

11262 7

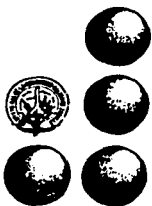


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Expresión del Factor de Crecimiento transformante beta (TGF_β) en sus tres isoformas y sus receptores y cicloxigena 2 en lesiones cutáneas de lepra humana.

T E S I S
Que para obtener el título de:
Maestría en Ciencias Médicas
P R E S E N T A:
Ana Elisa Costa Kiszewski



INNSZ

Ciudad Universitaria, México, D.F.

Noviembre del 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
" SALVADOR ZUBIRÁN"**

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS – SEDE CU

**EXPRESION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA
(TGF β) EN SUS 3 ISOFORMAS Y SUS RECEPTORES Y CICLOOXIGENASA 2
EN LESIONES CUTANEAS POLARES DE LEPROA HUMANA.**

Anteproyecto de tesis que presenta

Ana Elisa Costa Kiszewski

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Médicas

Tutor: Rogélio Hernández Pando - Jefe del Servicio de Patología Experimental – Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán". Investigador Nacional "B", SSA.

Co-Tutores:

Dr. Ramón Ruiz Maldonado – Investigador Nacional "C", SSA – Servicio de Dermatología – Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Pedro Gutiérrez Castellón - Jefe del Departamento de Metodología de la Investigación. Instituto Nacional de Pediatría.

**MEXICO
2002**

AGRADECIMENTOS

A MI QUERIDA FAMILIA

A CLAITON BAU

A MIS TUTORES ROGELIO HERNANDEZ PANDO, RAMON RUIZ MALDONADO
Y PEDRO GUTIERREZ CASTRELLON
POR SUS SUGESTIONES Y CRITICAS FUNDAMENTALES PARA EL
DESARROLLO DE ESTE TRABAJO

AL DR VICTOR RIOS BARRERA
POR LA AYUDA EN LOS TRAMITES DE LA MAESTRIA EN MI AUSENCIA DE
MEXICO

A MIS AMIGOS MEXICANOS
POR LOS MOMENTOS ALEGRES QUE COMPARTIMOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
POR EL APOYO ECONOMICO

AL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DEL INSTITUTO
NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA NUTRICION "SALVADOR
ZUBIRAN"
POR HABER FINANCIADO MI PROYECTO

INDICE

1	Antecedentes	pág.5
1.1	História	pág.5
1.2	Generalidades	pág.6
1.3	Epidemiología	pág.7
1.4	Agente etiológico	pág.9
1.5	Aspectos clínicos de la lepra	pág.10
1.6	Histopatología de la lepra	pág.12
1.7	Relación clínico-patológica	pág.15
1.8	Reacción de lepromina	pág.16
1.9	Respuesta Th1 y Th2	pág.16
1.10	Th1 y Th2 en lepra	pág.17
1.11	Factor de crecimiento transformante β y sus receptores	pág.19
1.12	El sistema ciclooxygenasas-prostaglandinas	pág.21
2	Justificación para el estudio	pág.24
3	Objetivos	pág.25
3.1	Objetivo general	pág.25
3.2	Objetivos específicos	pág.25
3.3	Objetivo secundario	pág.25
4	Material y Métodos	pág.25
4.1	Población estudiada	pág.25
4.2	Diseño del estudio	pág.26
4.3	Procedimiento	pág.26
4.4	Variables del estudio y mediciones	pág.28
4.5	Cálculo del tamaño de la muestra	pág.28
4.6	Análisis de concordancia	pág.29
4.7	Análisis estadístico	pág.30
4.8	Financiamiento del proyecto	pág.30
4.9	Consideraciones éticas del estudio	pág.31
5	Resultados	pág.32
5.1	Tipos celulares positivos en la inmunohistoquímica	pág.32
5.2	Análisis morfométrico	pág.34

6	Discusión	pág.38
7	Conclusiones	pág.41
8	Tablas	pág.42
9	Gráficas	pág.49
10	Bibliografía	pág.53
11	Anexo1 (AFB – Índice de bacilos ácido-resistente)	pág.61
12	Anexo 2 (Complemento de la clasificación histopatológica de Ridley)	Pág.62
13	Anexo 3 (Método ABC)	pág.64
14	Anexo 4 (Método de rt-PCR)	Pág.66
15	Fotos	

