulo de los factores tímicos y otras mueren. Los timocitos, es decir linfocitos T inmaduros, no expresan TCR, CD3, CD4 y CD8. Durante su diferenciación se transcriben los genes de CD3 y TCR- $\gamma\delta$ . Los timocitos doble negativos (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) comienzan a expresar CD4 y CD8 convirtiéndose en doble positivos (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Estas células son seleccionadas para morir o sobrevivir en base a la especificidad para antígeno que tengan y que está determinada por la unión del TCR a moléculas MHC propias y a los antígenos expresados en el timo. Aquellas células que son altamente afines a los autoantígenos y las que no son complementarias son eliminadas (selección negativa o deleción clonal). Sólo aquellas células que son parcialmente afines a los autoantígenos son seleccionadas para sobrevivir, madurar y pueden enfrentar a los antígenos extraños cuando llegan a la circulación (selección positiva) [2, 15].

b) Anergia clonal

Para la proliferación y diferenciación de linfocitos T específicos se requieren de dos señales: la primera es la formación del complejo trimolecular TCR/péptido/MHC, y la

segunda es la señal coestimuladora dada por otro receptor. Al parecer una señal coestimuladora importante es la debida a la interacción entre la molécula BB-1/B7 expresada en la CPA y la CD28 que es el ligando de la molécula B7 y que está expresada en la célula T. Esta unión estimula la producción de IL-2. Si sólo existe una de las señales, esto causa inactivación clonal, impidiendo la respuesta inmunológica contra el antígeno y por lo tanto contra la célula infectada confiriendo un estado de anergia funcional sin la delección de la clona [6,15].

En resumen, la anergia clonal se define como un fenómeno donde las clonas de la célula T contra un autoantígeno están presentes en el organismo, pero fallan en su habilidad para montar una respuesta inmunológica debido a una disfunción [15].

#### c) Supresión mediada por las células T

Una de las evidencias de la existencia de las células T con actividad supresora se basa en el hallazgo en ciertos individuos que no reponen a un antígeno en particular. En estos casos se ha visto que la respuesta se puede restaurar si se eliminan las células T. Esto quiere decir que dichos linfocitos llevan acabo una función de supresión específica [7]. Uno de los estudios que apoyan la presencia de las Ts es el realizado por Salgame y col. quienes aislaron una clona de célula T de biopsias de pacientes con LL con fenotipo CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, FcR<sup>+</sup>, CD28<sup>-</sup>, TCR  $\alpha\beta$ , la cual suprime la respuesta de la célula T CD4<sup>+</sup> contra antígenos de *M. leprae* "in vitro". Aún más, este efecto supresor se inhibe al adicionar al cultivo anticuerpos monoclonales anti-DR [73].

## **2. Receptor de la célula T**

Como ya se mencionó, el linfocito T reconoce al antígeno y a la molécula de

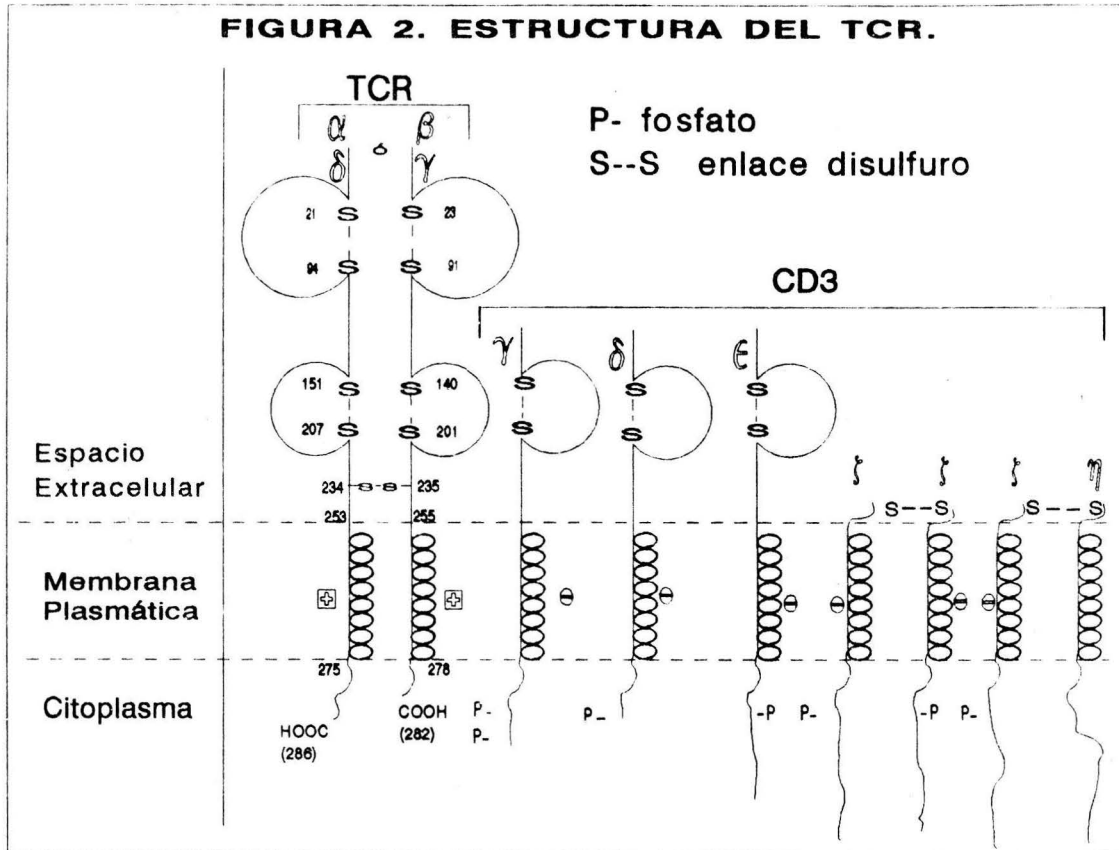
histocompatibilidad, mediante el receptor antígeno específico TCR indispensable para formar el complejo trimolecular y desencadenar una respuesta inmunológica celular específica contra el agente inductor. Así pues el TCR confiere especificidad a la célula T. Debido a su alto grado de diversidad, el TCR tiene la capacidad de reconocer a una extraordinaria variedad de antígenos mediante la formación de un repertorio funcional.

### 2.1 Estructura de los genes del TCR

El TCR es un heterodímero formado por las cadenas  $\alpha\beta$  (TCR 2) o por las cadenas  $\gamma\delta$  (TCR 1). Asociadas al heterodímero se encuentran 5 cadenas no polimórficas que conforman el complejo CD3: 3 se encuentran en forma monomérica,  $\gamma$  (20-25 Kd),  $\delta$  (20 Kd) y  $\epsilon$  (20 Kd) que transmiten señales de transducción; y dos en forma de dímero, ya sea  $\zeta\zeta$  o  $\zeta\eta$  que son importantes en la generación de fosfatidilinositol, el cual funciona como receptor de transducción para la producción de  $IL-2$  y como posible acarreador del complejo  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$  del retículo endoplásmico hacia la superficie durante el ensamble del TCR dentro de la célula [16,17]. En la figura 2 se observa la estructura de las diferentes cadenas del TCR. Los loci donde se encuentran los genes que codifican para las cadenas del TCR, se dividen en diferentes regiones, la región C o constante que codifica para el dominio constante y las regiones V o variable, la J o de unión y la D o de diversidad que codifican para el dominio variable de la cadena. Los genes que codifican para cada región se han agrupado en familias basándose en el porcentaje de homología que existe entre las secuencias de DNA. Así, los genes pertenecientes a una familia comparten entre sí por lo menos el 75% de homología [18].

#### a) Región variable

**FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL TCR.**



En el ratón existen más de 40 segmentos  $V\alpha$  que comprenden por lo menos 10 familias con 1-10 miembros [19] y 23 segmentos  $V\beta$  agrupados en 13 familias. En el humano, los genes que codifican para la cadena  $\alpha$  presentan 60 segmentos  $V\alpha$  agrupados en 29 familias [20] y para la cadena  $\beta$  hay más de 59 segmentos  $V\beta$  agrupados en 15 familias. De estas,  $V\beta_1$ ,  $V\beta_3$ ,  $V\beta_9$ ,  $V\beta_{10}$ ,  $V\beta_{11}$  y  $V\beta_{12}$  contienen un solo miembro;  $V\beta_2$ ,  $V\beta_4$ ,  $V\beta_7$  y  $V\beta_{15}$  contienen dos miembros;  $V\beta_5$  y  $V\beta_{14}$  tienen tres miembros;  $V\beta_{13}$  tiene cuatro miembros;  $V\beta_8$  tiene cinco miembros y  $V\beta_6$  tiene seis miembros [21]. En los genes que codifican para la cadena  $\gamma$  y  $\delta$  del ratón existen 7 segmentos  $V\gamma$  divididos en 5 familias y por lo menos 6 familias  $V\delta$  [22,23]. En el humano hay 4 segmentos  $V\delta$  y 14 segmentos  $V\gamma$  divididos en 4 familias, de los 14  $V\gamma$  solo 8 son funcionales [23,24].

#### b) Región de unión

Tanto en el ratón como en el humano hay muchos segmentos de unión  $J\alpha$ , 18 y 75 respectivamente, lo cual le confiere una mayor diversidad a la cadena  $\alpha$  sobre las demás cadenas del TCR y de las Igs. En  $\beta$  sólo hay 2 segmentos de unión o J ( $J\beta_1$  y  $J\beta_2$ ) [25].

#### c) Región de diversidad

La región de diversidad sólo se encuentra en los genes que codifican para las cadenas  $\beta$  y  $\delta$ . Hay 2 segmentos para  $\beta$  ( $D\beta_1$  y  $D\beta_2$ ) [18], y 2 para la cadena  $\delta$  ( $D\delta_1$  y  $D\delta_2$ ) [23].

#### d) Región constante

Para la cadena  $\alpha$  existe una región C de 20-40 Kb.  $C\alpha$  se compone de 4 exones de 294, 45, 108, y 550 nucleótidos, separados por intrones de 1,880, 871 y 937 nucleótidos [26]. La cadena  $\beta$  presenta 2 regiones C ( $C\beta_1$  y  $C\beta_2$ ). En los genes de la

cadena y del ratón hay 4 regiones C, mientras que en el humano sólo existen 2 (C $\gamma$ 1 y C $\gamma$ 2) [23]. C $\gamma$ 1 se compone por 3 exones, el primero codifica para el dominio extracelular, el segundo para una región de conexión y el tercero para el dominio transmembranal y para la región intracitoplasmática [24].

## 2.2 Organización genética

### a) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\alpha$

Los genes que codifican para la cadena  $\alpha$  en el humano se localizan en el cromosoma 14. Este locus presenta dos características importantes: una es la gran cantidad de segmentos J $\alpha$  que se encuentran en el extremo 5' de C $\alpha$ , abarcando por lo menos 35 Kb de largo [26]. La segunda son los genes que codifican para la expresión de la cadena  $\delta$  que se hallan entre V $\alpha$  y J $\alpha$  [18,27].

### b) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\beta$

En el brazo corto de cromosoma 7 (7p 13-21) se encuentran los genes para la cadena  $\beta$  [25]. En este locus los segmentos D, J y C, están ordenados en "tandem", es decir en unidades repetitivas que contienen a un segmento D $\beta$ , 7 J $\beta$  y un C $\beta$  [2,18].

### c) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\gamma$

El locus que contiene a los genes de la cadena  $\gamma$  también se localiza en el brazo corto del cromosoma 7. Tiene 2 regiones J $\gamma$ , cada una acompañada en su extremo 3' por una región C $\gamma$  [24].

### d) Genes que codifican para la síntesis de la cadena $\delta$

Como ya se mencionó, los genes que codifican para la cadena  $\delta$  se localizan en el cromosoma 14, entre los genes V $\alpha$  y J $\alpha$ . Los segmentos D $\delta$  están en el extremo 5' de



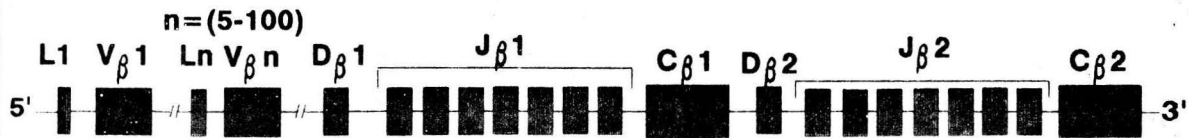
los segmentos J $\delta$ 1, J $\delta$ 2 y J $\delta$ 3 que a su vez están en el extremo 5' de la región C $\delta$  [2]. La organización genética de los diferentes loci del TCR se esquematizan en la figura 3.

e) Mecanismos de recombinación de los genes del TCR

Durante la maduración celular intratímica se rearreglan los segmentos de genes, mediante recombinación somática dada por intercambio de cromátides hermanas, inversión y por escisión de la orquilla. Esta última es la más utilizada para el rearreglo genético del TCR [28,29]. Cada segmento de la línea germinal tiene un heptanucleótido conservado (CACAGTG) conocido como secuencia de señal de recombinación (RSS). Adyacente a éste, separado por nucleótidos no conservados (12+1 o 23+1), se encuentra una secuencia nonamérica rica en AT. El heptámero se localiza en el extremo 3' de cada segmento V, en la 5' de J y en ambos lados de D [28,29]. Los genes RAG-1 y RAG-2 reconocen las RSSs e inducen la recombinación V(D)J [30]. Primero ocurre la unión de un segmento J con uno de diversidad para  $\beta$  y  $\delta$  o V y J en el caso de  $\alpha$  y  $\gamma$  formando un segmento V(D)J. Durante el procesamiento del RNAm V(D)J se une al segmento constante añadiendo al extremo 3' una cola poli A, finalmente ocurre la traducción dando lugar a la cadena polipeptídica correspondiente como se muestra en la figura 4. Después de la biosíntesis de las cadenas, éstas se ensamblan en el retículo endoplásmico comenzando por la dimerización de  $\zeta$ , formación del complejo CD3 y finalmente con la formación de heptámeros completos que se transportan a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática [16] (fig. 5). El primer TCR (TCR-1) que se expresa es el formado por las cadenas  $\gamma\delta$  y se identifica en la novena semana de gestación. Le sigue la expresión del TCR  $\alpha\beta$  (TCR2) a la décima semana [31].

### FIGURA 3. ORGANIZACIÓN GENÉTICA DEL TCR.

Locus de la cadena  $\beta$  (Cromosoma 7).



