



11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

16
2es.

FACULTAD DE MEDICINA

SERVICIO DE DERMATOLOGIA Y MICOLOGIA MEDICA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**RECONOCIMIENTO INMUNE CELULAR A UN NUEVO
ANTIGENO DE 45 kDa DE *Mycobacterium leprae* POR
CELULAS DE PACIENTES CON LEPRO Y
CONTROLES ENDEMICOS SANOS.**

TESIS DE POSGRADO
QUE PRESENTA EL
BIOLOGO RAFAEL MONDRAGON GONZALEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(INMUNOLOGIA)

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO VEGA LOPEZ



IMSS

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

263815



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Esta tesis se realizó bajo la asesoría y dirección del Dr. Francisco Vega López, jefe del laboratorio de Dermatología y Micología Médica perteneciente al Hospital de Especialidades “ Dr. Bernardo Sepúlveda ” del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social México, D.F

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo que se me ofreció al otorgarme la beca-manutención No de registro 87906, durante mi preparación académica

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente con admiración y respeto al director de tesis el Dr. Francisco Vega López por todo el apoyo que me brindó para la realización de éste trabajo, por sus enseñanzas y por su valiosa asesoría brindada durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Agradezco a los doctores que forman parte del comité de sinodales por haber aceptado revisar este trabajo, por sus valiosas sugerencias tan acertadas y los consejos que permitieron enriquecer este trabajo.

Presidente: Dr. SERGIO ESTRADA PARRA.

Secretario. Dra. CLARA ESPITIA PINZON.

Primer Vocal Dra CECILIA XIMENEZ GARCIA.

SUPLENTE Dra. IRIS ESTRADA

SUPLENTE Dr. ANTONIO ENCISO MORENO.

Un especial agradecimiento a las Doctoras. Hazel Dockrell, Anne MacFarlane y Carolynne Stanley de la London School of Hygiene & Tropical Medicine que con sus conocimientos y experiencia que me enseñaron a trabajar en laboratorio.

Agradezco profundamente a la Dra. Cecilia Ximénez por brindarme su apoyo durante la etapa final de revisión de tesis.

Agradezco a los siguientes doctores por brindarme material biológico para el desarrollo de este trabajo

Dra. Adriana Anides Fonseca del Servicio de Dermatología y Micología Médica del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).

Dra. Obdulia Rodríguez Rodríguez Directora del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua (SSA), México, D.F.

Dr. Octavio Flores Alonso y la Dra. Josefina dePeña del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua (SSA), México, D F

Dr. Raúl Suárez y de la Torre del Hospital Amigo del Niño y la Mujer (IMSS) Celaya, Guanajuato

Dra. Silvia Honda del Servicio de Dermatología del Hospital de Infectología. Centro Médico “La Raza” (IMSS)

Dr. Carlos Pérez y al Dr. Sergio Filigrana. Médicos Neumólogos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (SSA). México, D.F.

Agradezco al **Instituto Mexicano del Seguro Social** por apoyarme y brindarme la oportunidad superarme personalmente y sobre todo académicamente.

DEDICATORIAS

*Con todo mi amor para mi hijo **Damián** que gracias a sus sonrisas y travesuras me motivaron alcanzar una importante meta en mi vida.*

*A mi esposa **Claudia** por brindarme todo su amor y confianza para seguir siempre adelante.*

*A mi madre **Juana González** con admiración y cariño*

*A mis hermanos **Gustavo** y **Antonio** por su apoyo y cariño que han brindado a lo largo de mi vida.*

*A mis sobrinos **Lili**, **Isaac**, **Antonio**, **Erick** y **Daniel** con cariño y afecto.*

*A mis maestros y amigos **Dr. Francisco Vega**, **Dra. Adriana Anides Fonseca** y al **M. en C. Luis Javier Méndez Tovar** por ser ejemplos en mi superación académica y personal.*

*A las Doctoras. **Hazel M. Dockrell**, **Anne MacFarlanne** y **Carolynne Stanley** por compartirme sus conocimientos y experiencia durante el trabajo de laboratorio y tesis.*

*A mis amigos **médicos residentes** y demás compañeros del **Servicio de Dermatología y Micología Médica** por su apoyo y ayuda.*

*A la Sra **Ana Lilia Blázquez** por su apoyo y amistad.*

Gracias a Dios por permitirme seguir adelante y por haberme puesto en el camino a gente tan maravillosa

INDICE

RESUMEN.....	1
1.1 CONCEPTO.....	2
1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	2
1.3 MORFOLOGÍA DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	3
1.4 ESPECTRO DE LA LEPROSA	5
1.5 EPIDEMIOLOGÍA.....	8
1.6 RESPUESTA INMUNE A <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	10
1.6.1 INMUNIDAD HUMORAL	10
1.6.2 ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO.....	11
1.6.3 INMUNIDAD CELULAR.....	13
1.6.4 SECRECIÓN DE CITOCINAS.....	17
1.7 ANTÍGENOS DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	21
1.7.1 GLICOLÍPIDO FENÓLICO I	23
1.7.2 LIPOARABINOMANANA.....	23
1.7.3 65 kDA.....	24
1.7.4 18 kDA	26
1.7.5 70 kDA	27
1.7.6 36 kDA.....	28
1.7.7 28 kDA.....	29
1.7.8 12 kDA.....	29
1.7.9 45 kDA.....	29
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32

3.	HIPÓTESIS	33
4	OBJETIVO GENERAL	34
	OBJETIVOS PARTICULARES	34
5.	MATERIALES Y METODOS	35
5 1	DONADORES	35
5 2	ANTÍGENOS	37
5 3	SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR CON TIMIDINA TRITIADA	39
5.4	DETECCIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ) HUMANO POR MEDIO DE ELISA	41
6	RESULTADOS	43
6 1	RESPUESTA CELULAR AL SONICADO DE <i>M.LEPRAE</i> (MLSON)	43
6.2	RESPUESTA CELULAR A LA TUBERCULINA (PPD)	52
6 3	RESPUESTA CELULAR AL ANTÍGENO DE 10 KDA DE <i>M.LEPRAE</i>	61
6 4	RESPUESTA CELULAR AL ANTÍGENO DE 45 KDA DE <i>M.LEPRAE</i>	69
6 5	RESPUESTA CELULAR AL ANTÍGENO DE 65 KDA DE <i>M.LEPRAE</i>	86
6.6	RESPUESTA CELULAR AL ANTÍGENO DE 30-31 KDA DE <i>M.LEPRAE</i>	95
7.	DISCUSIÓN	105
8.	CONCLUSIONES	114
9.	ANEXO I.	116
10.	BIBLIOGRAFÍA	120

ABREVIATURAS

- PBMC Células mononucleares de sangre periférica
- LAM Lipoarabinomanana
- GPL-I Glicolípido fenólico I
- TT Lepra tuberculoide
- BT Lepra limítrofe tuberculoide
- BB Lepra limítrofe
- I Lepra indeterminada
- LLD Lepra lepromatosa difusa
- LLN Lepra lepromatosa nodular
- TB Tuberculosis
- C Contacto intradomiciliario sano
- E Individuo sano de zona endémica
- DHT Reacción de hipersensibilidad tardía
- TCR Receptor del linfocito T
- PPD Tuberculina
- IL Interleucina
- IFN- γ Interferón gamma
- HSP Proteínas de choque térmico
- PHA Fitohemaglutinina
- IE Índice de estimulación celular
- UI/ml Unidades internacionales por mililitro
- ELISA Inmunoensayo absorbente ligado a enzimas
- Mlson Sonicado de *Mycobacterium leprae*

RESUMEN

La lepra continua siendo un problema de salud en muchas partes del mundo, se estima que aproximadamente 10-12 millones de personas en países en vías desarrollo padecen algún tipo de lepra. La inmunidad celular es la principal defensa contra *Mycobacterium leprae*, pero también es la responsable del daño en los tejidos del huésped con la enfermedad avanzada. En este trabajo se estudió el reconocimiento inmune celular y la producción de IFN- γ inducida por un nuevo antígeno recombinante rico en serina de 45 kDa de *M.leprae* y los antígenos de 10 kDa, 30-31 kDa y 65 kDa de *M.leprae*, además del sonicado del bacilo (Mlson), tuberculina (PPD) y un mitógeno de linfocito T, la fitohemaglutinina (PHA). Para los ensayos de proliferación celular con timidina tritiada, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica y los sobrenadantes de los cultivos se usaron para la detección de IFN- γ por ELISA. Se estudiaron 45 pacientes con lepra multibacilar y 14 paucibacilares; 19 contactos intradomiciliarios; 20 individuos sanos de zonas endémicas y 19 pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Los resultados mostraron que en los contactos intradomiciliarios y pacientes con lepra existía una fuerte correlación entre el reconocimiento inmune celular y la secreción de IFN- γ con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*. La proliferación celular y producción de IFN- γ resultó ser mayor en paucibacilares que en los multibacilares, además se detectó un bajo reconocimiento en las células de pacientes con tuberculosis y de individuos de zonas endémicas de lepra. Se observó que los pacientes multibacilares que no respondieron a Mlson fueron positivos al antígeno de 45 kDa. La respuesta celular y secreción de IFN- γ al antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* fue elevada en todos los grupos, en especial en los pacientes con lepra, así como en los pacientes con tuberculosis. Esto hace que el antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* no sea totalmente específico. Los antígenos de 10 kDa y 65 kDa de *M.leprae* mostraron un alto reconocimiento en pacientes con lepra multibacilar, en individuos de zonas endémicas y especialmente en pacientes tuberculosos. Finalmente se obtuvieron en todos los grupos mayores índices de estimulación celular y de IFN- γ con la tuberculina (PPD), que con el sonicado de *M.leprae* (Mlson). Los resultados sugieren que el antígeno de 45 kDa de *M.leprae* es capaz de inducir linfocitos del tipo Th1 y la liberación de citocinas asociadas a la activación de la inmunidad celular tal como el IFN- γ .

1. ANTECEDENTES

1.1 Concepto.

La lepra es una enfermedad infecto contagiosa, crónica granulomatosa causada por el bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*, que afecta principalmente nervios periféricos, piel y la mucosa superior del tracto respiratorio (1).

1.2 Antecedentes Históricos.

La lepra es una de las enfermedades más antiguas en el mundo, probablemente tuvo su origen en la India hace 600 años a.C. en donde se le conocía como *Kushtha*. En China el primer registro se encuentra en uno de los libros clásicos de medicina, el *Nei Jing* escrito hace 400 a.C., donde se describe una enfermedad llamada *Dafeng*. La primera evidencia indiscutible con lesiones óseas se observó en una momia egipcia del siglo 2 a.C. La enfermedad se dispersó en la región del Mediterráneo cuando los soldados de Alejandro el Grande regresaron de las campañas realizadas en la India en los años 327-326 a.C. En Europa entre los años 1050 y 1348 la lepra fue tan abundante que llegaron a existir miles de leprosarios, en donde se mantenían a los enfermos aislados en condiciones deplorables de segregación, falta de higiene y alimentación. Por lo desagradable de las lesiones causadas por la lepra, se consideraba como un castigo divino a los pecadores y herejes. La lepra empezó a disminuir en ese continente en el siglo XV, aunque todavía se encuentran algunas regiones endémicas de bajo nivel en Portugal, España, Italia, Grecia, Chipre y la región Sudoeste de Rusia. Durante los siglos XVI y XVIII, la lepra se diseminó al continente Americano por el comercio de esclavos que eran llevados de Portugal a Brasil y de África a las Antillas y a Sudamérica. En nuestro país la lepra se dispersó durante la conquista. En 1528 Hernán Cortés fundó

el primer leproso, el Hospital de San Lázaro. Fue ahí donde en el año 1842 el Dr. Ladislao de la Pascua publicó sus experiencias clínicas con los pacientes con lepra, en 1852 el Dr. Rafael Lucio describió la variedad de lepra denominada manchada, actualmente conocida como lepra lepromatosa difusa o de Lucio. En 1873 el bacilo fué descubierto por Gerhard Hendrik Hansen médico noruego que observó en cortes de lesiones de pacientes con lepra, la presencia constante de pequeños bastones intracelulares, asociándolos como los agentes casuales de la enfermedad. Por esto *M.leprae* fue el primer patógeno bacteriano en ser descrito Aunque el organismo no se ha cultivado *in vitro* hasta la fecha se le clasifica como una micobacteria por ser un bacilo ácido-alcohol resistente, presentar ácido micólico, contener el glicolípido fenólico I con un trisacárido que es específico a *M.leprae*, además de tener la subunidad 16S del RNA ribosomal y estar asociado con la formación de granulomas (1, 2).

1.3 Morfología de *Mycobacterium leprae*.

El bacilo de la lepra es Gram positivo y morfológicamente pleomórfico, ya que puede ser recto o curvo, con un tamaño promedio $1.8 \times 0.3 \mu\text{m}$. En biopsias de pacientes *multibacilares* se observan en microscopía de luz la formación de masas compactas denominadas globias, las cuales se encuentran rodeadas por una membrana y contienen por lo general entre 50 y 400 bacilos (2, 3).

Los estudios de microscopía electrónica muestran que la pared celular de *M.leprae* está constituida por tres capas, una capa interna electrodensa formada por péptidoglicanos, una capa media electrotransparente compuesta principalmente por largas cadenas de ácidos grasos acilo micocerosil y de arabinogalactano, el mayor carbohidrato en *M.leprae* y finalmente una capa externa constituida por carbohidratos en los que en su parte terminal se incluyen sacáridos de lipoarabinomanana (LAM) y glicolípido fenólico (GPL-I), este último es secretado por el bacilo en

grandes cantidades y es uno de los antígenos más abundantes en tejidos infectados y ampliamente estudiado en diversas pruebas inmunológicas. Al teñir el bacilo de Hansen con la técnica de Ziehl-Neelsen se visualiza un gránulo metacromático cercano al polo o en el centro, la función de este gránulo hasta el momento no se ha definido (3, 4).

La permanencia y sobrevivencia de *M.leprae* dentro del fagosoma en el macrófago todavía no es muy clara. Recientemente se ha identificado con anticuerpos monoclonales una proteína de 28 kDa, la cual tiene una actividad de superóxido dismutasa. Por sus características esta proteína pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico. Esta superóxido dismutasa se encuentra presente en el 55% de tejidos infectados de pacientes con lepra y está involucrada en la resistencia a los metabolitos del oxígeno durante el estallido respiratorio (5). Otro antígeno importante es el glicolípido fenólico I (PGL-I) que está presente en la pared celular y es secretado en grandes concentraciones este actúa como una barrera contra los radicales del oxígeno sin embargo, también se sugiere que podría tener alguna función en la inhibición de la formación del fagolisosoma (4).

El crecimiento óptimo de *M.leprae* tiene lugar a 30°C, lo cual refleja la predilección de este organismo por la piel y la mucosa superior del tracto respiratorio. Puede crecer también muy lentamente en extremidades de animales homeotermos como es el ratón, en donde crece con un tiempo de replicación de 11-13 días en el cojinete plantar. En el armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) en donde produce lepromas después de un año de la infección, con índices bacteriológicos de mil millones de bacilos por gramo de tejido. Estas grandes cantidades de bacilos son aprovechadas para la elaboración del reactivo usado para la intradermoreacción denominado lepromina (6, 7).

El genoma de *M.leprae* se encuentra concentrado en un solo cromosoma circular con tamaño de 2.2×10^9 Da , con una concentración de guanina y citocina del 58% (8).

1.4 Espectro de la lepra .

La lepra es una enfermedad polimórfica, se encuentra en el transcurso de ésta una amplia gama de manifestaciones clínicas, pero existen dos polos: las formas lepromatosa y la tuberculoide.

La clasificación realizada por Ridley y Jopling (9), es aceptada internacionalmente y se basa en los criterios clínicos, bacteriológicos, inmunológicos e histológicos; en ésta se incluyen los tipos Tuberculoide (TT), Tuberculoide limitrofe (BT), Límitrofe (BB), lepromatoso limitrofe (BL) y lepromatoso (LL) Esta clasificación correlaciona con los diversos tipos de manifestaciones clínicas e inmunológicas encontradas durante la enfermedad (Figura 1)

La lepra tuberculoide (TT) es la forma no sistémica y puede curar espontáneamente, las lesiones se localizan en piel y en nervios periféricos, se presentan como placas anestésicas infiltradas generalmente en cara, nuca, miembros y regiones glúteas. En las lesiones se encuentran un gran infiltrado de linfocitos alrededor de células epiteloides y hay pocos bacilos en las células infectadas. La respuesta de proliferación celular es similar a la encontrada en individuos normales, por lo que la reacción a la lepromina es positiva (7, 8, 9).

La forma tuberculoide limitrofe (BT) es una forma inestable que induce numerosas lesiones en la piel. Esta presenta una menor infiltración celular que en la forma tuberculoide. La respuesta celular *in vitro* e *in vivo* disminuye a diversos antígenos incluyendo a la lepromina (7, 9).

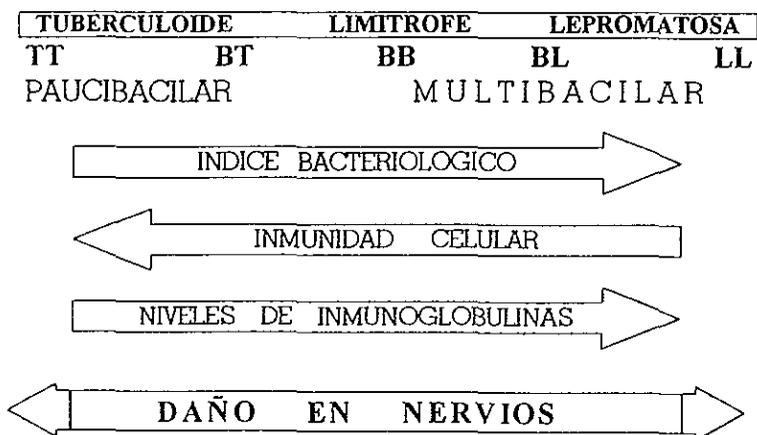


Figura 1. Espectro de la Lepra.

La lepra limitrofe (**BB**) es la forma clínica intermedia de la enfermedad y dependiendo de la respuesta celular contra el bacilo puede migrar al polo tuberculoide o hacia la forma lepromatosa. Durante esta etapa se observan un gran número de globias, con títulos séricos de anticuerpos de isotipo IgG anti-*M.leprae* incrementados con relación inversa a la respuesta celular *in vitro*, así como una disminución en la respuesta desarrollada a la lepromina, hay una mayor formación de placas hipocrómicas y anestésicas que causan un mayor daño en nervios periféricos, las lesiones se localizan en tronco, glúteos y extremidades del cuerpo.

En la forma limitrofe lepromatosa (**BL**), las lesiones pueden variar de placas hipocrómicas y anestésicas hasta la presencia de nódulos, el daño en los nervios periféricos es predominante y el

índice bacteriológico es alto, se encuentran escasos linfocitos y células epiteloides, hay una negativización a la lepromina y existe una baja respuesta proliferativa celular de linfocitos T a diversos antígenos de *M. leprae*, así como al mitógeno concanavalina A; los niveles de anticuerpos en este tipo de la enfermedad se encuentran aumentados (6, 7).

La lepra lepromatosa (LL) constituye el tipo progresivo, sistémico y transmisible de la enfermedad. Por las características de las lesiones existen dos variedades clínicas importantes: la nodular y la difusa. En ambas formas se encuentra un gran número de bacilos intracelulares en macrófagos, células de Virchow y sangre. En este caso la respuesta celular es baja para la mayoría de los antígenos obtenidos de *M. leprae* y para ciertos mitógenos. Sin embargo, se encuentran altas concentraciones de citocinas relacionadas con linfocitos Th2. Los títulos de anticuerpos son elevados, así como la formación de complejos inmunes. En los nervios el daño es simétrico, *progresivo* y es frecuente encontrar en los pacientes con este tipo de lepra la destrucción del cartilago nasal del hueso (6, 7, 8)

En el paciente multibacilar se presentan dos tipos de manifestaciones clínicas importantes denominadas reacciones leprosas basadas en la respuesta inmune desarrollada contra el bacilo. La reacción de reversa tipo I está asociada con un rápido incremento de hipersensibilidad retardada y se presenta frecuentemente después de realizar un cambio en el tratamiento del paciente. Es común en este caso la formación de úlceras y abscesos en las extremidades, cara y en el nervio cubital. La reacción tipo II, se caracteriza por la formación de complejos inmunes, se presenta en pacientes lepromatosos con eritema nodoso (LLN) y ocasionalmente en el tipo limítrofe lepromatoso (BL). Las lesiones con forma nodular aparecen en las extremidades y en cara, aunque las manifestaciones

pueden ocurrir en otras partes del cuerpo en las que se incluyen ojos, huesos, nódulos linfáticos, riñones y testículos (10, 11)

1.5 Epidemiología.

La lepra es una enfermedad cosmopolita, pero predomina en regiones subtropicales y tropicales del mundo, es transmitida esencialmente de un humano a otro por contacto prolongado con algún paciente multibacilar. El período de incubación es de uno a veinte años y en los individuos multibacilares son la principal fuente del microorganismo; es posible que la forma de infección se lleve a cabo por el contacto de la piel con lesiones abiertas de úlceras de pacientes multibacilares sin tratar ó por el contacto de fomites, que al tener acceso a la mucosa nasal o del tracto respiratorio de individuos susceptibles pueden permitir el desarrollo de la enfermedad. Por la distribución geográfica de la lepra, se sugiere que las condiciones socioeconómicas y el medio ambiente son factores relevantes para su prevalencia. La enfermedad afecta principalmente individuos entre 30 y 50 años de edad y es más común en los hombres que en las mujeres, esta diferencia es mayor en la edad adulta que en la infancia, aunque no se ha demostrado hasta el momento la posible influencia hormonal en la susceptibilidad a la enfermedad. Existe una participación de ciertos genes ligados al HLA que determinan la susceptibilidad para desarrollar un tipo determinado de lepra, los marcadores *HLA-DR2* y *HLA-DR3* se relacionan con las formas paucibacilares y los *HLA-DQw1* se asocian con tipos multibacilares (12, 13, 14).

Actualmente en México las campañas realizadas por el Programa Nacional de Control de la Lepra, utiliza esquemas terapéuticos multimedicamentosos que previenen la posible resistencia del bacilo y estan formulados a base de sulfona acompañada de rifampicina y clofazimina. El uso de la

poliquimioterapia por espacio de cinco años ha modificado la distribución de la lepra y la tasa de prevalencia (15), así como la tendencia de la enfermedad (Tabla I)

TABLA I. EVOLUCION DE LA PREVALENCIA DE LA LEPRO EN MEXICO.

ESTADO	* INICIO DE POLIQUIMIOTERAPIA		** ACTUAL		CASOS CURADOS*
	CASOS	TASA	CASOS	TASA	
AGUASCALIENTES	77	1.1	31	0.4	52
BAJA CALIFORNIA NORTE	192	1.4	105	0.5	42
BAJA CALIFORNIA SUR	50	1.5	16	0.4	26
CAMPECHE	12	0.2	12	0.2	0
CHIAPAS	17	0.1	33	0.1	0
CHIHUAHUA	97	0.4	45	0.2	10
COAHUILA	101	0.5	52	0.2	3
COLIMA	522	12.3	24	0.5	541
DISTRITO FEDERAL	1151	1.1	293	0.4	4
DURANGO	197	1.4	170	1.2	4
ESTADO DE MEXICO	441	0.4	74	0.1	148
GUANAJUATO	2481	6.9	765	1.7	1227
GUERRERO	570	2.2	143	0.5	566
HIDALGO	10	0.1	21	0.1	0
JALISCO	3177	6.0	449	0.8	1749
MICHOACAN	1865	5.5	535	1.4	898
MORELOS	270	2.1	53	0.4	140
NAYARIT	567	6.6	144	1.7	534
NUEVO LEON	186	0.6	392	1.1	12
OAXACA	136	0.5	109	0.3	24
PUEBLA	26	0.1	27	0.1	0
QUERETARO	174	1.8	22	0.2	183
QUINTANA ROO	7	0.2	8	0.1	0
SAN LUIS POTOSI	77	0.4	61	0.3	6
SINALOA	2838	11.7	1594	6.6	1231
SONORA	612	3.4	145	0.7	473
TABASCO	12	0.1	12	0.1	0
TAMAULIPAS	268	1.2	267	1.1	27
TLAXCALA	3	0.1	7	0.1	0
VERACRUZ	95	0.1	115	0.2	0
YUCATAN	220	1.7	154	1.0	40
ZACATECAS	243	1.9	228	1.7	6
TOTAL	16694	2.0	6106	0.6	7946

* 1989

** 1995

*Casos Totales

La constitución química de la pared celular del bacilo de Hansen confiere cierta resistencia para la evasión de la respuesta inmune y es uno de los factores más importantes que intervienen en la viabilidad del *M.leprae* fuera del cuerpo del paciente. Los estudios realizados bajo diversas condiciones adversas para bacilos de *M.leprae* obtenidos de pacientes sin tratamiento, demuestran que en condiciones de humedad el bacilo sobrevive por 5 meses, en humedad con sol vive 46 días, mientras que en solución salina a temperatura ambiente llega a sobrevivir solamente hasta 60 días; sorpresivamente el organismo expuesto directamente al sol 3 horas diarias sobrevive por 7 días; en refrigeración a 4°C se preserva hasta 60 días. Estos resultados indican que *M.leprae* puede lograr sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales extremas en ciertas áreas endémicas por períodos de tiempo variables. Esta resistencia influye en la transmisión de la enfermedad a huéspedes susceptibles (16, 17).

1.6 Respuesta Inmune a *Mycobacterium leprae*.

1.6.1. Inmunidad Humoral.

Durante el transcurso de la enfermedad se ha observado la presencia de anticuerpos contra una gran variedad de antígenos anti-*M.leprae* que se encuentran en estrecha relación con el índice bacteriológico, lo que demuestra que los anticuerpos no tienen un papel determinante en los mecanismos de protección inmune. El incremento de bacilos contribuye a la patogénesis de la reacción leprosa tipo II, presentándose un efecto de adyuvante para la activación policlonal de linfocitos B y lo cual contribuye a la producción de autoanticuerpos anti-DNA nuclear, anti-esperma, anti-globulinas y anti-cardiolipina, así como un incremento de complejos inmunes anti-micobacteria circulantes que promueven reacciones de hipersensibilidad tipo III, que son responsables en gran parte del daño tisular observado en la reacción tipo II (18).

La respuesta inicial a *M. leprae*, en la mayoría de los pacientes es por anticuerpos del isotipo IgM. Estos anticuerpos son dirigidos contra el glicolípido fenólico I (PGL-I), y se incrementan de acuerdo a la cronicidad de la enfermedad. En los contactos intradomiciliarios, los niveles de anticuerpos del isotipo IgM llegan a ser más altos que los encontrados en individuos sanos de zonas endémicas, esto sugiere que la determinación de anticuerpos anti-PGL-I tiene sensibilidad en una prueba serológica en pacientes multibacilares pero no en los casos paucibacilares (19, 20).

1.6.2. Activación del Complemento.

La capa externa de la pared celular del bacilo de Hansen funciona como un sitio de reconocimiento para los macrófagos e induce el acceso de la bacteria a su interior por medio de la fagocitosis a través de los receptores CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18), mecanismo de fagocitosis totalmente independiente de los receptores para inmunoglobulinas (FcR). Los estudios recientes indican que el trisacárido terminal y el ácido graso micocerosil presentes en el PGL-I unen ávidamente al componente C3b del complemento por las vía clásica y alternativa (Figura 2). Sin embargo, esta opsonización no llega a ser suficiente para activar los mecanismos del estallido respiratorio una vez que el bacilo se encuentra dentro del macrófago, por lo que se sugiere que los receptores del complemento, en especial el CR3, proveen al *M. leprae* un acceso seguro al interior de la célula mononuclear, e incrementa la posibilidad de multiplicación de éste sin llegar a inducir los mecanismos de defensa innata del huésped. Por otro lado, se ha descrito que la segunda molécula, la LAM que se encuentra en grandes concentraciones no fija C3b (21, 22).

Diversos estudios indican que la fijación de C3b y C1q al PGL-I de *M. leprae* es generada por la presencia de pequeñas concentraciones de anticuerpos naturales IgG e IgM en sueros no

inmunes capaces de incrementar la fagocitosis por macrófagos y la expresión de moléculas de adhesión de tipo de las integrinas en diferentes tipos celulares (23).

Durante la reacción leprosa tipo I, los componentes del complemento de la vía clásica, C1q y C4, muestran una disminución en la concentración sérica. Por otra parte, en la reacción leprosa del tipo II los componentes C3b y el factor B de la vía alterna se incrementan de forma significativa, lo que explica la inmunopatología de las lesiones por complejos inmunes en esta última reacción (24, 25)

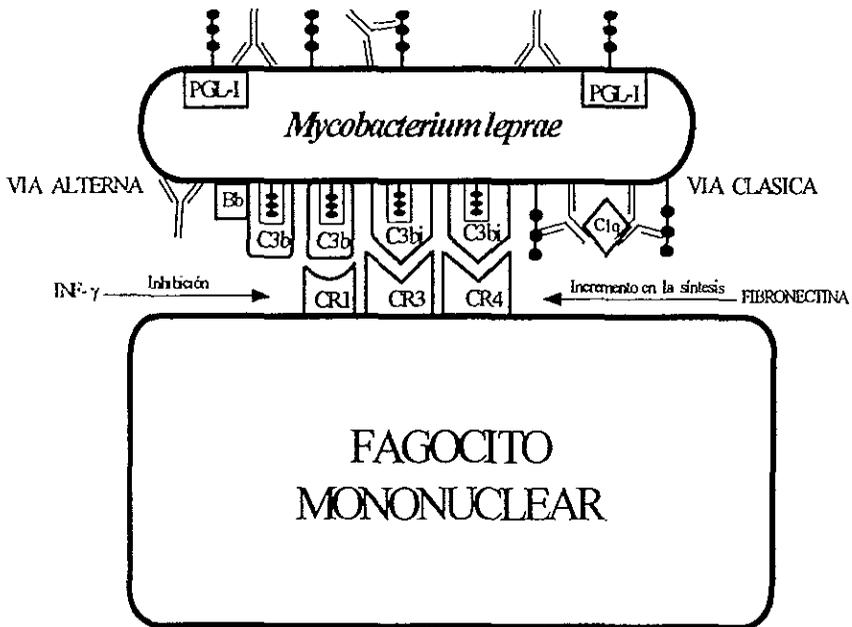


Figura 2. La fagocitosis de *M. leprae* es mediada por el reconocimiento del trisacárido terminal presente en el PGL-1, por fragmentos C3b del complemento y la participación de los receptores CR1, CR3 y CR4 de células fagocíticas.

1.6.3 Inmunidad Celular.

En la lepra, el estándar de medición de la respuesta celular que también se usa para la clasificación clínica de los pacientes es la reacción de Mitsuda. El reactivo de lepromina se elabora con bacilos muertos e intactos, obtenidos de tejidos de armadillos. La reacción de Mitsuda se presenta 3-4 semanas después de la inyección intradérmica de la lepromina y está histológicamente caracterizada por la presencia de un granuloma. La prueba es positiva solo en individuos sanos o en pacientes con una resistencia progresiva a la infección con *M. leprae* (pacientes tuberculoideos y contactos intradomiciliarios) y negativa en pacientes multibacilares, lo cual provee una excelente oportunidad para estudiar los diferentes procesos de inmunidad celular, secreción de citocinas y eventos de tolerancia que se desarrollan en la lepra (Figura 3.).