1- ANTECEDENTES

1.1- HISTORIA

Aun que no se conoce la fecha exacta del surgimiento de la lepra (o enfermedad de Hansen) en el mundo, evidencias apuntan que la referencia más antigua data del año de 1500 antes de la era cristiana, en la India, donde era conocida como *kushtha*. Subsecuentemente, la lepra fue llamada de *uchedu* en Egipto por el año de 1300 AC -1000 AC, de *tsaraath* en Israel (782 AC -732 AC) y de *lain ping* en la China entre 281AC- 341AC (1).

Las descripciones clínicas más antiguas compatibles con la lepra fueron encontradas en la India y China y datan del siglo quinto antes de Cristo (1, 2). Constan de descripciones de hiperestesia, anestesia y deformidades, así como ulceraciones cutáneas, pérdida de los dedos y amputación de la nariz (1).

Hay indicios de que la lepra fue introducida en Italia en el siglo primero antes de Cristo, por soldados romanos que retornaron a ciudad de Pompeya, después de luchar en Egipto. La enfermedad se diseminó por Europa en la Edad Media, alcanzando un número elevado de infectados en la época de las cruzadas. Las víctimas de lepra fueron tan numerosas que la enfermedad era considerada altamente contagiosa, criándose centenas de leprosarios para la protección de la población. El primer leprosario fue fundado en Nottingham, Inglaterra (625DC - 638 DC); seguido por el de St Gallen en Suiza (720), Palencia en España (1067), Bergen en Noruega (1400), Cullion en Filipinas (1906) y Japon (1907). El miedo de contraer lepra era tan grande que Philip IV (1285-1312), rey de Francia, ordenó recoger y quemar todas las personas con lepra hasta la erradicación de la enfermedad (1). En esta pandemia europea empezó el tratamiento deshumanizado sufrido por las víctimas (2). Los afectados eran excluidos de la sociedad, escuela, trabajo y familia, desde el diagnóstico hasta la muerte (3).

La lepra parece haber sido introducida en las Américas entre los siglos XVI y XVIII, por medio de los conquistadores europeos y del comercio de esclavos.

Por razones no bien comprendidas, pero probablemente relacionadas a la mejoría de los servicios de salud y educación, la lepra sufrió un declinamiento en Europa

apartir del siglo XV. Sin embargo, al final del siglo XIX, la lepra todavía era endémica en Noruega y en algunas áreas del Mediterráneo. Fue en Noruega, en 1873, que el Dr. Gerhard Armauer Hansen descubrió el bacilo, empezando la leprología científica y la enfermedad pasó a ser conocida de forma alternativa con el nombre de enfermedad de Hansen (2).

A través de los siglos la lepra ha permanecido como una enfermedad temible con severas repercusiones sociales para los que la padecen. Hasta la II Guerra Mundial, ningún tratamiento efectivo era conocido y las autoridades sanitarias mantenían sanatorios aislados para prevenir la diseminación de la enfermedad (4). En 1941, Faget en los Estados Unidos fue el primero en utilizar un derivado de la dapsona (*Promin*) por vía intravenosa para el tratamiento de la lepra. Cochrane utilizó el mismo medicamento en forma intramuscular en la India en 1946 y en 1947, pero fue Lowe quien introdujo la dapsona (DDS - damino difenilsulfona) oral en Nigeria. A partir de 1950 la droga se convirtió en la base del tratamiento de la lepra. Se esperaba que los pacientes fueran curados y la lepra sería erradicada. Sin embargo, eso no sucedió. En 1960 se tornó claro que los pacientes recidivaban después de un tratamiento largo y regular, en 1970 la resistencia a la dapsona se tornó un problema real (4). El régimen de tratamiento con múltiples drogas fue introducido en 1982 por la Organización Mundial de la Salud (5). A partir de entonces los esquemas han sido cambiados y el último consenso de la OMS en 1998 (6) concluyó que el tratamiento para la lepra paucibacilar (PB) debería ser de una dosis única de la combinación de rifampicina, ofloxacina y minociclina y el tratamiento de la lepra multibacilar (MB) debería ser con el esquema convencional de rifampicina, dapsona y clofazimine, pero la duración del tratamiento se reduciría de 3 años para 1 año. Con eso la OMS propuso la erradicación de la lepra en el inicio del siglo XXI, pero esto tampoco sucedió (7).