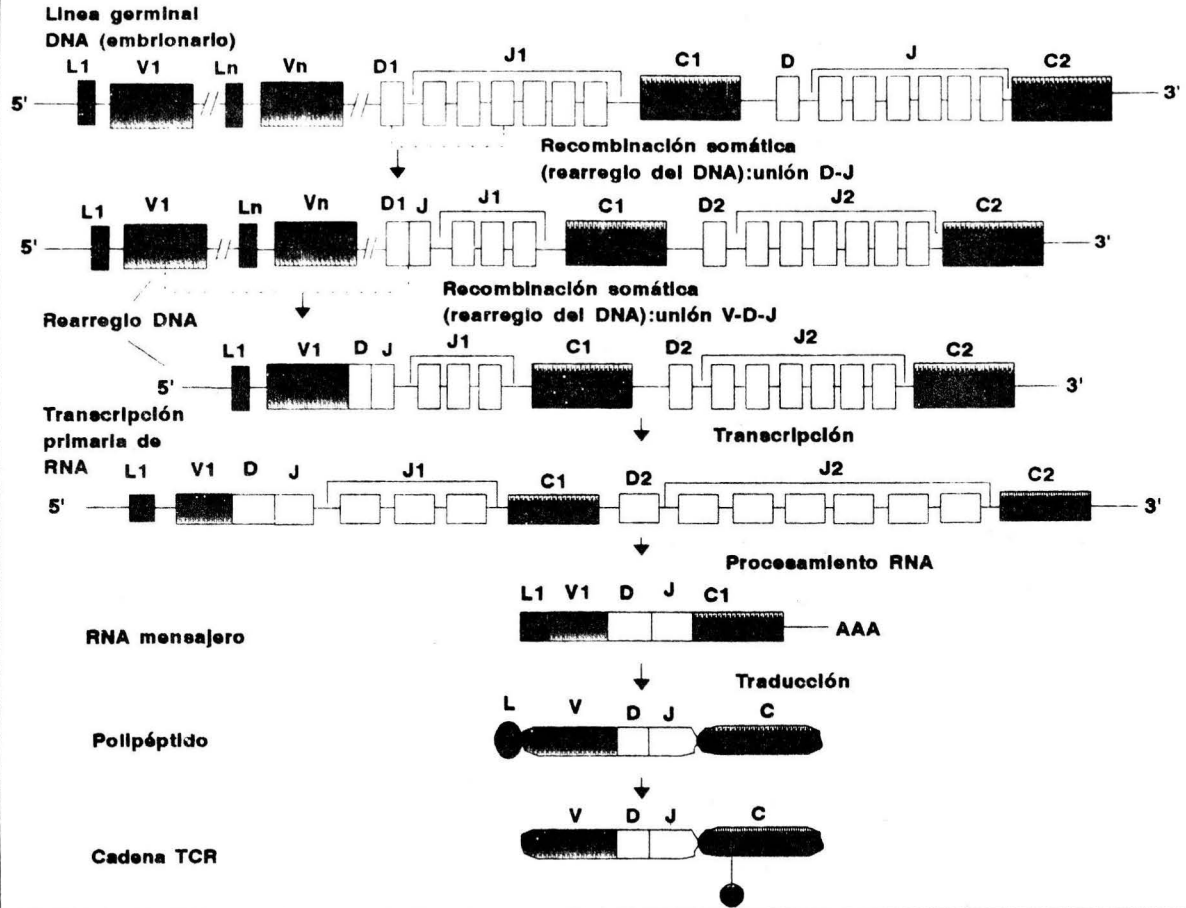
Locus de las cadenas  $\alpha$ ,  $\delta$  (Cromosoma 14).  
( $n = 50-100$ )



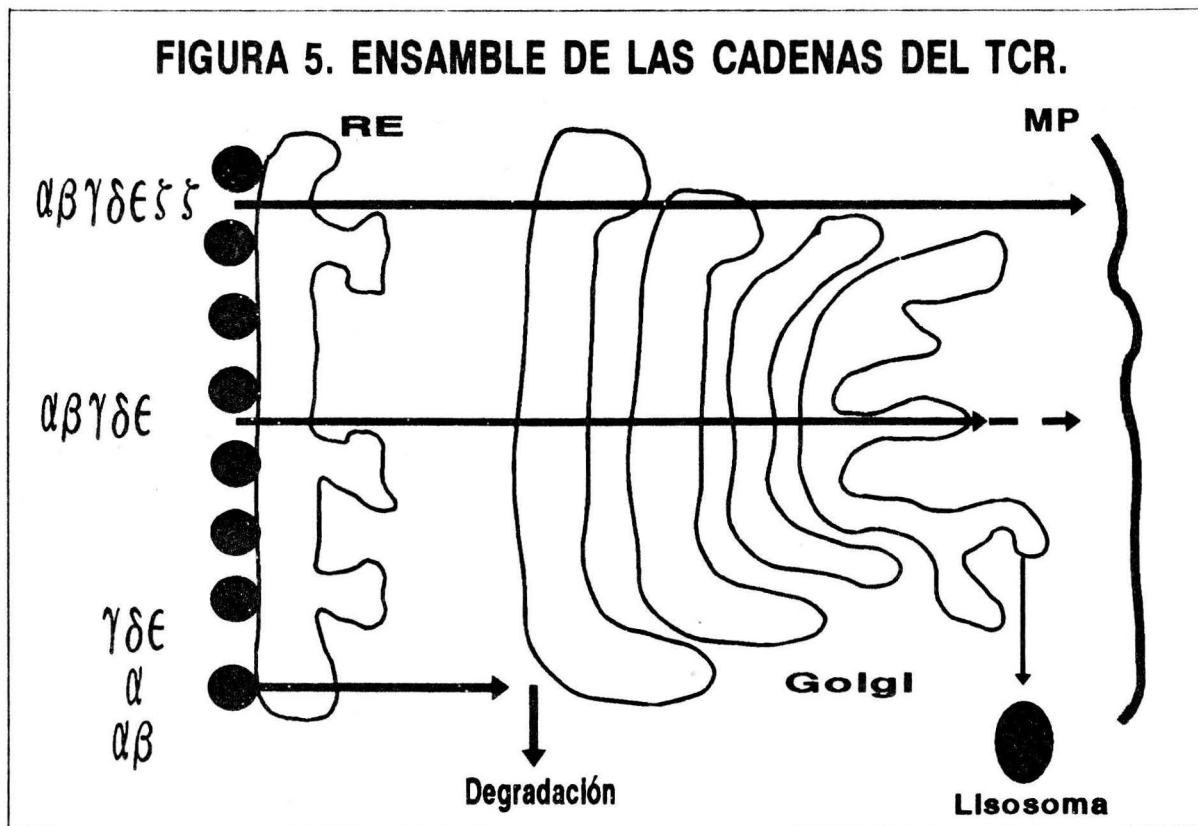
Locus de la cadena  $\gamma$  (Cromosoma 7).



**FIGURA 4. REARREGLO DE GENES DEL TCR.**



**FIGURA 5. ENSAMBLE DE LAS CADENAS DEL TCR.**



RE Retículo endoplásmico  
MP Membrana plasmática

Tomado de Aswell, 1990 [16].

### 2.3 Generación de diversidad. Repertorio de reconocimiento antigénico

La base genética de la generación de la diversidad del TCR es similar a la descrita para las Igs, que está fundamentalmente basada en la recombinación somática de pequeños segmentos génicos que ocurre en una forma imprecisa y al azar para dar lugar a un gen funcional. Existen también una gran cantidad de segmentos, sobre todo de células  $\alpha\beta$  y en cierto grado de alelismo de algunos segmentos lo cual contribuye a la naturaleza polimórfica del TCR, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, es decir de formación del enorme repertorio de reconocimiento.

La generación de diversidad del TCR incluye: 1) el gran número de segmentos de genes variables germinales, 2) la existencia de segmentos múltiples V y J (principalmente  $J\alpha$ ), 3) la recombinación somática de los segmentos V(D)J, 4) la adición de nucleótidos al azar por la enzima desoxi-terminal transferasa (TdT) quien preferentemente agrega nucleótidos G [27,28,30], 5) la recombinación imprecisa y al azar de los segmentos 6) la combinación al azar de las cadenas que forman el heterodímero y 7) la capacidad de los segmentos D para ser leídos dentro de cualquiera de los marcos de lectura [29]. En el cuadro 3 se muestra la diversidad calculada del repertorio del TCR.

### 2.4 Estructura de las cadenas del TCR

#### a) Estructura primaria

Las cadenas que forman el heterodímero del TCR (90 Kd) se encuentran unidas mediante un enlace disulfuro. La cadena  $\alpha$  (40-45 Kd) se une en forma covalente con la cadena  $\beta$  (42-44 Kd) formando el TCR2 o TCR  $\alpha\beta$ . La cadena  $\gamma$  (36-55 Kd) se une

**CUADRO 3**  
**DIVERSIDAD DE RECONOCIMIENTO**

	TCR 1 ( $\gamma\delta$ )		TCR 2 ( $\alpha\beta$ )	
	$\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\beta$
SEGMENTOS V	8	3	50	57
SEGMENTOS D	-	3	-	2
SEGMENTOS J	5	3	70	13
COMBINACION DE SEGMENTOS	V x J 8 x 5	V x J x D 3 x 3 x 3	V x J 50 x 70	V x D x J 57 (13+7)
TOTAL	40	27	3500	1140
COMBINACION DE CADENAS	40 x 27		3500 x 1140	
TOTAL	1,080		3,990,000	
OTROS MECANISMOS	$10^3$		$10^3$	
TOTAL	1,080,000		$3.9 \times 10^9$	

TOMADO DE ROIT T 1994 [1].

también covalentemente a la cadena  $\delta$  (40-60 Kd) dando lugar al TCR1 o TCR  $\gamma\delta$ . En el análisis de secuenciación se encontraron 2 residuos conservados de cisteína (Cys) en la posición 23 y 91, que también se encuentran involucrados en los enlaces disulfuro intradominio de la región variable (V) de las Igs. Así mismo, el triptofano (Trp) que está conservado en la región V de las Igs, se encuentra en la posición correspondiente del TCR que es la posición 34. Existe un residuo Cys en la posición 234 en  $\alpha$  y en la 236 en  $\beta$ . Y en estos residuos se puede dar el enlace disulfuro intracatenario. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos se dedujo la estructura del TCR, donde cada molécula está formada por dos cadenas, cada una con dos dominios extracelulares, uno constante carboxiterminal y uno variable aminoterminal. Cada dominio está estabilizado por un enlace disulfuro entre los residuos de Cys separados en la secuencia lineal por 60-70 residuos de aminoácidos [32] (fig.2).

#### b) Estructura secundaria y terciaria

Novotny y col [33] compararon los residuos conservados de la región  $\beta$  plegada del TCR con la de las inmunoglobulinas. De acuerdo con esto, encontraron que el dominio V del TCR presenta 8 cadenas  $\beta$  plegadas antiparalelas. Aún no se tiene la cristalografía del TCR, por lo que no se conoce su estructura terciaria.

#### c) Heterodímero $\alpha\beta$

A diferencia de las Igs, el TCR reconoce al péptido antigénico sólo cuando éste está asociado a las moléculas del MHC. Con la comparación de secuencias entre clase I y clase II, se sugirió que la superficie del complejo MHC/péptido podía interactuar con el sitio de unión del TCR. Basados en la estructura tridimensional de las Igs, se postuló

que existen 3 regiones hipervariables en el TCR análogas a las Igs. Así, CDR1 y CDR2 reconocen las cadenas del MHC, mientras que el CDR3 que tiene mayor diversidad, hace contacto con el péptido [18]. Las células con receptor  $\alpha\beta$  tienen funciones efectoras de secreción de linfocinas como respuesta al estímulo de una CPA blanco. En la sangre periférica hay un 95 % de células T que expresan al TCR  $\alpha\beta$  y pueden tener en la superficie ya sea al CD4 o al CD8 [20,21,24].

e) Heterodímero  $\gamma\delta$

De las células con TCR  $\gamma\delta$  se tiene poca información comparada con las  $\alpha\beta$ . Sin embargo por similitud estructural se sugieren funciones efectoras similares. Esto se ha afirmado al encontrar en el sobrenadante de cultivo de células T activadas con TCR  $\gamma\delta$ , inducción de adhesión y agregación de monocitos de médula ósea en presencia del factor estimulante de colonias. Además hay evidencias claras de que las células TCR  $\gamma\delta$  son fundamentales para destrucción de parásitos intracelulares obligados como las leishmanias, bacilos de tuberculosis y lepra [34,35,36].

Las células  $\gamma\delta$  están presentes principalmente en la piel y en el intestino. En sangre periférica sólo el 5 % de los linfocitos T expresan el TCR  $\gamma\delta$ . Estas células son CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> aunque también se han encontrado células con el fenotipo CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> [37].

## 2.5 El TCR y las enfermedades

El rearreglo aberrante de los genes puede producir alteraciones estructurales de las cadenas del TCR conllevando a cambios físicos y bioquímicos en el reconocimiento del antígeno y en la activación de la célula T, que ocasionan perturbación en la respuesta inmunológica. De hecho se han estudiado algunas patologías mediante la técnica de



fragmentos polimórficos de longitud variable (RFLP) y más recientemente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el cuadro 4 se muestra que hay alteraciones de genes del TCR en diferentes enfermedades tanto autoinmunes como infecciosas y se señalan ya sea asociaciones positivas o negativas. En algunos casos, los defectos en los genes del TCR pueden contribuir a la expresión de dichas patologías como en la diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, miastenia gravis y espondilitis anquilosante, entre otras. Los resultados son contradictorios probablemente por las diferencias en el tipo de población estudiada, así como por la heterogeneidad clínica de los pacientes, las enzimas y/o sondas utilizadas [56]. Un ejemplo de esto es la miastenia gravis, en donde no existe relación alguna con el TCR cuando se hibrida con una sonda que reconoce todos los segmentos; sin embargo, cuando se emplean sondas más específicas (segmentos separados), entonces se hace evidente la asociación con los genes del TCR [45,46].

El hecho de encontrar asociación de una enfermedad con un determinado rearreglo, con mayor utilización de ciertas familias o con delección de ciertos segmentos del TCR es de gran importancia, ya que puede tener implicaciones terapéuticas, como el diseño de anticuerpos monoclonales contra un TCR específico para el tratamiento de enfermedades autoinmunes [57]. Hay dos enfermedades autoinmunes que han sido claramente mapeadas en caucosoides de EUA y cuya asociación con el TCR  $\beta$  es convincente: una es el síndrome de Sjögren que se asocia al TCR V $\beta$ 13.52 y la otra es la artritis juvenil pauciarticular (AJP) que está asociada al alelo HLA-DQA\*0101 y al TCR V $\beta$ 6.51. Las dos enfermedades muestran cambios alélicos que regulan la expresión de

## CUADRO 4

### ASOCIACION DE GENES DEL TCR CON DIVERSAS PATOLOGIAS

ENFERMEDAD	ASOC. HLA	TCR	ASOC.	REFERENCIA
Diabetes tipo I	DR3,DR4	$\beta$	+	38
		$\beta$	+	39
		$\beta$	-	40
		$\beta$	+	41
		$\beta$	-	42
Esclerosis múltiple	DR2	V $\beta$	+	43
		C $\beta$	+	43
		V $\beta$	-	44
		C $\beta$	-	44
		VDJC $\beta$	-	45
		VJC $\alpha$	-	45
		V $\alpha$	+	46
		C $\alpha$	+	46
		V $\beta$ 5.2 **	+	47
Miastenia gravis	DR2	VCJC $\beta$	-	45
		VJC $\alpha$	-	45
		V $\alpha$	+	46
		C $\alpha$	+	46
Artritis reumatoide	DR4 **	C $\beta$	+	48
		C $\beta$	+	48
		C $\beta$	+	49
		V $\beta$	+	50
		V $\beta$	+	51
Tuberculosis	DR2	V $\delta 2\gamma 9$	+	52
		$\gamma\delta$	+	53
Malaria		V $\gamma 9$	+	54
Lepra	DQ1	$\beta$ **	+	55

\*DATOS OBTENIDOS CON PCR

\*\*REARREGLO DE GENES

genes del TCR. Los polimorfismos significativos de la primera, están localizados en regiones no codificadoras y los de la segunda son principalmente de regulación aunque están en regiones codificadoras, pues conducen a una falla en la expresión. Lo mismo ocurriría si otros subgrupos de pacientes mapearan con el alelo nulo TCR V $\beta$ 20.

Si existiera la homocigocidad para un alelo nulo en una enfermedad autoinmune, sería fácil explicar la presencia de un "agujero" en el repertorio del TCR que sea el responsable de la manifestación de la enfermedad, pero en el caso del V $\beta$ 13.52 siempre hay algunas células T con V $\beta$ 13 y la mayoría de los pacientes con AJP son homocigotos para los alelos nulos, por lo que tienen circulando algunas células V $\beta$ 6.1 y V $\beta$ 20. No obstante, aunque *in vitro* basta que exista una sola célula para que haya respuesta, *in vivo* está depende de la frecuencia de ellas. Por ejemplo, la reacción injerto contra huésped en el período post-trasplante de médula ósea depende de la densidad de células precursoras de T del donador que liberen IL-2 [29]. Sí esto opera también en enfermedades autoinmunes, se podría pensar que sólo es necesario reducir, pero no eliminar células T con ciertos receptores, para lograr que la enfermedad no se establezca. En las enfermedades infecciosas este es un punto de gran interés; dentro de éstas, se puede encontrar un amplio espectro de respuestas inmunológicas que van desde una rápida curación hasta enfermedades crónicas y aún fatales en diferentes individuos. Tal es el caso de la lepra, producida por el *Mycobacterium leprae*, la que ha intrigado a los investigadores por sus manifestaciones clínicas e inmunológicas tan heterogéneas, ya que la enfermedad se presenta sólo en algunos individuos de los que se exponen al *M. leprae*, y hoy es evidente que las diferentes formas de lepra están condicionadas

genéticamente [36,55,58,74].