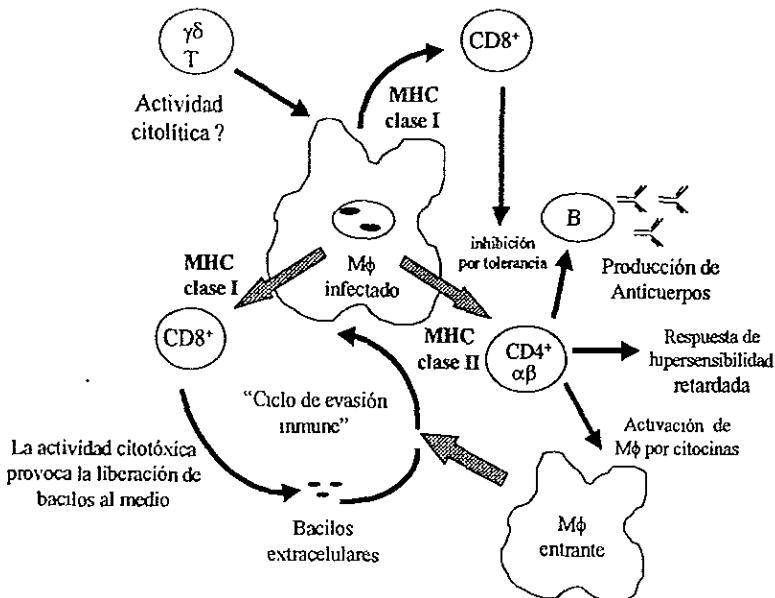


Figura 3. Estimulación de la respuesta inmune celular durante la infección con *Mycobacterium leprae*.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* señalan que solo un grupo muy limitado de antígenos son reconocidos por linfocitos T provenientes de lesiones de pacientes positivos a la prueba de Mitsuda; además se sabe que hay una sobreexpresión de los genes de las regiones variables V α , pero la familia de genes V β (en especial los genes V β 2, V β 6, y V β 13.1) es la que define el repertorio antigénico de reconocimiento para linfocitos Th-1 en células mononucleares con el haplotipo HLA-DR15 de pacientes tuberculoideos y lepromatosos con reacción leprosa tipo I (26, 27). En contraste, los genes V β 12, V β 14 y V β 19 se involucran con eventos de autoinmunidad en pacientes multibacilares (28, 29)

En el modelo murino los linfocitos T estimulados con antígenos de micobacterias muestran que dependiendo del patrón de citocinas que secretan pueden ser subdivididos en dos grupos distintos: Los linfocitos Th1 producen IL-2, IFN- γ y TNF- β , involucrados en la respuesta inmune celular y en la activación de macrófagos infectados con *M.leprae*. (30). Este tipo de respuesta por linfocitos Th1 se encuentra involucrada en las reacciones de hipersensibilidad tardía y activación de macrófagos, mientras que el otro tipo de linfocitos cooperadores, los Th2 se encuentran presentes en las formas multibacilares y secretan las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Estas citocinas se asocian con la activación policlonal de linfocitos B y la producción de anticuerpos con diversas afinidades. Recientemente, diversos estudios *in vitro* indican un patrón similar de genes para la secreción de citocinas producidas en linfocitos Th1 y Th2 de pacientes con lepra tuberculoide y lepromatosa. También se ha demostrado en estos pacientes que el incremento y la función de linfocitos Th1 y Th2 se encuentra en relación inversa (30).

Algunos investigadores indican que durante la proliferación de melanocitos estimulados con antígenos crudos y recombinantes de *M.leprae*, se incrementa la inducción de clones de linfocitos T

CD4⁺ y CD8⁺, la secreción de citocinas IL-1 β e IL-10 y se induce la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1/LAF-1 y LFA-3/CD2. Estas moléculas coestimuladoras se encuentran involucradas en enfermedades autoinmunes tal como el vitiligo. La expresión y activación de estas moléculas están correlacionadas con la lisis celular mediada por linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. Esto repercute en la patogénesis de la enfermedad, manifestándose como hipopigmentación e inflamación de la piel de los pacientes con vitiligo y lepra tuberculoide (31, 32).

Varios investigadores han demostrado que los linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentran presentes entre un 1-9% en la sangre periférica de pacientes con lepra y favorecen la resistencia del hospedero. La proliferación de los linfocitos en estos pacientes se incrementa entre 2 y 20 veces más al ser estimulados con antígenos de *M.leprae*, *M.tuberculosis* o *Staphylococcus aureus* (33). La activación celular de los linfocitos $\gamma\delta$ parece estar correlacionada con la expresión del RNAm y la síntesis de IL-2, con la actividad citolítica de células infectadas. Otros autores señalan que los altos porcentajes descritos de células $\gamma\delta$ que se encuentran circundantes a las lesiones necróticas en la linfadenitis tuberculosa de los pacientes con lepra limitrofe (BB), no están involucrados en la formación de granulomas ni en procesos los histopatológicos. Recientemente se publicaron datos de que los linfocitos $\gamma\delta$ tienen acción reguladora sobre linfocitos CD8⁺, CD4⁺ y NK (natural killer) durante la protección contra micobacterias, no obstante la participación de estos linfocitos aún no es del todo clara en la lepra (34, 35).

La lepra lepromatosa tiene importancia especial en los procesos involucrados en la inmunoregulación. Así se ha encontrado *in vivo* una ausencia parcial o total en la respuesta celular a antígenos de *M.leprae*. Esto hace que la lepra sea un modelo único para el estudio de los mecanismos de tolerancia. En la mayoría de los pacientes lepromatosos la falta de respuesta no es

irreversible, puesto que cuando se emplean citocinas recombinantes del tipo Th1, se induce la inmunocompetencia del paciente y favoreciéndose la curación del mismo. Diversos estudios *in vitro* señalan que en los pacientes lepromatosos se presenta una supresión de linfocitos CD4⁺ contra antígenos de *M. leprae*, esta inmunosupresión parece estar mediada por células supresoras (Ts) con marcador CD8⁺. El fenotipo de tales células supresoras provenientes de biopsias de piel o de sangre de pacientes multibacilares, indican que expresan los marcadores de membrana CD8⁺, CD4⁺, CD3⁺, HLA-DR⁺, FcR⁺, CD28⁺ y TCR $\alpha\beta$. Al carecer de la expresión del marcador CD28, estas células difieren de las CD8⁺ citotóxicas, mientras que otros investigadores indican que clones Ts provenientes de pacientes lepromatosos, son dependientes del polimorfismo de las cadenas $\alpha\beta$ del TCR y sugieren que el haplotipo HLA-DQ es propicio para los elementos de supresión que se desarrolla a los antígenos de *M. leprae* (36).

Otra posible explicación de la supresión de linfocitos T se basa en la explicación del bloqueo por anticuerpos, a través de complejos inmunes circulantes. Estos estudios fundamentan que los anticuerpos obtenidos de pacientes multibacilares LLN y BL en presencia de un extracto crudo de *M. leprae*, tiene efectos supresivos en la proliferación celular de linfocitos T de individuos respondedores sanos, estos efectos supresivos no se registraron en la proliferación de linfocitos activados con la tuberculina (PPD) ni en pacientes con lepra tuberculoide (37).

Un gran número de procesos han sido involucrados para explicar la falta de respuesta celular para antígenos propios y extraños, en los que se incluyen la delección clonal de linfocitos T y B antígeno-específicos, anergia clonal de linfocitos T y la supresión de linfocitos T. Sin embargo, la delección clonal específica de linfocitos T parece ser el mecanismo principal, el mismo que se desarrolla para generar la autotolerancia neonatal manteniéndose en la etapa adulta (38, 39)

1.6.4. Secreción de citocinas.

El espectro clínico-patológico de la lepra tiene estrecha relación con las citocinas que se secretan por linfocitos Th1 y Th2 en el transcurso de la enfermedad. Se sabe que los monocitos de pacientes lepromatosos producen IL-10 y prostaglandina E2 (PGE2), estos compuestos solubles inhiben la linfoproliferación en pacientes tuberculoides, contactos intradomiciliarios e individuos sanos. Sin embargo, estos efectos son reversibles al tratar los cultivos con anticuerpos anti-IL-10 e indometacina. Estos estudios indican que los monocitos infectados, complejos inmunes y los linfocitos del tipo Th2 contribuyen al desarrollo de la anergia en pacientes multibacilares (40, 41).

El IFN- γ juega un papel importante en la defensa celular contra el bacilo, dentro de las múltiples funciones biológicas destacan: incremento en la inducción y proliferación de células citotóxicas (CTL), inducción de MHC clase II en macrófagos infectados, síntesis de óxido nítrico dentro del fagosoma, inhibición de la fagocitosis mediante receptores CR1 y CR4 para C3 del complemento, activación de macrófagos y linfocitos Th1, inducción de la secreción de IL-2, TNF- α , GM-CSF e IL-12 (42, 22)

La ausencia de la respuesta causada por mecanismos de anergia está estrechamente relacionada con la disminución de IFN- γ , algunos autores indican que los contactos intradomiciliarios corren el riesgo de adquirir la infección al convivir con pacientes multibacilares por períodos de 2 años y muestran un decremento de hasta un 50% en los niveles de IFN- γ en comparación con individuos sanos (42, 43, 44).

Se ha descrito *in vitro* que la combinación de IFN- γ e IL-6 incrementa la activación de CTL y la lisis de macrófagos infectados con *M. leprae* o BCG, mientras que otras citocinas tipo Th1 como son IL-2 y TNF- α por sí solas no modifican la acción de las CTL, otras citocinas

pertenecientes a la secretadas por Th2 como IL-4 e IL-10 inhiben la activación de las CTL, efecto reversible por la acción del IFN- γ suministrado en lesiones de pacientes multibacilares (45, 46, 47).

La IL-12 promueve la inmunidad celular contra patógenos intracelulares y favorece la presencia de linfocitos Th1, mientras que la IL-10 tiene efectos contrarios a está respuesta. Está modulación se desarrolla en la lepra, en respuesta a la estimulación de *M.leprae*, existe una producción diferencial de IFN- γ regulada por la acción de las citonas IL-12 e IL-10. Estos resultados sugieren que la interacción entre monocito-linfocito está determinada por la presencia o ausencia de IFN- γ en el microambiente y resulta ser clave para determinar el tipo de citocina a ser secretada por la célula, así como el grado de intensidad de la respuesta inmune celular a desarrollar en el hospedero (48, 49, 50).

Estudios recientes describen a la IL-15 como potente factor de crecimiento de linfocitos T. En la lepra, esta citocina así como su RNAm se encuentran expresadas en grandes concentraciones en pacientes tuberculoides, más que en los lepromatosos, en donde la anergia clonal de células T antígeno-específica es mayor, ésto se corroboró por estudio *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica que producen altas concentraciones de IL-15 al ser estimuladas con antígenos de *M leprae* Por otro lado, cuando se usa rIL-15 (recombinante) sola o combinada con rIL-2 o rIL-7 se obtiene de igual forma un incremento en la respuesta proliferativa al patógeno. Sin embargo, la IL-15 induce in incremento en la presencia de NK con marcadores CD3⁻, CD56⁺, mientras que la combinación de IL-15 con *M.leprae* induce la expansión de células T CD3⁺, CD56⁺. En el análisis de lesiones de piel la frecuencia de linfocitos CD3⁺, CD56⁺ y la elevada expresión de IL-15, esta citocina incrementa la respuesta de células T en respuesta a patógenos intracelulares (49, 50).

El análisis del patrón de citocinas en pacientes lepromatosos, tuberculoides e individuos sanos, se reveló que los linfocitos Th1 son inducidos por antígenos recombinantes de choque térmico de *M.leprae* en el contexto de HLA-DR, pero las formas alélicas DR1 y DR7 activan células Th2. Estos estudios sugieren que el fenotipo del complejo mayor de histocompatibilidad de la célula presentadora de antígeno puede modular la presencia y actividad de linfocitos Th1 y Th2 durante la respuesta inmune celular en infecciones intracelulares (51).

El empleo de la hibridación *in situ* y de anticuerpos monoclonales han demostrado que el RNAm del TNF- α y la proteína en macrófagos obtenidos de lesiones de piel y nervios periféricos de pacientes con lepra límite (BB) se encuentran en altas concentraciones y en correlación estrecha con el estado reaccional tipo I. Su presencia en el microambiente así como el daño local en el tejido que se produce, se explica por la respuesta del hospedero contra la infección micobacteriana (52, 45)

Estudios *in vitro* revelan que en pacientes lepromatosos ocurre un desequilibrio entre IL-10 e IL-4. Esto tiene un efecto en la inhibición de la presentación del antígeno por el MCH clase II y en el reconocimiento específico de linfocitos T, lo que conduce a la reducción de linfocitos T CD4⁺ (Th1). Por otro lado IL-10 muestra un efecto negativo en la liberación y producción de óxido nítrico e IL-2, aunque se induce también la síntesis de TNF- α y GM-CSF, las cuales son moléculas con una fuerte actividad antimicrobiana. Por otro lado, la IL-4 induce un incremento en la síntesis de anticuerpos anti-*M.leprae* y otros anticuerpos con diversas afinidades contra tejidos del hospedero. Algunos autores proponen un modelo (Figura 4), en el cual el balance de la IL-4 y de la IL-10 actúan en la red de inmunosupresión que se presenta en los pacientes multibacilares, inicialmente la secreción de IL-4 de linfocitos CD8⁺ activa una expansión clonal de células con este

marcador de diferenciación, la acción supresiva de IL-4 sobre linfocitos T y macrófagos facilita el crecimiento de *M. leprae*. La liberación de antígenos del patógeno provee el estímulo para la producción de IL-10, la capacidad de IL-10 para suprimir la respuesta de células T específicas a *M. leprae* resulta en un sinergismo con la supresión de IL-4 para suprimir la proliferación de células CD4⁺ e inducción de IFN- γ , eventos que propician la inmunosupresión (53, 54, 55)

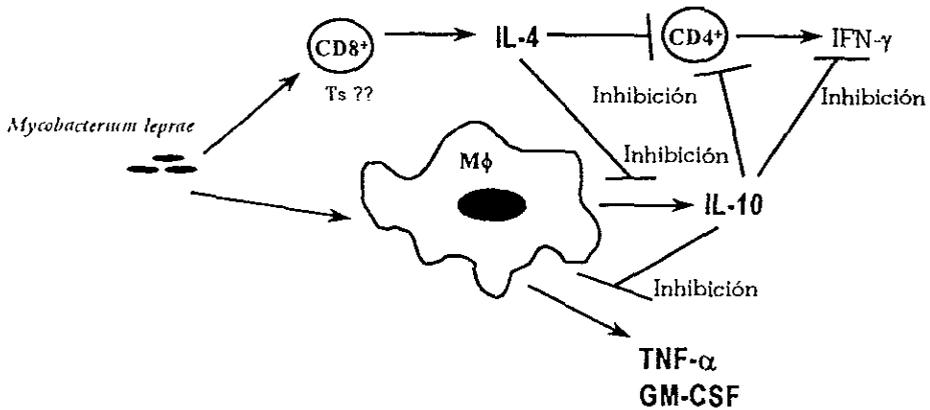


Figura 4. Función de IL-10 e IL-4 en la inmunosupresión causada por *Mycobacterium leprae* en pacientes multibacilares.

1.7 Antígenos de *Mycobacterium leprae*.

Un gran número de antígenos micobacterianos han sido descritos y caracterizados en base a la interacción con antisueros hiperinmunes, por medio de diversas técnicas inmunológicas (8, 55, 56), pero la mayoría de estos antígenos presentan reactividad cruzada con otras bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*. La mayoría de los antígenos micobacterianos se han identificado por inmunoelectroforesis cruzada (CIE) y por el reconocimiento de antígenos por anticuerpos en Western blott, esto permite conocer características fisicoquímicas, bioquímicas y permite inferir su posible localización y distribución en el microorganismo (Figura 5).

La aplicación de las técnicas de inmunología molecular han permitido determinar los aminoácidos de las proteínas deducidas de las secuencias del DNA. Esto es posible gracias a la obtención de genótecas, mediante la expresión de genes en vectores como λ gt11. El uso de estas herramientas han sido de gran importancia para el estudio de la biología molecular del bacilo de la lepra y han permitido obtener un gran número de proteínas recombinantes específicas que reaccionan con anticuerpos monoclonales. Así una serie de antígenos de *M.leprae* se han logrado determinar por medio del mapeo de epitopos para linfocitos T y B. El empleo de estas técnicas ofrecen un gran potencial para la generación de una vacuna recombinante para la lepra (56, 57).

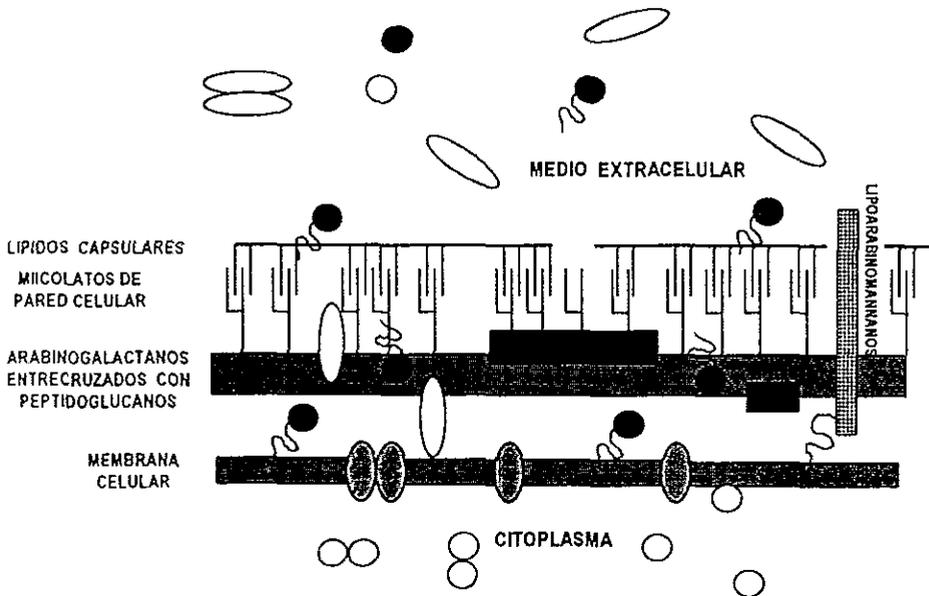


Figura 5. Localización y distribución subcelular de las diferentes clases de antígenos proteicos en micobacterias.

- Proteínas de Choque térmico (70/71 kDa, 65 kDa y 18 kDa) y super óxido dismutasa (23/28 kDa), son proteínas principalmente citoplasmáticas, sin embargo, se pueden encontrar en los sobrenadantes de los cultivos en la fase log
- ◐ Proteínas que se encuentran en asociación con la membrana celular como son 45 kDa y 30 kDa de *Mycobacterium leprae* y 31kDa de *M. avium-intracellulare*
- Agregado proteico altamente inmunogénico e insoluble en SDS y ligeramente asociado con la pared celular de *M. leprae*.
- ◑ Antígenos de 38 kDa y 19 kDa de *M. tuberculosis* con propiedades y secuencias bioquímicas que sugieren que puede representar una clase de lipoproteínas, posiblemente involucradas en el transporte de nutrientes a través de la pared celular. Estos antígenos se encuentran en el medio de cultivo de algunas especies micobacterianas.
- ◒ Principales antígenos exportados en los que se incluyen el complejo BCG85, MPB64 y MPB70. Estas proteínas son sintetizadas con un péptido señal y son activamente secretadas a través de la membrana. Miembros del complejo BCG85 se encuentran también asociados a la pared celular

Por sus características bioquímicas los antígenos de *M.leprae* descritos hasta la fecha se pueden clasificar en dos grupos: los no proteicos, que están constituidos principalmente por glicolípidos y lipoarabinomananas. El segundo grupo pertenecen los de naturaleza proteica, algunos genes que codifican para éstos han sido clonados, así como su estructura proteica (58, 59). En las siguientes páginas se destacarán algunas de las principales características de los antígenos descritos en la literatura científica

1.7.1 GLICOLIPIDO FENOLICO I (PGL-I) .

Es el principal antígeno del bacilo y relativamente específico, químicamente es un oligoglucosilfenólico phthiocerol diester que constituye el 2% del peso del microorganismo y es secretado en grandes cantidades en los tejidos infectados; el trisacárido terminal está glicosilado a un grupo fenil y asociado a una cadena glicólica; la región inmunodominante de la molécula y es reconocida principalmente por anticuerpos IgM e IgG de pacientes lepromatosos, la sensibilidad en los ensayos se correlaciona directamente con la carga bacilar (60, 61, 62)

1.7.2 LIPOARABINOMANANA (LAM) .

Es el segundo antígeno en abundancia en la pared del *M.leprae*, el antígeno LAM presenta una elevada reactividad cruzada con otras micobacterias del mismo género, en especial con *M.tuberculosis* y *M.avium* (6, 8)

Dentro de los antígenos proteicos existe un grupo de proteínas que con base en la similitud de la estructura primaria, reactividad cruzada en pruebas inmunológicas y la expresión génica, se agrupan dentro de las **proteínas de choque térmico (HSP)** ó de estrés. Inicialmente su síntesis solo

se relacionó como una respuesta al cambio brusco de temperatura y a condiciones adversas del microambiente, tales como la presencia de radicales oxidativos y iones metálicos tóxicos. Ahora se sabe que estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tienen secuencias genéticas homólogas con otros organismos. Estos compuestos participan en funciones esenciales del crecimiento normal celular y se producen en casi todas las condiciones microambientales. La función de las proteínas de choque térmico en *M.leprae* se relacionan con los procesos de replicación del DNA, división celular y secreción de proteínas. Las principales HSP descritas para el bacilo de Hansen son las de 65 kDa, 18 kDa y 70 kDa (63, 64, 65)

1.7.3 65 kDa.

Una de las primeras HSP que se identificaron por medio del aprovechamiento del DNA recombinante fué el antígeno de 65 kDa, constituido por 540 aminoácidos, la distribución y localización del antígeno se ha ubicado en el citoplasma del bacilo, un incremento en la síntesis ocurre como respuesta al estrés oxidativo de la fagocitosis, la HSP 65 kDa es una de los principales antígenos inmunodominantes durante la infección y es reconocida por anticuerpos monoclonales y policlonales, linfocitos T y B en una alta proporción de individuos y ratones BALB/c infectados e inmunizados con *M.leprae*. Análisis de la secuencia del gene Y3178 correspondiente a la HSP 65 kDa, señalan que presenta más del 95% de homología con *M.tuberculosis*, *M.bovis* BCG y *M.fortutum* y un 50 % con genes y proteínas de *Escherichia coli*. La HSP 65 kDa actúa como "chaperona" durante el ensamblaje eficiente de complejos moleculares como la holoenzima Rubisco presente en cloroplastos, la ATPasa-F1 de la mitocondria y la proteína B del fago λ en *E.coli* (65, 66, 67)

Los epitopes de la HSP de 65 kDa que se han identificado principalmente por linfocitos T humanos y en ensayos de proliferación celular, son reconocidos dentro del contexto de moléculas clase II (HLA-DR1, DR2, DR5 y DR7), mientras que los haplotipos DR4, Dw4 y Dw14 que reconocen la HSP 65 kDa, se relacionan con procesos de autoinmunidad en pacientes con lepra lepromatosa (65, 68).

Estudios en la India con 200 muestras de sangre de pacientes con lepra y contactos intradomiciliarios demuestran que en la estimulación de PBMC con el antígeno recombinante de 65 kDa, presentan bajos índices de proliferación celular en pacientes lepromatosos. Además se sabe que puede haber una posible correlación con el incremento en la síntesis de anticuerpos IgG. Por otro lado existe una relación inversa en pacientes con formas tuberculoides, contactos intradomiciliarios e individuos sanos (69)

El antígeno recombinante de 65 kDa tiene una función importante en la inmunoregulación de células infectadas. Estudios *in vitro* se ha señalado que el antígeno HSP 65 kDa es capaz de inducir la activación policlonal de CTL CD4⁺ con una marcada lisis en macrófagos. Sin embargo, la lisis se presenta en otras CTL como CD8⁺ y sorpresivamente linfocitos CD4⁺ con TCR $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, está última interacción T-T se sugiere que ocurre en los granulomas micobacterianos ya que el contenido de detritos celulares y bacterianos son abundantes. La presencia del antígeno de 65 kDa incrementa la probabilidad de incorporarse al MCH clase II en CD4⁺, ya sea que ocurra la lisis por linfocitos T CD4⁺ citotóxico. Por otro lado, el antígeno de 65 kDa induce la proliferación de linfocitos $\gamma\delta$ en procesos que involucran autoinmunidad en pacientes lepromatosos y con artritis (69, 70).

Con base en estudios anteriores, se sabe que la proteína de 65 kDa de *M. leprae* no es un excelente candidato para la protección contra la infección en modelos murinos ni humanos, ya que

por su elevada reactividad cruzada con antígenos de *M.tuberculosis* y humanos, además está involucrada en procesos de autoinmunidad haciendo que su especificidad disminuya notablemente.

1.7.4 18 kDa .

Es otro miembro de la familia de choque térmico, está constituida por 111 residuos y presenta una gran homología con la proteína de estrés de 17 kDa descrita en el frijol de soya (8).

En la respuesta *in vitro* de clonas de linfocitos T estimuladas con la HSP 18 kDa de *M.leprae*, presenta una respuesta inmune celular en el 93% de los contactos intradomiciliarios, 50% en pacientes tuberculoides sin tratamiento y un 70% en individuos europeos sanos vacunados con BCG. Estos resultados indican que la proteína de 18 kDa induce linfoproliferación, conservando un epítotope que causa reactividad cruzada en individuos sanos que jamás han visitado zonas endémicas de lepra (71, 72)

La respuesta inmune celular al estimular linfocitos *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos está genéticamente controlada. Algunos estudios con ratones con haplotipos BALB/cJ (H-2^d), BALB B (H-2^b), B10.BR (H-2^k) y B.10.M (H-2^f), se encontró que la respuesta linfoproliferativa es elevada con altos niveles de IFN- γ , el patrón de citocinas tiene correlación con Th-1, mientras que en C57BL/10J (H-2^b) los índices de estimulación son bajos, pero la presencia de IL-2 sugiere que a pesar de tener una menor estimulación celular, se encuentra una tendencia a inducir linfocitos Th-1 en cultivos y animales estimulados con el antígeno de 18 kDa de *M.leprae* (73, 74)

El reconocimiento del antígeno de 18 kDa de *M.leprae* por pacientes lepromatosos es principalmente por anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG3, este reconocimiento no se presenta en los tuberculoides, al examinar está diferencia en el cambio que se induce en linfocitos T durante el

desarrollo de la enfermedad, en estudios en donde se utilizó un panel de antígenos sintéticos 15mer para determinar los epitopos de reconocimiento por IgG1 e IgG3, se encontró que las IgG1 de pacientes lepromatosos mostraron un reconocimiento por el extremo carboxilo terminal del péptido, mientras que las IgG3 de los pacientes con lepra tuberculoide reconocieron diversos epitopos de amino terminal en la parte media del antígeno. Estos resultados sugieren que en la forma tuberculoide tiene lugar una inducción de diferentes clases de inmunoglobulinas pero no en los pacientes lepromatosos, mientras que el número y naturaleza de los epitopos de células B reconocidas por IgG2 están altamente influenciadas por la presencia de linfocitos Th-1 (75, 76).

Existe alta homología en la secuencia en la estructura primaria entre la **HSP de 18 kDa** de *M.leprae* y el péptido de 34-63 aa denominada **toxina-1 del síndrome de shock (TSST-1)** presente en *Staphylococcus*. La TSST-1 es un superantígeno que se une a la cadena V β de la molécula de clase II e induce linfoproliferación en individuos con HLA-DR, ambas moléculas son reconocidas por anticuerpos monoclonales y por PBMC de individuos expuestos a diversos antígenos micobacterianos, además ambas moléculas se encuentran involucradas en procesos de autoinmunidad (77, 78)

1.7.5 **70 kDa.**

Es otra proteína de choque térmico constituida por 621 aminoácidos, en la estructura primaria presenta homología del 56% con la proteína codificada por el gene dnaK de *E.coli*, 46% con la HSP 70 kDa de *Caenorhabditis elegans*, 47% con 70 kDa humana, 70% en los 203 aminoácidos del C-terminal de la HSP 71kDa de *M.tuberculosis* y gran similitud en el carboxilo

terminal de *M bovis* , por el contrario los aminoácidos del N-terminal sugieren una especificidad del péptido de la 70 kDa de *M.leprae* (74, 79, 80).

Estudios previos de proliferación celular con PBMC de pacientes con lepra, tuberculosis y contactos intradomiciliarios señalan que la HSP 70 kDa induce altos índices de estimulación celular y secreción de IFN- γ , y además provoca reacciones de hipersensibilidad tardía en pacientes multibacilares e individuos vacunados con BCG, la región de C-terminal es el blanco principal de la respuesta inmune humoral para modelos murinos y de la reactividad cruzada con *M.bovis* en el 48% de los anticuerpos de pacientes con lepra lepromatosa (81, 82)

Un mapeo de péptidos señala la existencia de dos grande regiones en el C-terminal del antígeno de 70 kDa de *M.leprae*, la primera región tiene determinantes lineales que son reconocidas por epitopes de células B y por anticuerpos monoclonales e hiperinmunes de animales. La segunda región tiene determinantes conformacionales con dos a cinco bucles que son fuertemente reconocidos por los anticuerpos de pacientes con lepra lepromatosa (80, 82).

1 . 7 . 6 36 kDa .

Está formado por 249 aminoácidos, posee secuencias ricas en prolina y posiblemente sea un componente de la membrana celular. Esta molécula fue inicialmente aislada e identificada por anticuerpos monoclonales, este reconocimiento por anticuerpos monoclonales murinos y de pacientes tuberculoides. Este reconocimiento se da principalmente a la región N-terminal, estudios *in vitro* señalan que esta molécula es capaz de estimular la proliferación de PBMC de pacientes multibacilares con lepra y tuberculosis (8)

1.7.7 28 kDa.

Esta molécula fue caracterizada usando anticuerpos monoclonales. Se sabe que esta proteína es secretada en el medio de cultivo de *M.tuberculosis* y en los tejidos de pacientes multibacilares infectados por *M.leprae*. Estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales se sugieren que la localización de este antígeno en el bacilo de Hansen está principalmente en la membrana celular.

El antígeno de 28 kDa de *M.leprae* induce linfoproliferación en células de pacientes con lepra y tuberculosis. Por otro lado, los anticuerpos de estos pacientes presentan una elevada reactividad cruzada (83, 84)

1.7.8 12 kDa.

Inicialmente identificado partir de una biblioteca genómica tamizada con anticuerpos IgG y linfocitos T de pacientes lepromatosos, este antígeno presenta un fuerte reconocimiento con el sonicado de bacilos provenientes de armadillo, pero existe elevada reactividad cruzada con *M.tuberculosis* y *M.bovis* (8, 84).

1.7.9 45 kDa.

Recientemente se ha identificado un nuevo antígeno de 408 aminoácidos con un peso molecular de 42,466 Daltons (Da) y con un punto isoelectrico (pI) de 3.98. Este antígeno fue aislado a partir de una genoteca obtenida en 1985 con λ gt11, presenta una fuerte reactividad con

anticuerpos de pacientes lepromatosos, los lisogenos obtenidos con el λ gt11 fueron subclonados dentro del gene *lacZ* del vector pU290. El análisis del mapa de restricción y secuenciación reveló la existencia de un frente de lectura abierta (ORF) de 1,227 pares de bases (bp) con un primer codón ATG que codifica el inicio del polipéptido de 45 kDa de *M.leprae* (85, 86).

Estudios realizados con el programa de computación PCGENE versión 4.5 mostraron que la proteína posee tres dominios, dos de ellos con el C y N-terminal de naturaleza hidrofóbica y un dominio central hidrofílico. Aunque no es clara la localización del antígeno, pero se sugiere que por las características de antigenicidad este localizada en la pared celular. Sin embargo, de acuerdo a la naturaleza hidrofóbica de los dominios C y N-terminal es posible que la proteína pueda estar en un medio hidrofóbico tal como la membrana citoplasmática o una región rica en lípidos de la pared celular (86)

El dominio central hidrofílico está formado por un 29.9% por residuos de serina y tiene un 14.9% de la serina total de la proteína. Dentro del dominio central se han identificado algunas secuencias repetidas ricas en serina (Tabla II), la posible función biológica de estas secuencias ricas en serina es todavía desconocida. Se ha descrito una homología del 34% en la región del N-terminal con un antígeno hipotético de 51 kDa de *M.tuberculosis* (85, 86).

Al evaluar el reconocimiento del antígeno de 45 kDa por anticuerpos de pacientes con lepra por Western Blot, se encontró un reconocimiento del 78% en pacientes multibacilares. Los individuos con historia de eritema nodoso resultaron ser positivos en un 94% , mientras que solo un 68% de los pacientes paucibacilares reconocieron al antígeno, aunque no se encontró reconocimiento por parte de individuos sanos, pero sí en 26% de pacientes con tuberculosis pulmonar activa

Estos resultados sugieren que el antígeno de 45 kDa puede estar involucrado en el proceso inmune durante la reacción leprosa tipo II. Además por presentar un alto porcentaje de positividad en los paciente paucibacilares, se ha sugerido que el antígeno puede tener un valor diagnóstico (86).

Tabla II. Motivos de repetición del antígeno de 45 kDa de *Mycobacterium leprae*. *

LOCALIZACIÓN EN EL POLIPEPTIDO	SECUENCIAS
REPETICION 1	
209	SVAQSE
230	SVAQSE
REPETICION 2	
192	SSSSS
267	SIISS
281	SISSS
315	SISST
REPETICION 3	
286	TASSI
294	VASQV
326	AASKV
351	TASQP
390	TASVA

* Adaptado de Vega-López *et al.* (88).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1) La lepra es un problema de salud pública por su elevada frecuencia y distribución en nuestro país; el control de la enfermedad en la actualidad se basa en el diagnóstico temprano para dar un tratamiento oportuno y adecuado. Sin embargo, la gran mayoría de los antígenos utilizados para el diagnóstico en diversas pruebas inmunológicas presentan baja especificidad y elevada reactividad cruzada con otros antígenos micobacterianos, por lo que es necesario realizar estudios con antígenos recombinantes que puedan reducir estos inconvenientes en pruebas diagnósticas y que aporten nuevos conocimientos en la respuesta inmune celular desarrollada por los pacientes con lepra.