1.2- GENERALIDADES

La lepra o enfermedad de Hansen es una enfermedad granulomatosa crónica

causada por *Mycobacterium leprae* que afecta principalmente los nervios periféricos, la piel y las mucosas de las vías respiratorias superiores; secundariamente afecta ojos, hígado, testículos, músculos y huesos (6). Es un problema epidemiológico importante, que afecta varios millares de personas en el mundo, con un importante peso en la salud y economía en los países en desarrollo. A pesar de la terapia antibacilar aparentemente curativa, aproximadamente 1/3 de los pacientes tendrán déficit neurológico permanente (6, 8).

La lepra es de importancia particular para los médicos debido a la diversidad de reacciones del hospedero. Ella representa un desafío para el diagnóstico y también es de interés de los inmunólogos, pues esta enfermedad aporta un modelo para la comprensión de la respuesta inmune celular en humanos (1).

1.3- EPIDEMIOLOGÍA

Aunque la distribución de la lepra sea mundial, predomina en regiones tropicales, subtropicales y en países del tercer mundo donde las condiciones económicas e higiénicas son precarias.

La enfermedad es de amplia diseminación, siendo el problema más frecuente en África Central y el Sudeste Asiático; en América, la enfermedad es endémica en todos los países, con excepción de Chile, pero su frecuencia es menor que en Asia y África (9).

La lepra continua siendo un problema significativo en los países en desarrollo, con 752,417 casos registrados en el mundo en el año de 2000, comparado con 1.2 millones en 1995. La lepra es altamente prevalente en el sudeste asiático (incluyendo India, Filipinas y Corea), en el sur de China, Nueva Guinea y algunas islas del Pacífico. La mayor parte de los casos (números absolutos) reportados en América se originan en 5 países: Brasil, Colombia, México, Argentina y Venezuela, pero otros países de Centroamérica y Sudamérica también son afectados (1,10,11,12).

En 1991, la OMS (WHO) propuso un plan para la eliminación de la lepra como

problema de salud pública para el año 2000, siendo esa eliminación definida como una prevalencia menor a 1 para 10,000 personas (13). El plan de eliminación de la lepra en América, implementado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), ha llevado a una reducción promedio del 30% del problema; en 1991 se informó que el total de casos fue de 322,186 y para 1993 fueron 219,737 casos totales (14).

En 1995, 5 países – India, Brasil, Bangladesh, Indonesia y Myanar – contaban con 76% del número total de casos en el mundo (8).

Aún con los esfuerzos de la OMS, la lepra continúa siendo un problema de salud pública en 24 países. En enero del año 2000, la tasa de prevalencia en los 11 principales países endémicos era todavía de 4.1 por 10,000. India mantenía una prevalencia de 5.0 por 10,000 y 73% de la detección mundial (14).

En América, el mayor problema está en Brasil, con una prevalencia de 4.3 por 10,000 habitantes, seguida por Surinam con una prevalencia de 2.3 por 10 000 en enero de 2000 (7).

En México, la endemia es considerada poco intensa con relación al panorama mundial, aunque se sigue estimando como problema de salud pública. La tasa de prevalencia en 1991 y en 1993 fue de 1.85 y 1.06 por cada 10,000 habitantes, respectivamente; en 1994 existía un total de 9 532 casos registrados, con una tasa igual a la de 1993 (11). En enero de 2000 había un total de 2,318 casos registrados (7).