### **3. La lepra**

#### **3.1 Aspectos epidemiológicos**

La organización mundial de la salud estima que existen 11,525,000 casos de lepra en el mundo, de los que alrededor del 60% se encuentran en Asia y el resto en Africa y América [36]. En esta última existen 336,242 casos informados [36,59,60]. En México la enfermedad se encuentra principalmente en los estados de Sinaloa, Colima, Nayarit, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Sonora, Morelos, Guerrero y Zacatecas con un total de 13,061 casos registrados y una prevalencia 2/10,000 habitantes [60]. Sin embargo, probablemente hay una subestimación y la cantidad real de enfermos se calcula en alrededor de 60,000. Por lo tanto, la lepra constituye un grave problema de salud pública para las instituciones de salud nacionales y para las autoridades gubernamentales, ya que dicha enfermedad se encuentra fuertemente relacionada con las condiciones de hacinamiento e insalubridad en las que habitan los individuos afectados [61].

#### **3.2 Características clínicas e inmunológicas**

La lepra es una enfermedad crónica transmisible cuyas lesiones en la piel y en los nervios tienen un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde una lesión simple localizada que puede curar espontáneamente hasta lesiones graves que producen deformaciones cutáneas y aún la muerte [61]. El espectro clínico se estudió en 1966 por Ridley y Jopling [62] quienes basándose en las características de inmunidad y en la evolución histopatológica en los pacientes, clasificaron a la lepra en 6 formas:

**1) Lepra indeterminada (I).** Esta es la forma inicial de la lepra, desde la cual puede

evolucionar a los demás estadios clínicos.

**2) Lepra tuberculoide (TT)** o forma benigna de la lepra, que es el polo benigno de la enfermedad, en la que se presentan lesiones en la piel y nervios, y se encuentran pocos o ningún bacilo en las lesiones. Hay pocos anticuerpos específicos y una RIC eficiente.

**3) Lepra dimorfa tuberculoide (BT)**, en la cual se encuentran lesiones en la piel parecidas a la forma TT, sólo que son más pequeñas y en mayor cantidad, con presencia de pocos bacilos.

**4) Lepra dimorfa o "boderline" (limitrofe) (BB)**. En este tipo se observan varias lesiones hipopigmentadas de diferente tamaño y ensanchamiento de nervios.

**5) Lepra dimorfa lepromatosa (BL)**. Aquí se presentan gran cantidad de pápulas hipopigmentadas y nódulos, con muchos bacilos en las lesiones.

**6) Lepra lepromatosa (LL)**. Es el extremo maligno de la enfermedad y el de mayor gravedad, donde se muestra un deterioro progresivo del estado clínico e inmunológico del paciente, y en el que las lesiones contienen grandes cantidades del bacilo y muy pocos linfocitos. En este extremo existe una inmunosupresión específica de la RIC mientras que en la TT está intacta [62,63,64]. Con presencia de grandes cantidades de anticuerpos específicos y formación de complejos inmunes que se depositan en diferentes órganos, por ejemplo dentro de las articulaciones causando una complicación adicional que es la hipersensibilidad tipo IV.

El agente causal de la lepra, M. leprae, fue descubierto en 1873 por Armauer Hansen. Es un bacilo ácido-alcohol resistente de vida intracelular obligada, compuesto por un complejo de membranas intracitoplasmáticas unidas a una membrana plasmática,

una pared celular y una zona conocida como zona transparente a los electrones. Esta última zona se ensancha cuando el bacilo entra a la célula hospedera, específicamente el macrófago, dificultando la difusión de enzimas lisosomales en el fagosoma, lo cual provoca la evasión de la actividad microbicida, escapando así del fagolisosoma para quedarse a residir en forma libre en el citoplasma de la célula [64,65].

Desde las investigaciones iniciales de la lepra, se observó que la respuesta humoral de los pacientes con LL era normal o bien, podía estar un poco elevada, mientras que la respuesta celular disminuía conforme aumentaba la gravedad del padecimiento, hasta llegar a una no respuesta celular contra el bacilo [63]. Esto se observa claramente cuando a los pacientes se les aplica la lepromina intradérmicamente. Esto recibe el nombre de prueba de Mitsuda, y lo que se aplica es una solución fenolada que contiene bacilos del M. leprae destruidos por calor. Con esta prueba se puede comprobar el estado de inmunidad celular específica contra el M. leprae. En los pacientes TT y en personas sanas la reacción es generalmente positiva (induración  $\geq 5$  mm), mientras que los pacientes BL y LL no responden a la prueba cutánea (reacción negativa). Además, conforme los pacientes sanan, su reacción va cambiando de negativa a positiva [61]. Tiempo después se observó que la anergia de los pacientes LL es específica, ya que reaccionan favorablemente al PPD, BCG, al antígeno de Candida albicans y a otras micobacterias como el M. tuberculosis, pero no a M. leprae [66,67]. Cabe aclarar que las personas sanas que responden, son sólo aquellas que han estado en contacto con el bacilo y que han montado una respuesta eficiente contra el agente inductor.

La falla de la respuesta inmunológica celular contra el M. leprae en la LL ha llevado

al análisis profundo de esta enfermedad. Se han encontrado algunas alteraciones que son causa, efecto o contribuyen a la anergia; uno de estos hallazgos es el decremento en la capacidad endocítica de fagocitos de pacientes con LL; sin embargo, este decremento no parece estar relacionado con defectos intrínsecos de las células fagocíticas, sino con la presencia de factores en el suero de los lepromatosos que interfieren con la función endocítica [68]. También se ha observado que los linfocitos T de pacientes con LL son incapaces de producir IFN- $\gamma$  cuando las CPAs presentan a los antígenos procesados de la micobacteria al TCR del linfocito T [69,70,71]. La síntesis de IFN- $\gamma$  se incrementa en algunos pacientes por adición de IL-2 [70]. Sin embargo, Kaplan y col. [72], concluyen que el defecto en la LL probablemente es por la no respuesta de las células T de los pacientes hacia el M. leprae más que por la incapacidad de los fagocitos mononucleares para responder al IFN- $\gamma$ . Por otro lado, se ha visto que en las lesiones de los pacientes con LL se encuentran principalmente linfocitos con marcador CD8 (citotóxicos y supresores), mientras que las células T con CD4 (Th) son escasas. En las lesiones de pacientes TT en cambio, se encuentra lo inverso [64]. El estudio de estas subpoblaciones con anticuerpos monoclonales ha mostrado que en las lesiones de los LL predomina el fenotipo CD8 supresor y la mitad de las células con CD4 que se encuentran, son inductoras de supresión, lo cual sugiere que existe algún mecanismo activador de las células supresoras las cuales a su vez inhiben a la respuesta celular específica [73].

En la LL se han descrito dos subpoblaciones celulares que parecen estar involucradas en supresión y que se pueden inducir *in vitro* con la lepromina. Una son los monocitos y la otra son las células llamadas T $\gamma$ , porque tienen sobre la superficie,

receptor para el fragmento Fc de la cadena  $\gamma$  y de la IgG. Estas inhiben la respuesta de individuos sanos y de pacientes con TT a la Concanavalina-A, mientras que los monocitos y linfocitos de estos últimos no tienen efecto supresor [74,75]. Además, la falla de los macrófagos para eliminar al bacilo está asociada con la presencia del antígeno HLA-DQ1 [73,76].

Algunos investigadores han propuesto que la anergia al M. leprae se debe a la ausencia de células productoras de IL-2 [77]. De hecho se ha visto que la adición de IL-2 estimula la expansión en la lesión de células T CD8<sup>+</sup> con TCR  $\alpha$ - $\beta$  y NK. Además estas células producen IFN- $\gamma$  que es responsable de la activación del mecanismo bactericida de los macrófagos [78]. Otros han mostrado que la falla se encuentra en la expresión de receptores para IL-2 [64,71,79]. En un estudio reciente, se demuestra la ausencia total de mRNA de IL-2, IFN- $\gamma$  y linfotoxinas y un incremento de mRNA para la síntesis de IL-4, IL-10, IL-8 e IL-5 en biopsias de pacientes con LL. En cambio en las lesiones de pacientes con TT se encontraron cantidades menores de mRNA para la producción de TNF- $\alpha$ , de GM-CSF, de TGF- $\beta$ 1, IL-6 e IL-1, lo que refleja la presencia *in situ*, del patrón de células T asociadas con resistencia y susceptibilidad a las enfermedades [80]. También demostraron el amplio espectro de alteraciones de la respuesta celular, estrechamente relacionado con las formas clínicas específicas, es decir con los diferentes polos de la lepra.

Cabe mencionar que a algunos pacientes a los que se les trata con quimioterapia o bien se les administra IFN- $\gamma$  recombinante, presentan proliferación de queratinocitos, expresión de antígenos HLA-DR y disminución del número de micobacterias; sin embargo,



estos tratamientos producen efectos secundarios como es la presencia del eritema nudoso lepromatoso (lesiones dolorosas diseminadas en cara y miembros que pueden llegar a la ulceración) en donde el paciente presenta altos niveles de TNF- $\alpha$ , para lo que se les administra talidomida la cual inhibe los niveles de síntesis del mRNA para la producción del TNF- $\alpha$  [81].

### 3.3 Marcadores genéticos que determinan la susceptibilidad a la lepra

Desde hace tiempo, se observó que la mayoría de los individuos que están en contacto con el M. leprae nunca presentan manifestaciones de la enfermedad, mientras que algunos desarrollan una lesión localizada que cura espontáneamente y la minoría expresa alguna de las dos formas polares de la lepra ya mencionadas. Por estos motivos se sugirió que los individuos que padecen la enfermedad tienen un defecto inmunológico, que está determinado genéticamente y que condiciona la expresión de la TT o de la LL [36,61,76]. De hecho, desde antes del descubrimiento del M.leprae se consideraba a la lepra como una enfermedad hereditaria y tiempo después se encontró que tanto el riesgo de contraer la lepra como el grado de la enfermedad, está fuertemente influenciado por factores genéticos del hospedero [36,76,82]. Bajo esta suposición, comenzaron los estudios genéticos que involucraban a los antígenos del MHC.

Con respecto a la susceptibilidad genética ligada al HLA, se demostró que la TT se asocia al antígeno HLA-DR3, en los pacientes con TT de Surinam, Venezuela y México [83,84,85,86]. En cambio la expresión de la LL depende de dos genes asociados con la susceptibilidad, el HLA-DQ1, y el -DR2 que se han encontrado en pacientes con LL y no en TT [66,76,85,86]. Además de estos hallazgos, Gorodezky y col. informaron que los

macrófagos de individuos sanos portadores del DQ1, infectados *in vitro*, y activados con linfocitos T DQ1<sup>+</sup> y DQ1<sup>-</sup> no eliminan a la micobacteria y que está operando la restricción DQ para la no respuesta, pues se requiere la ausencia del DQ1 en el macrófago y/o en el linfocito para que los macrófagos eliminen eficientemente al bacilo [76]. Por otro lado la supresión mediada por los linfocitos T puede bloquearse con anticuerpos monoclonales anti-DQ, lo que refuerza que estas moléculas actúan como genes Is [73]. También se ha observado que los diferentes alelos HLA-DR expresados en la CPA presentan al linfocito T diferentes epítopes del M. leprae que pueden ser reconocidos tanto por las Th que funcionan como cooperadores como por las células T que ejercen supresión, por lo que las moléculas de clase II pueden actuar tanto como genes Ir como Is [36,87]. De hecho se ha visto que las células de pacientes con LL reaccionan contra secuencias específicas de la micobacteria y no contra el patógeno completo o contra extractos crudos, contrario a lo que ocurre en los TT. Esto sugiere que hay péptidos específicos que inducen supresión como lo ha sugerido por un lado Gulle y col [88] y por otro lado Gorodezky y col [36,76]. Más aún, se ha logrado obtener una clona de T supresoras que inhibe totalmente la respuesta de Th contra un péptido de 36 Kd de M. leprae sugiriendo que este péptido es inductor de supresión [89].

#### 3.4 Alteraciones del TCR en la lepra

Actualmente con el descubrimiento del TCR y la trascendencia de sus funciones, se está investigando la participación de este receptor en el reconocimiento del M. leprae y en la inducción de la respuesta inmunológica celular en las formas polares de la enfermedad. Se ha observado un rearrreglo de los genes  $\beta$  en clonas de células T que

tienen actividad supresora y que se han obtenido de las lesiones de pacientes LL. Estas clonas tienen el fenotipo CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> αβ<sup>+</sup>. Un hecho interesante es que no se encontró en estas células mRNA para la transcripción de los genes y del TCR γδ, lo que sugiere que el reconocimiento del M. leprae por algunas células T CD8<sup>+</sup> con actividad supresora esta mediada por el uso del TCR αβ [55]. Por otro lado, se encontró que las clonas de células T que tienen actividad supresora pueden proliferar y producir IFN-γ ante la estimulación con M. leprae y otras micobacterias. Dichas células reconocen al antígeno específico en el contexto del antígeno HLA-DR3 cuando se trata de pacientes con TT [90]. Por otro lado como ya se dijo, Gorodezky y col [76] demostraron que los macrófagos de individuos DQ1 son incapaces de digerir y eliminar a la micobacteria y que este efecto está restringido por el DQ1. Así mismo Salgame y col [73] generaron clonas de células T supresoras con fenotipo CD8 de pacientes con LL que también está restringido por el DQ1 y que inducen una anergia clonal en clonas Th reactoras que tienen fenotipo CD4. Probablemente este efecto se debe a la liberación de IL-4 ya que se ha observado la predominancia de esta linfocina en las lesiones de pacientes con LL usando análisis por PCR [80]. Estos hallazgos son de gran importancia, ya que en algunas investigaciones se ha logrado inhibir la actividad supresora con anticuerpos monoclonales contra la cadena β del TCR [67], el HLA-DR, el receptor de IL-2, el TCR αβ, y en el caso de clonas supresoras CD4<sup>+</sup> con anti-CD4.

Parece ser que las células T con diferentes TCR γδ juegan un papel importante en la RIC contra el M. leprae. Aunque la proporción de células T con TCR γδ es baja en las lesiones tanto en el polo TT como en el LL, hay un incremento del 25-35% con respecto a los linfocitos totales en las lesiones de la forma TT y en la lesión de la reacción a la

lepromina. Dichos hallazgos sugieren que estas células están directamente involucradas en la respuesta de hipersensibilidad retardada y que la acumulación de células con TCR  $\gamma\delta$  se debe a la expansión clonal contra un número limitado de péptidos específicos [34,53]. También hay evidencia de que hay más uso de células T con TCR  $\gamma\delta$  en la TT que en la LL [34] lo que es consistente con una probable alteración en los genes o la expresión de  $\gamma\delta$  en la lepra.

La relevancia de la participación del TCR en la inducción de la respuesta inmunológica celular protectora se ha analizado en algunas enfermedades infecciosas. Este es el caso de la tuberculosis, donde las células con TCR  $\gamma\delta$  de sangre periférica se expanden ante la presencia de M. tuberculosis, y lo hacen en mayor proporción aquellas células provenientes de sanos reactivos a la tuberculina y en pacientes con tuberculosis pleural (la forma reactiva) que en las obtenidas de pacientes con tuberculosis miliar o pulmonar (la cual causa inmunosupresión). Estas células producen IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-3 e IL-4 características de las células Th2 [53]. En esta misma patología se observó que las células T  $\gamma\delta$  de sangre periférica y líquido pleural de pacientes con tuberculosis pulmonar, responden al ser estimuladas con el M. tuberculosis. La mayoría de estas células expresan el TCR V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2; cabe mencionar que la utilización de V $\gamma$ 9 también se ha encontrado en células T estimuladas con Plasmodium falciparum, lo que indica que este receptor es necesario para montar una respuesta inmunológica contra enfermedades infecciosas [52,54].