2) Son pocos los antígenos descritos para *Mycobacterium leprae* capaces de inducir una respuesta linfoproliferativa y secreción de citocinas tipo Th1 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes (PBMC) con lepra. Esto limita a la gran mayoría de los antígenos conocidos para el empleo en el diagnóstico temprano, así como su utilización como marcadores de los estados reaccionales. Por lo anterior es conveniente investigar el reconocimiento inmune celular del nuevo antígeno recombinante de *Mycobacterium leprae* de 45 kDa por células mononucleares.

3) Aún cuando se sabe que el antígeno de 45 kDa de *M.leprae* es reconocido específicamente por anticuerpos en una alta proporción de pacientes paucibacilares y multibacilares, se desconoce la reactividad celular *in vitro* y la posible secreción de IFN- γ durante la estimulación antigénica, por lo que es necesario determinar la especificidad del reconocimiento celular, así como los niveles de IFN- γ secretados por pacientes con diversos tipos de lepra, tuberculosis pulmonar activa, contactos intradomiciliarios y controles sanos de zonas endémicas

3. HIPOTESIS.

- 1) El antígeno de 45 kDa de *M.leprae* será reconocido por la mayoría de los pacientes con lepra, contactos intradomiciliarios e individuos de zonas endémicas pero no por pacientes con tuberculosis activa.

- 2) Se encontrarán elevados índices de proliferación celular en todos los pacientes con lepra en respuesta al antígeno de 45 kDa de *M.leprae* y en relación con otros antígenos recombinantes del mismo bacilo. La reactividad cruzada en células de pacientes con tuberculosis será en este caso baja.

- 3) Las células de pacientes con lepra, en especial los lepromatosos secretarán altos niveles de IFN- γ al ser estimulados con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*.

4. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar si la estimulación del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* es capaz de inducir la activación de la inmunidad celular y la secreción de citocinas de tipo Th1 involucradas en procesos de defensa y protección contra el bacilo de Hansen.

Objetivos Particulares.

- 1) Determinar el reconocimiento del antígeno recombinante de 45 kDa de *M.leprae* por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diversos tipos de lepra, contactos intradomiciliarios, individuos sanos de zonas endémicas y evaluar la reactividad con células mononucleares de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.
- 2) Evaluar la linfoproliferación por medio de ensayos de proliferación celular mediante la incorporación de timidina tritiada en cultivos de PBMC estimulados con una batería de antígenos recombinantes del bacilo de Hansen, fitohemaglutinina (PHA), proteína purificada derivada de tuberculina (PPD) y el antígeno de 45 kDa rico en serina de *M.leprae*.
- 3) Determinar por medio de la prueba de ELISA la secreción de IFN- γ presente en los sobrenadantes de cultivos de PBMC de los ensayos de proliferación celular estimulados con los antígenos estudiados
- 4) Comparar y correlacionar los índices de estimulación celular y los niveles de secreción de IFN- γ obtenidos en respuesta a los diversos antígenos recombinantes empleados.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 DONADORES.

Las muestras de sangre periférica utilizada en este trabajo de investigación provinieron de pacientes ambulatorios y hospitalizados. La toma de la muestra de sangre venosa fue por punción del antebrazo con jeringas estériles por personal de los centros de salud participantes en el proyecto. La información de cada uno de los donadores endémicos sanos, contactos intradomiciliarios, enfermos con lepra ó tuberculosis se encuentra en el apéndice I.

a) Pacientes con lepra.

Los 59 pacientes con diferentes tipos de lepra provinieron principalmente de cuatro centros de salud:

- 1 Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).
2. Centro Medico La Raza (IMSS). México, D. F.
3. Centro Dermatológico Dr. "Ladislao de la Pascua" (SSA). México, D. F.
4. Hospital Amigo del niño y la mujer (IMSS). Celaya, Guanajuato.

Todos los pacientes incluidos durante la investigación fueron diagnosticados por médicos especialistas, las muestras de sangre fueron enviadas ó tomadas directamente en las instituciones anteriormente señaladas

b) Pacientes con Tuberculosis pulmonar activa.

Todos los 19 pacientes estudiados fueron estudiados en él:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (SSA). México, D. F.

Las muestras de sangre fueron tomadas en este mismo instituto por médicos neumólogos, que diagnosticaron a los pacientes en base a estudios radiólogos y laboratorio clínico realizados *previamente a su inclusión dentro del trabajo*

c) Contactos intradomiciliarios

Los 19 sujetos estudiados en el grupo de contactos intradomiciliarios son familiares de casos con lepra estudiados en:

- 1 Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” (SSA). México, D. F.
- 2 Hospital Amigo del Niño y de la Mujer (IMSS). Celaya, Guanajuato.

Todos los contactos estudiados en este trabajo carecían de manifestaciones clínicas de la enfermedad de Hansen, tuberculosis ó cualquier otra infección micobacteriana.

d) Controles endémicos sanos.

La gran mayoría de los 20 donadores sanos fueron captados en dos centros de salud:

- 1 Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” (SSA). México D. F.
- 2 Hospital Amigo del niño y de la mujer (IMSS).

Los resultados de estos donadores se emplearon para valorar el fondo étnico de la enfermedad, ya que todos ellos se encontraban relacionados con el área geográfica en donde la lepra es endémica y las enfermedades causadas por micobacterias atípicas son frecuentes.

5.2 ANTIGENOS.

Todos los antígenos recombinantes, mitógeno y sonicado de *M.leprae*, utilizados en este trabajo fueron adquiridos a través de un financiamiento de la Unión Europea incluyendo reactivos procedentes de la London School of Hygiene & Tropical Medicine, el Hospital University Leiden y el NIMR Mill Hill del Reino Unido.

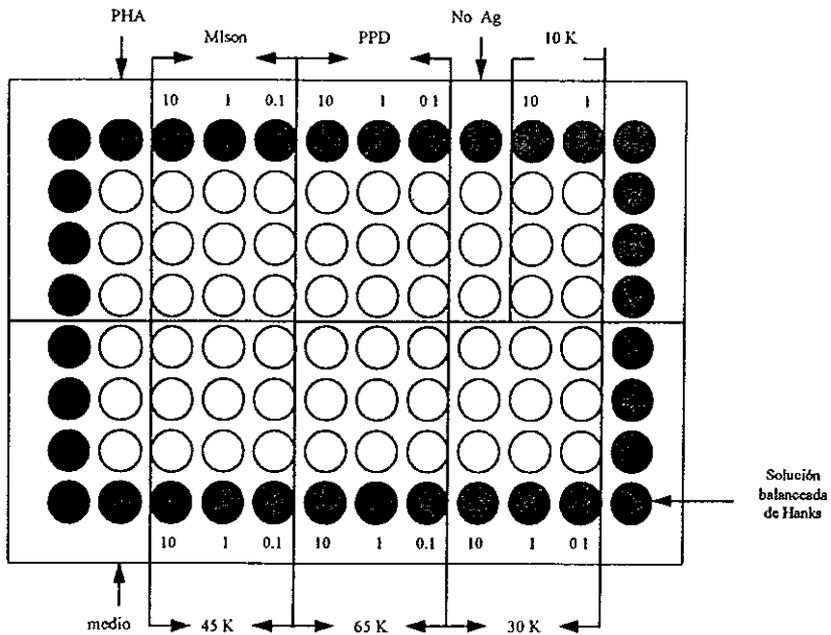
Antígeno recombinantes de <i>Mycobacterium leprae</i>	Lote N°	Concentración de Proteína (mg/ml)
45 kDa	-	1
65 kDa	ML 65-6	1.3
10 kDa	ML 10-2	0.4
Complejo 85 (30-31 kDa)	IV	3

Antígeno crudo de <i>Mycobacterium leprae</i>	Lote N°	Concentración de Proteína (mg/ml)
Sonocado (Mlson)	CD235	1

Mitógeno de linfocitos T	Lote N°	Concentración de Proteína (mg/ml)
Fitohemaglutinina (PHA)	3110-56	5

Antígeno purificado de <i>Mycobacterium bovis</i>	Lote N°	Concentración de proteína (mg/ml)
Tuberculina (PPD)	RT 48	1

La estimulación celular con los antígenos se realizó con tres concentraciones 10µg/ml, 1µg/ml y 0.1µg/ml por triplicado, como control positivo se agregó fitohemaglutinina a una dilución de 1/20. Todos los antígenos se prepararon a partir de una concentración inicial de 100µg/ml y se colocaron de acuerdo al siguiente esquema:



5.3. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y ensayo de proliferación celular con timidina tritiada.

A todos los pacientes e individuos control se les tomó sangre venosa por punción de una vena periférica de antebrazo, la separación del paquete celular y el ensayo de proliferación celular se realizaron dentro de un gabinete de seguridad de la siguiente manera:

- 5.3.1 Tomar de 22 a 25 ml de sangre y mezclar con 500µl de heparina contenida dentro de tubos cónicos Falcon (Greiner, Inc.) estériles de 50 ml, agregar un volumen igual de medio RPMI-1640 (Gibco BRL) a una temperatura de 37°C y mezclar.
- 5.3.2 Dividir en dos la mezcla sangre-RPMI-1640 (Gibco BRL) y agregarla cuidadosamente por los bordes en otros tubos Falcon (Greiner, Inc.) que contengan c/u 15 ml de Ficoll-Histopaque (Sigma, Chem.).
- 5.3.3 Centrifugar a 1, 300 rpm (400g) durante 30 minutos a temperatura ambiente
- 5.3.4 Tomar 9-11 ml de la mezcla plasma-RPMI (1:2), almacenar en tubos universales de 20 ml hasta su empleo a -75°C.
- 5.3.5 Recolectar los mononucleares con una pipeta de plástico estéril, que se encuentran en el botón de color blanco y agregarlos en otro tubo Falcon de plástico estéril de 50 ml.
- 5.3.6 Adicionar solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (Gibco BRL) hasta la marca de 50 ml y centrifugar a 1, 300 rpm (400g) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5.3.7 Resuspender del botón y lavar dos veces más con HBSS.

- 5 3 8 Preparar en un tubo universal estéril el volumen adecuado de medio de cultivo que consiste de RPMI con 10% de plasma autólogo, 1% de L-glutamina 200 mM (Gibco BRL) y 1% de antibióticos (Penicilina 1000 UI/ml-Estreptomicina 1000 µg/ml (Gibco BRL)) y filtrar con acrodiscos de 0.2µm (Nalgene) para jeringa de 10 ml.
- 5 3 9 Resuspender el botón en 0.5 ml de medio de cultivo y hacer una dilución 1:10 con azul de tripano (Sigma, Chem.) para contar en un hemocitometro la viabilidad celular.
- 5 3 10 Ajustar a 200,000 cel/pozo y agregarlas en 180 µl de medio de cultivo RPMI-1640 con plasma autólogo al 10%, en placas estériles de 96 pozas con fondo en U (Nunc, Inter Med)
- 5 3 11 Adicionar la concentración adecuada de antígeno y del control positivo diluidos en 20µl de medio de cultivo RPMI-antibióticos al 1%.
- 5 3 12 Agregar 200µl de HBSS en las pozas circundantes para evitar deshidratación de la células en proliferación e incubar a 37°C con 5% de CO₂ y humedad durante 6 días.
- 5 3 13 Pulsar al séptimo día con 1µCi/pozo (Amersham, Life Science) en 20µl de RPMI-1640 con plasma autólogo al 10% e incubar 24 horas a 37°C 5% de CO₂ y humedad.
- 5.3.14 Cosechar en papel filtro (ICN Biomedicals, Inc.) y dejar secar los círculos cortados.
- 5 3 15 Colocar los círculos dentro de viales de plástico desechable (Packard, Camberra Co.) y agregar 1.5 ml de líquido de centelleo (ICN Biomedicals Inc)

5 3 16 Leer con un contador de centelleo β y registrar los resultados como índice de estimulación celular de la siguiente forma:

Cuentas por minuto en cultivo con antígeno (CPM-Ag) / Cuentas por minuto en cultivo sin antígeno (CPM-Sin Ag)

5.4. Detección de Interferón Gamma (IFN- γ) Humano por medio de la técnica de ELISA.

Al sexto día del ensayo de proliferación celular se tomaron 100 μ l de cada pozo de sobrenadante, esta operación se realizó con mucho cuidado evitando tocar el botón celular, enseguida se marcó con el mismo esquema de distribución otra placa microtitulación y en esta se agregó el sobrenadante, para almacenarlo a -75°C para realizar la detección de IFN- γ por medio de la prueba de ELISA de la siguiente manera:

5 4.1 Adicionar 100 μ l por pozo del anticuerpo monoclonal anti IFN- γ humano (Hycult. Biochem.) a una concentración de 2.5 μ g/ml en buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6 e incubar toda la noche a 4°C.

5 4.2 Decantar el contenido y bloquear con 100 μ l por pozo con albúmina sérica bovina, fracción V (BSA) (Sigma, Chem.) al 2.5% en buffer de fosfatos salina (PBS) 150 mM pH 7.2. e incubar en cámara húmeda 1 hora a 37°C.

5.4 3 Lavar dos veces con PBS-Tween al 0.05% (PBS-T).

5 4 4 Preparar el estándar de IFN- γ disuelto en medio de cultivo RPMI-1640 con suero humano tipo AB al 10% (Sigma, Chem), filtrar con acrodiscos de 0.2 μ m y agregar por duplicado

100µl por pozo las siguientes concentraciones del estándar 400 UI/ml; 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125 y medio de cultivo solo.

- 5.4.5 Agregar por duplicado los sobrenadantes de los cultivos de los ensayos de proliferación celular e incubar durante dos horas a 37°C en cámara húmeda.
- 5.4.6 Descartar el contenido de las placas y adicionar 100µl por pozo del anticuerpo policlonal de conejo anti-IFN-γ humano a una dilución de 1:2000 en PBS-T adicionado con 0.25% de BSA y 5% de suero humano tipo AB, solución previamente filtrada con acrodiscos de 0.2µm
- 5.4.7 Incubar durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda
- 5.4.8 Lavar tres veces con PBS-T al 0.05%
- 5.4.9 Adicionar 100µl/pozo de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa (Sigma, Chem.) a una dilución de 1:2000, solución en hecha en PBS-T al 0.05% adicionada con 5% de suero humano tipo AB.
- 5.4.10 Incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
- 5.4.11 Lavar cuatro veces con PBS-T al 0.05%.
- 5.4.12 Agregar 100µl/pozo del sustrato 3', 3', 5', 5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Kirkegaard & Perry, Lab.) y dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 5.4.13 Leer a 620nm, graficar en papel semi-log una curva estandar y calcular por extrapolación las concentraciones de IFN-γ que se encuentran presentes en los sobrenadantes de cultivo.

6. RESULTADOS.

Se realizó una cinética de dosis respuesta para cada uno de los antígenos utilizados con la finalidad de determinar la concentración adecuada para la respuesta proliferativa celular y la secreción de IFN- γ en las PBMC de los siguientes sujetos: individuos normales de zonas endémicas, contactos intradomiciliarios, pacientes con diversos tipos de lepra y pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

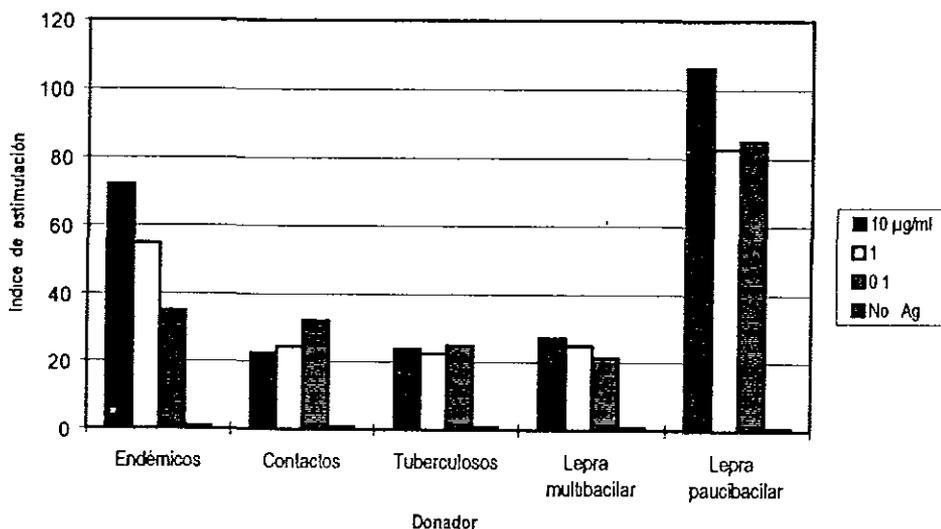
6.1 Respuesta celular al sonicado de *M.leprae* (Mlson).

El antígeno que se usó para estimular las PBMC de los pacientes y controles fue a las concentraciones de 10, 1 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ en RPMI-1640 adicionado con antibióticos al 1%.

En las gráficas 1 y 2 se muestran los promedios de los índices de estimulación, así como las Unidades Internacionales (UI) de IFN- γ obtenidas en cada uno de los ensayos realizados para cada grupo estudiado.

En la gráfica 1 se muestran los promedios obtenidos en cada grupo. Los individuos de zonas endémicas mostraron un índice de estimulación mayor de 60 en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, se encontró una ligera diferencia con la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, pero no así en la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, lo cual indica que en los individuos de zonas endémicas para la enfermedad existe un reconocimiento por algunos epitopes en *M.leprae*. Esto puede explicarse por la existencia de otras enfermedades micobacterianas, tal como la tuberculosis. En cuanto a los contactos intradomiciliarios la respuesta proliferativa fue menor, pero la dosis de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ fue la única que alcanzó índices de estimulación mayores a 30 en relación con las otras dos concentraciones. Los

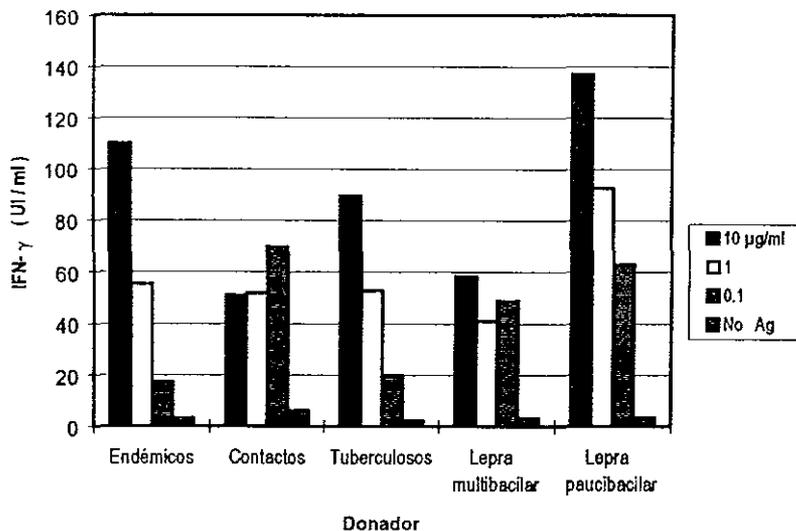
resultados sugieren que el tiempo de convivencia por períodos prolongados con un paciente leproso multibacilar es fuente de una posible infección, lo que favorece una tolerancia a los antígenos presentes en *M. leprae* y solo una limitada población de linfocitos es capaz de proliferar a bajas concentraciones del antígeno, tal como lo sugiere Hartskeerl *et al.* (44). La respuesta linfoproliferativa en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa es también baja en las tres concentraciones del antígeno, no se observan diferencias significativas en las tres concentraciones del sonicado, lo que indica que estos pacientes presentan una anergia a ciertos epitopes de *M. leprae* y *M. tuberculosis*, además de presentar reactividad cruzada en dichos epitopes. Por otro lado, en los pacientes con lepra multibacilar la respuesta linfoproliferativa fue similar a la encontrada en los pacientes con tuberculosis, estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Mehra *et al.* (19), en donde la estimulación celular es baja a los antígenos de *M. leprae* en pacientes multibacilares y sugiere una posible eliminación de linfocitos T antígeno-específicos. La explicación de la respuesta inmune celular baja es por el incremento de bacilos y complejos inmunes circulantes y tiene una relación inversa a la encontrada en los pacientes paucibacilares en donde los índices de estimulación superan las 100 unidades en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y se encuentra una ligera diferencia entre las dosis de 1 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de sonicado. En todos los grupos estudiados el control sin antígeno siempre resultó negativo.



Gráfica 1 Dosis-respuesta al sonicado (Mison) de *M. leprae* en las PBMC en los grupos estudiados

Con respecto a la producción de IFN- γ (gráfica 2), en los individuos sanos de áreas endémicas los máximos niveles se encontraron en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno, resultando el doble de producción de la citocina que en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y cinco veces más que en 0.1 $\mu\text{g/ml}$. En cuanto a la liberación de IFN- γ . La secreción en los contactos fué menor en comparación con los individuos endémicos, pero se necontraron niveles mayores en la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ del sonicado, observándose una similitud con los resultados de estimulación celular, aunque no se detectaron diferencias apreciables en la producción de la citocina en las dos concentraciones. En los pacientes con tuberculosis se encontró una elevada producción

de IFN- γ en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de Mlson, registrándose un decremento del 50% conforme se reduce la concentración del antígeno. Los pacientes con lepra multibacilar nuevamente mostraron una baja producción de la citocina en relación con los pacientes paucibacilares que secretaron más del doble en las concentraciones de 1 y especialmente en 10 $\mu\text{g/ml}$, ésto confirma la importancia del IFN- γ en la defensa inmune celular y eliminación del bacilo de Hansen al comienzo de la enfermedad. Los valores en los controles sin antígeno resultaron negativos en todos las concentraciones y en todos los grupos estudiados.

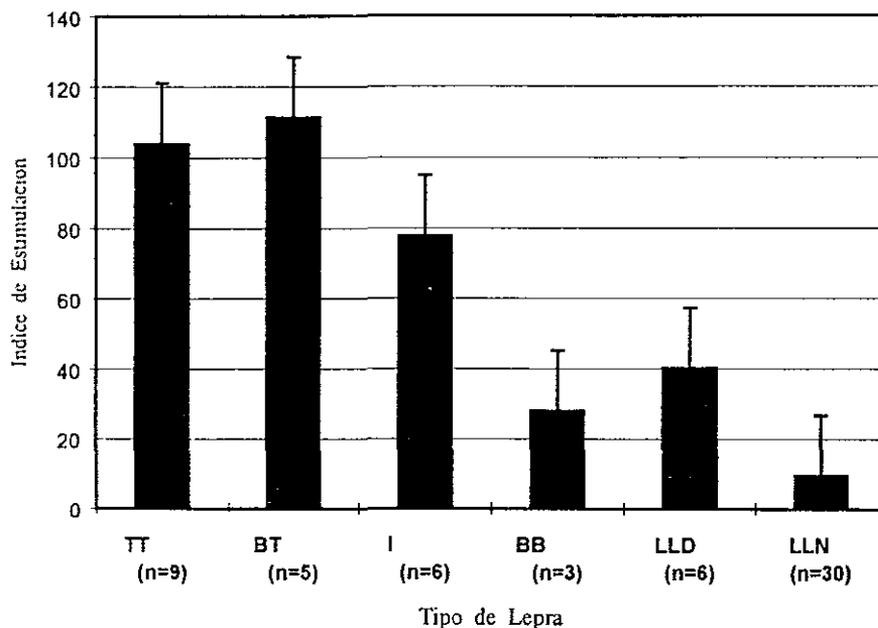


Gráfica 2 Producción de IFN- γ de las PBMC de los grupos estudiados en respuesta al sonicado (Mlson) de *M.leprae*

De acuerdo a la cinética de dosis-respuesta, la mejor concentración del sonicado para la estimulación celular y liberación de IFN- γ fué de 10 μ g/ml. De acuerdo a ésto, se realizó el análisis de los resultados para los pacientes con los diferentes tipos de lepra a esta concentración, así como para los restantes grupos estudiados.

En la gráfica 3 se encuentran los promedios y la desviación estándar de los índices de estimulación de los pacientes con lepra clasificados de acuerdo al espectro de la enfermedad. Las células mononucleares fueron estimuladas con 10 μ g/ml del sonicado de *M.leprae* (Mlson). Los máximos índices de estimulación se encontraron en el 85% de los pacientes con los tipos: tuberculoides (TT) y tuberculoide límite (BT), con 100 y 110 índices de estimulación respectivamente. Este aumento en la respuesta es confirmado por diversos estudios que indican que en los pacientes paucibacilares la inmunidad celular es capaz para destruir del bacilo dentro de las células infectadas. Los pacientes multibacilares y los indeterminados (I) mostraron una elevada respuesta en relación con los demás grupos con alto índice bacteriológico, los individuos con el tipo lepromatoso difuso (LLD) presentaron el 50% de la respuesta que se detectó en pacientes indeterminados. En los pacientes límite (BB), la estimulación fue menor a 30 y la respuesta en los lepromatosos nodulares (LLN), fue la más baja registrada en todos los multibacilares. Diversos estudios (11, 19), señalan que en la mayoría de los pacientes con alta carga bacilar dentro de los tejidos como lo son los lepromatosos nodulares, decrece la respuesta inmune celular contra diversos mitógenos y en especial a antígenos de *M.leprae*. Nuestros resultados confirman lo reportado por otros autores. Algunos investigadores han demostrado que la participación del HLA influye en el tipo de lepra que desarrollan diversos pacientes, el HLA presente en la célula es clave para el procesamiento y presentación de antígenos micobacterianos al linfocito T y poder desarrollar o no

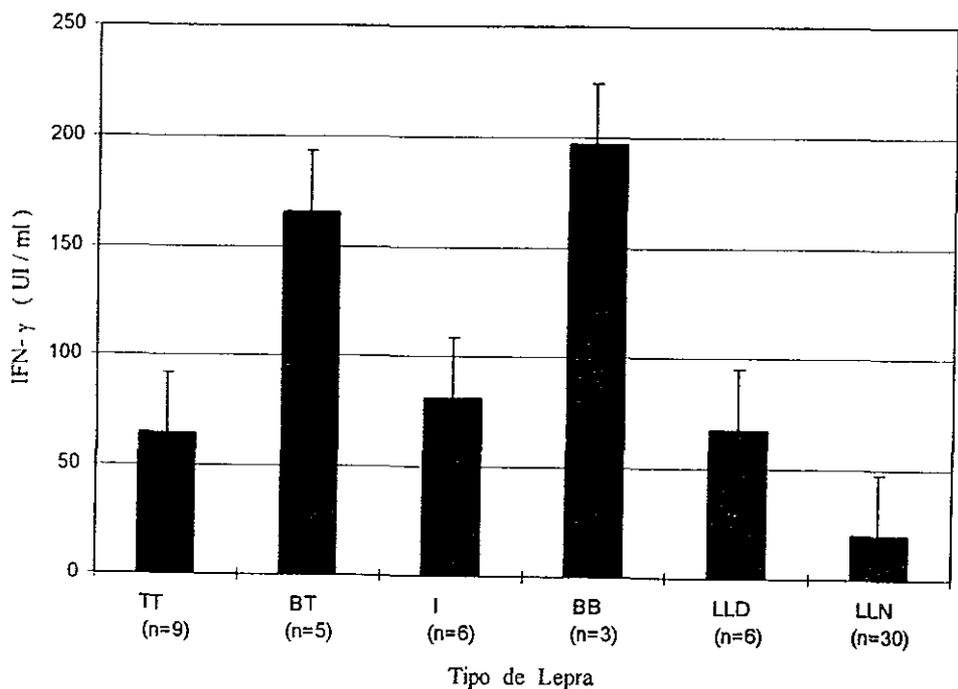
una respuesta inmune eficiente contra el bacilo de Hansen (13) (14).



Gráfica 3. Estimulación celular en pacientes con diferentes tipos de lepra con 10µg/ml del sonicado de *M. leprae*.

La producción de IFN- γ en los pacientes tuberculoides fué menor a 70, en cuanto a los limitrofos tuberculoides la producción fue mayor a 150 UI/ml, en uno de los pacientes con la forma BT llegó a los 400 UI/ml de citocina. Los pacientes multibacilares del tipo limitrofo (BB) mostraron un incremento en la liberación de IFN- γ y sus valores fueron los más altos que se registraron en todos los grupos estudiados, mientras que en los I y LLD los niveles son bajos sin mostrar una diferencia significativa en la producción de IFN- γ . En el tipo LLN nuevamente la estimulación no

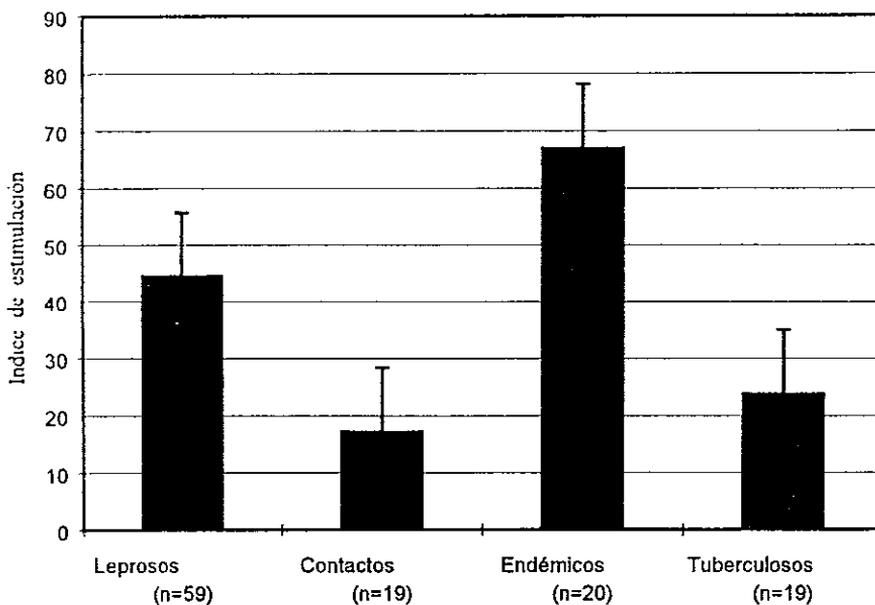
fue lo suficiente para producir un incremento en los niveles de IFN- γ (gráfica 4).



Gráfica 4 Producción de IFN- γ en pacientes con diversos tipos de lepra con 10 μ g/ml del sonicado de *M.leprae* (Mlson).

Al analizar los promedios y la desviación estándar por grupos (gráfica 5), se observa que la mayor estimulación celular se encuentra en los individuos sanos de zonas endémicas con un índice superior a 60. En los pacientes con lepra se presenta un máximo valor de 45, la explicación a este resultado se debe a que se encuentra una mayor población de pacientes con formas multibacilares que no son fuertes respondedores al sonicado y en algunos casos resultan ser anérgicos a este

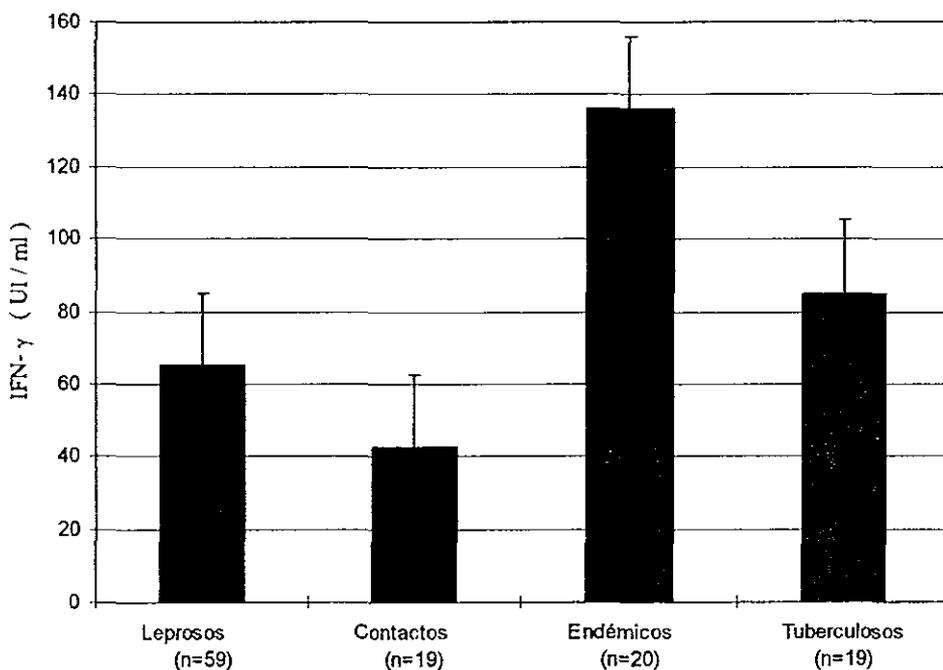
antígeno En los contactos intradomiciliarios al igual que en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa la linfoproliferación presenta diferencias significativas y es menor a 26. Esta puede explicarse por el tiempo de exposición con pacientes multibacilares que son fuente potencial de infección, y por la reactividad cruzada con epítopes del bacilo de *M.tuberculosis* presente en los pacientes tuberculosos.