Un importante problema a considerar es que la reducida prevalencia puede ser resultado de esquemas de tratamientos cortos y de la eliminación de registros y no de una reducción en la incidencia. De hecho, la incidencia mundial ha cambiado poco y permaneció en torno de 500,000 a 800,000 casos detectados/año (4). Sin embargo, la OMS ha utilizado el registro de prevalencia como el principal indicador del proceso de monitorización por las dificultades operacionales en la medidas de incidencia (15).

Varios artículos enfatizan que la política para el control de la lepra no debe detenerse con el cumplimiento de la meta de eliminación propuesta por la OMS

(prevalencia menor de 1: 10,000 personas) (4,15). Acreditar que la lepra está casi erradicada y desactivar los servicios públicos de salud para su control produciría un aumento súbito de la prevalencia, como ocurrió recientemente con la tuberculosis. Además la historia nos enseña que la erradicación de infecciones micobacterianas tales como la lepra es improbable solamente con la quimioterapia (16).

La enfermedad se presenta en todas las edades. Sin embargo, las tasas de incidencia tienen un máximo entre los 10 a 20 años de edad y los índices de prevalencia lo alcanzan entre los 30 a 50 años. Tanto la incidencia como la prevalencia general de lepra son más elevadas en los hombres que en las mujeres, en la proporción de 2 a 1 (12).

Generalmente el contacto prolongado y cercano a un enfermo es requerido para la transmisión de la enfermedad. La vía de infección más importante del *M. leprae* es la respiratoria, particularmente la nariz y la diseminación a través de lesiones cutáneas parece ser menos importante (15), aunque hay controversia (17). Además, es conocido que los pacientes más infectantes son los afectados por lepra lepromatosa vírgenes al tratamiento, pues tendrán millones de bacilos en la secreción nasal y también bacilos viables en las secreciones de heridas abiertas. El tiempo de incubación para la lepra tuberculoides es de más de 5 años y puede ser de 20 años o más para la lepra lepromatosa, aunque se han reportado periodos de incubación en el rango de 6 meses a varias décadas (1). Se asume que *M. leprae* no es muy patógeno y la mayor parte de las infecciones no resultan en síntomas. Además, los síntomas tempranos de la lepra pueden autolimitarse y las lesiones cutáneas cicatrizar espontáneamente (15). Los autores concuerdan que el factor crucial en el proceso de infección de la lepra es la respuesta inmune del huésped (15).

1.4- AGENTE ETIOLÓGICO

El *M. leprae* pertenece al género *Mycobacterium*, que se caracteriza por resistir a

la decoloración con el alcohol ácido de la tinción de Ziehl-Nielsen y teñirse de color rojo intenso. Su morfología es de un bacilo recto o ligeramente curvo, que mide de 4 a 7 μ de largo por 0,3 a 0,4 μ de ancho (1, 18). El microorganismo es de vida intracelular obligada y reside dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos de la piel y células de Schwann de nervios periféricos. Dentro de estas células tienden a agruparse en masas compactas conocidas como *globias*, que pueden contener 50 o mas bacilos cada una. Hasta el momento no se ha logrado cultivar in vitro, por lo que ha sido necesario recurrir a modelos experimentales para su abasto y estudio (1).

1.5- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA LEPROSIS

El sistema de clasificación de la leprosis mas conocido es el descrito por Ridley y Jopling en 1966, basado en los aspectos clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e inmunológicos de la enfermedad, dividiendo el espectro clínico de la enfermedad en 5 grupos (LL, BL, BB, BT, TT) (19). En 1974, el mismo autor (Ridley) propuso una clasificación histológica basada en los hallazgos histológicos de biopsias de piel. Describió con detalles los hallazgos histológicos encontrados para cada una de las 5 formas propuestas anteriormente, pero agregó un sexto grupo: la leprosis indeterminada (20). Entre las ventajas de esta clasificación está la aplicabilidad a todos los grupos étnicos e incluso a leprosis experimental en animales y la muy buena concordancia entre patólogos que utilizaron este sistema de clasificación (20).