Es evidente pues, que el uso de las diferentes familias del TCR es central en las infecciones, y los estudios en la lepra son muy escasos, por lo que, se considera de gran importancia estudiar a los genes del TCR de pacientes con LL, para saber si existe alguna alteración o rearreglo de dicho receptor, que pueda ser uno de los factores relevantes en el desencadenamiento de la anergia al M. leprae en este extremo de la lepra.

### III OBJETIVOS

#### 1. Objetivo general

Identificar si existe algún defecto o alteración genética en los genes del receptor de las células T de los pacientes con lepra lepromatosa comparando con sujetos sanos, mediante análisis molecular usando la técnica del Southern-blot que identifica RFLPs (fragmentos polimórficos de longitud variable).

#### 2. Objetivos particulares

1. Estudiar el polimorfismo de los genes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  del TCR, incluyendo a las regiones variables y constantes.
2. Emplear 3 enzimas de restricción (Eco RI, Eco RV y Hind III) para mapear el polimorfismo del TCR en mexicanos.
3. Realizar el Southern-blot para cada caso y comparar el patrón de bandeo obtenido con las diferentes endonucleasas utilizadas, entre los testigos sanos y los pacientes con lepra lepromatosa.
4. Aplicar un análisis estadístico con el objetivo de establecer si hay diferencias en los polimorfismos entre sanos y enfermos, para identificar si existe alguna banda o patrón de bandeo significativamente aumentado en los pacientes con LL con respecto al de testigos. Con estos datos se determina si existe un defecto o rearmiento en los genes del TCR que contribuyan a la inmunosupresión en la LL.

## IV HIPOTESIS

Debido a la importancia del reconocimiento del antígeno en los procesos inmunológicos normales y en la patología, es muy probable que los genes o la expresión de variantes de diferentes TCRs jueguen un papel central en la inmunosupresión característica del polo lepromatoso de la lepra. Esto es altamente probable pues en enfermedades autoinmunes y en una infecciosa, la tuberculosis, que está emparentada con la lepra, hay evidencias de reconocimiento alterado de péptidos por parte de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$ .

## **V METODOS**

### **POBLACIONES DE ESTUDIO**

Todos los sujetos incorporados al estudio son mestizos mexicanos residentes de México.

#### **1.-Testigos**

Para la realización de este estudio se obtuvieron 30 ml de sangre periférica de 22 personas aparentemente sanas provenientes del Banco de sangre del Hospital de la Mujer SSA. y del personal del INDRE, SSA.

#### **2.-Pacientes con LL.**

Se obtuvieron muestras de 30 ml sangre periférica de 22 pacientes diagnosticados como lepra lepromatosa, por los leprólogos expertos del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao Pascua", SSA.

La enfermedad se confirmó con el análisis de las biopsias y todos los pacientes fueron anérgicos a la lepromina, es decir Mitsuda negativos. Los pacientes provienen de las zonas endémicas del País,

### **EXTRACCION DE DNA [91]**

1. Los 30 ml de sangre periférica, se centrifugaron a 1600xg durante 10 min.
2. Con un bulbo de plástico se separa el paquete de células blancas y se lavan con una solución de lisis para eritrocitos (Tris-HCl pH 7.6, 10mM; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM NaCl).
3. El paquete celular se resuspende en SSC 1X (NaCl 0.15M; citrato de sodio 0.15M), se añadieron 4 ml de solución de lisis de glóbulos blancos (Tris-HCl pH 7.6 10mM; EDTA pH 8.0 10mM; NaCl 50mM; SDS 0.2%; proteinasa K 300 ug/ml), y se

incubaban a 53°C durante 12-18 hs.

4. Se añaden 5 ml de fenol equilibrado (fenol/Tris-HCl 0.1M pH 8.0, mercaptoetanol 0.2%), y se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min a 4°C.

5. Se realiza una extracción más con fenol equilibrado, dos con fenol/cloroformo-alcohol isoamílico, y una con cloroformo alcohol isoamílico.

6. El DNA se precipita con 120 ul de NaCl 5 M y un volumen de isopropanol, se lava con etanol al 70% y se resuspende en 400 ul de TE 1X (Tris-HCl pH 8.0 10mM; EDTA pH 8.0 1mM).

#### CUANTIFICACION DE DNA

1. Para verificar la cantidad y pureza del DNA, se hace una dilución 1:1000, y se lee a 240 nm, 260 nm y 280 nm.

2. La concentración de DNA se calcula con la fórmula:

$$DO_{260} \times 50 \times \text{factor de dilución} = \text{ug/ml.}$$

3. Se calcula la pureza del DNA por las relaciones 260/240, para fenol y 260/280, para proteínas. La relación debe estar entre 1.7 y 2.0.

#### TECNICA DEL SOUTHERN BLOT [91]

#### ENDONUCLEASAS UTILIZADAS

Para el corte de DNAs se utilizaron las endonucleasa o enzimas de restricción Hind III, Eco RI y Eco RV.

#### 1.DIGESTION CON ENDONUCLEASAS

a) Se utilizan 10 ug de DNA para cada enzima, se adiciona el amortiguador adecuado que provee el fabricante para cada enzima, 1.7 ul espermidina 20mM a una



concentración final 2mM y la enzima a una concentración final de 5u/ul.

b) La enzima se añade en dos partes, la primera se deja incubar de 12-18 hs y la segunda de 4-6 hs. Ambas incubaciones se hacen a 37°C, temperatura de actividad óptima para las enzimas seleccionadas.

## 2. ELECTROFORESIS DEL DNA

a) Se realiza un corrimiento electroforético de los DNAs digeridos con cada una de las enzimas y se incluyen en el mismo gel a los marcadores de peso molecular que son fragmentos de DNA del fago lambda. La electroforesis se hace en un gel de agarosa al 0.8% y se coloca en una charola de electroforesis con capacidad para 300 ml. El gel se corre durante 36-48 hs aplicando 30 V. Se utiliza solución amortiguadora de corrimiento el TAE 1X (Tris 40mM; ácido acético glacial 20mM; EDTA 20mM).

## 3. TRANSFERENCIA DEL DNA

a) Al término de la electroforesis, el gel se coloca en 400 ml de HCl 0.15 M durante 10 min con agitación.

b) Se desecha el HCl 0.15M y se adicionan 400ml de NaOH 0.4M, NaCl 0.6M con agitación durante 30min.

c) El gel se trasfiere a una membrana de nylon durante toda la noche, utilizando NaOH 0.4M, NaCl 0.6M como solución de transferencia.

d) Para eliminar los restos de agarosa en la membrana, esta se lava durante 10-15 min en SSC 2X.

## 4. SONDAS DE DNA

Para la realización de esta investigación se utilizarón las sondas  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 4$ ,  $\delta 1$

y  $\delta 2$ . Dichas sondas fueron gentilmente donadas por el DR. Tak W. Mak de The Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada, para el trabajo del 11 Workshop Internacional de Histocompatibilidad. Las sondas estón clonadas en pUC 18, Bluescribe, pUC 19, pUC, pUC 18 y pUC respectivamente. Sus características se muestran en el cuadro 5.

Las bacterias que contienen el plásmido con cada sonda, se lisan para extraer el plásmido, con el método de lisis alcalina de baja velocidad [94]. Este método consiste en promover el crecimiento bacteriano y su lisis posterior de la siguiente manera: Al paquete bacteriano se le agrega solución de lisis alcalina (glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM, EDTA 10mM, Lisozima 10 mg/ml). Se deja reposar 5 min y se adiciona NaOH 0.2 N, SDS 1 %; se coloca en hielo durante 10 min y posteriormente se adiciona acetato de potasio. Esta mezcla se deja 10 min en el hielo y finalmente se cenrifuga y se precipita [91].

#### OBTENCION DE LA SONDA [95]

A cada plásmido obtenido se le digiere con la(s) enzima(s) de restricción correspondiente(s) para liberar el inserto (sonda). Para  $\alpha 2$  con Eco RI.  $\beta 1$  con Eco RI-Hind III,  $\gamma 1$  con Sac I,  $\gamma 3$  con Bam HI-Pst I,  $\gamma 4$  con Eco RI,  $\delta 1$  con Sac I-Pst I y  $\delta 2$  con Xho I-Hind III. El inserto se aísla mediante el corrimiento electroforético de los plásmidos digeridos, colocando un papel filtro y una membrana de diálisis debajo del inserto. Posteriormente se coloca en un tubo ependorff de 600 ul, que a su vez se mete en un tubo ependorff de 1500 ul y se centrifuga durante 5 min, obteniendo de esta manera el inserto puro.

#### MARCADO RADIOACTIVO DE LA SONDA [91]

Las sondas se marcan radioactivamente mediante la técnica de "random primer"

**CUADRO 5**  
**MUESTRAS, ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SONDAS DEL TCR**

No DE MUESTRAS		ENZIMA	SONDA	REGION DE RECONOCIMIENTO	TAMAÑO DEL INSERTO
LL	T				
22	22	Eco RI	$\gamma 1$	Variable 1	1.2 Kb
12	11		$\beta 1$	Variable 8	320 pb
22	22		$\gamma 3$	Constante 2	136 pb
22	22		$\delta 1$	Variable 2	500 pb
22	22		$\delta 2$	Unión 2	2.8 Kb
11	12	Eco RV	$\alpha 2$	V, J y C	1.1 Kb
8	11		$\gamma 4$	Constante 1	840 pb
11	11	Hind III	$\delta 2$	Union 2	2.8 Kb
12	12		$\gamma 1$	Variable1	1.2 Kb
9	10		$\delta 1$	Variable 2	500 pb
22	22		$\alpha 2$	V, J y C	1.1 Kb
11	11		$\gamma 4$	Constante 1	840 pb

que consiste en lo siguiente: Hervir 50 ng de sonda con 500 pg de fago lambda durante 10 min, enfriar en hielo durante 10 min. Adicionar 4 ul de cada nucleótido (dNTPs), [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000Ci/m Mol) y 2.6 U de la enzima Klenow; incubar a temperatura ambiente de 1-12 hs.

Añadir solución bloqueadora (SDS 2%, EDTA pH 7.4 50 mM), hervir durante 10min, enfriar en hielo durante 5 min y colocarla en una columna de sephacryl-300 previamente lavada con la solución bloqueadora. Centrifugar durante 3 min a 400xg.

#### HIBRIDACION DE DNA [91]

1.-La membrana se coloca en una bolsa de plástico con 50 ml de la mezcla de prehibridación (Denharth 5X, SSPE 6X, SDS 1%, ssDNA 200 ug/ul), y se incuba durante 12-16 hs a 60°C.

2.-Se eliminan 20 ml de la mezcla de prehibridación y se añade la sonda marcada y desnaturalizada. Se incuba de 12-36 hs a 60°C.

3.-La membrana se lava 2 veces durante 5 min con SSPE 2X, SDS 0.1% a temperatura ambiente; se hacen 2 lavados con la misma solución durante 30 min c/u a 60°C, 2 lavados con SSPE 0.5X, SDS 0.1% durante 30 min c/u a 60°C; y un lavado final con 2X SSPE.

#### EXPOSICION [91]

1.-A la membrana se le retira el exceso de líquido, se envuelve en Kleen-pack, se coloca sobre una película de rayos X y se introduce dentro de un cassette de exposición con una pantalla intensificadora. La exposición se hace de 8-15 días.

### REVELADO [91]

Para el revelado de las placas, estas se colocan 3 min en el revelador radiográfico, después 30 seg en agua y finalmente 1 min en fijador.

Una vez obtenidos los patrones de bandeó se procede a su análisis mediante la medición del corrimiento electroforético.

### DESHIBRIDACION [91]

1.-Para la reutilización de la membrana, es decir para poderla hibridar con otra sonda, esta se incuba con NaOH 0.4N 30 min a 42°C; y con Tris-HCl pH 7.5 0.2M, SSPE 0.1%, SDS 0.5% 30min a 42°C.

2.-Se enjuaga con SSPE 2X. Las membranas así tratadas quedan listas para una nueva hibridación o pueden almacenarse a -20°C envueltas en Kleen-pack hasta su uso.

### TIPIFICACION SEROLOGICA DEL HLA [96]

La metodología se describe brevemente, ya que la tipificación fue hecha por otra persona del Departamento como aporte a este trabajo.

1.- Se obtienen linfocitos T y B a partir de sangre periférica, utilizando las células mononucleares con el método de ficoll-hypaque, las subpoblaciones de T y B se separan mediante columna de nylon o con una mezcla de anticuerpos monoclonales de un reactivo llamado Lympho-Kwik.

2.- Los linfocitos se lavan, se ajustan y se siembran en las microplacas que contienen los reactivos anti HLA de clase I y de clase II. Los linfocitos T se incuban durante 30 min y los linfocitos B durante 60 min.

3.- Se agrega complemento especial para cada grupo celular, posteriormente se

vuelve a incubar y se agrega eosina como colorante de exclusión y formol para fijar la reacción.

4.- Las placas se leen en un microscopio invertido a 250 aumentos y se calcula el número de células vivas y muertas. Una vez hechas las lecturas se asignan los antígenos correspondientes.

La tipificación fue hecha por la Bióloga Gabriela de la Rosa en el laboratorio de serología HLA del Departamento de Inmunogenética.

El material y equipo que fue utilizado, se muestra en el apéndice.

## VI RESULTADOS

Los resultados de este trabajo muestran que de los 22 pacientes, el 86% de ellos se caracterizaron clínicamente como LLN (18 lepra lepromatosa nodular), el 5% como LLD (1 con lepra lepromatosa difusa) y el 9 % sólo como LL (2 pacientes con lepra lepromatosa). Un paciente fue diagnosticado como LL, pero sin determinar el tipo. La edad promedio es de 55 años, que fluctúa entre los 18 y los 81 años. Los pacientes se trataron con sulfonas, talidomida o rifampicina según el criterio del médico. La mayoría de ellos (76%), es consistente y ha llevado su tratamiento con regularidad, mientras que el 24 % abandonado el tratamiento.

En el cuadro 6 se muestran los resultados de los DNAs de los pacientes y testigos digeridos con la enzima de restricción Hind III e hibridados con la sonda  $\alpha 2$ . Se obtuvieron 6 bandas de los siguientes tamaños, 6.4, 5.5, 4.5, 4.3, 3.7 y 2.7 Kb. Dichas bandas están presentes en ambas poblaciones con la misma frecuencia. Los patrones de bandedo obtenidos con Hind III/ $\alpha 2$  se muestran en la figura 6.