Gráfica 5 Respuesta proliferativa por grupos con 10 µg/ml del sonicado (Mlson) de *M.leprae*

En la gráfica 6 se encuentran por grupos los promedios y la desviación estándar de la producción de IFN-γ. Se observa que al igual que en la gráfica anterior los individuos de zonas

endémicas muestran la mayor respuesta, con niveles que superan 130 UI/ml, los pacientes con tuberculosis pulmonar presentaron un incremento en la producción de IFN- γ , alcanzando valores de 80 UI/ml; los pacientes con lepra tienen niveles mayores de 50 y la secreción del IFN- γ en este grupo tiene un máximo de 400 UI/ml, mientras que los pacientes con lepra se detecta una menor producción, que resulta tener una diferencia significativa con relación a los individuos endémicos y los pacientes tuberculosos. Este decremento se explica porque al realizar los promedios se tomaron en cuenta los pacientes LLN que presentaron una baja respuesta al sonicado del *M.leprae* y esto reduce los valores obtenidos en el grupo.



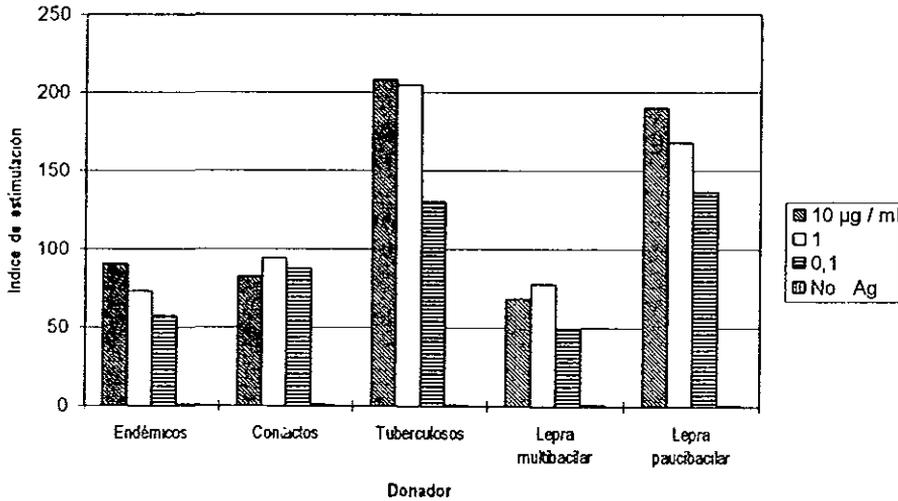
Gráfica 6 Producción de IFN- γ por grupos estudiados con 10 μ g/ml de Mison.

6.2 Respuesta inmune celular a la tuberculina (PPD).

Los resultados obtenidos en la cinética de dosis respuesta con diferentes concentraciones de tuberculina se encuentran en la gráfica 7, en donde se muestran los promedios obtenidos para cada grupo de individuos probados con diferentes concentraciones de tuberculina (PPD).

Los pacientes con tuberculosis pulmonar activa presentaron índices de estimulación celular mayores a 200 y no se encontraron diferencias entre las concentraciones de 10 y 1 µg/ml. En el grupo de individuos sanos de zonas endémicas la respuesta fué un 52% menor que en los pacientes con tuberculosis, en estos grupos se observó una mínima diferencia entre las tres concentraciones del antígeno, aunque la mejor respuesta proliferativa tuvo lugar con 10 µg/ml del PPD. Los contactos intradomiciliarios presentaron un índice promedio de 96 en las tres concentraciones y la estimulación fue tan baja como en la observada en los individuos de zonas endémicas. Los pacientes con lepra paucibacilar constituyen el segundo grupo de mayor respuesta proliferativa con índices altos en la concentración de 10 µg/ml, mientras que en los pacientes con lepra multibacilar se registraron los más bajos índices de estimulación de todos los grupos sin observarse una diferencias significativa entre las concentraciones de 10 y 1 µg/ml del antígeno. En el caso particular de los pacientes con lepra multibacilar, es necesario destacar la similitud de epitopes entre *M.leprae* y *M.tuberculosis*, lo cual se ve reflejado en la alta reactividad cruzada, razón por la cual los pacientes con la forma paucibacilar presentan una elevada proliferación y una baja respuesta en los pacientes multibacilares que son reactivos a diversos antígenos de micobacterias, tal como lo es el sonicado de *M.leprae* (Mlson) Es importante señalar que siempre se detectaron mayores índices de estimulación en los ensayos realizados con PPD que en los efectuados con el sonicado de *M.leprae*

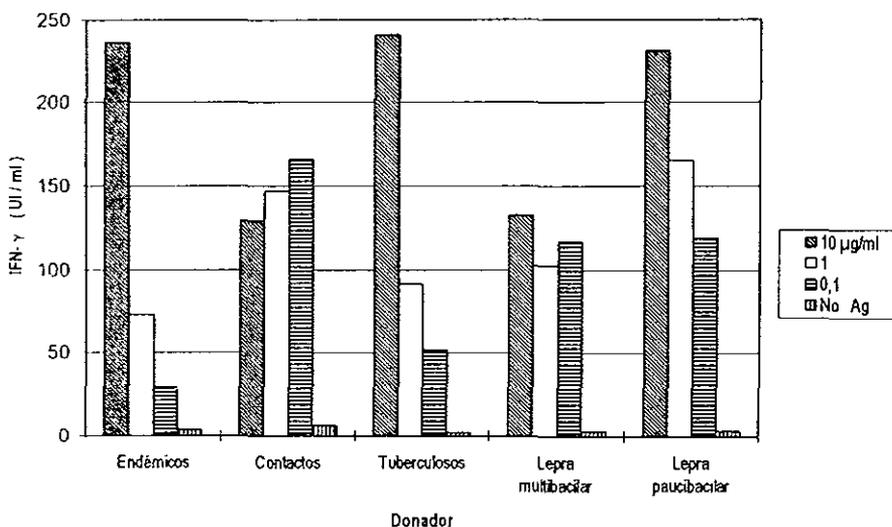
(Mlson). Todos los controles sin antígeno usados en cada grupo fueron negativos.



Gráfica 7 Linfoproliferación por grupos con diferentes concentraciones de tuberculina (PPD).

En la gráfica 8 se encuentran los promedios de cada grupo analizado, observándose que la mayor secreción de IFN- γ para la mayoría de los grupos estudiados se detectó en la concentración de 10µg/ml del PPD. Los individuos endémicos, pacientes con tuberculosis y lepra paucibacilar mostraron una elevada inducción de IFN- γ a la concentración de 10µg/ml y la diferencia con las otras dos concentraciones del antígeno fue significativa. En los individuos de zonas endémicas y pacientes con tuberculosis pulmonar activa la diferencia entre las diferentes dosis fue acentuada. Los contactos intradomiciliarios mostraron una mejor secreción de la citocina en la concentración de 0.1 µg/ml y la diferencia entre las otras dos dosis fue poco perceptible. Los pacientes multibacilares no

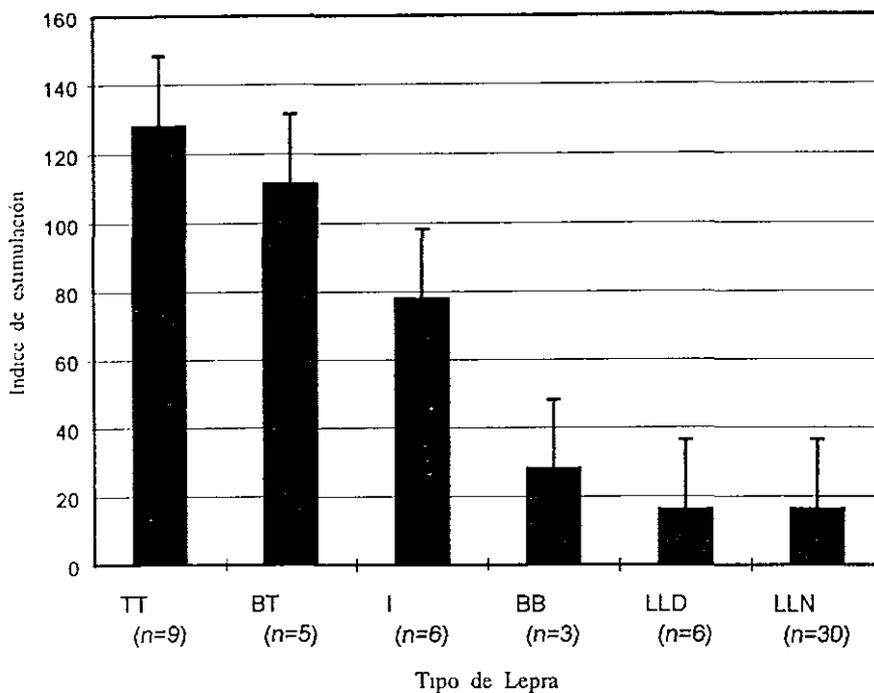
mostraron gran diferencia en las tres concentraciones del antígeno. Se observó en la linfoproliferación de los controles sin antígeno un resultado negativo en la producción de IFN- γ .



Gráfica 8 Producción de IFN- γ con diferentes concentraciones de tuberculina (PPD) por grupos

Los promedios y la desviación estándar en la respuesta celular a la tuberculina a la concentración de 10 µg/ml usada para estimular las células de los pacientes con diversos tipos de

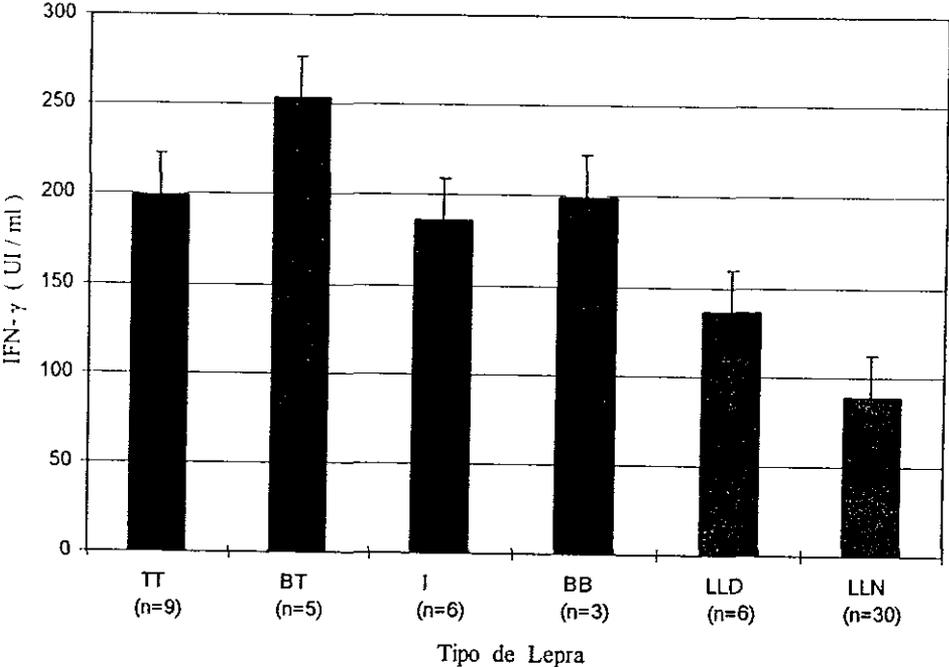
lepra se presentan en la en la gráfica 9. Los pacientes con lepra tuberculoide (TT) registraron altos índices de estimulación. En los pacientes con la forma limítrofe tuberculoide (BT) la respuesta fue también alta con índices de estimulación de 110; en los pacientes indeterminados se detectaron índices de estimulación menores en un 30%, a los registrados en los tuberculoides y en los limítrofes (BB) Solo dos pacientes superaron valores de 50. Por otro, lado se observó una baja estimulación celular en los multibacilares LLN y LLD en quienes los índices de estimulación no llegaron a superar el valor de 18; estos resultados sugieren y corroboran que en los pacientes multibacilares la respuesta inmune celular se encuentra disminuida y no son capaces de activar de manera eficiente la proliferación de linfocitos T ante un estímulo antigénico de mitógenos y de otros antígenos micobacterianos Este fenómeno explica la incapacidad para destruir al bacilo en los casos multibacilares (19, 37, 60).



Gráfica 9 Estimulación con 10µg/ml de PPD en pacientes con lepra.

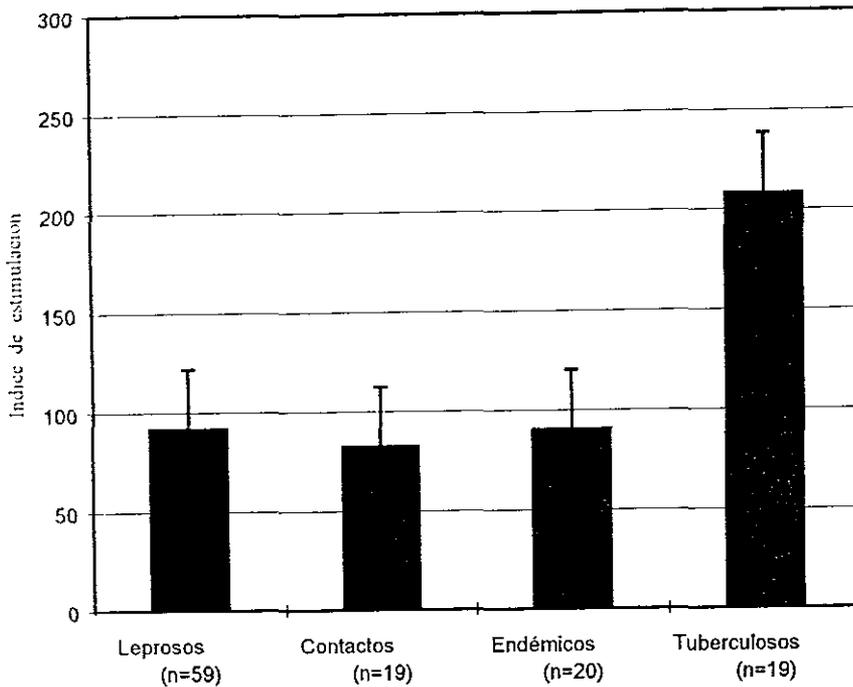
La producción de IFN- γ nuevamente es elevada en la mayoría de los pacientes paucibacilares TT y BT que mostraron niveles entre 200 y 250 UI/ml. En los pacientes indeterminados (I) y en los limitrofes (BB) los niveles de la citocina presentaron poca disparidad. La diferencia entre estas es de 40 UI/ml con la encontrada en los pacientes paucibacilares TT y BT. Estos resultados en la producción de IFN- γ en pacientes multibacilares I y BB puede estar relacionada a la duración del tratamiento, ya que estos pacientes multibacilares recibieron un tratamiento anti-leproso por varios años y es probable que este factor favorezca la recuperación del sistema inmune celular de los casos

con lepra indeterminada y limítrofe. En los pacientes multibacilares LLD y LLN, los niveles de IFN- γ fueron de 130 y 90 respectivamente, aunque resultaron los más bajos registrados en todos los grupos. Una probable explicación de esta respuesta como se mencionó anteriormente es el periodo prolongado del tratamiento de algunos pacientes multibacilares (gráfica 10).



Gráfica 10 Producción de IFN- γ con 10 μ g/ml de PPD en los diferentes grupos analizados.

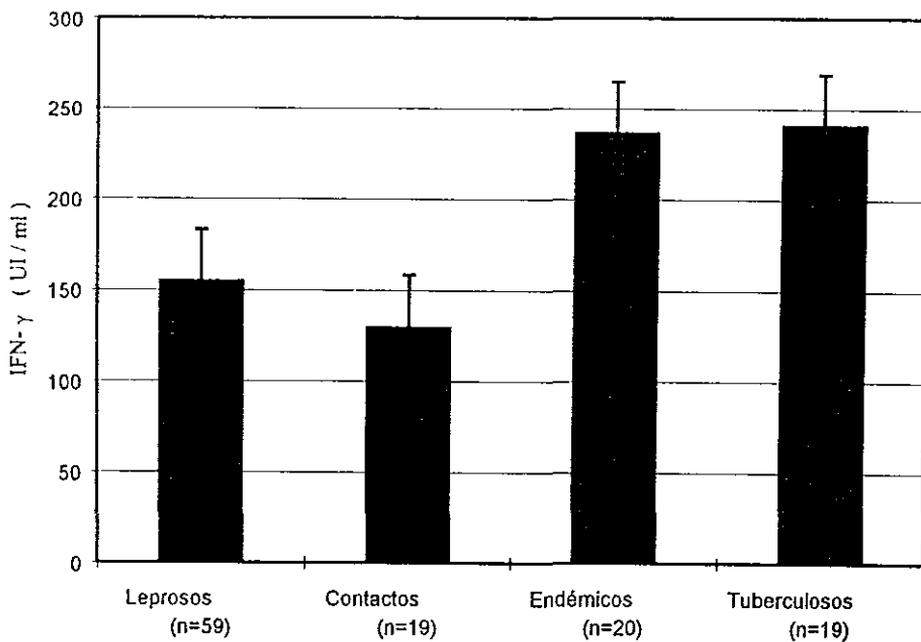
En la gráfica 11 se muestra la respuesta proliferativa por grupos. Los pacientes con tuberculosis pulmonar activa presentaron el índice de estimulación de 210; esta respuesta es más del 100% mayor en relación con los otros grupos analizados con la misma concentración de 10 µg/ml. Los pacientes con lepra forman el segundo grupo con mayor índice de estimulación celular con un valor promedio de 90. Todos los pacientes paucibacilares y la mayoría de los multibacilares fueron altos respondedores al PPD. Los individuos de zonas endémicas presentaron una respuesta similar y sin alguna diferencia significativa a la que se encontró en los pacientes con lepra. La correlación en la estimulación celular es mayor en los pacientes del tipo paucibacilar. Los contactos intradomiciliarios no tienen una diferencia importante en relación con los otros grupos. Los resultados entre los pacientes con lepra y tuberculosis sugieren la similitud entre ciertos epitopes en la vacuna del BCG y los presentes en el sonicado (Mison) de *M leprae*, lo que tiene como consecuencia la elevada reactividad cruzada en la respuesta proliferativa de linfocitos T de los pacientes con lepra y tuberculosis, tal como lo indica Convit *et al.* (46), además explica la amplia variación en la respuesta celular. Por otra parte esta similitud en la respuesta de los individuos de zonas endémicas con los grupos de pacientes con lepra y contactos, sugiere que los individuos de zonas endémicas están en un contacto continuo con antígenos micobacterianos, posiblemente de *M tuberculosis* durante alguna etapa de su vida, como los indican los estudios realizados por Bretscher *et al.* (84)



Gráfica 11 Estimulación celular con 10µg/ml de PPD por grupos

En relación con la producción de IFN- γ (gráfica 12) el PPD resultó ser un excelente inductor de IFN- γ para todos los grupos estudiados, especialmente en los individuos de zonas endémicas y pacientes con tuberculosis pulmonar activa, ya que éstos presentaron una similar producción de IFN- γ y los mayores valores con relación a los otros grupos. Estos resultados confirman que los individuos sanos de zonas endémicas han estado en contacto con antígenos micobacterianos durante alguna etapa de su vida. Los pacientes con lepra presentaron 80 UI/ml menos que los pacientes con tuberculosis y los individuos de zonas endémicas. Es importante indicar que todos los pacientes con

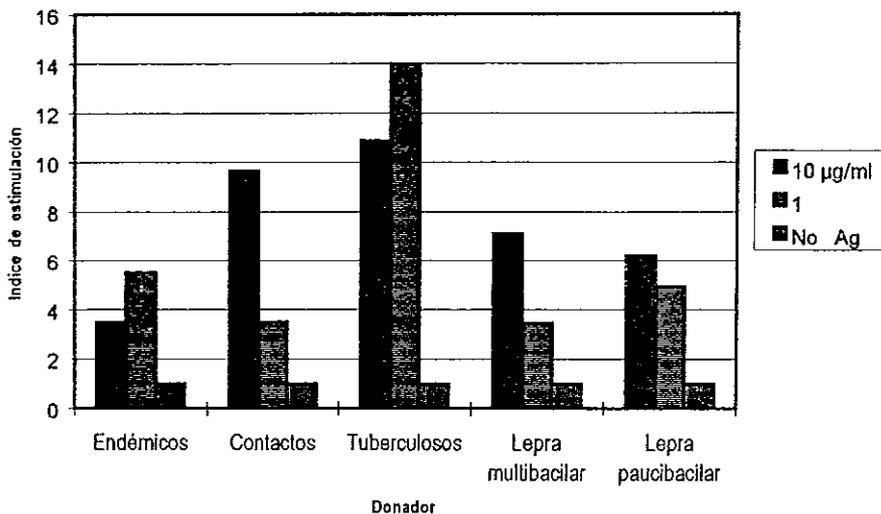
lepra fueron PPD positivos en los ensayos de proliferación celular y secreción de IFN- γ , en especial todos los paucibacilares, indeterminados y límites que mostraron los mayores valores. La producción de IFN- γ fué muy similar a la encontrada en los pacientes con lepra y no se detectó alguna diferencia en este grupo



Gráfica 12 Secreción de IFN- γ con 10 μ g/ml de PPD en los pacientes con lepra

6.3 Respuesta inmune celular al antígeno de 10 kDa de *M.leprae*.

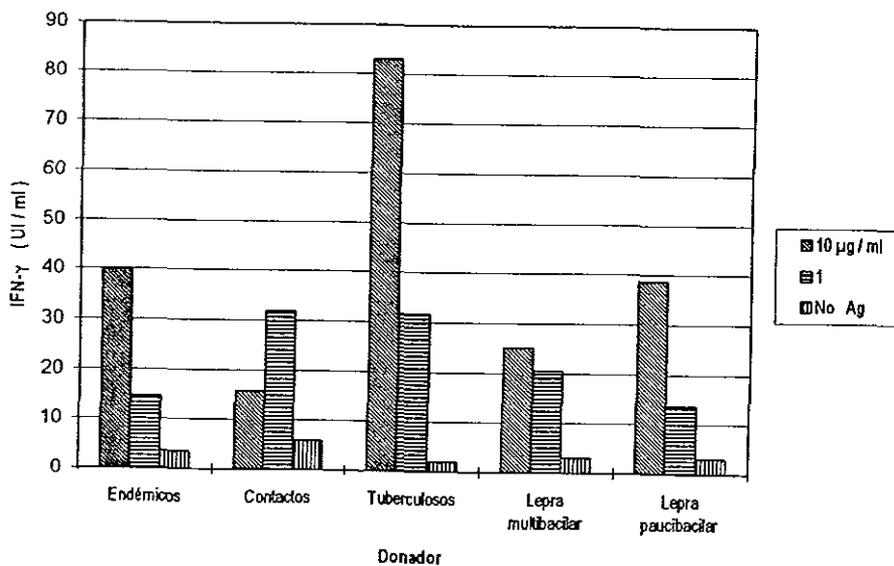
Los promedios obtenidos en la estimulación celular con el antígeno de *M.leprae* de 10 kDa se muestran en la gráfica 13. Se puede notar que la mejor concentración para inducir proliferación celular fue la de 10 µg/ml al igual que en el sonicado de *M.leprae* (Mlson) y la tuberculina (PPD). Es importante señalar que los índices de estimulación obtenidos con el antígeno de 10 kDa de *M.leprae* son bajos y el grupo que logró tener los mayores valores a una concentración de 1 µg/ml, fué el de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Esta respuesta se debe a la gran similitud del antígeno de 10 kDa de *M.leprae* con otros péptidos descritos para *M.tuberculosis* como lo señalan los estudios realizados por McFadden *et al.*(8). Los contactos intradomiciliarios tienen un fuerte reconocimiento celular por este antígeno puesto que muestran índices de estimulación parecidos a los encontrados en los pacientes con tuberculosis en la concentración de 10 µg/ml. En los individuos de zonas endémicas la proliferación es baja y solo en la dosis de 1 µg/ml se logró tener un índice de estimulación mayor de 5. Los pacientes con lepra paucibacilar mostraron una respuesta máxima de 6 índices de estimulación y en los multibacilares la linfoproliferación fue de 7; en ambos casos la activación fue del 50% menor a la registrada en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Estos resultados indican que el antígeno de 10 kDa de *M.leprae* no es relevante para la activación de linfocitos T de pacientes con Hansen y de individuos sanos de zonas endémicas a la enfermedad.



Gráfica 13 Dosis respuesta al antígeno recombinante de 10 kDa de *M.leprae* en PBMC por grupos.

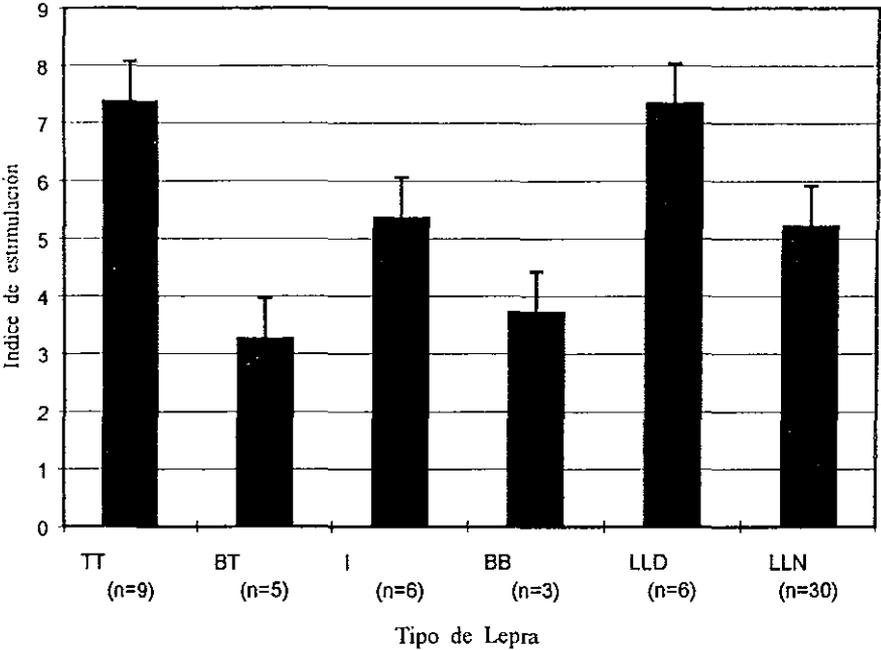
Los promedios de la producción de IFN- γ por grupos que fueron obtenidos durante la estimulación con el antígeno de 10 kDa de *M.leprae* se presentan en la gráfica 13. Los pacientes con tuberculosis mostraron nuevamente valores altos en la producción de esta citocina. Los individuos de zonas endémicas y los pacientes con lepra paucibacilar presentan similitud en la inducción de IFN- γ al ser estimulados con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 10 kDa de *M.leprae*, pero no es la concentración adecuada para una producción eficiente. Se encontraron valores mayores a 30 UI/ml de IFN- γ en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno, cuando las células de los contactos intradomiciliares se estimularon. En los pacientes con tuberculosis, lepra paucibacilar y los controles la secreción de IFN- γ resultó ser mejor a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, a diferencia de la

proliferación celular que resultó ser adecuada con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 10 kDa de *M.leprae*. En los pacientes con lepra multibacilar, la respuesta celular no difiere significativamente de la producción de IFN- γ , ya que la mejor dosis inductora fue también de 10 $\mu\text{g/ml}$, pero los valores obtenidos en la liberación de IFN- γ en las células de los pacientes paucibacilares fueron más bajos con relación a los encontrados en los otros grupos. En base a estudios realizados por Lee *et al* (66) se sugiere que este antígeno de 10 kDa de *M.leprae* no es un inductor para que la respuesta inmune celular sea eficiente en los pacientes tuberculoides. En general los valores obtenidos con la estimulación con este antígeno de 10 kDa, son más bajos que los registrados en los ensayos del sonicado de *M.leprae* y la tuberculina (PPD).



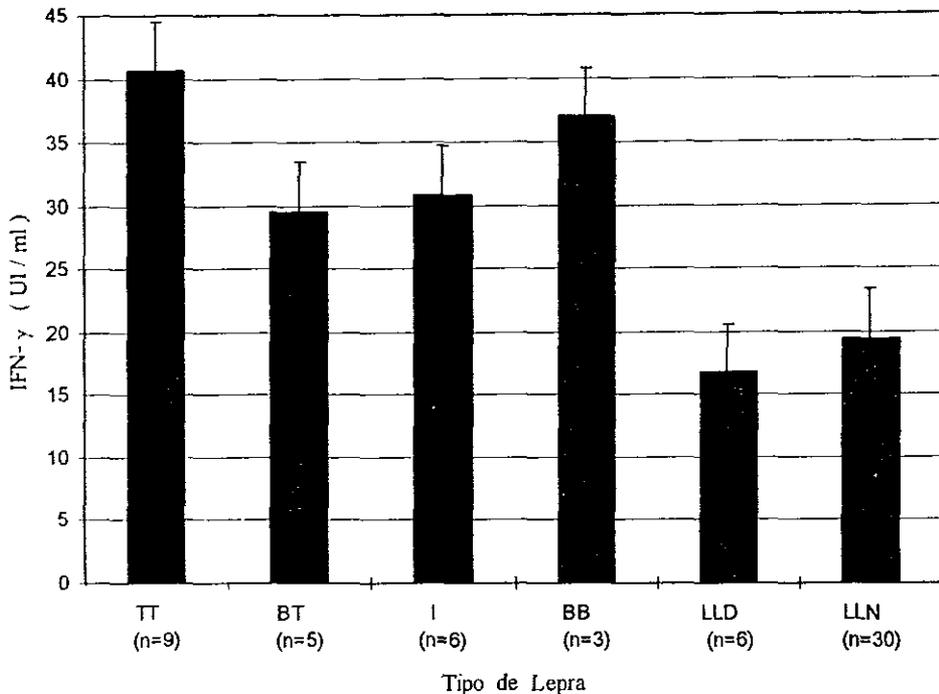
Gráfica 14 Producción de IFN- γ en PBMC estimulados con diferentes concentraciones del antígeno de 10 kDa de *M.leprae*.

Al analizar la gráfica 15, se observa baja estimulación celular en todos los pacientes con lepra, ningún tipo de lepra llegó a superar el índice de estimulación de 8. Los pacientes con las formas tuberculoide (TT) y los lepromatosos difusos (LLD), fueron los más altos pero no muestran entre éstos una diferencia significativa. En los pacientes indeterminados (I) y lepromatoso nodular (LLN) la respuesta fue muy similar y tampoco se encuentra una diferencia importante. Solo los grupos limitrofe tuberculoide (BT) y limitrofe (BB) mostraron una menor respuesta celular al antígeno. La elevada respuesta de los pacientes LLN puede explicarse por la duración de varios años del tratamiento a que están sujetos estos pacientes multibacilares



Gráfica 15 Proliferación celular con 10µg/ml del antígeno de 10 kDa de *M. leprae* en PBMC de diferentes grupos de pacientes con lepra.

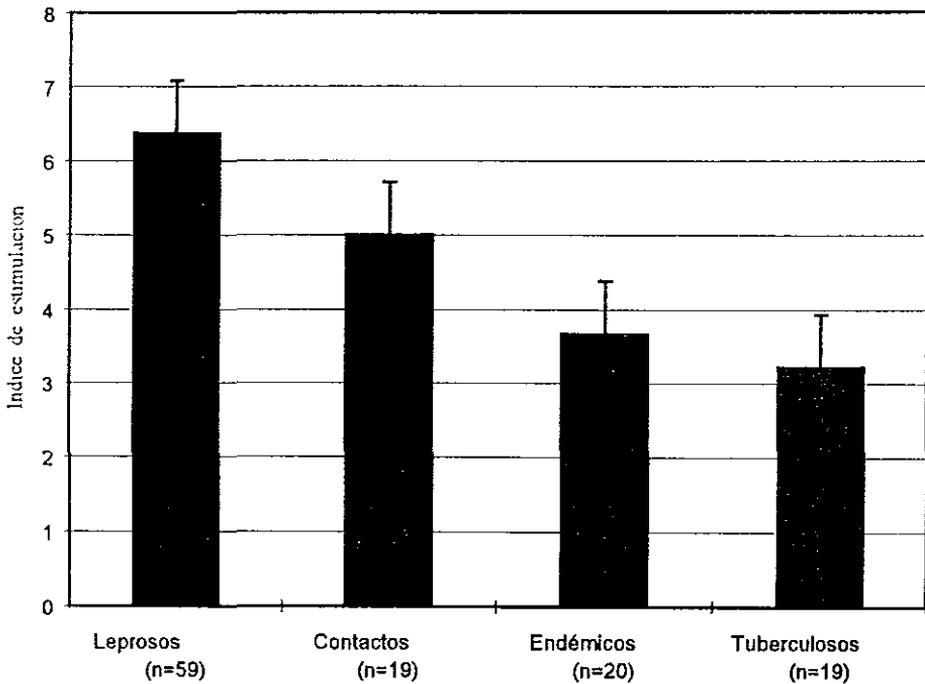
En la gráfica 16 se ilustran los promedios y la desviación estándar de la producción de IFN- γ de los pacientes con lepra. Los pacientes paucibacilares (TT), (BT) y los multibacilares (I) y (BB) fueron los grupos con mayor respuesta, la secreción entre los BT e I fue muy similar y las diferencias no son significativas, mientras que en los TT y BB muestran una diferencia de 7 UI/ml aunque las diferencias fueron contrastantes. En los pacientes lepromatosos difusos (LLD) y nodulares (LLN) la secreción promedio fue muy baja. Diversos autores (58, 66, 80), mencionan la participación de este péptido en procesos autoinmunes y lo involucran en la posible inducción de citocinas del tipo Th2, es probable que ésta sea la razón para observar los más bajos índices de estimulación celular y una escasa producción de IFN- γ . Esto implica que este antígeno no sea capaz de activar una adecuada respuesta inmune celular en pacientes multibacilares.