En la clasificación propuesta, las formas polares se encuentran en los extremos del espectro, una de las cuales se designa forma benigna o leprosis tuberculoide (TT) y la otra forma, maligna o leprosis lepromatosa (LL); ambos polos son clínicamente estables. Los estadios intermedios se sitúan entre las formas polares y se definen con base a su similitud a estas, constituyendo 3 entidades clínicas: una central denominada leprosis dimorfa o borderline (BB), una mas cercana al polo TT llamada tuberculoide limitrofe o tuberculoide borderline (BT) y otra cercana al polo LL, denominada lepromatosa limitrofe o lepromatosa

bordeline. Las formas intermedias son clínicamente inestables y pueden desplazarse dentro del espectro. La lepra indeterminada (LI) está considerada como la forma inicial de la enfermedad y punto de partida hacia las demás.

La TT es la forma localizada de la enfermedad. Los pacientes presentan una o pocas lesiones de la piel con anestesia profunda y puede haber un engrosamiento de los nervios periféricos vecinos. La lesión primaria en la lepra TT es una placa, que seguidamente asume una configuración anular con propagación periférica y más clara en el centro. Típicamente la lesión es firmemente endurecida, elevada, eritematosa, hipopigmentada, anidrótica, alopecica y anestésica. La respuesta inmunológica es adecuada (20).

La LL es la forma diseminada y anérgica de la enfermedad. Hay un gran número de bacilos en prácticamente todos los tejidos como sangre, piel, nervios, hígado, bazo, músculos, testículos y médula ósea. Los nódulos o lepromas pueden contener hasta 10^{10} bacilos/g de tejido. En las secreciones de pacientes LL como leche materna, orina y semen, también pueden encontrarse abundantes bacilos (21). Las lesiones de piel, que son múltiples y generalmente con distribución simétrica, pueden ser difusas (LL difusa) o nodulares (LL nodular) (21,22).

La lepra borderline exhibe rasgos tuberculoides y lepromatosos, a menudo con prevalencia de uno u otro (20,23). En la lepra borderline tuberculoides (BT) las lesiones cutáneas primarias son placas y pápulas. Al igual que en la forma TT, la configuración anular es común, pero las lesiones anulares pueden presentar pápulas satélites. La hipopigmentación puede ser sospechosa en pacientes de piel oscura. En contraste con la forma TT, típicamente hay poca o ninguna escama y menos eritema, menos induración y menos elevación, pero las lesiones pueden tornarse mucho mayores (más de 10 cm en diámetro), con una única lesión afectando a veces toda una extremidad. Las lesiones en general son múltiples y asimétricas (2). En la lepra borderline (BB), las lesiones cutáneas se caracterizan por lesiones anulares con bordes marginados, placas grandes con islas de piel normal en su interior (aspecto de queso suizo), o la clásica lesión dimórfica. Esta última se caracteriza por una placa elevada y

endurada de configuración anular pobremente marginada en su borde externo (al igual de la forma lepromatosa), pero con una margen interna bien definida (al igual de la forma tuberculoide). En la lepra bordeline lepromatosa (BL), la expresión clínica es muy variable siendo que 1/3 de los pacientes presentan la típica lesión dimorfa, pero también pueden presentar la variaciones en aspecto de "queso suizo" y lesiones anulares con margen exterior e interior bien definidas. Además, al igual que en la LL, pápulas pobremente definidas y nódulos pueden ser numerosos pero son acompañadas de lesiones marginadas en algún lugar. Las lesiones varían de solitarias a múltiples y diseminadas. De forma general, las lesiones anulares y en placas son asimétricas y los nódulos son simétricos. Las lesiones cutáneas son en general hiperestésicas o anestésicas pero no necesariamente. La lepra indeterminada es un término utilizado para una lesión temprana donde la respuesta inmunológica todavía no se ha definido. Clínicamente, se caracteriza por una mácula hipopigmentada, con o sin déficit sensorial. Tales pacientes en general evolucionan a la forma BL, pero ocasionalmente también evolucionan a la forma LL.

1.6- HISTOPATOLOGÍA DE LA LEPROA

La revisión que sigue de los aspectos histopatológicos de la lepra fueron basadas en las descripciones de Ridley (20), de Binford & Mayers (24), de Lever (25) y de Rea & Modlin (2).