En el mismo cuadro se observan los DNAs digeridos con Eco RV los cuales se hibridaron con  $\alpha 2$ . Se encontraron 7 bandas para los pacientes con LL, estas son de 19.4, 10.4, 7.5, 2.7, 2.5, 1.6 y 1.4 Kb, y para los sujetos sanos se hallaron 10 bandas: de 19.4, 10.4, 8.5, 7.5, 5.7, 5.1, 2.6, 2.5, 1.6 y 1.4 Kb. Aunque las 6 bandas que comparten los pacientes y los sanos se presentan con diferente frecuencia, dichas diferencias no representan ningún cambio genético pues no son estadísticamente significativos. Enfatizando, el 90.9 % de los pacientes con LL tienen las bandas de 19.4 y 10.4 Kb, la banda de 7.5 está presente en 36.6 %, la de 2.5 Kb en 100 %, la de 1.6 Kb en 81.8 %, y

**CUADRO 6**  
**PATRONES DE BANDEO OBTENIDOS CON  $\alpha$  2**

Hind III						EcoR V					
LL		T		X <sup>2</sup>	P	LL		T		X <sup>2</sup>	P
Kb	%	Kb	%			Kb	%	Kb	%		
6.4	100	6.4	100	0	NS	19.4	90.9	19.4	100	0	NS
5.5	100	5.5	100	0	NS	10.4	90.9	10.4	83.3	0	NS
4.5	100	4.5	100	0	NS	8.5	0	8.5	8.3	1.15	NS
4.3	100	4.3	100	0	NS	7.5	36.6	7.5	25.0	0.01	NS
3.7	100	3.7	100	0	NS	5.7	0	5.7	8.3	1.15	NS
2.7	100	2.7	100	0	NS	5.1	0	5.1	8.3	1.15	NS
						2.7	9.0	2.7	0	0.001	NS
						2.6	0	2.6	50.0	0	NS
						2.5	100	2.5	50.0	0	NS
						1.6	81.8	1.6	91.6	2.7	NS
						1.4	90.9	1.4	100	1.9	NS

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos



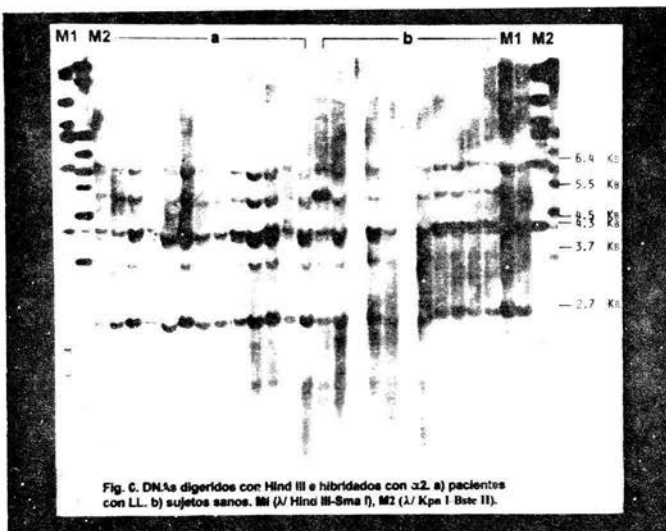


Fig. C. DNAs digeridos con Hind III e hibridados con  $\lambda$ 2. a) pacientes con LL. b) sujetos sanos. M1 ( $\lambda$ /Hind III-Sma I), M2 ( $\lambda$ /Kpn I Bst II).

la de 1.4 Kb en 90.9 % de los casos. En los sanos las frecuencias son de 100 %, 83.3 %, 25 %, 50 %, 91.6 % y 100 % respectivamente. A pesar de la ausencia de las bandas de 8.5, 5.7, 5.1 y 2.6 Kb en los pacientes con LL y la de 2.7 Kb en los sanos, no existe diferencia significativa entre los grupos estudiados.

En el cuadro 7 se muestra que los patrones de bandeo de los pacientes y de los testigos sanos, obtenidos con la digestión con Eco RI e hibridación con  $\beta 1$ . Los resultados indican que son idénticos, pues presentan sólo 2 bandas una de 17 y una de 14.9 Kb.

En los patrones de bandeo obtenidos utilizando la sonda  $\gamma 1$  con los DNAs digeridos con Hind III, se encuentran 5 bandas en ambos grupos que son de: 5.9, 5.5, 4.6, 4.4 y 3.5 Kb. Dos de éstas, son más frecuentes en los LL que en los sanos. La de 5.5 Kb se observa en el 36.6% y la de 4.6 Kb en el 100% de los pacientes. Los resultados en los sanos son muy semejantes pues la bandas se hallan en el 25 % y 91.6 % respectivamente de ellos. Estas diferencias no alcanzaron ningún significado estadístico como se observa en el cuadro 8.

De la digestión con EcoRI e hibridación con  $\gamma 1$ , se obtuvieron 8 bandas tanto en pacientes con LL como en sanos. Los tamaños son de 7.2, 6.0, 5.3, 4.4, 3.7, 3.3, 2.6 y 1.8 Kb (fig. 7), con diferentes frecuencias en 4 bandas; la de 4.4 Kb con 18.8 %, 3.3 Kb con 86 %, 2.6Kb con 78 % y de 1.8 Kb con 86 % en pacientes con LL, y en los testigos sanos se observan en 68.2 %, 70 %, 70 % y 87.5 % de los casos, para las bandas respectivas. Existe una diferencia significativa en la banda de 4.4 Kb ,  $X^2=13.3$   $P=0.0002$  (cuadro 8).

En el cuadro 9 se muestran las diferentes bandas obtenidas con la digestión con Eco RI y la hibridación con  $\gamma 3$ . Para los enfermos hay 4 bandas, 3 de éstas con la misma

**CUADRO 7**  
**PATRON DE BANDEO OBTENIDO CON  $\beta 1$**

		EcoRI					
LL		T		$X^2$	P		
Kb	%	Kb	%				
17	100	17	100	0	NS		
14.9	100	14.9	100	0	NS		

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos

**CUADRO 8**  
**PATRONES DE BANDEO OBTENIDOS CON  $\gamma 1$**

Hind III						EcoR I					
LL		T				LL		T			
Kb	%	Kb	%	X <sup>2</sup>	P	Kb	%	Kb	%	X <sup>2</sup>	P
5.9	100	5.9	100	0	NS	7.2	100	7.2	100	0	NS
5.5	9.09	5.5	9.09	0.62	NS	6.0	100	6.0	100	0	NS
4.6	100	4.6	90	0.002	NS	5.3	100	5.3	100	0	NS
4.4	100	4.4	100	0	NS	4.4	18.8	4.4	68.2	13.3	0.0002
3.5	100	3.5	100	0	NS	3.7	100	3.7	100	0	NS
						3.3	86	3.3	70	0.529	NS
						2.6	78	2.6	70	0.009	NS
						1.8	86	1.8	87.5	0.24	NS

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos

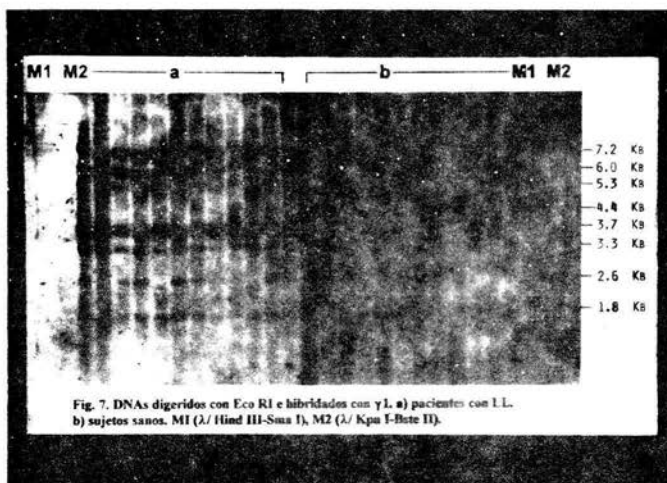


Fig. 7. DNAs digeridos con Eco RI e hibridados con  $\gamma$ L. a) pacientes con L.L. b) sujetos sanos. M1 ( $\lambda$ / Hind III-Sma I), M2 ( $\lambda$ / Kpn I-BstE II).

**CUADRO 9**  
**PATRON DE BANDEO OBTENIDO CON  $\gamma$ 3**

LL		Eco RI		X <sup>2</sup>	P
		T			
Kb	%	Kb	%		
4.2	9.1	4.2	59.1	14.6	0.0001
2.2	100	2.2	100	0	NS
1.7	100	1.7	100	0	NS
1.4	100	1.4	100	0	NS

LL= Pacientes con LL

T =Testigos sanos

frecuencia que en sanos, 2.2, 1.7 y 1.4 Kb. Nuevamente aparece una banda de 4.4 Kb presente sólo en el 9.1 % en los pacientes y en un 59.1 % de los testigos. Esta última banda disminuída en LL representa una diferencia significativa entre ambas poblaciones ( $X^2=14.6$   $P=0.0001$ ).

En la hibridación de  $\gamma 4$  con los DNAs digeridos con Hind III, el 70 % de los pacientes presentan una banda de 12.2 Kb, el 90% expresan una de 4.4 Kb, y el 10% una de 5.8 Kb; mientras que los testigos las expresan en un 80 %, 100 % y 10 % respectivamente. Además, el 10 % de los pacientes tienen una banda de 6.4 Kb que no está presente en los testigos; sin embargo, la existencia de esta banda adicional no es una diferencia significativa (cuadro 10).

La hibridación de  $\gamma 4$  con los DNAs digeridos con Eco RV, mostró 3 bandas en los pacientes con LL, de 18.2, 14.6 y 9.9 Kb mientras que en los sanos sólo aparecen las bandas de 18.2 y 14.6 Kb. La presencia de la banda de 18.2 en el 100 % de los pacientes contra el 90.9 % en testigos no es significativa. La ausencia de la banda de 9.9 Kb en testigos tampoco representa una diferencia significativa (cuadro 10).

En los DNAs digeridos con Hind III e hibridados con  $\delta 1$ , se observan tres bandas en los pacientes con LL que son de 9.4, 7.8 y 4.4 Kb y tienen una frecuencia del 11.1, 11.1 y 100 % respectivamente; los testigos muestran 3 bandas de 5.4, 4.5 y 4.4Kb con una frecuencia del 10, 20 y 100 % respectivamente. La ausencia de las bandas de 9.4 y 7.8 Kb en testigos y la de 4.5 Kb en pacientes con LL no implican cambios significativos (cuadro 11).

Tanto en pacientes LL como en los testigos, se ven 2 bandas con la digestión con

**CUADRO 10**  
**PATRONES DE BANDEO OBTENIDOS CON  $\gamma$  4**

Hind III						Eco RV					
LL		T				LL		T			
Kb	%	Kb	%	$X^2$	P	Kb	%	Kb	%	$X^2$	P
12.2	70	12.2	80	1.3	NS	18.2	100	18.2	90.9	0.6	NS
4.3	90	4.3	100	0.4	NS	14.6	100	14.6	100	0	NS
6.4	10	6.4	0	0	NS	9.9	12.5	9.9	0	0.2	NS
5.8	10	5.8	10	0.7	NS						

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos



## CUADRO 11

### PATRONES DE BANDEO OBTENIDOS CON $\delta 1$

Hind III						Eco RI					
LL		T		X <sup>2</sup>	P	LL		T		X <sup>2</sup>	P
Kb	%	Kb	%			Kb	%	Kb	%		
9.4	11.1	9.4	0	0	NS	11.6	100	11.6	100	0	NS
7.8	11.1	7.8	0	0	NS	4.45	29.7	4.45	60	7.7	0.005
4.5	0	4.5	20	0.44	NS						
4.4	100	4.4	100	0	NS						

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos

Eco RI después de la hibridación con  $\delta 1$ . Dichas bandas fueron de 11.6 y 4.45 Kb. La frecuencia en la banda de 4.45 Kb es distinta pues existe una proporción del 29.7 % en LL, y aumenta al 60 % en testigos. Esta diferencia entre los dos grupos es relevante ( $X^2=7.7$   $P=0.005$ ) (cuadro 11).

La hibridación de  $\delta 2$  con los DNAs digeridos con Hind III mostró 9 bandas para los LL de 15.4, 14.8, 12.7, 11.1, 9.4, 6.6, 5.7, 4.45 y 3.2 Kb y 10 bandas para los testigos de 14.8, 12.7, 11.1, 9.4, 6.6, 5.7, 5.3, 4.45, 3.5, y 3.2 Kb. Tres bandas presentan diferentes frecuencias entre ambas poblaciones: la de 11.1 que está en el 18.1 % en pacientes y en el 54.5 % de los testigos. La de 5.7 Kb se halla en un 27.2 % de los pacientes con LL y en el 45.4 % de los testigos y la de 4.45 Kb se observa en el 45.4 % en LL y el 54.5 % de los testigos. Estas diferencias no son significativas. Finalmente, la banda de 15.4 Kb presente en el 9 % de los pacientes está ausente en los testigos, lo cual no tiene ningún significado. Las bandas de 5.3 y 3.5 Kb en los sanos están presentes en un 9 y 18.1 % respectivamente, y no se encuentran en LL, aunque estas diferencias tampoco son significativas (cuadro 12).

La hibridación con la sonda  $\delta 2$  con los DNAs digeridos con Eco RI, muestran una banda de 4.8 Kb presente en ambos grupos, y nuevamente se observa una banda de 4.45 Kb ausente en los pacientes con LL (0 % en pacientes contra 63.6 % de testigos,  $X^2=24.0$   $P=0.00001$ ) (cuadro 12) (fig.8).

Por último es importante señalar que también se encontró una disminución significativa en la existencia de una banda de 4.45 Kb al hibridar con la sonda  $\alpha 2$  ( $X^2=7.6$   $P=0.005$ ) (fig. 9) (cuadro 13) lo mismo que en  $\gamma 2$  ( $X^2=8.6$   $P=0.003$ ) en los LL con respecto

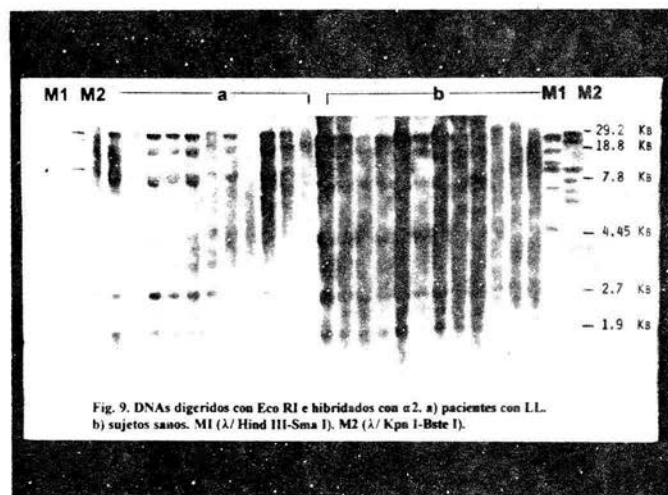
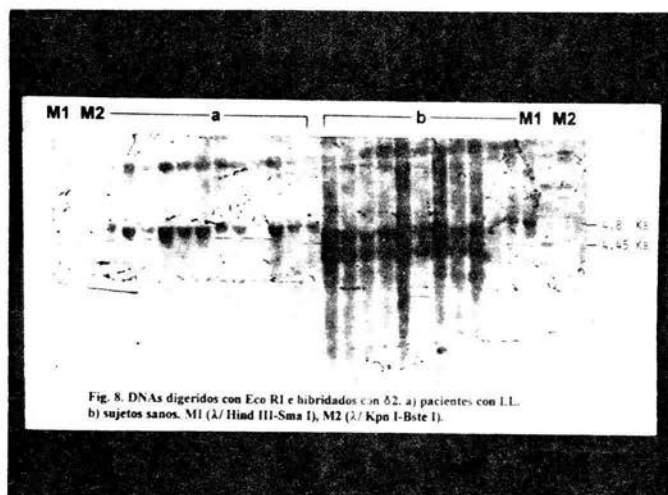
## CUADRO 12

### PATRONES DE BANDEO OBTENIDOS CON $\delta 2$

Hind III						Eco RI					
LL		T		$\chi^2$	P	LL		T		$\chi^2$	P
Kb	%	Kb	%			Kb	%	Kb	%		
15.4	9	15.4	0	0	NS	4.8	100	4.8	100	0	NS
14.8	100	14.8	100	0	NS	4.45	0	4.45	64	24	<0.00001
12.7	100	12.7	100	0	NS						
11.1	18.1	11.1	54.5	3	NS						
9.4	100	9.4	100	0	NS						
6.6	54.5	6.6	54.5	0	NS						
5.7	27.2	5.7	45.4	0.2	NS						
5.3	0	5.3	9	1.7	NS						
4.45	45.4	4.45	54.5	0.7	NS						
3.5	0	3.5	18.1	0	NS						
3.2	100	3.2	100	0	NS						

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos



**CUADRO 13**  
**PATRON DE BANDEO OBTENIDO CON  $\alpha$  2**

LL		Eco RI		X <sup>2</sup>	P
Kb	%	Kb	T		
29.2	82	29.2	83	0.005	NS
19.4	9	19.4	0	2.18	NS
18.8	82	18.8	75	0.143	NS
7.8	91	7.8	100	2.18	NS
4.45	23	4.45	58	7.6	0.005
2.7	100	2.7	100	0	NS
1.9	73	1.9	87.5	1.42	NS

LL= Pacientes con LL

T= Testigos sanos

a los sanos, otra vez cuando la digestión de los DNAs fue con la enzima Eco RI.