Gráfica 16. Producción de IFN- γ en PBMC estimuladas con 10 μ g/ml del antígeno de 10 kDa de *M. leprae* en pacientes con diversos tipos de lepra.

Al analizar los índices de estimulación en los diferentes tipos de lepra (gráfica 17), una vez más se confirma la escasa respuesta celular hacia el antígeno de 10 kDa de *M. leprae*. Los pacientes con lepra son el grupo que presenta la mayor respuesta hacia este antígeno mostrando un índice de 6.3. Los contactos intradomiciliarios son el segundo grupo en mostrar reconocimiento al antígeno y la diferencia es significativa al compararlo con los resultados observados en los pacientes con lepra. En los individuos sanos de zonas endémicas se observó un índice de estimulación de 3.8, siendo la estimulación celular similar a la encontrada en los pacientes con tuberculosis; *no se mostraron*

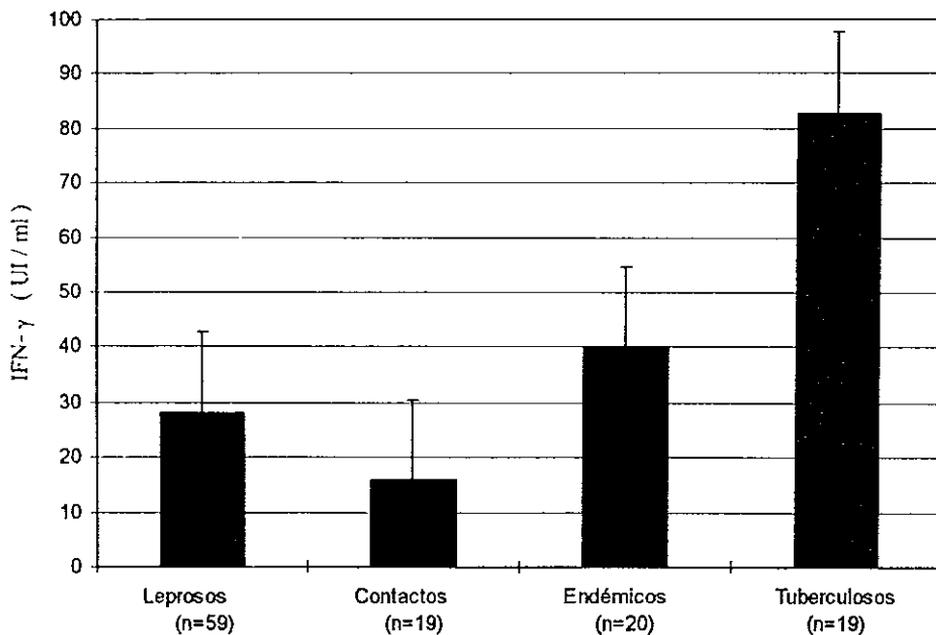
diferencias importantes en la actividad linfoproliferativa al antígeno de 10 kDa. Algunos estudios señalan que la reactividad cruzada presente en este antígeno de 10 kDa de *M.leprae* se debe a la elevada homología con otros péptidos descritos para el bacilo de *M.tuberculosis* (81).



Gráfica 17 Proliferación en los diferentes grupos estimulados con 10µg/ml del antígeno de 10 kDa de *M.leprae*.

La producción de IFN-γ por PBMC bajo la estimulación con el antígeno de 10 kDa de *M.leprae* en los diferentes grupos puede observarse en la gráfica 18. Existe una notable diferencia con los niveles de proliferación celular señalada en la gráfica anterior. Los pacientes con lepra y en

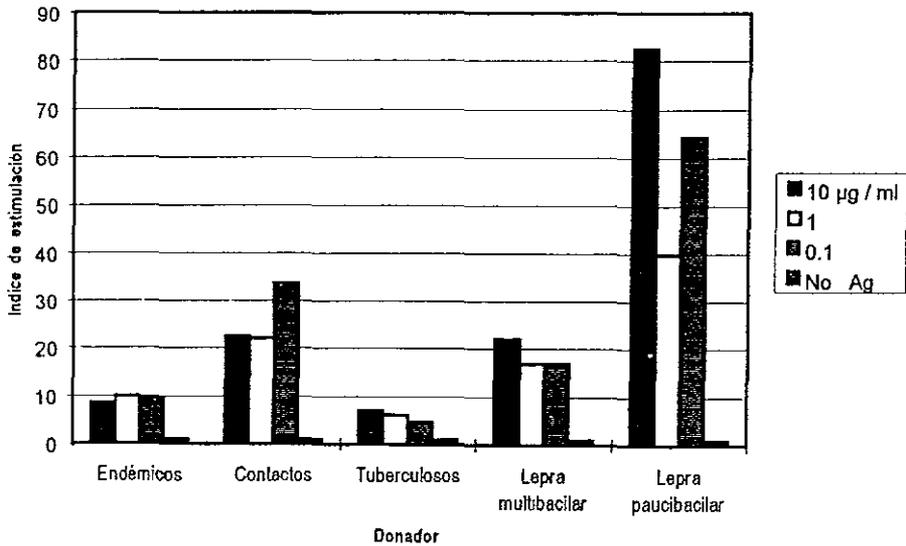
el grupo de los contactos intradomiciliarios se presenta una escasa secreción de IFN- γ , en relación con los pacientes con tuberculosis y los individuos de zonas endémicas. El elevado reconocimiento en los pacientes con tuberculosis es debido a la homología de la proteína con otras presentes en el bacilo de *M.tuberculosis*, tal como lo señalan diversos autores.



Gráfica 18 Secreción de IFN- γ en PBMC de pacientes con lepra estimuladas con 10 μ g/ml del antígeno de 10 kDa de *M.leprae*

6.4 Respuesta inmune celular al antígeno de 45 kDa de *M.leprae*.

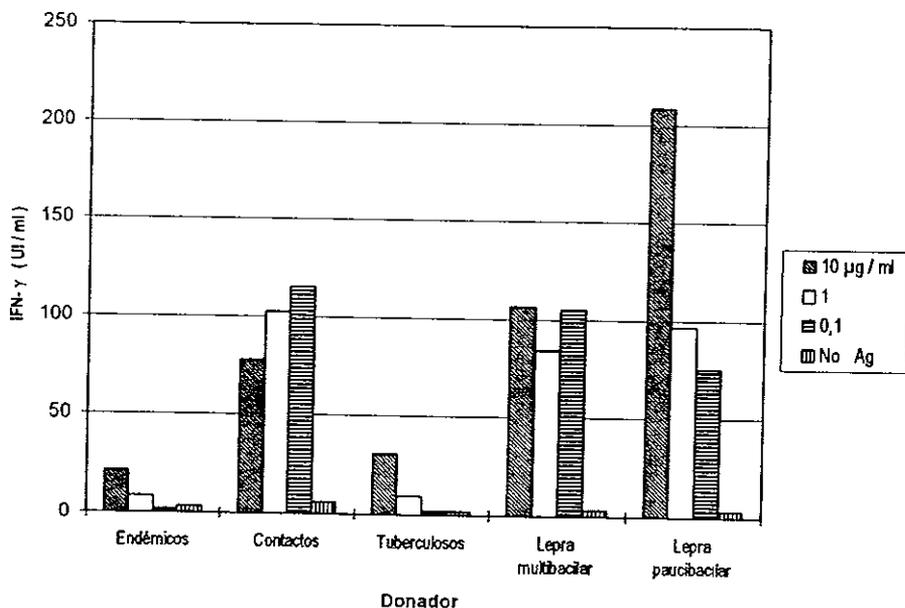
En la gráfica 19 se muestran los promedios de los índices de estimulación obtenidos en la cinética de dosis-respuesta para PBMC de los diferentes grupos estimulados con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*. La respuesta inmune celular en los individuos endémicos fué similar a la reportada en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa; en ambos grupos se registraron valores menores a 10 índices de estimulación y no se observaron diferencias significativas entre las tres diferentes concentraciones del antígeno de 45 kDa. La proliferación en los contactos intradomiciliarios fué del doble a la presentada en los individuos de zonas endémicas y en los pacientes con tuberculosis. El mejor nivel de estimulación celular se obtuvo con la concentración de 1 µg/ml, mientras que no se observaron diferencias entre las otras dos concentraciones del antígeno. Estos resultados sugieren que el antígeno es reconocido por las células de pacientes con diversos tipos de lepra y por personas que están en contacto estrecho con los pacientes con lepra multibacilar. La respuesta de proliferación celular desarrollada en los pacientes con lepra multibacilar es ligeramente menor a la encontrada en los contactos, no habiendo diferencias significativas entre las concentraciones de 1 y 0.1 µg/ml, pero si hay una adecuada proliferación en la concentración de 10 µg/ml. Los controles sin antígeno resultaron negativos en todos los ensayos de dosis-respuesta realizados con el antígeno de 45 kDa.



Gráfica 19. Dosis respuesta de las PBMC de los diferentes grupos analizados con el antígeno recombinante de 45 kDa de *M.leprae*.

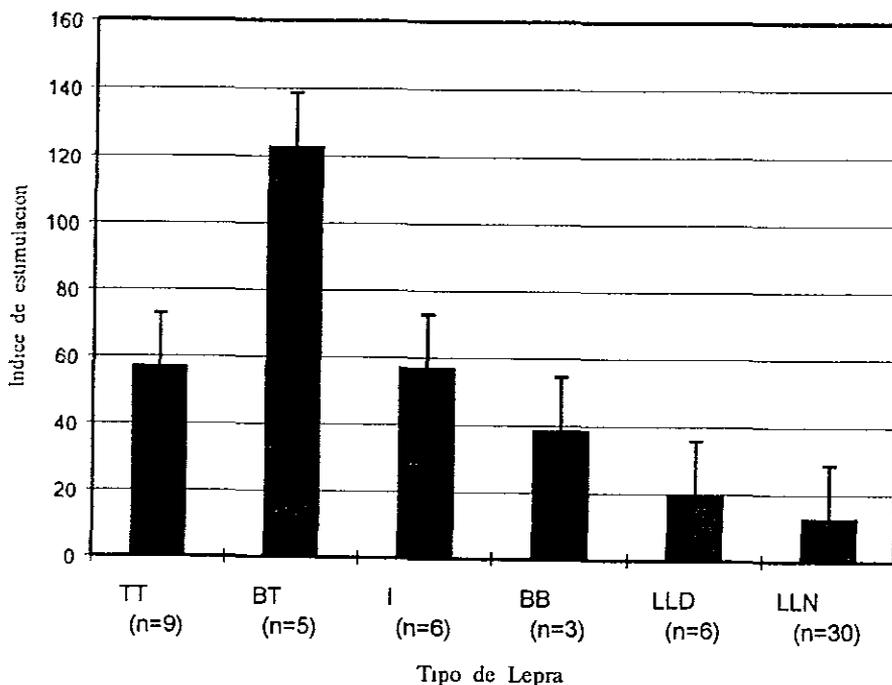
Los promedios de la secreción de IFN- γ producida durante los ensayos de proliferación celular con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae* se muestra en la gráfica 20. Se observa que los individuos sanos de zonas endémicas no llegan a tener una estimulación suficiente en ninguna de las tres concentraciones como para producir cantidades significativas de IFN- γ . Tampoco se encuentra una producción de IFN- γ significativa en la respuesta celular de los individuos de zonas endémicas ni en los pacientes con tuberculosis. La mayor respuesta para ambos casos se encontró en la concentración de 10 μ g/ml. En los contactos intradomiciliarios, la secreción de IFN- γ fué alta en la concentración de 0.1 μ g/ml y decrece conforme la dosis del antígeno se incrementa. En los

pacientes con lepra multibacilar la producción de IFN- γ no mostró diferencia entre las tres concentraciones. Los pacientes paucibacilares presentaron una clara dosis-respuesta a las diferentes concentraciones utilizadas, siendo la máxima liberación de IFN- γ en 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 45 kDa de *M.leprae*. Esta respuesta resultó ser el doble de la encontrada en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 100% mayor a la respuesta máxima registrada en los demás grupos estudiados. Los resultados obtenidos se encuentran en estrecha relación con la proliferación celular representada en la gráfica 19.



Gráfica 20. Producción de IFN- γ en los diferentes grupos estudiados durante el estímulo celular con el antígeno recombinante de 45 kDa de *M.leprae*.

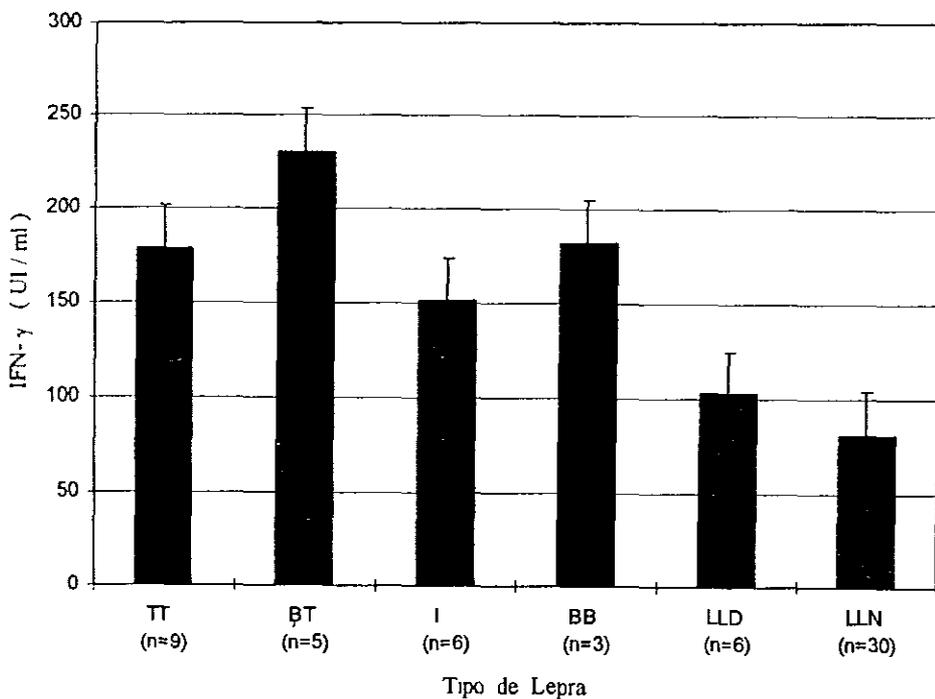
Los promedios de los índices de proliferación desarrollada en los pacientes con diferentes tipos de lepra se presentan en la gráfica 21. Los mayores índices de estimulación celular se detectaron en los pacientes *límitrofes tuberculoides (BT)*, la *linfoproliferación* resultó ser más del doble que la registrada en cualquier otro grupo. Los pacientes tuberculoides e indeterminados respondieron de igual forma y no presentaron diferencias significativas. Se encontró que la respuesta celular va decreciendo a medida que la enfermedad evoluciona al polo *lepromatoso*. Una posible explicación para esta respuesta es sugerida por Mehra *et al.* (19) y Tyagi *et al.* (37), que postulan que los epitopes de *M.leprae* y los complejos inmunes circulantes son capaces de inducir una ausencia de la activación de linfocitos T antígeno específicos por mecanismos de tolerancia en los hospederos que presentan índices bacteriológicos altos, tales como lo son pacientes con lepra lepromatosa nodular y difusa (LLN y LLD).



Gráfica 21. Proliferación con 10 µg/ml del antígeno de 45 kDa de *M. leprae* en pacientes con lepra

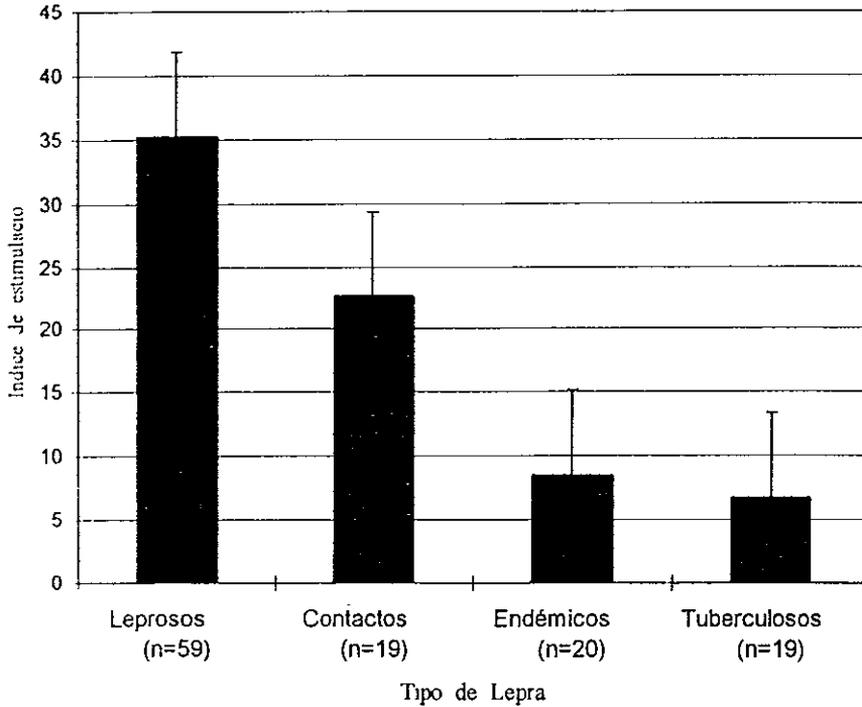
Los promedios de secreción de IFN-γ producidos por los pacientes con lepra se presentan en la gráfica 22. Los pacientes que logran registrar la mayor producción de IFN-γ son los pacientes paucibacilares (TT y BT). Sin embargo, los pacientes multibacilares con las formas indeterminada (I) y limitrofe (BB) presentaron una producción considerable de IFN-γ, similar a la registrada en los pacientes TT y BT. Diversos autores (34, 43) señalan que los pacientes multibacilares sujetos a esquemas terapéuticos multi-medicamentosos a base de sulfona acompañada de rifampicina y clofazimina, o en los pacientes que son tratados por medio de la inmunoterapia con IL-2

recombinante presentan un incremento en la activación eficaz de la respuesta inmune celular y en la destrucción intracelular del bacilo de Hansen. Los pacientes con la forma lepromatosa nodular (LLN) y difusa (LLD) registraron escasa liberación de IFN- γ , a excepción de dos individuos LLN, que por estar en tratamiento por varios años que mostraron una producción de 400 UI/ml.



Gráfica 22-. Liberación de IFN- γ en PBMC de pacientes con diversos tipos de lepra estimuladas con 10 μ g/ml del antígeno de 45 kDa de *M.leprae*.

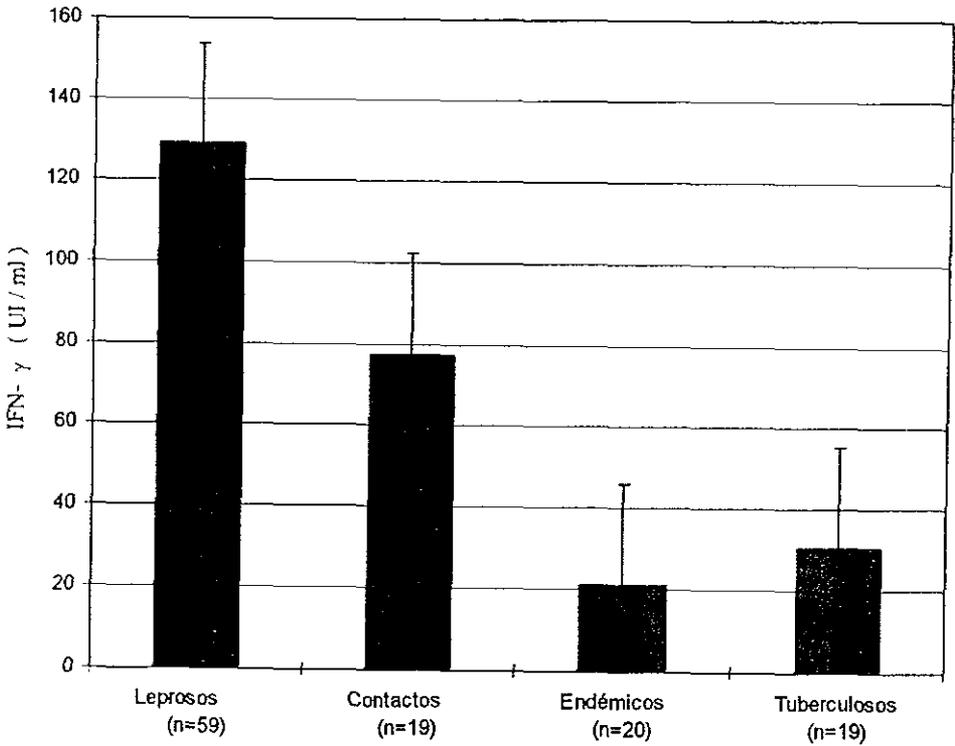
Los promedios de la proliferación celular por grupos se encuentran representados en la gráfica 23. Los pacientes con lepra muestran un fuerte reconocimiento al antígeno de 45 kDa de *M. leprae*. La respuesta es tres veces mayor en comparación con los pacientes con tuberculosis y los individuos sanos de zonas endémicas. Estos resultados tienen una estrecha relación con los encontrados durante la cinética de dosis-respuesta (gráfica 19). Los contactos intradomiciliarios tienen también una elevada respuesta proliferativa, esto sugiere que el antígeno de 45 kDa de *M. leprae* puede ser capaz de ser reconocido e inducir una respuesta inmune celular en individuos que no tienen la enfermedad, pero que se encuentran en contacto estrecho con los pacientes multibacilares que son una fuente potencial de infección. Los individuos de zonas endémicas y pacientes con tuberculosis pulmonar activa no superan un índice de estimulación de 9. Los índices de estimulación obtenidos son altos en relación a los obtenidos en los ensayos con tuberculina y el sonicado, además sugieren que el antígeno de 45 kDa es reconocido principalmente por pacientes con lepra paucibacilares del tipo TT y BT, pero de acuerdo con los datos un gran porcentaje de pacientes I y BB presentan una estimulación celular y secreción de IFN- γ .



Gráfica 23. Linfoproliferación con 10 µg/ml del antígeno de 45 kDa de *M. leprae* con células mononucleares de los diferentes grupos estudiados

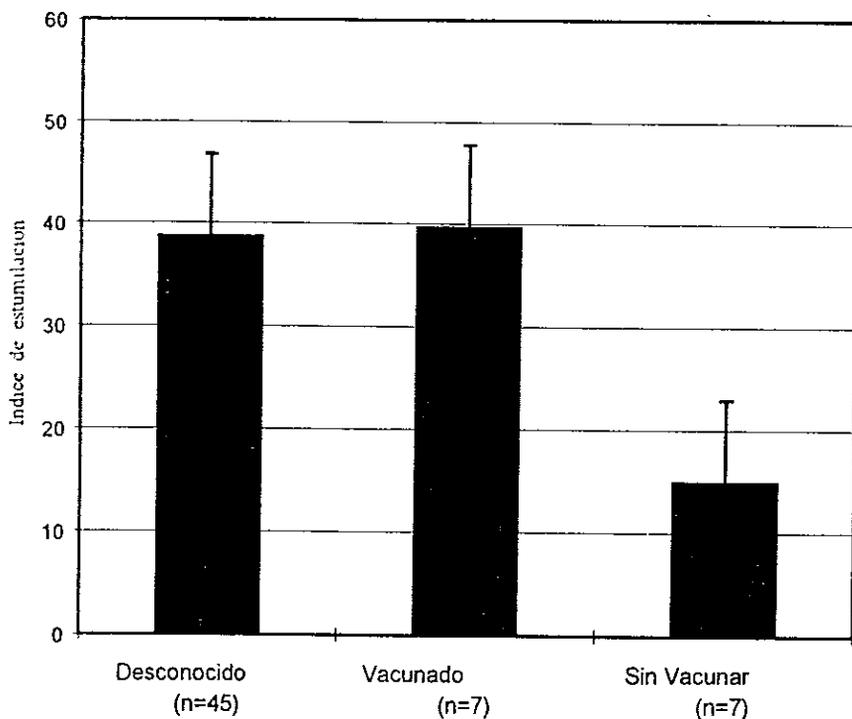
En la gráfica 24 se presentan los promedios de la secreción de IFN-γ durante el estímulo antigénico con la proteína de 45 kDa de *M. leprae*. Se puede observar una estrecha relación entre la producción de IFN-γ y la proliferación celular (gráfica 23); nuevamente, los pacientes con lepra y los contactos intradomiciliarios mostraron los valores más altos en relación con los otros grupos estudiados. Los pacientes con tuberculosis presentaron un ligero incremento en la producción de IFN-γ y en general una mayor respuesta con relación a la encontrada durante la proliferación celular

Es importante mencionar que los pacientes que fueron bajos respondedores al sonicado del bacilo (Mison), tuvieron una eficiente estimulación celular y liberación de IFN- γ al ensayarlos con 10 μ g/ml del antígeno de 45 kDa de *M.leprae*. Por otro lado, al revisar las gráficas 23 y 24 se puede sugerir que hay un bajo reconocimiento por parte de las células de los pacientes con tuberculosis en fase aguda



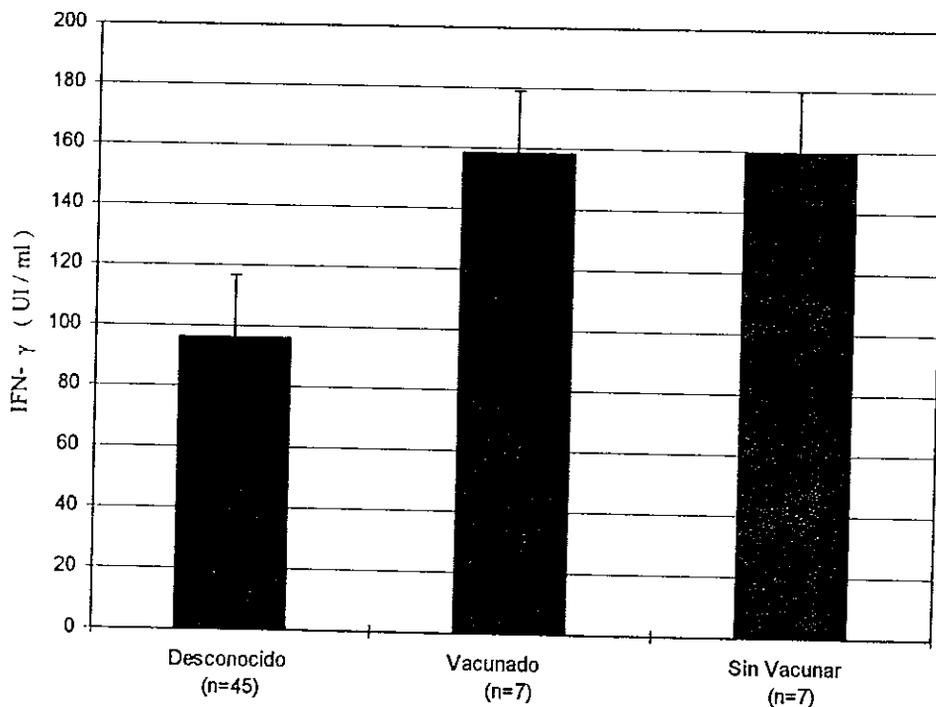
Gráfica 24. Secreción de IFN- γ con 10 μ g/ml del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en los diferentes grupos.

De los 59 pacientes estudiados 45 no presentaban la cicatriz de vacunación con BCG, 7 reconocieron no haber sido vacunados y solo en 7 se presentó la típica cicatriz de la vacuna a la tuberculosis. En la gráfica 25 están los promedios de los ensayos de proliferación celular de los pacientes con lepra vacunados o no con BCG. Se observa que no hay diferencias entre los individuos vacunados y aquellos en los que se desconoce o que carecen de la cicatriz de vacunación, ambos grupos presentan altos índices de estimulación que van entre 37 y 40 respectivamente. Los pacientes que reconocieron no ser vacunados con BCG mostraron escasa proliferación celular con relación a los otros dos grupos.



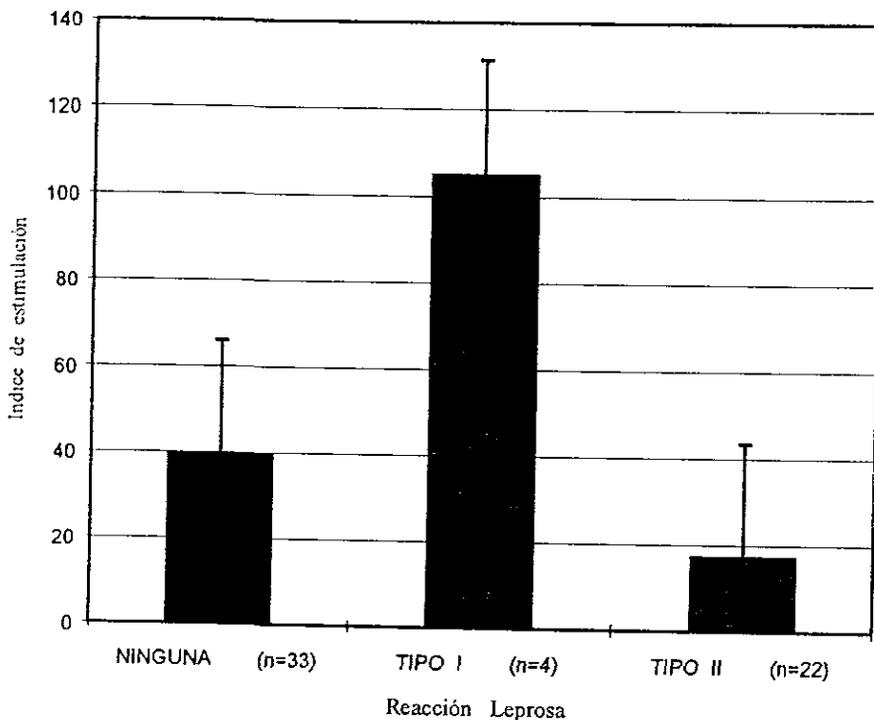
Gráfica 25. Proliferación celular con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en pacientes con lepra vacunados o no con BCG.

La producción de IFN- γ en las células mononucleares de los pacientes leproso vacunados o no con BCG se encuentra en la gráfica 26. Los resultados obtenidos en la producción de IFN- γ contrastan con los datos registrados en la proliferación celular, ya que los pacientes que no fueron vacunados tienen una elevada producción de IFN- γ , sin tener ninguna diferencia con el grupo de pacientes vacunados, mientras que en los individuos sin antecedentes de la vacunación la secreción de IFN- γ es 60 % menor a la registrada en los otros dos grupos. De acuerdo a los resultados descritos en las gráficas 25 y 26 el antígeno de 45 kDa induce el incremento de los niveles del IFN- γ en células pacientes con lepra independientemente de estar o no vacunados con BCG.



Gráfica 26. Producción de IFN- γ con 10 μ g/ml del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en pacientes con lepra vacunados o no al BCG.

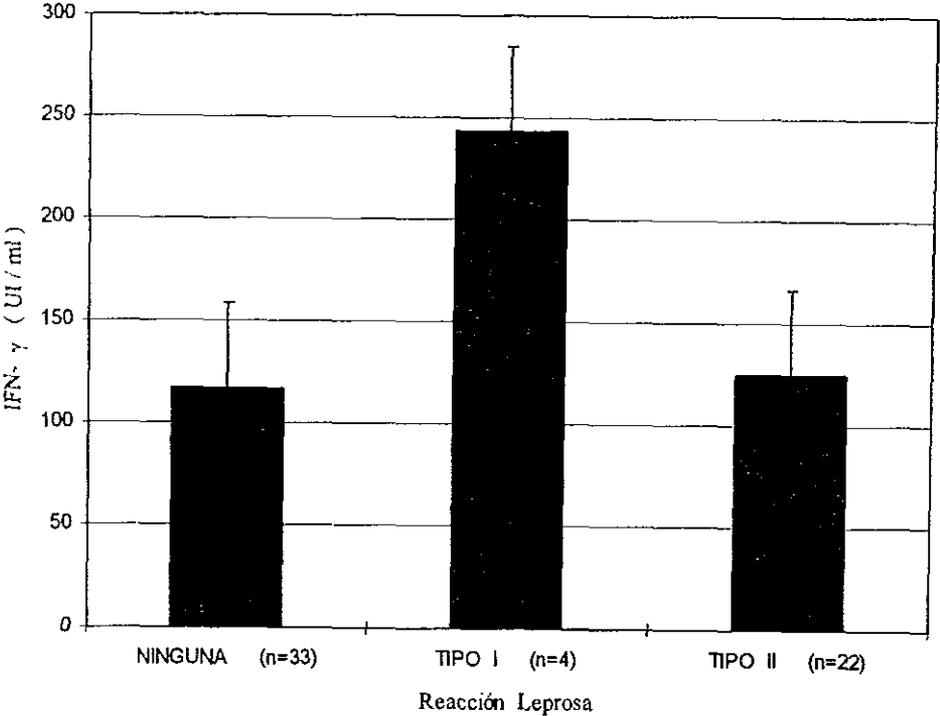
En los pacientes multibacilares con la enfermedad clínica muy evolucionada tales como son los lepromatosos difusos (LLD) y nodulares (LLN), se presentan frecuentemente las denominadas *reacciones de reversa*, que son el efecto de la exacerbada respuesta inmune celular del mismo paciente que termina por lo general incrementando el cuadro histopatológico del mismo. De estos pacientes se encontraron que 33 nunca presentaron historia alguna, 4 presentaban al tomar la muestra de sangre una reacción leprosa tipo I y 22 tenían historia de reacción tipo II, por esta razón se decidió analizar la respuesta proliferativa y la secreción de IFN- γ durante la estimulación con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 45 kDa de *M. leprae*. En la gráfica 27 se muestran los índices de estimulación obtenidos en los pacientes con o sin historia de reacción leprosa. La respuesta en los individuos sin evidencia clínica de reacción leprosa mostraron un valor máximo de 40, mientras que los pacientes con reacción tipo I se registraron un índice de estimulación celular superior a 100. En los pacientes con historia de reacción tipo II se mostró la más baja proliferación con relación a los otros dos grupos analizados. Estos resultados indican que en los pacientes multibacilares sin reacción leprosa la respuesta celular es aún capaz de inducir una proliferación antígeno-específica al 45 kDa de *M. leprae*, por otro lado se encuentra una mayor respuesta linfocitaria al antígeno de 45 kDa en los pacientes con reacción tipo I. En los pacientes con reacción de tipo II, los resultados obtenidos se correlacionan con las observaciones de diversos autores que han informado de que en éstos pacientes con reacción tipo II la respuesta inmune es principalmente humoral y se encuentran un gran número de complejos inmunes que dañan diversos tejidos del hospedero, mientras que la respuesta inmune celular es escasa para mitógenos y ciertos antígenos recombinantes (11, 43, 87).



Gráfica 27. Linfoproliferación con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en pacientes con historia de reacción leprosa.

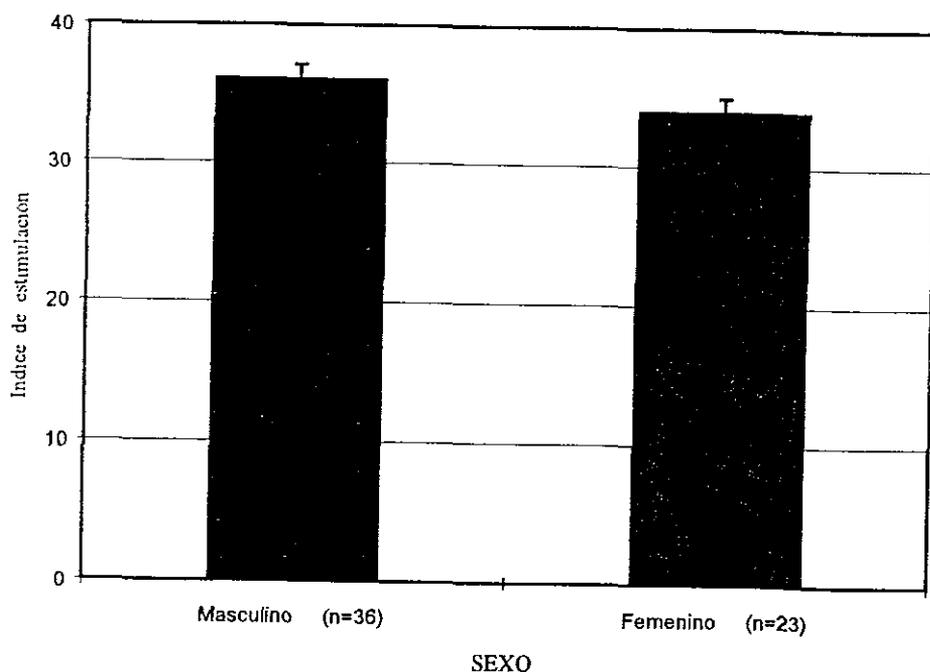
Los promedios en la producción de IFN- γ en pacientes con lepra con y sin reacción leprosa se presentan en la gráfica 28. Se observó una estrecha relación entre la proliferación celular y la producción de IFN- γ en los pacientes con la reacción tipo I. Nuevamente, se presentan valores de linfoproliferación de más del doble, en relación con los otros dos grupos estudiados. Los pacientes sin reacción leprosa y los que tienen el tipo II presentan producción similar de IFN- γ y ambos grupos superan las 100 UI/ml. La diferencia entre estos dos grupos no es significativa. Estos datos

sugieren que frente al antígeno de 45 kDa los pacientes con o sin reacción tipo I, mientras que su proliferación celular se encuentra en correlación con la producción de IFN- γ . Mientras que en los pacientes con reacción tipo II la respuesta inmune celular es baja, pero no la producción de IFN- γ . Los estudios realizados por otros investigadores (43, 49), demuestran que cuando los niveles de IFN- γ se incrementan en pacientes multibacilares se disminuye la activación policlonal de linfocitos B y los títulos de anticuerpos. Los resultados obtenidos sugieren que el antígeno de 45 kDa de *M. leprae* pueda reducir la síntesis de citocinas IL-4 e IL-10 y por lo tanto de linfocitos tipo Th2 en los pacientes multibacilares con reacción leprosa tipo II.



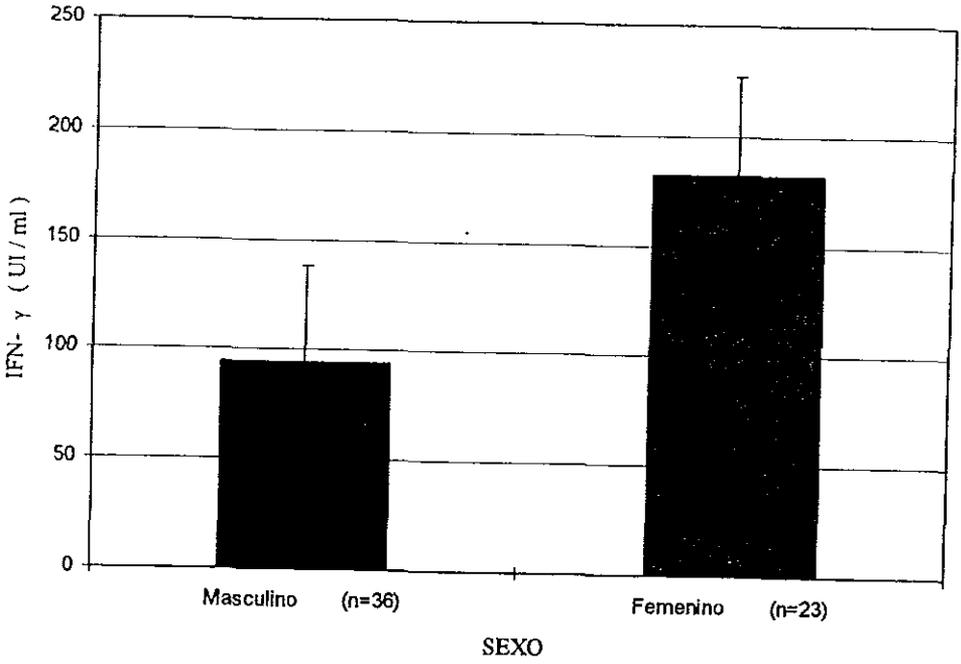
Gráfica 28. Secreción de IFN- γ con 10 μ g/ml del antígeno de 45 kDa de *M. leprae* en pacientes con historia de reacción leprosa.

En algunas infecciones causadas por hongos y bacterias se ha demostrado la influencia hormonal para el desarrollo de la infección y para la evolución hacia un polo determinado de la enfermedad, en este trabajo analizamos en ambos sexos las diferencias posibles durante la proliferación celular y la secreción de IFN- γ . La respuesta inmune celular por sexos con el antígeno de 45 kDa se muestran en la gráfica 29. Se encontró que a pesar de que hay más sujetos del sexo masculino que femenino con la enfermedad, no hay diferencias importantes en la respuesta inmune celular al antígeno de 45 kDa de *M.leprae*.



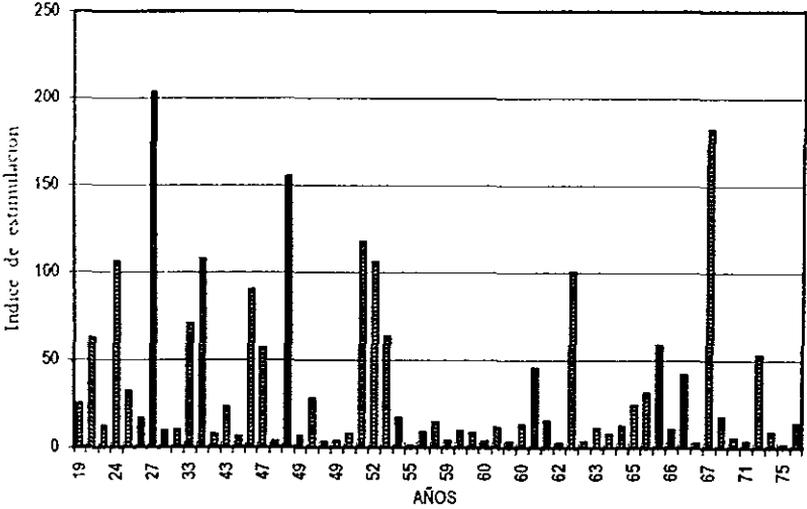
Gráfica 29. Proliferación de PBMC por sexos con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en pacientes con lepra

Los resultados de la producción de IFN- γ en ambos sexos se presentan en la gráfica 30. Se detectó que las mujeres produjeron más del doble de IFN- γ que la población masculina. Posiblemente esto se debe a que la mayor parte de la población femenina es más joven con respecto a la masculina, además de que presentaban en promedio una menor evolución de la enfermedad.



Gráfica 30. Producción de IFN- γ con 10 μ g/ml del antígeno de 45 kDa de *M. leprae* en pacientes con lepra por sexos.

También se analizó si la edad de los pacientes con lepra tiene algún efecto sobre la respuesta inmune celular al antígeno de 45 kDa de *M.leprae*. En la gráfica 31 se observa que los mejores respondedores al antígeno se encuentran entre las edades de 20 y 56 años. Además se encontró un decrecimiento en la proliferación en los pacientes de mayor edad. La explicación a esto se debe a que los pacientes con mayor edad padecen principalmente las formas multibacilares (LLN y LLD), mientras que los individuos jóvenes tienen las formas tuberculoides (TT y BT)

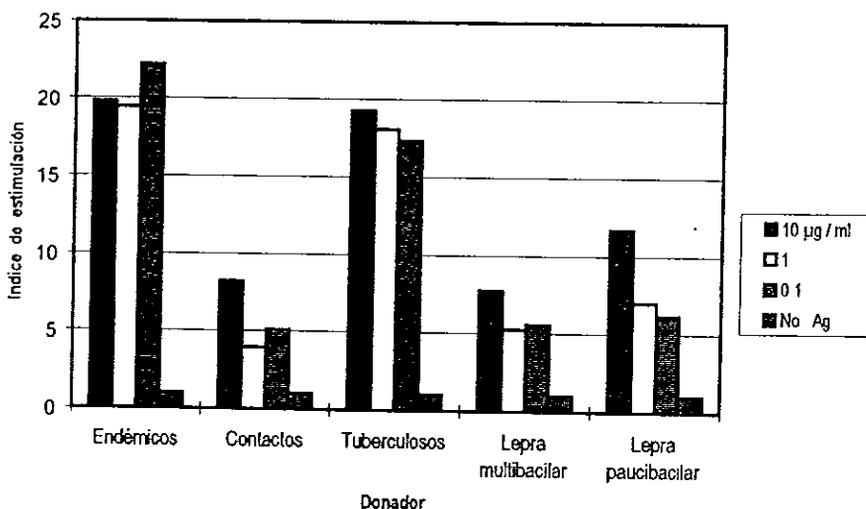


Gráfica 31 Proliferación celular con 10 µg/ml del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en pacientes con lepra por edades.

6.5 Respuesta inmune celular al antígeno de 65 kDa de *M.leprae*.

Los promedios de la cinética de dosis respuesta con el antígeno de 65 kDa se encuentran en la gráfica 32. La mayor respuesta a este antígeno se detectó en los pacientes con tuberculosis e individuos de zonas endémicas. Los índices de estimulación son elevados en las tres concentraciones y no se encontró diferencia significativa entre éstas. Los elevados índices de estimulación celular presentada en los pacientes con tuberculosis se explica por la homología del 85% de este antígeno de 65 kDa de *M.leprae* con otros antígenos descritos previamente (8, 68). Los resultados obtenidos indican que el antígeno de 65 kDa es reconocido por linfocitos de individuos sanos de zonas endémicas y por pacientes con tuberculosis. Los contactos intradomiciliarios mostraron una respuesta máxima en la concentración de 10 µg/ml y en las otras dos la estimulación fué similar. Los pacientes con lepra multibacilar mostraron una proliferación celular mayor en la concentración de 10 µg/ml, mientras que en 1 y 0.1 µg/ml no se encontró diferencia significativa alguna. Los pacientes paucibacilares desarrollaron índices de estimulación de 13 en la concentración de 10 µg/ml y la respuesta fué menor que la encontrada en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Algunos autores como Esaguy *et al.* (18) y Lamb *et al.* (64), han sugerido que la homología del antígeno de 65 kDa de *M.leprae* con otros péptidos descritos para *M.tuberculosis* reduce el reconocimiento de inmunoglobulinas del isotipo IgG provenientes de pacientes con lepra paucibacilar, además de asociar a este antígeno con fenómenos de autoinmunidad durante la activación policlonal inespecífica sobre linfocitos T y B en pacientes multibacilares.

Los índices de estimulación que se obtuvieron en el presente trabajo con el antígeno de 65 kDa de *M.leprae* sugieren un fuerte reconocimiento en pacientes con tuberculosis pulmonar activa, controles endémicos sanos y pacientes paucibacilares con la enfermedad de Hansen .

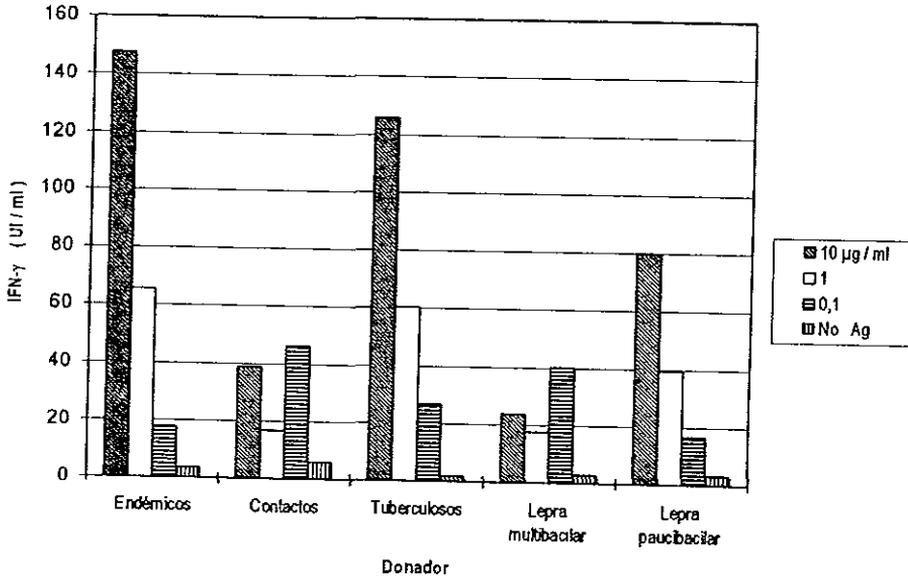


Gráfica 32. Dosis respuesta durante la estimulación con el antígeno recombinante de 65 kDa de *M.leprae*.

En la gráfica 33 se presentan los promedios del IFN- γ producido en cada grupo estudiado. Se observó una relación entre los índices de estimulación celular y los niveles de IFN- γ producidos durante la estimulación con el antígeno de 65 kDa en las células de los pacientes con tuberculosis e individuos endémicos. La secreción de IFN- γ fue alta en la concentración de 10 μ g/ml en pacientes con tuberculosis e individuos endémicos. Los valores registrados llegaron a superar los valores de

125 y 130 respectivamente, mientras que la producción de IFN- γ fue disminuyendo de acuerdo a la concentración del antígeno. Los contactos intradomiciliarios y los pacientes con lepra multibacilar presentaron índices de estimulación similares para la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y las diferencias encontradas entre las dos concentraciones restantes fue mínima. La respuesta al antígeno de 65 kDa de *M.leprae* que se obtuvo en los contactos, se puede explicar por tiempo prolongado de convivencia que tienen la mayoría de estos individuos con los pacientes con lepra que son fuente de diversos antígenos y también por la tasa de pacientes con diversas formas con tuberculosis que hay en nuestro país.

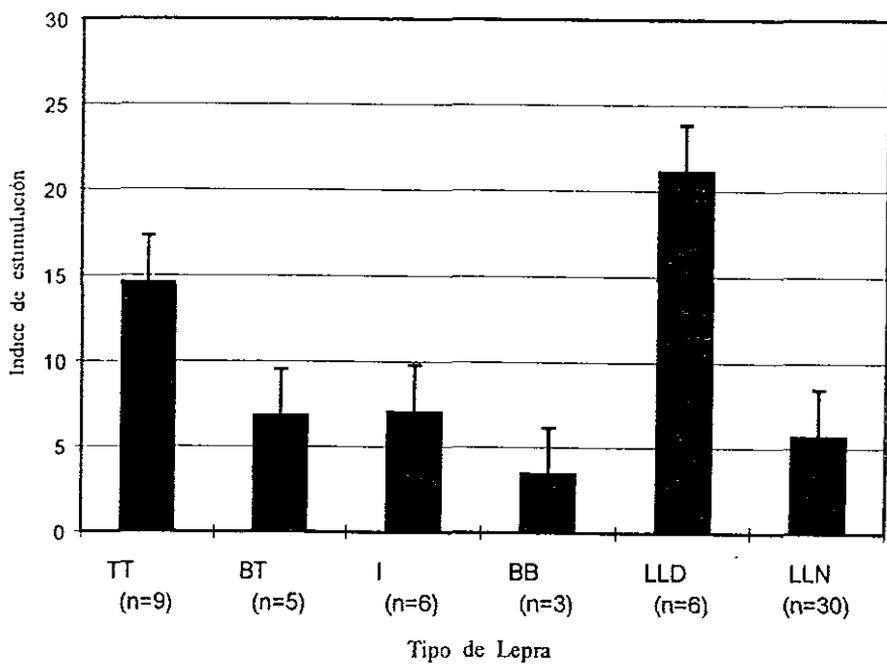
En los pacientes con lepra paucibacilar la secreción de IFN- γ es baja a las concentraciones de 1 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno, mientras que a 10 $\mu\text{g/ml}$, se encontró una producción mayor a 10 UI/ml. Los resultados obtenidos en los grupos endémicos, tuberculosos, contactos y pacientes con lepra paucibacilar tienen correlación con la respuesta inmunidad celular descrita en la gráfica 32. La escasa producción de citocina en los pacientes con lepra multibacilar está en relación con la carga de bacilos dentro de los tejidos de los pacientes. Por otro lado en los valores encontrados en los pacientes paucibacilares el IFN- γ de 80 UI/ml, sugieren que el antígeno de 65 kDa no es un buen inductor de la proliferación celular pero sí es capaz de activar la producción de IFN- γ . Los controles sin antígeno en todos los ensayados y en todos los grupos resultaron negativos.



Gráfica 33. Producción de IFN- γ durante le estímulo antigénico con el 65 kDa de *M. leprae* en los PBMC por grupos.

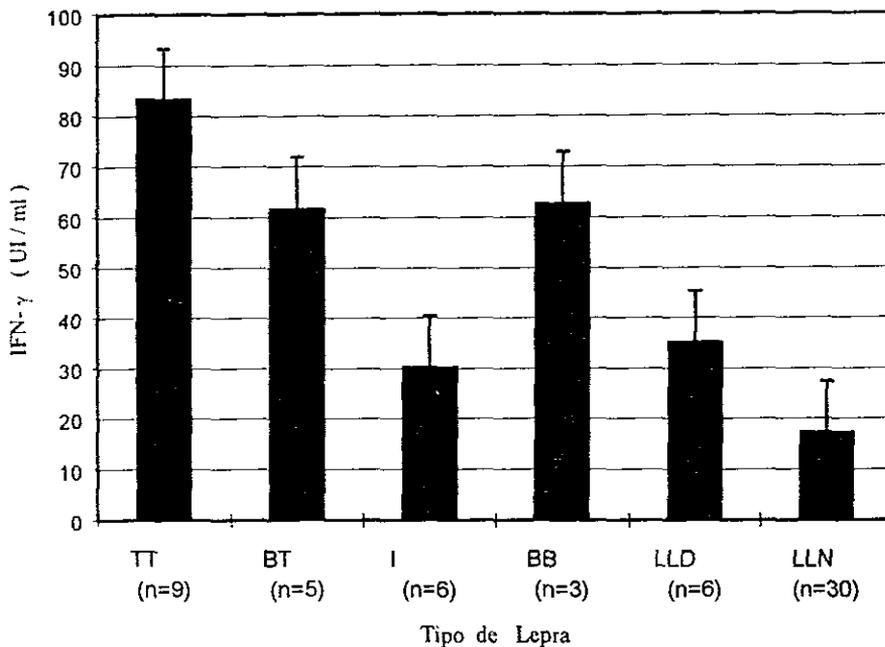
Los promedios de la respuesta proliferativa desarrollada en los pacientes con diferentes tipos de lepra estimulados con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 65 kDa de *M. leprae* se presentan en la gráfica 34. De los pacientes paucibacilares, los del tipo tuberculoide (TT) presentan un valor máximo de 14. Este índice es el mayor registrado en los paucibacilares, mientras que en los limítrofes tuberculoideos (BT) se muestra una escasa proliferación celular a este antígeno. Los pacientes indeterminados (I) no muestran una diferencia alguna con la estimulación desarrollada en los pacientes BT. La menor respuesta encontrada en pacientes multibacilares se registra en el grupo

limitrofe (BB) con un índice máximo promedio de 4. Los pacientes con formas lepromatosas difusas (LLD) tienen una elevada proliferación al antígeno de 65 kDa. La posible explicación a este incremento en la activación es que algunos de estos pacientes de este grupo presentaban una reacción leprosa del tipo I al momento de tomar de la muestra de sangre, otra probable explicación para el reconocimiento del antígeno por parte de los paciente LLD es la relación a que se involucra a este antígeno de 65 kDa con diversos procesos de autoinmunidad desarrollados en las reacciones leprosas. Por otro lado se observó que los pacientes lepromatosos nodulares (LLN), no son eficientemente estimulados por este antígeno, para inducir la proliferación que es necesaria para destruir al bacilo o para activar la maquinaria enzimática intracelular para la destrucción del bacilo.



Gráfica 34. Linfoproliferación en los pacientes con lepra estimulados con 10 µg/ml del antígeno de 65 kDa de *M. leprae*

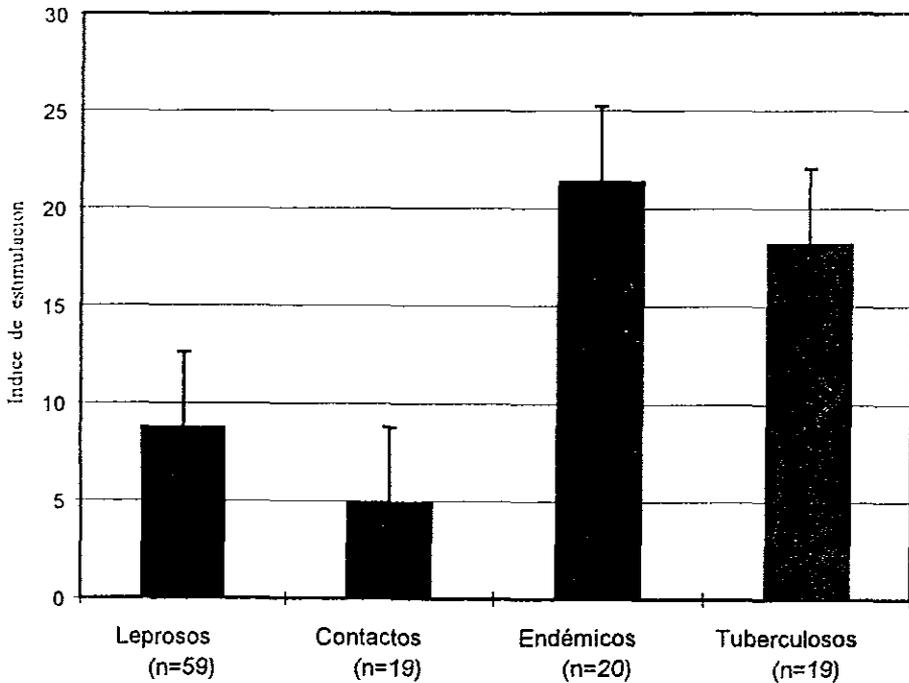
Los promedios de secreción de IFN- γ durante la estimulación celular con el antígeno de 65 kDa de *M.leprae* se presentan en la gráfica 35. Los pacientes con la forma tuberculoide (TT) resultan ser estimulados apropiadamente y presentan la más alta secreción de IFN- γ registrada en todos los grupos estudiados. Los pacientes limítrofes presentan gran similitud en la secreción de IFN- γ y no se encuentra una diferencia real ente estos dos grupos. Se presenta una baja producción de IFN- γ en especial con los pacientes con las formas multibacilares I, LLD y LLN. Al relacionar los resultados obtenidos con la cinética de dosis-respuesta para la secreción de IFN- γ con el antígeno de 65 kDa de las gráficas 32 y 33, se encuentra que los pacientes con tuberculosis reconocen mejor al antígeno, ya que muestran los más altos niveles de IFN- γ liberados durante el estímulo antigénico. Esto confirma la gran homología que tiene el antígeno de 65 kDa de *M.leprae* con péptidos presentes en el bacilo de *M.tuberculosis*. Los resultados obtenidos indican que en lugares en donde existe una alta tasa de tuberculosis y un predominio de pacientes con lepra multibacilar, la respuesta celular y producción de IFN- γ al 65 kDa de *M.leprae* no es eficiente y el antígeno no es una buena opción para realizar estudios seroepidemiológicos, ya que presenta una elevada reactividad cruzada y se reduce la especificidad como lo indican otros investigadores como Khanolkar *et al.* (45) y Misra *et al.* (52), que muestran datos muy similares a los presentados en este trabajo



Gráfica 35 Producción de IFN- γ en los pacientes con diferentes tipos de lepra estimulados con 10 μ g/ml de antígeno de 65 kDa de *M.leprae*.

Los promedios obtenidos en la proliferación por grupos se presentan en la gráfica 36. Se observó una estrecha correlación con los resultados registrados en la gráfica 32. Los mayores índices de estimulación celular se obtuvieron en los pacientes con tuberculosis y en los individuos sanos de zonas endémicas. Los pacientes con lepra no son respondedores al antígeno, ya que muestran un índice de estimulación máximo de 8. Los contactos intradomiciliarios muestran una escasa respuesta celular de 5 índices de estimulación. Estos resultados obtenidos en los pacientes con lepra y contactos confirman que el antígeno de 65 kDa de *M.leprae* no podría estimular lo suficiente las células mononucleares para producir la destrucción intracelular del bacilo y llegar a

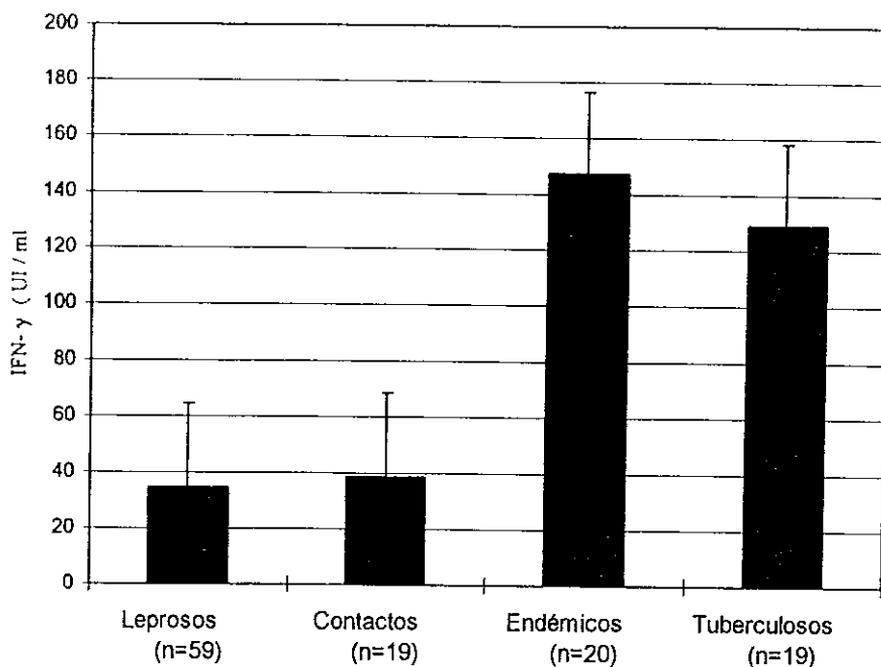
producir una protección en individuos que se encuentran con alto riesgo a adquirir la enfermedad como lo son los contactos intradomiciliarios o en los pacientes con una baja carga de bacilo dentro de las células infectadas



Gráfica 36. Proliferación celular por grupos con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 65 kDa de *M. leprae*.

Los promedios de la secreción de IFN- γ por grupo se encuentran en la gráfica 37. Los pacientes con tuberculosis y controles endémicos nuevamente presentaron la mayor respuesta registrada. Mientras que en los pacientes con lepra y los contactos intradomiciliarios la respuesta

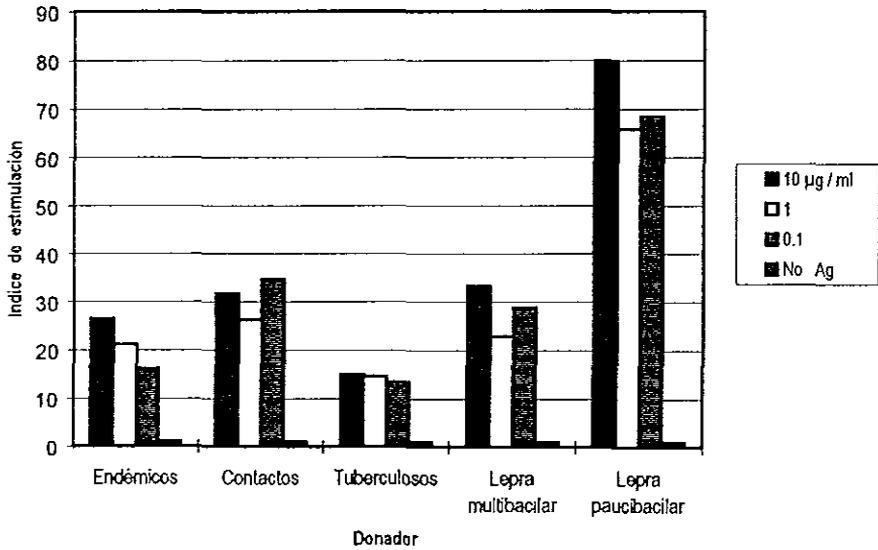
fué baja y sin diferencia significativa entre ellas. Los resultados de la secreción de IFN- γ corroboran que no es eficiente la activación de la respuesta inmune celular en pacientes infectados con el bacilo de Hansen ni en individuos que conviven con ellos y que tienen un alto riesgo de adquirir la enfermedad. La baja respuesta encontrada en los pacientes con lepra por el antígeno de 65 kDa de *M. leprae* no se puede atribuir al tratamiento en que se encontraban al tomar las muestras de sangre ya que éstos mismos individuos respondieron con altos índices de estimulación celular y elevados niveles de IFN- γ a la tuberculina (PPD) y a la fitohemaglutinina (PHA) utilizada como control positivo en todos los ensayos de proliferación celular.