En el cuadro 14 se resumen los hallazgos significativos de las diferentes regiones en los pacientes con respecto a los sanos. En la región Vy1, el 18.2 % de los pacientes presentan la banda contra el 68.2 % de los sanos; en la región Cy2 la banda existe en el 9.1 % de los enfermos contra el 59.1 de los sanos; para la región Vδ2 el 29.7 % de los pacientes la tienen contra el 60 % de los testigos; en la región Jδ2 ningun paciente la presenta pero el 63.6 % de los sujetos sanos la tienen. Por último, también la región VJC  $\alpha$  muestra una alteración en el polimorfismo de  $\alpha$ 2, pues el 81 % de los sanos muestran la banda y sólo el 40.9 % de los enfermos.

El patrón de bandas del TCR de cada uno de los sujetos sanos se muestra en el cuadro 15; 3 individuos presentan defecto en las 4 regiones es decir ausencia de todas las bandas, 3 individuos carecen de ella en 3 regiones, un individuo muestra 2 regiones afectadas, 7 tienen una region alterada y los 8 restantes no muestran ninguna alteración.

En el cuadro 16 se muestran las alteraciones de cada paciente con LL: 5 pacientes tienen defecto en 3 regiones, 3 muestran 2 regiones alteradas y los 14 individuos restantes presentan ausencia de banda en las 4 regiones .

Debido al papel central del complejo trimolecular en la activación de la respuesta inmunológica celular se intentó buscar una correlación entre dos de los componentes del complejo, el TCR por un lado y por el otro los antígenos HLA. Actualmente, en el Departamento de Inmunogenética también se está investigando la participación de los péptido antigénico en la inducción de protección o de supresión en la lepra.

Los datos de la tipificación de los sujetos incluidos en este estudio fueron obtenidos

**CUADRO 14**  
**ALTERACIONES DEL TCR EN LA LL**  
**CON LA ENZIMA Eco RI**

REGION	PACIENTES (%) CON BANDA	TESTIGOS (%) CON BANDA	X <sup>2</sup>	P
VJC α	40.9	81	7.6	0.005
V γ1	18.2	68.2	13.3	0.0002
V γ4	23.8	63.6	8.6	0.003
C γ2	9.1	59.1	14.6	0.0001
V δ2	29.7	60	7.7	0.005
J δ2	0	63.6	23.6	<0.00001

El tamaño de la banda en todas las regiones es de aprox. 4.45 Kb.

## CUADRO15

### PATRON DE BANDAS ALTERADAS EN SANOS

TESTIGOS	V $\gamma$ 1	C $\gamma$ 2	V $\delta$ 2	J $\delta$ 2
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	+	+	+
8	+	-	+	+
9	-	+	+	+
10	-	+	+	+
11	-	-	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	-	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	+	-	+
20	+	+	-	+
21	+	+	ND	-
22	-	+	ND	-



## CUADRO 16

### PATRON DE BANDAS ALTERADAS EN LL

PACIENTES	<i>V</i> $\gamma 1$	<i>C</i> $\gamma 2$	<i>V</i> $\delta 2$	<i>J</i> $\delta 2$
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	+	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	+	-	-	-
14	+	+	-	-
15	+	-	+	-
16	+	-	+	-
17	-	-	+	-
18	-	-	+	-
19	-	-	+	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-

LL=Lepra lepromatosa

en el Laboratorio de Serología HLA del Departamento de Inmunogenética.

Al analizar la posible correlación de los antígenos clase II con los diferentes polimorfismos de los genes del TCR, se encontró en todas las regiones estudiadas, que el antígeno HLA-DQ1 se halla en una frecuencia mayor en los pacientes sin banda que en los testigos sin banda: En el caso de V $\gamma$ 1; 57.9 % de los pacientes son DQ1<sup>+</sup> y solo el 27.2 % de los sanos. En cuanto a C $\gamma$ 2, el 63.2 % de los pacientes son DQ1<sup>+</sup> vs. 36.4 % de los sanos. Para V $\delta$ 2; 52.6 % de los pacientes son portadores del DQ1 vs. 35 % de los sanos. Por último, en J $\delta$ 2- 68.4 % de los pacientes son DQ1<sup>+</sup> vs. 22.7 % de los sanos (cuadro 17).

En el caso del antígeno DQ3, la distribución que se observa en todas las regiones es de una frecuencia menor en los pacientes que presentan la banda y que además son portadores del DQ3 que en los sujetos sanos: Para la región V $\gamma$ 1, el 10.5 % de los pacientes son DQ3<sup>+</sup> vs. 45.4 % de los sanos. En el caso de C $\gamma$ 2, el 5.3% de los pacientes son portadores del DQ3 vs. 40.9 % de los sanos. Para V $\delta$ 2, el 15.8 % de los pacientes son DQ3<sup>+</sup> vs. 30 % de los sanos. En la última región, J $\delta$ 2, ninguno de los pacientes expresa el DQ3 vs. 31.8 % de los sanos (cuadro 17).

## CUADRO 17

### CORRELACION TCR/HLA EN LL Y TESTIGOS

PACIENTES (%)			TESTIGOS (%)			
	S/BANDA	C/BANDA	<b>V</b> $\gamma$ 1	S/BANDA	C/BANDA	P
DQ 1	57.9	<b>21.05*</b>		27.2	<b>50*</b>	<b>*0.002</b>
DQ 3	36.8	<b>10.5**</b>		18.2	<b>45.4**</b>	<b>**0.005</b>
	S/BANDA	C/BANDA	<b>C</b> $\gamma$ 2	S/BANDA	C/BANDA	P
DQ 1	63.2	<b>5.3*</b>		36.4	<b>40.9*</b>	<b>*0.002</b>
DQ 3	42.1	<b>5.3**</b>		22.7	<b>40.9**</b>	<b>**0.002</b>
	S/BANDA	C/BANDA	<b>V</b> $\delta$ 2	S/BANDA	C/BANDA	P
DQ 1	52.6	<b>15.8*</b>		35	<b>50*</b>	<b>*0.009</b>
DQ 3	31.6	15.8		25	30	
	S/BANDA	C/BANDA	<b>J</b> $\delta$ 2	S/BANDA	C/BANDA	P
DQ 1	<b>68.4*</b>	0		<b>22.7*</b>	50	<b>*0.009</b>
DQ 3	47.4	0		27.3	31.8	

C/BANDA= CON BANDA

S/BANDA= SIN BANDA

## VII DISCUSION

La LL es un modelo ideal para analizar la participación de diversos factores y marcadores genéticos de la respuesta inmunológica en los mecanismos de supresión, que son una característica de las infecciones intracelulares y que han sido ampliamente investigados en la lepra.

Ahora es claro que el TCR juega un papel fundamental en la inducción de una respuesta inmunológica eficiente y que por lo tanto, sí hay alteraciones en los genes, esto puede conducir a defectos importantes en la inducción de la respuesta a la micobacteria. La naturaleza del repertorio del TCR y su participación en la respuesta inmunológica ha sido razonablemente explorada en diversas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, miastenia gravis, diabetes mellitus tipo I y lupus eritematoso entre otras [56]. Sin embargo la participación del TCR en la respuesta inmunológica a los antígenos exógenos ha sido poco explorada.

Debido a sus alteraciones inmunológicas, la lepra lepromatosa permite analizar las interacciones y los fenómenos de reconocimiento del TCR y a las subpoblaciones de linfocitos T que participan en la respuesta inmunológica, las lesiones en la lepra han sido claramente caracterizadas y se sabe que en las lesiones de TT hay un acúmulo de células CD4<sup>+</sup> y producción de interleucinas, como la IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que en las lesiones de pacientes con LL, se observan células CD8<sup>+</sup> y la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 [97].

Los hallazgos de este estudio demuestran, sin lugar a duda, que existe un defecto en los genes del TCR  $\gamma\delta$  en la LL, aunque también parece haber un problema en los genes  $\alpha$  (cuadro 14). La alteración se observa siempre en las digestiones obtenidas con

la enzima Eco RI y en un fragmento de 4.45 Kb en todos los genes. Este defecto probablemente induce una no respuesta específica, por falla en el reconocimiento de las secuencias expuestas por el HLA-clase II para que el TCR las acople. Es muy posible que este defecto se deba a la delección de genes en la línea germinal y que además se herede en forma homocigótica, pues sí se observan los cuadros 15 y 16, se ve claramente que el 63.6 % de los pacientes muestran ausencia de todas las bandas V $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, V $\delta$ 2 y J $\delta$ 2; el 22.7 % tienen una sola banda, el 13.6 % muestra dos bandas y ninguno muestra 3 o 4 bandas (0 %). Es interesante señalar que cada uno de los pacientes carecen de por lo menos dos bandas. También es importante señalar que sí bien los 22 pacientes pertenecen al polo LL, la mayoría, es decir el 86 %, manifiestan la forma nodular, por lo que se puede deducir que es precisamente en este subtipo de LL donde se encuentra el defecto. Modlin y col. [55] sugirieron la participación de la cadena  $\beta$  del TCR-2, desde los primeros estudios, en los que se encuentra un rearrreglo del gen  $\beta$  del TCR, al comparar el DNA genómico con el DNA de clonas de célula T de lesiones de pacientes con LL. Más adelante, se observó que en las reacciones reversas de pacientes con lepra había una mayor proporción de células T que usan a las familias V $\beta$ 6, V $\beta$ 12, V $\beta$ 14 y V $\beta$ 19 [92]. De hecho, se corroboró la participación de V $\beta$ 6 en el reconocimiento de T, con una mayor expresión de las familias V $\beta$ 6.1, V $\beta$ 6.2, V $\beta$ 6.3, V $\beta$ 6.4, V $\beta$ 6.5, V $\beta$ 6.8 y V $\beta$ 6.9 en las subpoblaciones de linfocitos T presentes en las lesiones de pacientes con TT, que aquellas de pacientes con LL [93]. Valga enfatizar que en los trabajos mencionados, se analizó el patrón molecular del TCR en las formas benignas de la lepra. En el caso del trabajo de Wang y col. se estudiaron las reacciones reversas, las cuales representan una

forma natural de manifestación de hipersensibilidad retardada en la lepra, en la cual el incremento de la respuesta celular específica es paralela a la eliminación del bacilo de las lesiones. En el segundo caso se trata del análisis en pacientes TT, en los que la respuesta celular esta intacta. De modo que es esencial señalar que los hallazgos mencionados no son contradictorios, pues la respuesta celular se activa en las formas benignas y no en las malignas, como ocurrió en el presente estudio. En esta investigación no se encontró ninguna alteración en los genes de la cadena  $\beta$ . Estos datos no representan necesariamente una discrepancia en los resultados comparados con otras investigaciones debido a los factores que se señalan a continuación:

El primero y más importante es el tipo de lepra que se estudió en los 3 casos; el segundo radica en los diferentes métodos utilizados en los 3 estudios, así, Wang y col. [92,93] aislaron RNA, a partir del cual sintetizaron cDNA.. Este se amplificó utilizando el método de PCR con iniciadores de cada familia  $V\beta$  de tal manera que se sólo observan aquellos genes que se expresan. En el presente estudio se utilizó el método de RFLP, aplicando a DNA genómico. con este método se observan tanto los genes que se expresan como los que no se expresan. Además, aun cuando se utilizaron los mismos métodos, se encuentran pequeñas diferencias que son cruciales en los resultados, debido a la utilización de diferentes sondas. Los hallazgos de este trabajo fueron obtenidos con una sonda que reconoce a la familia  $V\beta 8$ , en tanto que los resultados del trabajo de Modlin y col. [55] se obtuvieron con el uso de las sondas que reconocen la región  $J\beta 1$  y  $J\beta 2$ . En este último estudio se compararon el DNA genómico con el DNA obtenido de la lesión del mismo individuo; mientras que en este trabajo se comparó el DNA genómico de

22 pacientes con LL con el DNA genómico de 22 sujetos sanos. Es importante enfatizar que en los otros estudios sólo se estudiaron a 3 pacientes.

Sí se observan los cuadros 15 y 16, queda claro un defecto en el repertorio codificado por los genes de la cadena  $\gamma$  y uno en los genes de la cadena  $\delta$  dando como resultado una función anormal en el reconocimiento de la célula T, que conduce a la inducción de una respuesta inmunológica celular de supresión. En este sentido es importante señalar la intervención del TCR  $\gamma\delta$  quizás más que el  $\alpha\beta$  en enfermedades infecciosas tales como la malaria, leishmaniasis y lepra. Por ejemplo, en las reacciones granulomatosas inducidas por lepromina en pacientes con TT se observó que hay un incremento de células T con receptor  $\gamma\delta$  de 5 a 8 veces. Las clonas de linfocitos T obtenidas de células de estos granulomas, proliferan "*in vitro*" a los antígenos micobacterianos [34]. Además, hay evidencias de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> TCR  $\gamma\delta$ , obtenidas de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, cuando estos se ponen en contacto con antígenos micobacterianos. También se ha encontrado proliferación de la célula T  $\gamma\delta$  en respuesta al Plasmodium falciparum [54], Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium leprae. Estas células secretan IL-2 y son capaces de lisar a la célula infectada [35].

Nuestros resultados muestran claramente un defecto en los genes que codifican para la región V $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, V $\delta$ 2 y J $\delta$ 2 de los genes del TCR en pacientes con LL, indicado que este defecto es la causa al menos en parte, de la no respuesta celular característica en este polo de la enfermedad. Además reafirma la participación esencial de las células

T con TCR  $\gamma\delta$  en los mecanismos de protección, que permiten que en un individuo infectado con M. leprae quede inmune al padecimiento .

Fujita y col. [98] examinaron la cinética de las células T con TCR-1 ( $\gamma\delta$ ) en las lesiones provocadas por la lepromina y observaron que dos días después de la aplicación, la mayoría de las células T expresan TCR-2 ( $\alpha\beta$ ), mientras que solo el 4.4 % de las células expresan CD3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>. Hasta el día 21 observaron 16.0 % de células T con TCR  $\gamma\delta$ , aun cuando las  $\alpha\beta$  predominan. Esta cinética contradice la hipótesis de "regulación temprana" por las  $\gamma\delta$  observada en ratón. La mayoría de las células expresan a las familias V $\delta$ 2 y V $\gamma$ 9 y proliferan en las lesiones de piel, sugiriendo que estas células son capaces de responder a los antígenos micobacterianos y juegan un papel activo en la reacción a la lepromina, aun cuando no encontraron ninguna correlación con la formación del granuloma, el tamaño de las áreas necróticas, el contenido de bacilos o la frecuencia de células CD4 o CD8.

Por otro lado, en este trabajo se logró hacer un análisis tratando de correlacionar la presencia de los antígenos clase II con el defecto del TCR. Esto es fundamental, ya que Gorodezky y col . describieron previamente [76] que existe un gen Is ligado al DQ1 que probablemente presenta a los péptidos de M. leprae a las células Th2 que inducen supresión de la respuesta inmunológica celular.