Gráfica 37 Secreción de IFN- γ en los grupos estudiados con 10 μ g/ml del antígeno de 65 kDa de *M. leprae*

6.6 Respuesta inmune celular al antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae*.

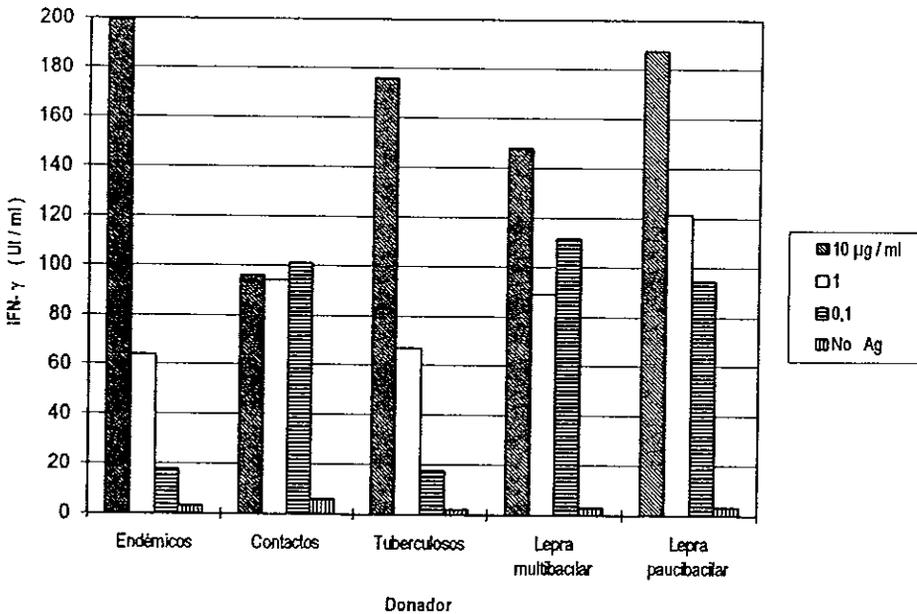
Los promedios de los índices de estimulación durante la cinética de dosis-respuesta celular al antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* se encuentran en la gráfica 38. Se encontró proliferación celular en los individuos de zonas endémicas dependiente a la concentración del antígeno y no se registró una diferencia importante entre las tres concentraciones. En los contactos intradomiciliarios, existe una mayor respuesta, pero no se observó con diferencias significativas entre las tres concentraciones utilizadas. La proliferación en los pacientes con lepra resultó ser elevada, en especial en los pacientes paucibacilares que mostraron tener una estimulación máxima en la concentración de 10 µg/ml del antígeno, mientras que las otras dos concentraciones no se detectaron variaciones. Diversos estudios mencionan que el antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* es uno de los primeros componentes del bacilo que se difunde de los tejidos infectados, esto hace que su antigenicidad sea mayor y se aumente el reconocimiento de anticuerpos de isotipos IgM e IgG de pacientes paucibacilares (TT y BT). Se ha descrito que este antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* presenta una reactividad cruzada de 25-30% con otros antígenos de *M.tuberculosis*.



Gráfica 38. Dosis respuesta al antígeno recombinante de 30-31 kDa de *M.leprae* en los diferentes grupos estudiados

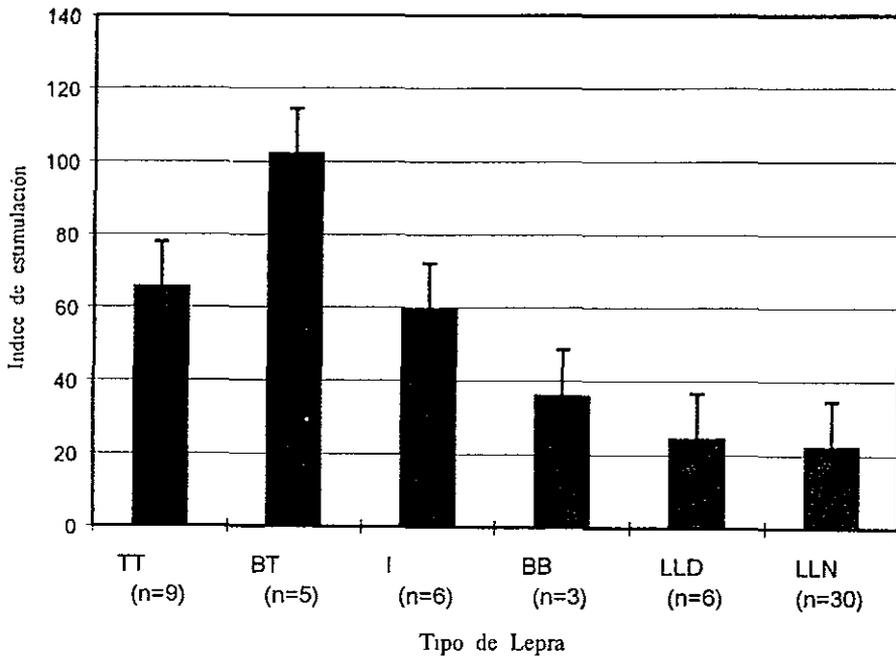
En la gráfica 39 se encuentran los promedios de la producción de IFN- γ en las células mononucleares de los diferentes grupos estimulados con el antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae*. La producción de IFN- γ para todos los grupos fue la mayor con respecto a todos los otros antígenos recombinantes y crudos estudiados en el presente trabajo. Los individuos de zonas endémicas presentaron las mayores unidades de IFN- γ cuando fueron estimulados con la concentración de 10 μ g/ml, llegando a secretar concentraciones mayores de 200 UI/ml de IFN- γ . En los contactos intradomiciliarios, la producción fue elevada y no se encontraron diferencias significativas entre las tres concentraciones del antígeno. Los pacientes con tuberculosis al igual que los individuos de

zonas endémicas mostraron una excesiva producción de IFN- γ en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. No se encontró alguna diferencia importante entre las dos concentraciones restantes y ambos mostraron una clara dosis-respuesta al antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae*. Todos los pacientes con lepra fueron fuertes respondedores al antígeno y los niveles de secreción también fueron elevados, en especial a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno. Estos resultados confirman la elevada antigenicidad del antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* para inducir una producción no específica de IFN- γ .



Gráfica 39. Producción de IFN- γ durante el estímulo con el antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* por grupos estudiados.

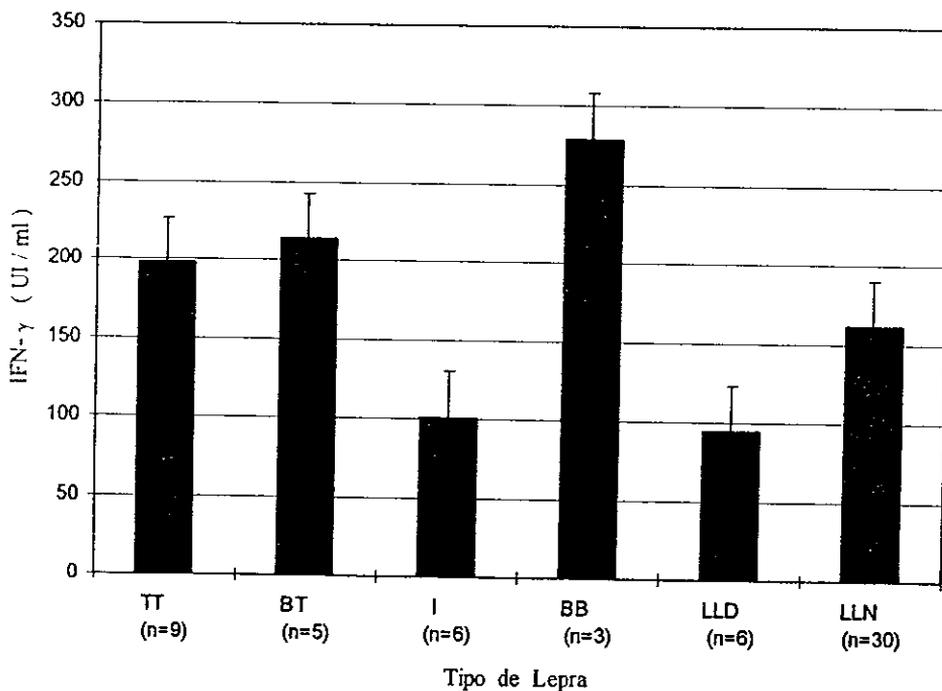
Los promedios y la desviación estándar de la estimulación celular obtenida en los pacientes con lepra al antígeno de 30-31 kDa de *M. leprae*, se presentan en la gráfica 40. Se observó que los pacientes paucibacilares (TT y BT) mostraron índices de estimulación altos, en especial los limitrofes tuberculoides que llegaron a tener una estimulación de 100, no obstante, el grupo de indeterminados (I), mostraron valores similares a los registrados en los pacientes tuberculoides (TT) Esto probablemente significa que la inmunidad celular aún en pacientes con alta carga bacteriológica en sus tejidos es capaz de actuar eficientemente para la eliminación del bacilo. Los pacientes con las formas limitrofe (BB), lepromatosa difusa (LLD) y lepromatoso nodular (LLN), muestran una disminución de sus valores conforme a la evolución de la enfermedad. Algunos autores (19) han descrito que la respuesta inmune celular a los antígenos como la lepromina disminuye la activación y proliferación de monocitos (incluyendo macrófagos y linfocitos T), en pacientes multibacilares LLD y LLN. Contrastando con los hallazgos anteriores se detectó que solo dos pacientes lepromatosos nodulares (LLN) registraron una elevada reactividad al antígeno. Pero esto se explica por el tratamiento de años en que se encontraban cuando se tomaron las muestras. Esta observación es importante ya que se ha descrito que existe una relación directa entre la duración del tratamiento y la respuesta inmune celular contra el bacilo en pacientes multibacilares.



Gráfica 40. Proliferación con 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* en pacientes con diferentes tipos de lepra.

Los promedios de la secreción de IFN- γ en las PBMC de pacientes con lepra estimulados con el antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* se muestran en la gráfica 41. Todos los pacientes secretaron elevadas concentraciones de IFN- γ . Los pacientes paucibacilares TT y BT, sobre todo los del tipo limitrofe (BB), mostraron los mayores niveles de la citocina en los sobrenadantes de cultivo con el antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae*. Los pacientes indeterminados (I) y lepromatosos difusos (LLD) registraron bajas concentraciones de IFN- γ y no presentaron

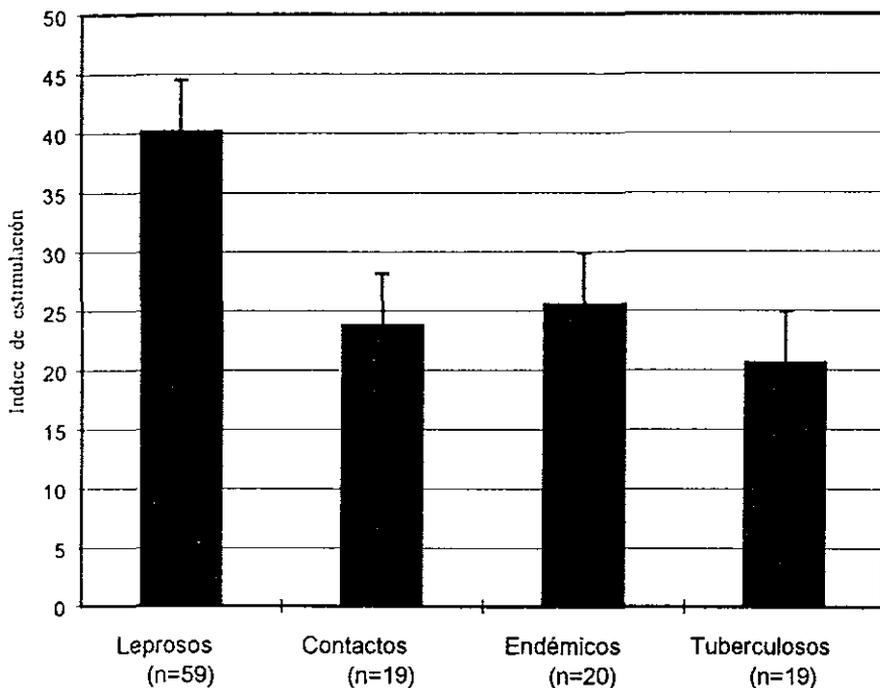
diferencias. En contraste los lepromatosos nodulares (LLN) fueron el segundo grupo de pacientes que mostraron un incremento en la secreción de IFN- γ .



Gráfica 41. Secreción de IFN- γ en paciente con lepra con 10 μ g/ml del antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae*.

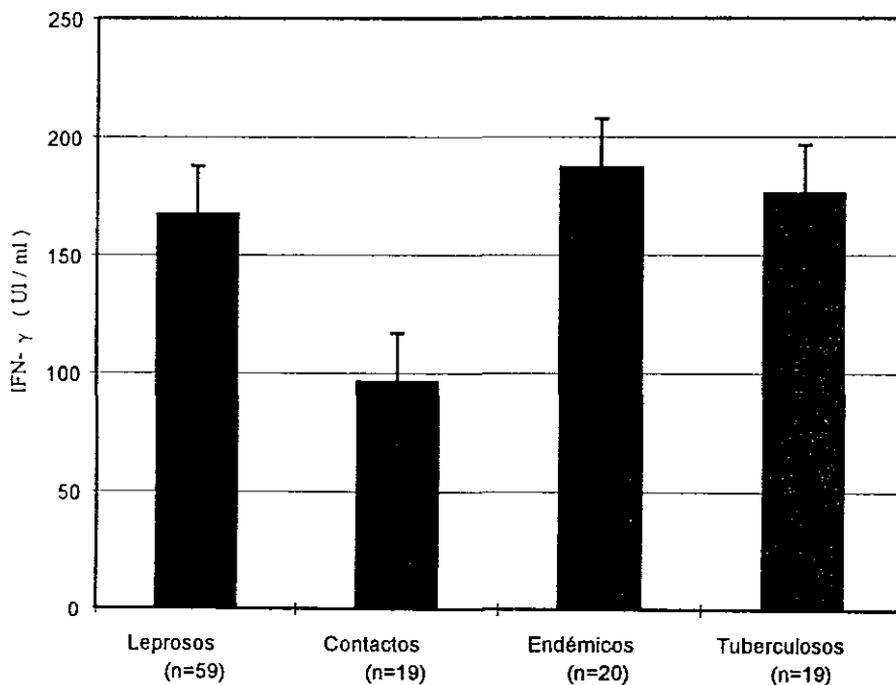
La respuesta inmune celular al antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* en diferentes grupos de pacientes con lepra se presenta en la gráfica 42. Mas del 50% de los pacientes con lepra mostraron ser los mejores respondedores al antígeno de 30-31 kDa, lo cual incrementó el promedio durante el

análisis de los datos obtenidos en este trabajo. Estos resultados muestran relación con diversos estudios (88, 89) que señalan la elevada antigenicidad que tiene este antígeno de 30-31 kDa de *M leprae* por la capacidad proliferativa de células mononucleares y reconocimiento con anticuerpos provenientes de pacientes con lepra tuberculoide y limitrofe. La respuesta encontrada en los contactos intradomiciliarios y en los individuos sanos de zonas endémicas fue muy similar y con poca variación, una excepción fue un contacto que mostró tener un índice de estimulación de 100. Los pacientes con tuberculosis pulmonar activa mostraron un reconocimiento por el antígeno, existiendo poca diferencia (5 UI/ml) en la secreción de IFN- γ en relación con los contactos y los individuos endémicos. De acuerdo a estos resultados, el antígeno de 30-31 kDa parece ser una buena opción para el estudio inmunológico de la lepra, no obstante, de que se presenta reconocimiento celular en individuos sanos de zonas endémicas y en pacientes con otras enfermedades causadas por micobacterias tales como *M.tuberculosis*.



Gráfica 42. Índices de estimulación en los diferentes grupos estimulados con 10 µg/ml del antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae*.

Los promedios de la producción de IFN-γ por grupo se presentan en la gráfica 43. Nuevamente en todos los grupos se observaron niveles elevados de IFN-γ, sobre todo en los pacientes con lepra, tuberculosis e individuos endémicos, sin encontrarse una variación importante entre estos grupos. Los contactos intradomiciliarios secretan más de 100 UI/ml, lo cual sugiere que el antígeno de 30-31 kDa posiblemente provoca una activación de células productoras de IFN-γ que pueda inducir un desbalance negativo para los pacientes con lepra y tuberculosis, contribuyendo así al incremento en el daño histopatológico del paciente multibacilar.



Gráfica 43. Producción de IFN- γ con 10 μ g/ml del antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* por grupos.

En resumen la mejor estimulación celular y secreción de IFN- γ por grupos se obtuvo con la concentración de 10 μ g/ml de cada antígeno como se puede observar en la tabla III. Los pacientes con lepra y los contactos intradomiciliarios reconocieron adecuadamente el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*, en relación con los otros grupos y antígenos estudiados. Se puede notar que la activación en pacientes con tuberculosis y en individuos sanos de zonas endémicas es baja. Los resultados sugieren que el antígeno de 45 kDa no solo es reconocido por anticuerpos de pacientes con lepra,

sino también es capaz de inducir la activación específica de linfocitos en pacientes con diversos tipos de lepra y en individuos con riesgo a adquirir la enfermedad.

Tabla III.
Resumen de los resultados obtenidos por grupos durante la respuesta inmune celular con 10 µg/ml de los antígenos utilizados.

Ag o Mitógenos	Sujetos MB (n = 45)		PB (n = 14)		C (n = 19)		E (n = 20)		TB (n = 19)	
	IE	IFN-γ	IE	IFN-γ	IE	IFN-γ	IE	IFN-γ	IE	IFN-γ
65 kDa	9.31	36.25	10.67	72.45	4.90	39.90	21.34	147.27	18.17	128.99
45 kDa	31.88	129.74	89.73	205.06	22.64	77.47	8.56	21.22	6.80	30.85
30 kDa	35.46	159.39	83.70	205.89	23.80	96.28	25.52	187.20	20.57	176.05
10 kDa	5.21	19.52	5.30	35.13	5.00	15.93	3.67	40.13	3.22	82.94
Mison	38.88	91.66	107.57	115.28	17.17	42.82	66.92	136.1	23.73	85.26
PPD	34.51	152.49	119.65	226.47	82.36	129.70	90.44	236.40	208.12	240.74
PHA	136.46	297.14	299.07	277.14	126.32	222.42	119.78	293.00	204.32	233.68

n = Número de individuos estudiados
 PHA = Fitoheماغلوتینینا
 IE = Índice de estimulación celular
 C = Contactos Intradomiciliarios

PB = Pacientes con lepra paucibacilar
 MB = Pacientes con lepra multibacilar
 E = Individuos de zonas endémicas
 TB = Pacientes con tuberculosis

7. DISCUSION.

La descripción original del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* incluyó la caracterización inicial de esta proteína mediante serología usando Western blott (86). Con la finalidad de examinar la respuesta inmune celular de humanos con lepra y sujetos control a este antígeno, se llevó a cabo este estudio enfocando los objetivos hacia dos de los mecanismos que tienen un papel fundamental en la protección contra enfermedades micobacterianas. Uno de ellos es la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y el segundo, la producción de IFN- γ por dichas poblaciones celulares sometidas a la estimulación con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*.

En su fase inicial este proyecto comprendió la estandarización técnica y el análisis de dosis-respuesta (o cinética), con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*, así como de una batería de antígenos micobacterianos previamente caracterizados por otros autores. En su fase de desarrollo el estudio incluyó la realización de ensayos de proliferación celular y la determinación de IFN- γ en grupos de pacientes multibacilares y paucibacilares con lepra, sus contactos intradomiciliarios, sujetos sanos de zonas endémicas y pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

Los resultados obtenidos indican que la concentración de 10 μ g/ml para los antígenos recombinantes y del sonicado de *M.leprae* fué la más adecuada para estimular las células, ya que se registraron los más altos índices de estimulación y niveles de producción de IFN- γ durante los ensayos de proliferación celular y detección por ELISA. Ensayos previos realizados por la Dra. Anne MacFarlane, mostraron que concentraciones de antígeno mayores a 10 μ g/ml causaban un incremento en la muerte celular, esta fue el motivo para realizar la cinética de dosis-respuesta en todos los antígenos crudos y recombinantes empleados en este trabajo

Este trabajo indica que el antígeno de 45 kDa de *M.leprae* es capaz de estimular las células mononucleares de pacientes multibacilares con lepra LLD y LLN y en contactos intradomiciliarios los cuales tienen altas posibilidades de contraer la enfermedad. Los índices de estimulación y secreción de IFN- γ en estos grupos fueron los más altos detectados en comparación con los otros antígenos recombinantes del bacilo. Los índices de estimulación celular y niveles de IFN- γ obtenidos con el antígeno de 45 kDa mostraron tener una importante diferencia en todos los ensayos con los pacientes paucibacilares (TT y BT), indeterminados (I) y en los limitrofes (BB), la respuesta mostró una clara relación con el tipo de lepra del paciente. El reconocimiento resultó ser bajo en las células de sujetos sanos de zonas endémicas y en pacientes con tuberculosis pulmonar activa, lo cual sugiere que es una respuesta específica.

El antígeno de 45 kDa de *M.leprae* fue capaz de activar las células de pacientes multibacilares que resultaron negativos al sonicated (Mlson). Los resultados obtenidos durante la proliferación celular y la liberación de IFN- γ resalta la importante función que tienen los antígenos como posibles inductores de linfocitos tipo Th1 aún en pacientes con las formas LLD y LLN que resultan ser anérgicos a otros antígenos crudos o purificados. Estudios realizados por Haanen *et al* (25), mencionan el efecto que tienen antígenos micobacterianos para la estimulación de linfocitos tipo Th1 durante la respuesta inmune en pacientes multibacilares. Por otro lado los niveles de IFN- γ obtenidos en los contactos intradomiciliarios e individuos sanos de zonas endémicas se relacionan con los descritos por Sampaio *et al*, (43), los cuales mencionan que individuos que conviven por periodos prolongados con pacientes con lepra multibacilar, muestran una importante modificación en la respuesta inmune celular de los contactos, incrementando sus posibilidades de adquirir la enfermedad.

La proliferación celular y la producción de IFN- γ obtenida en los pacientes paucibacilares TT y BT que fueron estimulados con el antígeno de 45 kDa mostraron poca variación, pero en los multibacilares LLD y LLN, la estimulación y secreción de IFN- γ fue menor y no se encontró correlación entre ambas. Estudios realizados por Libraty *et al.*(49) y Jullien *et al.*(50), destacan la importancia de los elevados niveles de IFN- γ en la reducción en la proliferación celular de otras células como los son los linfocitos B. Estos autores mencionan también que el IFN- γ ejerce una regulación en la secreción y síntesis de otras citocinas tales como IL-12 e IL-15, las cuales son capaces de estimular la actividad y función de macrófagos y linfocitos T, lo cual altera la respuesta inmune celular contra el bacilo de Hansen.

Los bajos índices de estimulación obtenidos contrastan con la reducción de los niveles de IFN- γ secretado por las mismas células. Esto sugiere que altos niveles de IFN- γ liberados en el microambiente pueden alterar temporalmente la linfoproliferación durante el estímulo con antígenos crudos provenientes del bacilo o purificados.

Los índices de estimulación y los elevados niveles de IFN- γ en los pacientes con lepra multibacilar (I, BB, LLD) obtenidos en el presente trabajo, se relacionan con la restauración de la respuesta proliferativa descrita por Mustafa *et al.* (90); estos autores indican que los pacientes multibacilares con lepra lepromatosa poseen una pequeña proporción de células T que pueden reconocer y proliferar con antígenos recombinantes de 65 kDa, 36 kDa, 12 kDa y 18 kDa de *M.leprae* o con el empleo de adyuvantes como son *M.bovis* BGC + *M.leprae*. Estos antígenos son capaces de estimular la linfoproliferación e incrementar la producción de IFN- γ e IL-12 para contribuir con la restauración de la respuesta inmune celular contra el bacilo de *M.leprae*.

Convit *et al* (46), han demostrado que el bacilo de *M. bovis* BCG posee algunos epitopes que presentan reactividad cruzada y señalan que por su elevada antigenicidad, estos antígenos pueden conferir protección contra infecciones de lepra en individuos que conviven con pacientes multibacilares. Los resultados obtenidos en este estudio señalan que la estimulación con 10 µg/ml del antígeno de 45 kDa de *M. leprae* en células mononucleares de pacientes con lepra que fueron vacunados con BCG presentaron elevados índices de estimulación así como altos niveles de IFN-γ, mientras que los pacientes no vacunados mostraron baja estimulación celular, pero con elevación en la producción de IFN-γ. Esto indica que el antígeno de 45 kDa es capaz de inducir la producción de IFN-γ en pacientes multibacilares independientemente de tener la cicatriz de vacunación del BCG.

Estudios anteriores realizados por Vega-López *et al* (86) y Rinke De Wit *et al* (85), mostraron que existe un fuerte reconocimiento de anticuerpos del isotipo IgG de pacientes multibacilares y paucibacilares. Los resultados descritos por estos autores confirman que la proteína de 45 kDa de *M. leprae* es capaz de estimular y activar la producción de anticuerpos de linfocitos B y además es reconocido específicamente por linfocitos T y NK. Esto puede explicar los elevados niveles de IFN-γ secretados en los medios de cultivo de los pacientes con lepra y contactos intradomiciliarios. En células de pacientes con historia de reacción leprosa tipo I que fueron estimulados con 10 µg/ml del antígeno de 45 kDa de *M. leprae*, se observó una marcada producción de IFN-γ con relación a los pacientes con historia de reacción del tipo II y de aquellos que no tuvieron antecedentes de reacción de reversa. Estos resultados confirman que la respuesta inmune celular no está abatida en pacientes con lepra multibacilar con reacción de reversa y que existen células capaces de reconocer antígenos de *M. leprae*; tal es el caso del antígeno de 45 kDa que resultó estimular una respuesta celular para activar la linfoproliferación antígeno-específica.

Diversos autores han señalado que la calidad de los anticuerpos, así como la respuesta a diversos antígenos se encuentra en relación estrecha con la edad del paciente. Los resultados obtenidos aquí, señalan que los índices de estimulación celular presentan una distribución de acuerdo a la edad, esto puede explicarse porque los individuos de mayor edad padecían formas multibacilares, mostrando menores índices de estimulación celular en relación con los pacientes jóvenes que presentaban principalmente las formas clínicas del tipo tuberculoide.

No se detectó ninguna diferencia significativa en la estimulación celular con respecto al sexo de los pacientes con lepra, pero sí en la producción de IFN- γ . A la fecha no se sabe si existe alguna influencia hormonal que regule la respuesta humoral y liberación de IFN- γ en la enfermedad de Hansen.

Un estudio reciente realizado por Klatser *et al.* (91), señala que la respuesta humoral y celular de pacientes multibacilares y paucibacilares a antígenos recombinantes puede variar dependiendo del área geográfica. Estos autores demostraron que el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) tiene una función importante en el reconocimiento de antígenos purificados y crudos. En particular, señalan que el antígeno de 45 kDa de *M. leprae* presenta una baja respuesta celular y humoral en pacientes con lepra multibacilar, mientras que la respuesta a un extracto crudo la respuesta humoral y celular fué mayor con relación a los antígenos recombinantes que utilizaron. La importancia del trabajo de estos investigadores es el correlacionar la variabilidad genética del HLA con la importancia en la respuesta inmune celular, así como el contacto con otros antígenos micobacterianos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los descritos por Sieling *et al.* (48), en relación a los altos índices de linfoproliferación en pacientes con lepra lepromatosa y la producción elevada de IFN- γ , que se encuentra modulada con el sinergismo

de IL-12 e IL-2, producidos por células presentadoras de antígeno y linfocitos T. Los estudios previos y los resultados en este trabajo con antígenos recombinantes pueden ser aplicados para el diseño de vacunas recombinantes o para elaborar reactivos para intradermoreacción en lugares como en nuestro país donde la enfermedad de Hansen esta presente.

En este estudio se mostró el reconocimiento inmune celular al antígeno de 45 kDa de *M.leprae*, así como la elevada producción de IFN- γ durante la estimulación en pacientes con lepra y contactos intradomiciliarios. Una de la principales limitaciones fue no contar con muestras de sangre de individuos en donde la enfermedad ésta erradicada para poder comparar los resultados obtenidos y saber que tan específico resulta ser el antígeno de 45 kDa de *M.leprae*. La obtención de un DNAc de citocinas del tipo Th1 en pacientes con lepra multibacilar y paucibacilar sería necesaria para demostrar la inducción de otras citocinas que involucren la activación de la respuesta inmune celular. También sería necesario fraccionar el antígeno de 45 kDa en péptidos pequeños realizar un mapeo de epitopes de linfocitos B y determinar regiones inmunodominantes.

Todos los individuos sanos de zonas endémicas y los pacientes con lepra, en especial los paucibacilares presentaron una fuerte respuesta proliferativa y secreción de IFN- γ al sonicado de M leprae (Mlson). Algunos pacientes con lepra multibacilar mostraron escasa respuesta celular y poca producción de IFN- γ . Se observó que el tiempo de convivencia es un factor importante para la respuesta a Mlson, ya que los familiares con largos periodos de contacto con pacientes multibacilares presentaron en general escasa proliferación y bajos niveles de IFN- γ . Por otra parte, se detectó que los pacientes con tuberculosis mostraron valores mayores a contactos intradomiciliarios. Esto indica que Mlson es un fuerte inductor de la respuesta inmune para la mayoría de los individuos estudiados, pero posee epitopes que provocan reactividad cruzada en

células de pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Los resultados obtenidos presentan similitud con los realizados por Sampaio *et al* (43), que describen que el contacto estrecho con pacientes multibacilares favorece una posible anergia de linfocitos T a los antígenos de *M.leprae*, incrementándose la posibilidad de adquirir la infección. Esto se relaciona con los resultados obtenidos ya que los ensayos de linfoproliferación a los antígenos del bacilo, así como con mitógenos de T, se observó una escasa proliferación.

Se registraron índices de más del doble en la estimulación celular y niveles de $IFN-\gamma$ durante la respuesta a la tuberculina (PPD) con respecto a los observados con el sonicado de *M.leprae* (Mlson). Los resultados obtenidos reflejan la importancia que tienen los epitopes que producen reactividad cruzada con *M.leprae* y que son un adyuvante potencial para el desarrollo de posibles alternativas para la destrucción intracelular del bacilo.

La elevada respuesta al PPD que se detectó coincide con los estudios realizados por Convit *et al* (46), que muestran que los pacientes con lepra del tipo paucibacilar presentan una elevada respuesta al *M.bovis* BCG, ya que presentan además de similitud filogenética algunos epitopes que confieren reactividad celular y humoral al bacilo de *M.leprae*. La inmunogenicidad del BCG es aprovechado por Convit *et al.* (46) para inducir una protección en individuos con lepra paucibacilar vacunado con el bacilo del BCG y *M.leprae*. Otros estudios mencionan obtener una mayor eficiencia en la destrucción del bacilo al utilizar una combinación con rIL-2 (34).

No solamente los índices de estimulación y la secreción de $IFN-\gamma$ resultan ser mayores en los pacientes con tuberculosis, lepra paucibacilar e individuos endémicos; también los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la tuberculina es excelente inductora de la activación celular aún en los pacientes con lepra multibacilar que resultaron negativos al sonicado (Mlson).

Al estimular las células mononucleares con el antígeno de 10 kDa de *M.leprae*, se registró la más baja respuesta de proliferación celular y secreción de IFN- γ en los pacientes con lepra, tuberculosis, contactos e individuos endémicos. La escasa respuesta no fue afectada por factores como la edad ni por la duración del tratamiento, ya que en todos los grupos se obtuvieron en el control positivo (PHA), buenos índices de estimulación, con niveles de IFN- γ altos.

Diversos estudios sugieren que la variabilidad de la respuesta a determinados antígenos de *M.leprae* se debe al HLA que predomina en dicha áreas geográficas, ya que ésto determina la posibilidad de evolucionar hacia un polo determinado de la enfermedad (13, 14, 91).

El antígeno de 65 kDa de *M.leprae* presenta el mayor reconocimiento en las células de pacientes con tuberculosis e individuos endémicos y solo los pacientes con lepra limitrofes y multibacilares (LLD), los contactos intradomiciliarios y la mayoría de los pacientes con lepra mostraron una escasa transformación linfocitaria y bajos niveles de IFN- γ .

La baja activación celular en los contactos y pacientes con lepra presente en este estudio se relaciona con estudios previos que atribuyen esta respuesta a la elevada homología en su estructura primaria con otros antígenos descritos para *M.tuberculosis*, además de relacionar su participación en fenómenos de autoinmunidad. Esto reduce la especificidad del antígeno durante el reconocimiento celular y humoral en pacientes con lepra multibacilar, contactos intradomiciliarios e individuos sanos de zonas endémicas (8).

La elevada respuesta al antígeno de 30 kDa de *M.leprae* presente en la mayoría de los individuos estudiados, se debe a que este antígeno es el principal producto que se difunde de los tejidos infectados con *M.leprae*. Por sus características químicas, este es muy inmunogénico para las células y anticuerpos del isotipo IgM de pacientes paucibacilares. Por otro lado se observó que

el reconocimiento al antígeno se encuentra en relación con el espectro de la enfermedad, además de que presenta un fuerte reconocimiento por células mononucleares de pacientes con tuberculosis, contactos intradomiciliarios e individuos sanos de zonas endémicas.