El complejo trimolecular TCR-péptido-clase II es central para el curso que toma una infección, motivo por el cual se decidió buscar la correlación de ambos complejos genéticos TCR y HLA. El cuadro 16 muestra claramente que existe una correlación franca entre la ausencia de las bandas en cuestión y el DQ1. Así se observa que el 57.9 % de



los pacientes sin la banda V $\gamma$ 1 son DQ1 y sólo el 21.05 % de los portadores de la banda son DQ1. Esta proporción se invierte en los sanos (P=0.002). Además, entre los sanos DQ3<sup>+</sup> 45.4 % presentan la banda y solo el 10.5 % de los enfermos DQ3<sup>+</sup> la tienen (P=0.005). Las proporciones son en todos los casos, es decir para C $\gamma$ 2, V $\gamma$ 1, V $\delta$ 2 y J $\delta$ 2. En todos se mantiene la correlación de ausencia de banda en los enfermos DQ1 significativamente más que en los sanos. No se encontró ninguna preferencia por los subtipos del DQ1, DQ5 o DQ6, lo que probablemente significa que las secuencias conservadas del nicho DQ1 pueden asociar a los diferentes péptidos de la micobacteria dejando expuestos a los aminoácidos relevantes para que los 3 sitios del TCR que le confieren especificidad a la respuesta inmunológica celular, cierren el complejo trimolecular. Seguramente este mecanismo involucra a la célula Th2 que presenta el defecto germinal de los genes del TCR1 y por lo tanto se induce supresión en la LL.

De los individuos sanos que no tienen la banda de 4.45 Kb, 2 son lepromino positivos y en los otros 4 no se aplicó la prueba. Por estos motivos, sería muy aventurado sugerir algún mecanismo de interacción HLA-DQ-TCR-micobacteria. En el futuro próximo se aplicará la intradermoreacción en 3 de los 4 sujetos sanos que carecen de la banda, con el objeto de analizar cuidadosamente esta interacción.

Los resultados de este trabajo abren las puertas de un nuevo enfoque en la medicina: la "Medicina Predictiva", pues al conocer con precisión el perfil genético de un individuo, se pueden identificar los defectos por eliminaciones germinales del TCR y por su perfil HLA. Con este conocimiento, se puede prevenir a dichas personas para que no se pongan en contacto con enfermos y que sean vacunados, pues están dentro de un

grupo de personas que ya se pueden clasificar como genéticamente en riesgo. En otras situaciones, el recurso de la vacunación dirigida puede ser muy eficientemente utilizado.

Los resultados indican que se requiere la complementariedad DQ1<sup>+</sup>/defecto  $\gamma\delta$  para que ante la infección se manifieste la enfermedad, lo cual significa que una parte muy importante de la incapacidad del hospedero para montar una respuesta de protección frente a la infección con M. leprae radica en la ausencia de ciertos polimorfismos del TCR conjuntamente con la presencia de un marcador genético particular de la región de clase II, el HLA-DQ1.

Por último, un trabajo reciente de Ohmen y col. [52] demuestra que el TCR ( $\gamma\delta$ ) también es determinante en la generación de respuestas protectoras ante la presentación de péptidos de M. tuberculosis. Ellos analizaron las células T que expresan TCR  $\gamma\delta$  tanto de sangre periférica como de líquido pleural de pacientes con tuberculosis pulmonar. Estas células proliferaban en presencia del M. tuberculoide y utilizan el TCR-1 de la familia V $\delta$ 2. Sus datos indican que el bacilo tuberculoso promueve la expansión *in vitro* de células con receptor  $\gamma\delta$  que dependen del apareamiento específico de las cadenas V $\delta$ 2 y V $\gamma$ 9, sin selección aparente de regiones de unión V-J. Este hallazgo es de gran interés, ya que en nuestro estudio encontramos que la banda correspondiente a la región V $\delta$ 2 se encuentra disminuída en los pacientes con LL, quizás debido a una eliminación en la línea germinal por lo que probablemente esta región no se traduzca ni se exprese, y al no expresarse, no hay reconocimiento de los péptidos por parte de la célula Th1 induciendo de esta manera la anergia específica que también se observa en la tuberculosis pulmonar.

Trabajos como el que aquí se describe, abren las puertas por un lado a la ya mencionada "Medicina predictiva" y por el otro de la "Medicina Preventiva" con el uso de vacunaciones dirigidas que se lleven a cabo con la mezcla de péptidos sintéticos específicos. En este sentido, Pfeffer y col. [99] analizaron el linfocito T de sangre periférica de individuos reactivos a diferentes péptidos de antígenos micobacterianos y encontraron que las células T con TCR  $\alpha\beta$  responden a fracciones  $>30$  KDa mientras que las células con TCR  $\gamma\delta$  reconocen a fracciones  $> 3$ Kda. También probaron que las  $\alpha\beta$  reconocen componentes proteicos y las  $\gamma\delta$  no, pues no hay ningún cambio en el comportamiento cuando los lisados se tratan con proteasas y sólo algunas  $\gamma\delta$  responden a la HSP-65 KDa. Las perspectivas son muy alentadoras y una de las cuestiones inmediatas a investigar es identificar a los inductores de supresión y protección en el contexto de los genes  $\gamma\delta$  y/o  $\alpha\beta$  y en presencia y/o ausencia del HLA-DQ1. La identificación de estas secuencias de la o las micobacterias permitirá el diseño efectivo de vacunas sintéticas, en un futuro cercano.

## VIII CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran la existencia de un defecto en el TCR  $\gamma\delta$  en LL. El defecto es por lo menos parcialmente responsable de la anergia específica en la lepra lepromatosa.

2. Hay una disminución significativa de bandas de la regiones V $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, V $\delta$ 2 y J $\delta$ 2. Se sugiere que existe una eliminación de la línea germinal, en los pacientes con LL que se hereda en forma homocigota.

3. Los pacientes con LL presentan:

Ausencia de todas las bandas	63.6 %
Presencia de una banda	22.7 %
Presencia de dos bandas	13.6 %
Presencia de tres bandas	0 %

Todos los pacientes carecen por lo menos de 2 fragmentos polimórficos.

4. Los resultados indican que se requiere de un defecto en los genes  $\gamma$  y uno en los  $\delta$  para dar como resultado un reconocimiento anormal de los péptidos micobacterianos, el cual induce supresión de la respuesta inmunológica celular y por lo tanto un estado de anergia específica y el establecimiento de una enfermedad severa.

5. El DQ1 está significativamente disminuído en los pacientes con LL con banda al comparar con los sujetos sanos. Además, la frecuencia de DQ1 es mayor en los pacientes LL que carecen de las bandas que en los pacientes que las presentan. Estos resultados sugieren que las secuencias conservadas del nicho del antígeno DQ1 pueden asociar peptidos que presentan aminoácidos relevantes al TCR  $\gamma\delta$  de las células Th2,

sólo en presencia del defecto del TCR. Se propone que las regiones del nicho DQ1 que intervienen son las conservadas, debido a que no se encontró ninguna asociación significativa de ausencia o presencia de polimorfismos del TCR con ninguno de los subtipos del DQ1, es decir ni con el DQ5 ni con el DQ6. Si se hubiese encontrado correlación con alguno de los dos, entonces la participación sería de las secuencias polimórficas determinantes de la especificidad de la molécula.

6. Los sujetos sanos que no presentan las bandas no han tenido contacto con el M. leprae por lo que la hipótesis es que sí estos individuos estuvieran en contacto con la micobacteria, probablemente desarrollarían el polo LL de la enfermedad, después de ser infectados.

7. El DQ3 se encuentra incrementado en los pacientes con todas las bandas. Se propone que el nicho de DQ3 asocia péptidos que activan células Th1 induciendo protección.

8. Los resultados de la eliminación presente de la línea germinal de los genes del TCR  $\gamma\delta$  y la asociación con la presencia del DQ1, indica que se requiere de la existencia del defecto del TCR  $\gamma\delta$  y del DQ1 en el mismo individuo, para que éste, al exponerse al M. leprae desarrolle el polo maligno de la lepra. Con estos hallazgos se podrán identificar a sujetos genéticamente en riesgo de desarrollar el polo maligno de la lepra.

## **IX APENDICE**

### **a) Material**

Todo el material debe estar estéril.

Tubos de plástico de 10 X 1.5 cm con tapón.

Bulbos de plástico de 1 ml

Recipientes de vidrio de 500 ml.

Matraces aforados de 500 ml.

Vasos de precipitados de 250 ml.

Gradillas.

Micropipetas de volumen variable.

Matraces Erlenmeyer de 500 ml.

Tubos eppendorf de 1.6 ml.

Tubos eppendorf de 0.6 ml.

Puntas desechables para micropipeta.

Cronómetro.

Membranas de Nylon cargadas positivamente

Servilletas.

Papel filtro Whatman para cromatografía

Papel filtro Whatman #1

Membrana de diálisis, Sigma D-9277

Bolsas de plástico Kapak/scotchpak de 25.40 X 30.48 cm

Probetas de 50 y 100 ml

Selladora

Recipientes de plástico de 4 l.

Cajas de plástico de 30 X 20 cm

Guantes desechables.

Kleen pack.

Navaja.

Cassettes de exposición.

Pantallas intensificadoras.

Contador Geiger para radiación  $\beta$

Pantalla de acrílico de 90 mm de espesor.

Placas radiográficas X-OMAT AR

Agujas del No. 18

Un peso de 500 gr.

### **b) Equipo**

Balanza analítica y granataria.

Baño María a 37, 53 y 60°C.

Centrífuga Beckman modelo TJ-6.

Microcentrífuga Fisher Scientific modelo 235-C.  
Agitador magnético.  
Barra magnética.  
Cámara de electroforesis BRL H4.  
Fuente de poder.  
Peine de 30 pozos.  
Bomba peristáltica.  
Transluminador de luz UV de 302 nm.  
Estufa seca a 80°C.  
Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ II, M4Q II.  
Campana de flujo laminar vertical, Dexon modelo HT54G.  
Campana de flujo laminar horizontal, Veco.  
Campana de extracción.  
Potenciómetro Beckman.  
Congelador a -20 °C.  
Congelador a -50 °C.

### C) Reactivos

Revelador radiográfico V40, Russell.  
Fijador y reforzador, Russell.  
Isopropanol, Merck  
Agarosa , BRL 5510UB  
NaOH 0.4 N  
NaCl 5 M  
HCl 0.15 M  
Espermidina 20 mM  
DNA de esperma de salmón  
Fenol bidistilado  
RNAsa, Sigma R-5503  
8-hidrixiquinolina, Sigma H-6878  
SDS 20 %  
Megaprime DNA labelling systems RPN 1605, Amersham.  
 $\alpha^{32}$  P dCTP 3000 Ci/mmol.

#### Destilación de fenol:

El fenol líquido se coloca en un matraz de destilación. Se inicia el proceso de destilación, los primeros 15 ml se descartan al igual que los últimos 15 ml. Este fenol se vuelve a destilar de la misma manera.

#### Amortiguador RCLB:

MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl pH7.6 10 mM, NaCl 10 mM.

Amortiguador WCLB:

Tris-HCl pH 7.6 10 mM, EDTA pH 8.0 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 0.2 %, proteinasa K 300 µg/ml

Fenol equilibrado:

Tris-HCl pH 8.0 0.5 M

8-hidroxiquinolina

Tris-HCl pH 8.0 0.1 M

Al fenol líquido se le agrega un volumen de Tris-HCl pH 8.0 0.5 M y 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1 %, se agita durante 15 min y se deja reposar hasta que se separen 2 fases, se elimina la fase superior y se mide el pH a la inferior. Agregar Tris-HCl pH 8.0 0.1 M y agitar durante 15 min, repetir el paso anterior hasta ajustar un pH no menor de 7.8.

Cloroformo/alcohol isoamílico:

Mezclar 24 partes de cloroformo puro con una de alcohol isoamílico

Fenol cloroformo/alcohol isoamílico:

Mezclar un volumen de fenol equilibrado con un volumen cloroformo/alcohol isoamílico

TE 1X:

Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM

TAE 50X:

Tris-base 242 g

Acido acético 57.1 ml

EDTA 0.25 M pH 8.0 200 ml

Disolver estos reactivos y llevar a un litro. Filtrar con 0.22 µm

Denharth 50X:

Albúmina sérica bovina pH 7.5 1%, Polivinil pirrolidona 1 %, Ficoll 400 1 %

SSPE 20X:

NaCl 3.0 M

Fosfato de sodio monobásico 0.2 M

EDTA pH 8.0 20.0 mM

Mezclar estos reactivos, ajustar el pH a 7.4 y aforar a un litro.



## X BIBLIOGRAFIA

- 1.- Roitt I. 1994. *Essential Immunology*. 8a ed. ed. Blackwell Scientific Publications Oxford, Inglaterra. 448pp.
- 2.- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 1993. *Cellular and molecular immunology*. WB. Saunders Company, Nueva York, EUA.
- 3.- Grey MH, Sette A, Buus S. 1989. How T cells see antigen. *Sci. Am.* **261**:38-46.
- 4.- Marrack P, Kappler J. 1986. The T cell and its receptor. *Sci. Am.* **254**:28-37.
- 5.- Davis MM, Bjorkman JP. 1985. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**:395-401
- 6.- Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. 1992. Stigma variations: observations on supressor T cells and leprosy. *Ann. Rev. Immunol.* **10**:453-488.
- 7.- Gorodezky C. Inmunogenética en las enfermedades reumaticas. En: Rodriguez RS. *Reumatología pediátrica*. 1a ed. Ed. Interamericana.McGraw-Hill. México DF.1994. pp 21-35.
- 8.- Maryansky JL, Verdini AS, Weber PC, Salemme FR, Corradin G. 1990. Competition analogs for defined T cell antigens: Peptides incorporating a putative binding motif and polyproline on polyglycine spaces. *Cell.* **60**:63-72. (citada en 33).
- 9.- Nikolic-Zugic J, Carbone RF. 1991. Peptide presentation by class-I Major Histocompatibility Complex Molecules. *Immunol. Res.* **10**:54-65.
- 10.- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1993. Threee-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* **364**. 33-39.
- 11.- Lechler R. The roles of class I and II molecules of the major histocompatibility complex in T-cell immunity. En: Lechler R. *HLA and disease*. Ed. Academic Press. London 1994. pp 47-72.
- 12.- Kaplan G, Cohn ZA. 1991. Leprosy and cell-mediated immunity. *Curr. Opinion Immunol.* **3**:91-96.
- 13.- Braciale TJ, Braciale VI. 1991. Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol. Today.* **12**:124-129.

- 14.- Engelhard VH. 1994. How cells process antigens. *Sci.Am.* August:44--51.
- 15.- Mizuki N, Inoko H, Ohno S. 1994. Role of HLA and T lymphocytes in the immune response. *Occular Immunol. and inflam.* **2**: 57-91.
- 16.- Aswell JD, Klausner DR. 1990. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Ann.Rev.Immunol.* **8**:139-167.
- 17.- Mercep M, Bonifacino JS, Garcia-Morales P, Samelson LE, Klausner RD, Ashwell JD: 1988. T cell CD3- $\epsilon\zeta$  heterodimer expression and coupling to phosphoinositide hydrolysis. *Science* **242**:571-574.
- 18.- Komori S, Siegel RM, Yui K, Katsumata M, Greene MI. 1990. T-cell receptor and autoimmune disease. *Immunol. Res.* **9**:245-264.
- 19.- Arden B, Klotz JL, Siu G, Hood LE. 1985. Diversity and structure of genes of the  $\alpha$  family of mouse T-cell antigen receptor. *Nature* **316**:783-787.
- 20.- Roman-Roman S, Ferradini L, Azocar J, Genevée C, Hercend T, Triebel F. 1991. Studies on the human T cell receptor  $\alpha/\beta$  variable region genes I. Identification of 7 additional V $\alpha$  subfamilies and 14 J $\alpha$  gene segments. *Eur. J. Immunol.* **21**:927-933.
- 21.- Concannon P, Pickering LA, Kung P, Hood L. 1986. Diversity and structure of human T-cell receptor  $\beta$ -chain variable region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**:6598-6602.
- 22.- Takihara Y, Reimann J, Michalopoulos, Ciccone E, Moretta, Mak TW. 1989. Diversity and structure of human T cell receptor  $\gamma$  chain genes in peripheral blood  $\gamma/\delta$ -bearing T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **169**:393-405.
- 23.- Raulet DH. 1989. The structure, function and molecular genetics of the  $\gamma/\delta$  T cell receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **7**:175-205.
- 24.- Moss PAH, Rosenberg WMC, Bell JI. 1992. The human T cell receptor in health and disease. *Ann. Rev. Immunol.* **10**:71-96.
- 25.- Caccia N, Kronenberg M, Saxe D, Haars R, Bruns GAP, Goverman J, Malissen M, Willard H, Yoshikai Y, Simon M, Hood L, Mak TW. 1984. The T cell receptor  $\beta$  chain genes are located on chromosome 6 in mice and chromosome 7 in humans. *Cell* **37**:1091-1099.
- 26.- Yoshikai Y, Clark SP, Taylor CS, Sohn U, Wilson BI, Minden MD, Mak TW. 88.- Yoshikai Y, Clark SP, Taylor CS, Sohn U, Wilson BI, Minden MD, Mak TW. 1985. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T cell receptor  $\alpha$ -chain. *Nature* **316**:837-840.