8. CONCLUSIONES.

- Los mejores resultados de estimulación celular y producción de IFN- γ se obtuvieron usando una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno crudo ó recombinante.
- Se registró un elevado reconocimiento al antígeno de 45 kDa en las células de pacientes con lepra paucibacilar y en los contactos intradomiciliarios. Los índices de estimulación celular y niveles de IFN- γ obtenidos fueron los más altos en relación con los otros antígenos recombinantes estudiados. Mientras que la respuesta en pacientes con tuberculosis y controles endémicos sanos fue baja.
- Se registró baja reactividad cruzada con el antígeno de 45 kDa por células de pacientes con tuberculosis e individuos de zonas endémicas, lo cual confiere un mayor grado de especificidad que el obtenido con otros antígenos.
- El análisis de los resultados de proliferación celular con el antígeno de 45 kDa de *M.leprae* no demostró ninguna correlación con el sexo de los pacientes o con el antecedente de vacunación con BCG. Por el contrario, la producción de IFN- γ fue mayor en los pacientes con cicatriz de vacunación por BCG.
- Se detectaron diferencias en la proliferación celular en cuanto a la edad de los individuos y el antecedente clínico con historia de reacción leprosa. Es importante mencionar que en la reacción leprosa tipo I se encuentra implicada la participación de la inmunidad celular, mientras que en la reacción del tipo II se encuentra una activación desmesurada de linfocitos B y un subsecuente incremento de los títulos de anticuerpos y complejos inmunes circulantes que incrementan el daño histopatológico en el paciente multibacilar

- La estrecha correlación entre los índices de estimulación celular y los niveles de IFN- γ que se obtuvieron durante el reconocimiento del antígeno de 45 kDa de *M.leprae* en los pacientes con lepra y contactos intradomiciliarios, sugieren que el antígeno de 45 kDa es capaz de inducir la proliferación de linfocitos Th1 aún en pacientes con lepra multibacilar (LLN) cuyas células resultaron negativas a la estimulación con el sonicado de *M.leprae* (Mlson).
- Los pacientes con tuberculosis pulmonar activa, individuos de zonas endémicas y pacientes con lepra, mostraron una elevada respuesta celular y secreción de IFN- γ al sonicado de *M.leprae* (Mlson), mientras que con algunos pacientes LLN fueron negativos al sonicado.
- Los mayores índices de estimulación y niveles de IFN- γ en todos los grupos estudiados se obtuvieron con la tuberculina (PPD), las lecturas obtenidas fueron siempre mayores que las encontradas con el sonicado de *M.leprae* (Mlson).
- El antígeno de 10 kDa de *M.leprae* no es capaz de activar eficientemente los linfocitos de los pacientes con lepra ni de inducir una producción importante de IFN- γ ; por el contrario, esta proteína genera un fuerte reconocimiento en pacientes con tuberculosis.
- El antígeno de 65 kDa de *M.leprae* fue reconocido por un elevado número de pacientes con tuberculosis y controles endémicos sanos, mientras que los pacientes con lepra multibacilar mostraron escasa actividad celular a este antígeno.
- El antígeno de 30-31 kDa de *M.leprae* resultó ser un excelente inductor de la proliferación celular, así como en la síntesis de IFN- γ , pero presenta una elevada reactividad cruzada en muestras de pacientes con tuberculosis y en controles endémicos sanos.
- El elevado reconocimiento celular y humoral por el antígeno de 45 kDa en pacientes con lepra multibacilar y paucibacilar sugieren la necesidad de estudios de mapeo de epitopes de linfocitos B y de análisis de transcripción para interleucinas producidas por linfocitos Th1.

9. ANEXO. I

Donadores usados en este estudio

CONTROLES ENDEMICOS SANOS

Donador	Lugar de origen	Sexo	Edad (años)	Vacuna BCG
1	Celaya, Gto.	Masculino	22	si
2	Queretaro, Qro.	Masculino	20	no
3	Cortazar, Gto.	Masculino	34	no
4	Celeya, Gto.	Masculino	33	desconocido
5	Celeya, Gto.	Masculino	39	no
6	Celeya, Gto.	Masculino	25	si
7	Villagrán, Gto.	Masculino	46	no
8	Celeya, Gto.	Masculino	29	si
9	Celeya, Gto.	Femenino	33	si
10	Celeya, Gto.	Femenino	21	si
11	Sn. Juan de la Vega, Gto.	Masculino	35	si
12	Celeya, Gto.	Masculino	25	si
13	Salvatierra, Gto.	Masculino	34	desconocido
14	Salvatierra, Gto.	Masculino	32	si
15	Celeya, Gto.	Masculino	23	si
16	Celeya, Gto.	Masculino	53	no
17	Celeya, Gto.	Masculino	44	desconocido
18	Celeya, Gto.	Masculino	20	si
19	Celeya, Gto.	Femenino	58	no
20	Celeya, Gto.	Femenino	18	desconocido

CONTACTOS INTRADOMICILIARIOS

Donador	Lugar de origen	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico del Paciente	Relación con el paciente
1	México, D.F.	Femenino	33	LLN	esposa
2	Culiacán, Sin.	Femenino	53	LLN	esposa
3	Acambaro, Gto.	Femenino	54	I	madre
4	Jerécuaro, Gto.	Femenino	27	LLN	hija
5	México, D.F.	Femenino	28	LLD	hija
6	Jerécuaro, Gto.	Femenino	39	LLN	esposa
7	Guajuapán de León, Oax.	Femenino	14	LLN	hija
8	México, D.F.	Masculino	25	BB	hijo
9	México, D.F.	Femenino	40	I	hermana
10	Zihuatanejo, Gro.	Masculino	25	LLN	hijo
11	México, D.F.	Femenino	27	LLN	cuñada
12	México, D.F.	Masculino	30	LLN	hijo
13	México, D.F.	Masculino	28	LLN	hijo
14	México, D.F.	Masculino	32	LLN	hijo
15	México, D.F.	Masculino	57	LLN	esposo
16	Guadalajara, Jal.	Femenino	31	LLN	cuñada
17	México, D.F.	Femenino	48	LLN	madre
18	Ometepepec, Gro.	Femenino	40	LLN	esposa
19	Tepecpan de Galena, Gro.	Masculino	20	LLN	hijo

PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA.

Donador	Lugar de origen	Sexo	Edad (años)	Vacuna BCG
1	Tlalcutepec, Pueb.	Masculino	54	desconocido
2	Morelia, Mich.	Femenino	64	si
3	México, D.F.	Masculino	31	desconocido
4	Chilpancingo, Gro.	Femenino	36	desconocido
5	Queretaro, Qro.	Masculino	46	desconocido
6	México, D.F.	Masculino	33	si
7	México, D.F.	Masculino	35	si
8	Motuzintla, Chis.	Femenino	50	desconocido
9	Veracruz, Ver.	Masculino	28	no
10	Iguala, Gro.	Masculino	34	desconocido
11	Puebla, Pueb.	Masculino	49	desconocido
12	Morelia, Mich.	Masculino	61	desconocido
13	México, D.F.	Masculino	60	no
14	México, D.F.	Femenino	26	no
15	Veracruz, Ver.	Masculino	51	no
16	México, D.F.	Masculino	49	si
17	Acapulco, Gro.	Femenino	25	desconocido
18	Acapulco, Gro.	Femenino	18	si
19	Taxco, Gro.	Masculino	32	no

PACIENTES CON LEPROA MULTIBACILAR.

Donador	Sexo	Edad (años)	Tipo de lepra	Lepromina	Reacción leprosa	Vacuna BCG	Duración del tratamiento (años)	Duración de la enfermedad (años)
1	Masculino	73	LLN	Negativo	ninguno	desconocido	18 años	18 años
2	Masculino	43	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	1 mes	8 años
3	Masculino	75	LLN	No hecho	ninguno	desconocido	35 años	37 años
4	Masculino	67	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	17 años	33 años
5	Femenino	83	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	17 meses	24 años
6	Masculino	63	LLN	Negativo	tipo II	desconocido	10 meses	17 años
7	Femenino	49	LLD	Negativo	ninguno	desconocido	23 meses	6 años
8	Masculino	49	I	Negativo	ninguno	desconocido	13 años	13 años
9	Masculino	29	LLN	No hecho	ninguno	desconocido	4 años	8 años
10	Masculino	59	LLN	ninguno	ninguno	desconocido	1 mes	3 meses
11	Masculino	63	LLN	Negativo	ninguno	desconocido	3 años	21 años
12	Masculino	63	LLD	Negativo	ninguno	desconocido	1 año	39 años
13	Masculino	19	LLD	No hecho	tipo II	desconocido	1 año	10 años
14	Masculino	67	LLN	Negativo	tipo II	desconocido	27 años	27 años
15	Femenino	71	LLN	Negativo	tipo II	desconocido	32 años	32 años
16	Femenino	59	I	Positivo	ninguno	desconocido	8 meses	9 años
17	Femenino	49	LLN	Negativo	ninguno	desconocido	19 años	28 años
18	Masculino	64	LLN	No hecho	ninguno	desconocido	26 años	28 años
19	Femenino	55	LLN	Negativo	ninguno	desconocido	1 año	12 años
20	Masculino	51	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	8 meses	20 años
21	Masculino	47	LLN	No hecho	tipo II	si	2 años	12 años
22	Masculino	48	LLD	No hecho	ninguno	no	35 años	39 años
23	Masculino	58	LLN	No hecho	ninguno	no	27 años	28 años
24	Masculino	42	LLN	No hecho	tipo II	si	3 años	5 años
25	Masculino	60	LLN	Negativo	tipo II	si	8 meses	19 años
26	Masculino	54	LLN	No hecho	tipo II	no	27 meses	26 años
27	Femenino	65	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	30 años	40 años
28	Masculino	59	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	4 años	17 años
29	Masculino	70	I	Positivo	ninguno	desconocido	20 años	20 años
30	Masculino	62	LLN	No hecho	tipo II	no	2 años	23 años
31	Masculino	26	LLN	No hecho	tipo II	si	9 meses	10 años
32	Masculino	49	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	8 años	23 años
33	Masculino	65	LLN	No hecho	tipo II	si	4 años	48 años
34	Masculino	60	LLN	No hecho	ninguno	si	18 años	26 años
35	Masculino	62	LLN	No hecho	tipo II	no	18 meses	48 años
36	Femenino	60	BB	Negativo	ninguno	desconocido	2 años	34 años
37	Masculino	57	LLN	No hecho	ninguno	desconocido	2 años	5 años
38	Femenino	21	LLD	No hecho	tipo II	no	1 mes	1 año
39	Femenino	47	I	Negativo	ninguno	desconocido	7 años	11 años
40	Femenino	37	I	Negativo	ninguno	desconocido	4 años	14 años
41	Masculino	33	LLN	No hecho	tipo II	desconocido	2 meses	1 año
42	Masculino	53	LLD	Negativo	tipo I	desconocido	3 años	5 años
43	Femenino	62	I	Positivo	ninguno	desconocido	1 año	20 años
44	Femenino	47	BB	Negativo	tipo I	desconocido	10 meses	2.5 años
45	Masculino	60	BB	Negativo	tipo II	desconocido	10 años	20 años

PACIENTES CON LEPROSA PAUCIBACILAR.

Donador	Sexo	Edad (años)	Tipo de lepra	Reacción leprosa	Vacuna BCG	Duración del tratamiento	Duración de l. enfermedad
1	Masculino	31	TT	positivo	si	18 años	40 años
2	Femenino	60	TT	positivo	no	20 años	1 año
3	Femenino	69	TT	positivo	desconocido	1 año	2 años
4	Femenino	52	TT	positivo	desconocido	1 año	1 año
5	Femenino	72	BT	positivo	desconocido	8 años	2 años
6	Femenino	48	BT	positivo	desconocido	3 meses	12 años
7	Femenino	66	TT	positivo	desconocido	2 años	8 años
8	Femenino	27	TT	no hecho	desconocido	2 años	12 años
9	Femenino	25	TT	positivo	desconocido	2 años	15 años
10	Masculino	65	TT	negativo	desconocido	1 año	4.5 años
11	Masculino	51	BT	positivo	desconocido	4 años	8 años
12	Femenino	19	TT	positivo	desconocido	1 año	5 años
13	Femenino	24	BT	positivo	desconocido	4.5 años	5 años
14	Masculino	67	BT	positivo	si	1 año	5 años

10. BIBLIOGRAFIA.

- 1 Macotela-Ruiz, E.; Rodríguez, O.y Vega-López, F. (1995).Tópicos en dermatología. Gac. Med. Mex. 131 (1): 38-48.
2. Colston, M.J. (1993). The microbiology of *Mycobacterium leprae*; progress in the last 30 años. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87 (5): 504-507|
- 3 Brennan, P.J. (1994) The microbiology of *Mycobacterium leprae*. Part II. Reflections on major developments and those responsible for them. Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis. 62 (4): 594-8.
- 4 Bloom , R.B. (1986). Learnig from leprosy: a perspective on immunology and the Thind World. J. Immunol. 137 (1): 1-15.
- 5 Thangaraj, S.H., Lamb, I.F., Davis, O.E., Jenner, J.P., Jeyakumar, H.L. and Colston, J.M (1990). Identification, sequencing, and expression of *Mycobacterium leprae* superoxide dismutase, a major antigen. Infect. Immun. 58 (6): 1937-1942.
- 6 Britton , W.J. (1993) Immunology of leprosy . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87 (5): 508-514.
- 7 Sehgal, V.N. (1994). Leprosy. Dermatol. Clin. 12 (4): 629-644.
- 8 McFadden J. (1990). Molecular biology of the Mycobacteria. Surrey University Press. Londres, United. Kingdom pp. 3-30.
- 9 Ridley, D.S. and Jopling, W.H. (1966). Classification of leprosy according to immunology: a five-group system. Int. J. Lepr. 34 : 255-273.
- 10 Watson, D.J. (1989). Leprosy: understanding protective immunity. Immun. Today. 10 (7): 218-221.
- 11 Ottenhoff, T.H. (1994). Immunology of leprosy. New developments. Trop. Geogr. Med 46 (2). 72-80.
- 12 Ottenhoff, T.H and De-Vries, R.P. (1987). HLAclass II immune response and suppression genes in leprosy Int. J. Lepr 55: 521-534.
- 13 Anderson, C.D., Van-Shooten, A.C., Janson, A., Barry, E.M and De Vries, P R (1990) Molecular mapping of interactions between a *Mycobacterium leprae*- specific T cell epitope restricting HLA-DR2 molecule, and two specific T cell receptors J Immunol 144 (7) 2459-2464

- 14 Abu, M., Lundin, A.K. and Oftung, F. (1993). Human T cells recognize mycobacterial heat shock proteins in the context of multiple HLA-DR molecules: studies with healthy subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun. 61 (12): 5294-5301
- 15 Secretaría de Salud Dirección General de Medicina Preventiva. (1996). Manual de procedimientos operativos para el control de la lepra. Yañez-Velasco, B.L., Castellanos-García, F. y Martínez-Figueroa, A. (Eds.). México. págs:3-8.
- 16 Scollard, D.M.; Smith, T.; Bhoopat, L.; Theetranont, C.; Rangdaeng, S. and Morens, D.M (1994). Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. Int. J. Lepr. Other. Mycobact Dis. 62 (4): 559-67.
- 17 Desikan, K.V.S.(1995) Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. Lepr. Rev. 66 (4): 287-295.
- 18 I-saguy, N., Aguas, P.A., Van-Embden, D.A and Silva, T.M. (1991). Mycobacteria and human autoimmune disease: direct evidence of cross-reactivity between human lactoferrin and the 65-kilodalton protein of tubercle and leprosy bacilli. Infect. Immun 59 (3):1117-1125
- 19 Mehra, V., Mason, H.L., Field, P.J. and Bloom, R.B (1979). Lepromin induced suppressor cells in patients with leprosy. J. Immun. 123 (4): 1813-1817.
- 20 Laal, S., Bhutani, K.L. and Nath, I. (1985). Natural emergence an antigen-reactive T cells in lepromatous leprosy patients during erythema nodosum leprosum. Infect. Immun. 50 (3): 887-892.
- 21 Schlersinger, S.L., and Horwitz, A.M. (1991). Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. J. Exp. Med. 174: 1031-1038.
- 22 Schlersinger, S.L and Horwitz, A.M. (1991). Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN- γ activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. J. Immunol. 147 (6). 1983-1994
- 23 Schlersinger, S.L and Horwitz, A.M. (1994) A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy antibody in nonimmune serum mediated C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 62 (1):280-289
- 24 Sehgal, V.N., Sharma, V. and Sharma, V.K (1989). Comprehensive evaluation of complement components in the course of type I and type II reactions Int. J. Dermatol. 28 (1): 32-35

- 25 Haanen, B.A.G.J., Waal Masculinofijt R., Res, M.C.P., Ottenhoff, M.H.T., De Vries, P.R.R. and Spits, H. (1991) Selection of human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. J. Exp. Med. 174: 583-592.
- 26 Oftung, F., Shinnick : M.T., Mustafa, S.A., Lundin, A.E., Godal, T., Nerland, H.A. (1990). Heterogeneity among human T cell clones recognizing an HLA-DR4, Dw4-restricted epitope from the 18 kDa antigen of *Mycobacterium leprae* defined by synthetic peptides. J. Immunol. 144 (4): 1478-1483
- 27 Wang, X., Golkar, L., Uyemura, K., Ohmen, D.J., Villarrosa, G.L., Fajardo, T.T., Cellona, V.R., Walsh, P.G. and Modlin, L.R. (1993). T cells bearing V β 6 T cell receptors in the cell mediated immune response to *Mycobacterium leprae*. J. Immunol. 151 (12): 7105-7116
- 28 Salgame, P., Convit, J. and Bloom, R.B. (1991). Immunological suppression by human CD8⁺ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 2598-2602
- 29 Uyemura, K., Ohmen, D.J., Grisso, L.C., Sieling, A.P., Wyzykowski, R., Reisinger, M.D., Rea, H.T. and Modlin, L.R. (1992). Limited T cell receptor β -chain diversity of a T helper cell type 1-like response to *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun. 60 (11): 4542-4548.
- 30 Modlin, R.L. (1994). Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. J. Invest. Dermatol. 102 (6) 828-832
- 31 Le Poole, C.I., Mutis, T., Van den Wijngaard, J.G., Westrhof, W., Ottenhoff, T., De Vries, P.R. and Das, K.P. (1993) A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. J. Immunol. 151 (12): 7284-72920
- 32 Ottenhoff, M.H.T. and Mutis, T. (1990). Specific killing of cytotoxic T cells and antigen-presenting cells by CD4⁺ cytotoxic T cell clones. J. Exp. Med. 171: 2011-2024.
- 33 Fujita, M., Miyachi, Y., Nakata, K. and Imamura, S. (1993). Gamma delta T cell receptor-positive cells in granulomatous lesions. J. Am. Acad. Dermatol. 28 (1): 46-50.
- 34 Kaplan, G., Britton, J.W., Hancock, E.G., Theuvent, J.W., Smith, A.K., Job, K.C., Roche, W.P., Molly, A., Burkhardt, R., Barker, J., Pradhan, M.H. and Cohn, A.Z. (1991). The systemic influence of recombinant interleukin 2 on the manifestations of lepromatous leprosy. J. Exp. Med. 173: 993-1006.
- 35 Munk, E.M., Gatrill, J.A. and Kaufmann, E.H. (1990). Target cell lysis IL-2 secretion by $\gamma\delta$ T lymphocytes after activation with bacteria. J. Immunol. 145 (8): 2434-2439

- 36 Walker, B.K., Butler, R. and Colston, J.M. (1992). Role of the Th1 lymphocytes in the development of protective immunity against *Mycobacterium leprae*. J. Immunol. **148** (6): 1885-1889.
- 37 Tyagi, P., Paptil, A.S., Girdhar, K.G., Katoch, K. and Sengupta, U. (1992). Suppressive effect of circulating immune complex from leprosy patients on the lymphocyte proliferation induced by *M. leprae* in healthy responders. Inter. J. Lepr. **60** (4): 562-569.
- 38 Marolia, J., Robinson, P. and Mahadevan, R.P. (1990). A complex component modulating immune-deficient cells in leprosy patients leading to loss of viability of *Mycobacterium leprae*- a possible vaccine. Clin. Exp. Immunol. **79**: 7-14.
- 39 Beckmann, M.E., Melián, A., Behar, M.S., Sieling, A.P., Chatterje, D., Furlong, T.S., Matsumoto, R., Rosat, P.J., Modlin, L.R. and Porcelli, A.S. (1996). CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells: evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. J. Immunol. **157**: 2795-2803.
- 40 Misra, N., Selvakumar, M., Singh, S., Bharadwaj, M., Ramesh, V., Misra, R.S. and Nath, I. (1995). Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and *in vitro* T cell suppression in lepromatous leprosy. Immunol. Lett. **48** (2): 123-128
- 41 Sieling, P.A., Modlin, R.L. (1994) Regulation of cytokine patterns in leprosy. Ann. NY. Acad. Sci. **730**: 42-52.
- 42 Vachula, M., Holzer, J. T., Kizlaitis L. and Andersen R. B. (1990). Effect of *Mycobacterium leprae*'s phenolic glycolipid on interferon gamma augmentation of monocyte oxidative responses Inter. J. Lepr. **58** (2): 342-346.
- 43 Sampaio, P.A., Moreira, L.A., Kaplan, G., Duppre, C.N., Miranda, F.C. and Sarno, N.F. (1991). *Mycobacterium leprae*-induced interferon- γ production by household contacts of leprosy patients: association with the development of active disease. J. Infect. Dis. **164**: 990-993.
- 44 Hartskeerl, A.R., Van-Res, M.R., Stabel, M.E., De Wit, L.Y. and Klatser, R.P. (1990). Selection and characterization of recombinant clones that produce *Mycobacterium leprae* antigens recognized by antibodies in sera from household contacts of leprosy patients Infect Immun. **58** (9): 2821-2827
- 45 Khanolkar-Young, S., Rayment, N., Brickell, P.M., Katz, D.R., Vinayakumar, S., Colston, M.J. and Lockwood, D.N. (1995) Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions Clin. Exp Immunol. **99** (2) 196-202

- 46 Convit. J. Sampson, C, Smith, G.P, Plata, J. Silva, J, Molina, J., Pinardi. E.M., Bloom. R.B. and Salgado. A. (1992). Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results. Lancet. 339: 446-450
- 47 Launois. P., Blum, L., Dieye, A. Millan. J. Sarthou., L.J., Michel C.J. and Bach M.A. (1991) *Mycobacterium leprae* and BCG induced chemiluminescence response of monocytes from leprosy patients and healthy subjects: effect of gamma interferon and GM-CSF Inter J. Lepr 59 (4): 582-589
48. Sieling . A.P., Wang, H.X., Gately, K.M., Oliveros. L.J., McHung, T., Barnes. F.P., Wolf, F.S., Golkar. L., Yamamura, M., Yogi. Y., Uyemura. K, Rea. H.T and Modlin. L.R. (1994). IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. J Immunol. 153: 3639-3647.
- 49 Libraty. D.H., Airan, L.E., Uyemura, K., Jullien. D. Spellberg, B., Rea. T.H and Modlin. R.L (1997). Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. J. Clin. Invest. 99 (2): 336-341.
- 50 Jullien. D., Sieling. P.A., Uyemura, K, Mar, N.D., Rea, T.H. and Modlin. R.L. (1997). IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. J. Immunol. 158 (2): 800-806.
- 51 Mitra. D.K., Rajalingam. R., Taneja, V., Bhattacharyya, B.C. and Mehra. N.K. (1997) HLA-DR polymorphism modulates the cytokine profile of *Mycobacterium leprae* HSP-reactive CD4+ T cells. Clin. Immunol. Immunopathol. 82 (1): 60-67.
- 52 Misra. N., Murtaza, A., Walker. B., Narayan. N.P., Misra, R., Ramesh. V., Singh. S., Coilton. M.J. and Nath, I. (1995) Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and unfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. Immunology 86 (1): 97-103.
- 53 Sieling. A.P., Abrams, S.J., Yamamura, M., Salgame, P., Bloom, R.B., Rea, H.T and Modlin. L.R. (1993). Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection: *In vitro* modulation to T cell responses in leprosy. J Immunol. 150 (12): 5501-5510.
- 54 Shiratsuchi. H., Hamilton, B., Toossi, Z. and Ellner, J.J (1996). Evidence against a role for interleukin-10 in the regulation of growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes. J. Infect. Dis. 173: 410-417.
- 55 Sathish. M., Esser, E.R., Thole. R.E.J. and Clark-Curtiss, E.J. (1990). Identification and characterization of antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* that react with antibodies in sera of leprosy patients. Infect. Immun. 58 (5): 1327-1336

- 56 Curtiss-Clark, E.J., Jacobs, R.W., Docherty, A.M., Ritchie, R.L. and Curtiss, R. (1985) Molecular analysis of DNA construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. J Bacteriol. 161 (3): 1093-1102.
- 57 Jacobs, R.W., Tuckman, M. and Bloom, R.B. (1987). Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. Nature. 327: 532-535.
- 58 Young, B.D., Kaufmann, E.H.S., Hermans, M.W.P. and Thole, R.E.J. (1992). Mycobacterial protein antigens: a compilation. Molec. Microbiol. 6 (2): 133-145.
59. Young, A.R., Mehra, V., Sweetser, D., Buchanan, T., Clark-Curtiss, E. J., Davis, W.R. and Bloom, R.B. (1985). Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacteria leprae*. Nature. 316: 450-452.
- 60 Chan, J., Fujiwara, T., Brennan P., McNeil, M., Turco, J.S., Sibille, J.C., Snapper, M., Aisen, P. and Bloom, R.B. (1989). Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 2453-2457
- 61 Schauf, V., Holobaugh, P., Miller, P. and Mittal, K. (1991). Sensitization *in vitro* of human peripheral blood mononuclear cells to phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae* in liposomes. Cell. Immun. 137: 81-87.
62. Ulrich, M., Smith, G.P., Sampson, C., Zihiga, M., Centeno, M., Garcia, V., Manrique, X., Salgado, A. and Convit, J. (1991). IgM antibodies to native phenolic glycolipid I in contacts of leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and prospective study of the risk of leprosy. Inter. J. Lepr. 59 (3): 405-415.
- 63 Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D. and Young A.R. (1988). Stress protein are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4267-4270.
- 64 Lamb, I.F., Kingston, E.A., Estrada, G.I. and Colston J.M. (1988). Heterolous expression of the 65 kilodalton antigen of *Mycobacterium leprae* and murine T cell responses to the gene product. Infect. Immun. 56 (5): 1237-1241.
65. Vega- López, F., Stoker, G.N., Locniskar, F.M., Dockrell, M.H., Grant, A.K. and McAdam, J. K. (1988). Recognition of Mycobacterial antigens by sera from patients with leprosy. J. Clin Microbiol. 26 (12): 2474-2479.
- 66 Lee, P.S., Stoker, G.N., Grant, A.K., Handzel, T.Z., Hussain, R., McAdam, J.W. and Dockrell, M.H. (1989). Cellular immune responses of leprosy contacts to fractionated *Mycobacterium leprae* antigens. Infect. Immun. 57 (8): 2475-2480.
- 67 Gulle, H., Schoel, B., Chiplunkar, S., Gangal, S., Deo, G.M. and Kaufmann, E.H. (1992). T cell responses of leprosy patients and healthy contacts toward separated protein antigens of *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. 60 (1): 44-53

- 68 Ilangumaran, S., Nayaran, S.P., Ramu, G. and Muthukkaruppan, V.R (1994) Cellular and humoral immune responses to recombinant 65 kDa antigen of *Mycobacterium leprae* in leprosy patients and healthy controls. Clin. Exp. Immunol. 96: 79-85.
- 69 Rambukkana, A. Das, K.P, Burggraaf, D., Faber, R.W, Teeling, P., Krieg, S, Thole, R.E and Harboe, M. (1992). Identification and caharacterization of epitopes shared between the mycobacterial 65-kilodanton heat shock protein and actively secreted antigen 85 complex: their *m situ* expression on the cell wall surface of *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun 60 (11) 4517-4527
- 70 Vega-López, F. y Macotella-Ruiz, E. (1991). Importancia de los antígenos protéicos de *Mycobacterium leprae*. Uso potencial para el desarrollo de una vacuna contra la lepra. Gac Med Mex. 127 (1): 31-39.
- 71 Dockrell, M.H, Stoker, G.N, Lee, P.S, Jackson, M, Grant, A. K, Jouy, F.N, Lucas, B.S, Hasan, R., Hussain, R. and McAdam J.W.P.K. (1989) T cell recognition of the 18 kilodalton antigen of *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun. 57 (7): 1979-1983.
- 72 Doherty, M.T., Bäckstrom, T.B., Prestidge L.R., Love, G.S., Harding, K.R. and Watson, D.J (1991) Immune resposnses to the 18 kDa protein of *Mycobacterium leprae*. J. Immunol 146 (6): 1934-1940.
- 73 Bäckström . B.T., Harris, P.D , Prestidge, L.R. and Watson, D.J. (1992) Genetic control of immune responses to the 18 kDa protein of *Mycobacterium leprae* Cell. Immunol 142 264-274.
- 74 McKenzie, R.K., Adams, E., Britton, J.W., Garsia, J.R. and Basten, A. (1991). Sequence and immunogenicity of the 70 kDa heat shock protein of *Mycobacterium leprae*. J. Immunol 147 (1): 312-319.
- 75 Hussam, R., Menz, B., Dockrell, M.H. and Chiang, J.T. (1995) Recognition of *Mycobacterium leprae* recombinant 18 000 MW epitopes by IgG subclasses in leprosy. Immunol. 84: 290-297.
- 76 Booth, J R., Williams, L.D, Moudgil, D.K, Noonan, C L., Grandison, M.P., McKee, J.J, Prestidge, L.R. and Watson, D.J. (1993). Homologs of *Mycobactum leprae* 18-kilodalton and *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigens in other mycobacteria. Infect. Immun 61 (4): 1509-1515.
- 77 Ramesh, N., Spertini, F., Scholl, P. and Geha, R. (1992). A toxic shock syndrome toxin-1 peptide that shows homology to mycobacterial heat shock protein 18 is presented as conventional antigen to T cells by multiple HLA-DR alleles. J. Immunol 148 (4). 1025-1030

- 78 Steinhoff, U., Wand-Wu Tenrberger, A., Bremerich, A. and Kaufmann, H.E. (1991) *Mycobacterium leprae* renders Schwann cells and mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells. Infect. Immun. 59 (2): 684-688.
- 79 Peake, W.P., Britton J.W., Davenport, M.P., Roche, W.P. and Mckenzie, R.K. (1991). Analysis of B cell epitopes in the variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70 kilodalton heat shock protein. Infect. Immun. 61 (1): 135-141
80. Mundayoor, S. and Shinnick, M.T. (1994). Identification of genes involved in the resistance of mycobacteria to killing by macrophages. Ann. N.Y. Acad. Sci. 730: 26-36.
- 81 Stanford, J.L.(1994). The history and future of vaccination and immunotherapy for leprosy. Trop. Geogr. Med. 46 (2): 93-107.
- 82 Davenport, P.M., McKenzie, R.K., Basten, A. and Britton, J.W. (1992). The variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein is the target for humoral immune responses. Infect. Immun. 60 (3): 1170-1177.
83. Cherayil, J.B. and Young, A.R. (1988). A 28 kDa protein from *Mycobacterium leprae* is a target of the human antibodies response in lepromatous leprosy. J. Immunol. 141 (12): 4370-4375.
- 84 Bretscher, A.P. (1992). A strategy to improve the efficacy of vaccination against tuberculosis and leprosy. Immunol. Today. 13 (9): 342-345.
85. Rinke De Wit, T.F., Clark-Curtiss, J.E., Abebe, F., Kolk, A.H.J., Janson, A.A.M. and Thole, J.E.R (1993). A *Mycobacterium leprae*-specific gene encoding an immunologically recognized 45 kDa protein. Mol. Microbiol. 10: 829-838.
- 86 Vega-López, F., Brooks, L.A., Dockrell, M.H., De-Smet, L.A., Thompson, K.J., Hussain, R. and Stocker, G.N. (1993). Sequence and immunological characterization of a serine-rich antigen from *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun. 61 (5): 2145-2153
- 87 Gelber, H.R., Murray, L., Siu, P. and Tsang, M.(1992). Vaccination of mice with a soluble protein fraction of *Mycobacterium leprae* provides consistent and long term protection against *M leprae* infection. Infect. Immun. 60 (5): 1840-1844.
- 88 Filley, E., Thole, R.E., Rook, W.A., Nagai, S., Waters, M., Drijfhout, W J., De wit, R., Devries, P.R. and Zeid-Abou, C. (1994). Identification of an antigenic domain on *Mycobacterium leprae* protein antigen 85B, which is specifically recognized by antibodies from patients with leprosy. J. Infect. Dis. 169: 162-169.
- 89 Pessolani, V.M.C. and Brennan, J.P. (1992) *Mycobacterium leprae* produces extracellular homologs of the antigen 85 complex. Infect. Immun. 60 (11): 4452-4459.

- 90 Mustafa. A S. (1996) Restoration of proliferative response to *M.leprae* antigens in lepromatous T cells against candidate antileprosy vaccines. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis 64 (3): 257-267.
- 91 Klatser. P R., Janson. A.M., Thole. J.E., Buhner. S., Bos, C., Soebono, H. and de Vries, R.R. (1997) Humoral and cellular immune reactivity to recombinant *M.leprae* antigens in HLA-type leprosy patients and healthy controls. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 65 (2): 178-189