- 27.- Klein J. 1990. Immunology. ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Inglaterra. pp 80-101.
- 28.- Davis MM. 1988. Molecular genetics of T-cell antigen-receptor. Hospital Practice (15):157-170.
- 29.- Kay RA. 1994. T-cell gene allelism. Immunologist. **215**:156-166.
- 30.- Schatz DG. 1992. V(D)J recombination: Molecular biology and regulation. Ann. Rev. Immunol. **10**:359-383.
- 31.- Pardoll DW, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, Schwartz RH. 1987. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. Nature **326**:79-81.
- 32.- Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, Hayday AC, Eisen HN, Tonegawa S. 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. Nature **309**:757-762.
- 33.- Novotny J, Tonegawa S, Saito H, Kranz DM, Eisen HN. 1986. Secondary, tertiary, and quaternary structure of T-cell-specific immunoglobulin-like polypeptide chains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**:742-746.
- 34.- Modlin RL, Pimez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. 1989. Lymphocytes bearing antigen-specific  $\gamma\delta$  T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. Nature **339**:544-548.
- 35.- Munk ME, Gatrill AJ, Kaufmann SHE. 1990. Target cell lysis and IL-2 secretion by  $\gamma\delta$  T lymphocytes after activation with bacteria. J. Immunol. **145**:2434-2439.
- 36.- Gorodezky C. 1994. Immunogenetics of leprosy. a model to understand host immune mechanism in mycobacterial diseases. As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. **2**:301-315.
- 37.- Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid sistem. J. Exp. Med. **169**:1277-1274.
- 38.- Ito M, Tanimoto M, Kamura H, Yoneda M, Morishima Y, Takatsuki K, Itatsu T, Saito H. 1988. Association of HLA-DR phenotypes and T-lymphocyte-receptor  $\beta$ -chain-region RFLP with IDDM in Japanese. Diabetes **37**:1633-1636.
- 39.- Millward BA, Welsh KL, Leslie RDG, Pyke DA, Demaine AG. 1987. T cell receptor beta chain polymorphisms are associated with insulin-dependent diabetes. Clin. Exp.

Immunol. **70**:152-157.

- 40.- Niven MJ, Caffrey C, Moore RH, Sachs JA, Mohan V, Festenstein H, Hoover ML, Hitman GA. 1989. T-cell receptor  $\beta$ -subunit gene polymorphisms and autoimmune disease.
- 41.- Hoover LM, Black EK, Ball E, Alford M, Marks J Stanstny P. 1989. Polymorphisms of the human T-cell receptor and chain genes and their relationships to insulin dependent Diabetes Mellitus. Immunobiology of HLA vol. II Ed. B. Dupont. Springer-Verlag Nueva York, EUA pp 412-413.
- 42.- Martínez-Narves E, Coto E, Gutiérrez V, Urra JM, Setien F, Dominguez O, Hood LE, López-Larrea C. 1991. Germline repertoire of T-cell receptor chain genes in patients with Insulin-dependent Diabetes Mellitus. Human Immunol **31**:77-80.
- 43.- Beall SS, Concannon P, Charmley P, McFarland HF, Gatti RA, Hood LE, McFarlin DE, Biddison. 1989. The germline repertoire of T cell receptor  $\beta$ -chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. **21**:59-66.
- 44.- Fugger L, Sandberg-Wolheim M, Morling N, Ryder LP, Svejgaard A. 1990. The germline repertoire of T-cell receptor  $\beta$  chain genes in patients with relapsing/remitting multiple sclerosis or optic neuritis. Immunogenetics **31**:278-280.
- 45.- Oksenberg JR, Gaiser CN, Cavalli-Sforza LL, Steiman L. 1988. Polymorphic markers of human T-cell receptor alpha and beta genes. Family Studies and comparison of frequencies in healthy individuals and patients with multiple sclerosis and myasthenia gravis. Human Immunol. **22**:111-121.
- 46.- Oksenberg JR, Sherritt M, Begovich AB, Erlich HA, Bernard CC, Cavalli-Sforza LL, Steiman L. 1989. T-cell receptor  $V\alpha$  and  $C\alpha$  alleles associated with multiple sclerosis and myasthenia gravis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**:988-992.
- 47.- Oksenberg JR, Panzara MA, Begovich AB, Mitchell D, Erlich HA, Murray RS, Shimonkevitz R, Sherritt M, Rothbard J, Bernard CCA, Steiman L. 1993. Selection for T-cell receptor  $V\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. Nature **362**:68-70.
- 48.- Stamenkovic I, Stegagno M, Wrigth KA, Krane SM, Amento EP, Colvin RB, Duquesnoy RJ, Kurnick J. 1988. Clonal dominance among T-lymphocyte infiltrates in arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**:1179-1183.
- 49.- Miltenbur AMM, van Laar JM, Daha, de Vries RRP, van den Elsen PJ, Breedveld FC. 1990. Dominant T-cell receptor  $\beta$ -chain gene rearrangements indicate clonal expansion in the rheumatoid joint. Scand. J. Immunol. **31**:121-125.

- 50.- Dedeoglu F, Kaymaz H, Seaver N, Shluter SF, Yocum DE, Marchalonis JJ. 1993. Lack of preferential V $\beta$  usage in synovial T cells of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Res.* **12**:12-20.
- 51.- Stryk L, Kurnick JT, Hawes GE, van Laar JM, Schipper R, Oksenberg JR, Steinman L, de Vries RRP, Breedveld FC, van den Elsen P. 1993. T-cell receptor V-gene usage in synovial fluid lymphocytes of patients with chronic arthritis. *Human Immunol.* **37**:237-251.
- 52.- Ohmen JD, Barnes PF, Uyemura K, Lu S, Grisso CL, Modlin RL. 1991. The T cell receptors of human  $\gamma\delta$  T cells reactive to *Mycobacterium tuberculosis* are encoded by specific V genes but diverse V-J junctions. *J. Immunol.* **147**:3353-3359.
- 53.- Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, Band H, Rea TH, Modlin RL. 1992.  $\gamma\delta$  T lymphocytes in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **165**:506-512.
- 54.- Langhorne J, Goodier M, Behr C, Dubois P. 1992. Is there a role for  $\gamma\delta$  T cells in malaria? *Immunol. Today* **13**:298-300.
- 55.- Modlin RL, Brenner MB, Krangel MS, Duby AD, Bloom BR. 1987. T-cell receptor of human suppressor cells. *Nature* **329**:541-545.
- 56.- Nepom GT, Concannon P. 1992. Molecular genetics of autoimmunity. The autoimmune diseases II. Academic Press. Ed. N Rose Nueva York. pp 127-152.
- 57.- Maeguerie C, Lunardi C, So A. 1992. PCR-based analysis of the TCR repertoire in human autoimmune diseases. *Immunol. Today.* **13**:336-338.
- 58.- Gorodezky C. Papel de la inmunogenética en la distribución y frecuencia de las enfermedades tropicales. En: Valdespino JL, Velasco O, Escobar A, del Río A, Ibañez S, Magos C. ed. INDRE SSA. Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. 1a ed. SSA. México DF. 1994. pp 66-79.
- 59.- Kaplan G, Cohn AZ. 1986. The immunobiology of leprosy. *Inter. Rev. Exp. Pathol.* **28**: 45-70.
- 60.- Rodríguez RO. Cuadro clínico. Citado en: Amezcua CH. Lepra: pasado, presente y perspectivas para el futuro. ed. INDRE SSA, 1992. Publicación técnica del INDRE #15 SSA, México D.F. pp 15-24; 33-38.
- 61.- Estrada PS, Estrada GI, Quesada PF, Rojas EO, Marroquín SH, Aguirre MJ, Acedo CJ, Moralla MG. 1988. Aspectos relevantes de la inmunología de la lepra, su diagnóstico temprano y su posible prevención. *Revista Médica de la UAS* **8**:5-21.
- 62.- Ridley DS, Jopling WH. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five

group system. *Int. J. Lepr.* **34**:255-273. (citada en 61).

63.- Godal T. 1974. The role of immune responses to *Mycobacterium leprae* in host defence and tissue damage in leprosy. *Prog. Immunol.* **4**: 161. (citada en 17).

64.- Kaplan G, Cohn Z. 1986. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr. Rev.* **57**:199-202.

65.- Picard BC, Frehel, Rastogi N. 1984. Cytochemical characterization of mycobacterial outer surfaces. *Acta Leprol.* **85**:227-235. (citada en 61).

66.- Kikuchi I, Ozawa T, Hirayama K, Sasazuki T. 1986. An HLA-linked gene controls susceptibility to lepromatous leprosy through T cell regulation. *Lepr. Rev.* **57**:139-142.

67.- Espinosa RO, Estrada PS. 1989. Inmunología de la lepra: anergia celular en el *Mycobacterium leprae*. *Arch. Invest. Méd.* **4**:335-341.

68.- Rojas O, Aponte J, González o, Estrada S, Ortiz Y. 1980. Phagocytosis in leprosy. III. Defective adhesive and endocytic abilities of circulating leukocytes in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* **48**:159-166.

69.- Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kushner P, Granelli-Piperno A, Vieiria L, Gould VC, Levis W, Steiman R, Yip YK, Cohn ZA. 1983. Defective interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. *J. exp. Med.* **158**:2165-2170.

70.- Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM, Levis WR, Elvers U, Patarroyo ME, Cohn ZA. 1985. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J. Exp. Med.* **162**:917-929.

71.- Ottenhoff THM, Klaster PR, Inanyl J, Elferink DG, de Wit MYL, de Vriers RRP. 1986. *Mycobacterium leprae*- specific protein antigens defined by cloned human helper T cells. *Nature* **319**:66-68.

72.- Kaplan G, Nathan CF, Gandhi R, Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. 1986. Effect of rIFN- $\gamma$  on hydrogen peroxide-releasing activity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy. *J. Immunol.* **137**:983-987.

73.- Salgame P, Connet J, Blomm RB. 1991. Immunological suppression by human CD8 T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:2598-2602.

74.- Mehra V, Mason LH, Fields JP, Bloom BR. 1979. Lepromin induced suppressor cells in patients with leprosy. *J. Immunol.* **23**:1813-1817.

- 75.- Mehra V, Mason LH, Rothman W, Reinhertz E, Schlossman SF, Bloom BR. 1980. T-cell subset responsible for suppression in leprosy.
- 76.- Gorodezky C. Genes de susceptibilidad y supresión inmunológica ligados al MHC en lepra. Tesis Doctoral. IPN. México D.F. 1989.
- 77.- Haregewoin A, Mustafa AS, Helle I, Waters MFR, Leiker DL, Godal T. 1984. Reversal by interleukin-2 of the T cell unresponsiveness of lepromatous leprosy to Mycobacterium leprae. Immunol. Rev. **80**:77-86.
- 78.- Britton WJ. 1993. Leprosy 1962-1992. Immunology of leprosy. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **87**:508-514.
- 79.- Mohagheghpour N, Gelber RR, Engleman EG, 1987. T cell defect in lepromatous leprosy is reversible *in vitro* in the absence of exogenous growth factors. J. Immunol. **138**:570-574.
- 80.- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science **254**:277-279.
- 81.- Kaplan G. 1993. Recent advances in cytokine therapy in leprosy. J. Inf. Dis. **167**:S18-22.
- 82.- de Vries RRP. 1991. Genetic control of immunopathology induced by Mycobacterium leprae Am. J. Trop. Med. **44**:S12-16.
- 83.- Van Eden W, Elferink BG, de Vries RRP, Leiker CL, Van Rood JJ. 1984. Low lymphocyte responsiveness to Mycobacterium leprae antigens in association with HLA-DR3. Clin. Exp. Immunol. **55**:140-148.
- 84.- Van Eden V, de Vries RRP. 1984. Occasional review-HLA and leprosy: a re-evaluation. Lepr. Rev. **55**:89-104. citada en 25.
- 85.- Ottenhoff THM, de Vries RRP. 1987. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. Int. J. Lepr. **55**:521-535.
- 86.- Gorodezky C, Flores J, Arevalo N, Castro L, Silva A, Rodriguez O. 1987. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3. Lepr. Rev. **58**:401-406.
- 87.- de Vries RRP, Ottenhoff HM, Elfrink DG, Shuguang L. 1989. HLA-DR molecules are both Ir- and Is-gene products for T cell responsiveness against M. leprae Immunobiology of HLA vol. II Ed. B. Dupont. Springer Verlag Nueva York pp. 463-464.

- 88.- Gulle H, Shoel B, Chiplunkar S, Gangal S, Deo MG, Kaufmann SHE. 1992. T-cell responses of leprosy patients and healthy contacts toward separated protein antigens of Mycobacterium leprae. *Int. J. Lepr.* **60**:44-53.
- 89.- Ottenhoff THM, Elferink DG, Klaster PR, de Vries RRP. 1986. Cloned suppressor T cells from a lepromatous leprosy patient suppress Mycobacterium leprae reactive helper T cells. *Nature* **322**:462-464.
- 90.- Li GS, Elferink DG, de Vries RRP. 1990. Phenotypic and functional characterization of human suppressor T-cell clones: Activation by Mycobacterium leprae presented by HLA-DR molecules to  $\alpha\beta$  T-cell receptor. *Human Immunol.* **28**:11-26.
- 91.- Marcadet A, Dupont B, Cohen D. 1989. Organization and design of the Southern blot component of the Tenth Histocompatibility Workshop, pp. 560-566. En: B. Dupont. *Immunobiology of HLA*, Vol 1. Springer-Verlag, New York.
- 92.- Wang X, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Kronenberg M, Modlin RL. 1993. Selection of T lymphocytes bearing limited T-cell receptor  $\beta$  chains in the response to a human pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:188-192.
- 93.- Wang X, Golkar L, Uyemura K, Ohmen JD, Villahermosa LG, Fajardo TT, Cellona RV, Walsh GP, Modlin RL. 1993. T cells bearing V $\beta$ 6 T cell receptors in the cell-mediated immune response to Mycobacterium leprae. *J. Immunol.* **151**:7105-7116.
- 94.- Juarez V, Olivo A, Debaz H, Gonzalez G, Hernández A, Gorodezky C. 1994. Low-speed centrifugation for plasmid isolation. *Biotechniques* **16**: 384-387.
- 95.- Estrada I. 1992. Aislamiento de DNA de bajo peso molecular. (comunicación personal).
- 96.- Gorodezky C. 1994. Manual de técnicas de histocompatibilidad. XIII curso teórico-práctico de actualización en histocompatibilidad. INDRE SSA. México DF.
- 97.- Modlin RL. 1994. Th1-Th2 Paradigm: insights from leprosy. *J. Invest Dermatol.* **102**: 828-832.
- 98.- Fujita M, Miyachi Y, Nakata K, Imamura S. 1993. Appearance of  $\gamma\delta$  T cell receptor-positive cells following  $\alpha\beta$  T cell receptor-positive cells in the lepromin reaction of human skin. *Immunol letters.* **35**: 39-44.
- 99.-Preffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufman SHE, Wagner H. 1990. Primary responses to human T cells to mycobacteria: a frequent set of  $\delta$  T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1175-1179.