I- Lepra Lepromatosa

En la lepra lepromatosa, las lesiones tempranas muestran proliferación de macrófagos (histiocitos) alrededor de los vasos sanguíneos, nervios y apéndices dérmicos. A medida que las lesiones progresan, los macrófagos se tornan repletos de *M. leprae* y pueden eventualmente sustituir y engrosar la dermis (Binford y Meyers). Aun que el infiltrado pueda ser masivo, una pequeña zona clara, subepidérmica y no involucrada es identificada inmediatamente abajo de la capa basal y es conocida como "*Banda de Unna*". Los macrófagos infectados son

sostenidos por un delicado estroma y la lesión está irrigada por una red de capilares. Los macrófagos viejos infectados desarrollan vacuolas lipídicas y presentan el aspecto espumoso. Tales macrófagos caracterizan la lepra lepromatosa y son llamados células de Virchow. En el desarrollo de las lesiones los bacilos frecuentemente se encuentran dispuestos agrupados paralelamente. Más tarde, las globias pueden sustituir completamente el citoplasma. Cuando la pared de una célula infectada degenera, los bacilos liberados pueden coalescer y formar grandes masas de bacilos (globia gigante) cercados por una célula gigante. En la lepra lepromatosa, muchos bacilos están dentro de pequeños nervios dérmicos que por otro lado son normales. Ellos también invaden las células endoteliales de los capilares y de los vasos sanguíneos mayores, paredes de vasos sanguíneos, músculos piloerectores y células epiteliales del folículo piloso. El *M. leprae* es la única micobacteria que regularmente invade los nervios. En la lepra lepromatosa, los macrófagos y células de Schwann adentro de los nervios contienen bacilos y el aumento de células infectadas puede eventualmente aumentar los fascículos y destruir las fibras nerviosas.

II - Lepra Tuberculoide

En la lepra tuberculoide la mayor característica es la infiltración de células epitelioides y linfocitos en cordones o en racimos. Células gigantes tipo Langhans pueden estar presentes. Usualmente el infiltrado de la dermis superior de la lepra tuberculoide se extiende hasta adentro del estroma papilar y hace contacto con las células basales de la epidermis, con ausencia de la banda de Unna. Extenso infiltrado de células epitelioides y mononucleares en los nervios dérmicos es una característica particular de la lepra tuberculoide. Células de Schwann pueden estar infectadas. Los bacilos usualmente se encuentran dentro de los restos de las fibras nerviosas. En algunos cortes la visualización de muchos campos es requerida en la búsqueda de un único bacilo. La proliferación de células epitelioides y mononucleares puede destruir las bandas nerviosas completamente. De hecho, en algunas biopsias de lesiones tuberculoideas

antiguas no se observan los nervios.

III- Lepra Borderline

En la lepra borderline, un único corte puede mostrar macrófagos con bacilos y agregados de células epitelioideas. Los nervios pueden revelar grados variados de infiltración celular intraneural y frecuentemente contienen bacilos. Los bacilos pueden ser escasos o numerosos dependiendo respectivamente del predominio de características tuberculoide o lepromatosa.

IV- Lepra Indeterminada

En la lepra indeterminada, el histopatólogo puede ser capaz de diagnosticar solamente una discreta dermatitis crónica inespecífica. Hay un mínima infiltración inflamatoria en los pequeños vasos sanguíneos o apendices. Todos los pequeños nervios deben ser examinados en búsqueda de bacilos, aunque no es óbvía la reacción inflamatoria intraneural. En estas lesiones tempranas, pocos bacilos pueden estar en el infiltrado o adentro de las fibras del músculo liso. El diagnóstico histopatológico de una lepra indeterminada no puede ser hecho sin la demostración de los bacilos.

Principios de la clasificación histológica (propuesta por Ridley)

En la clasificación de Ridley, cinco características histológicas demostraron tener correlación con la inmunidad y la clasificación clínica. El primero y el último poseen un mayor peso cuando utilizamos un valor numérico: (I) Tipo celular del granuloma; (II) Carga bacilar; (III) Linfocitos; (IV) Nervios y (V) Epidermis y zona subepidérmica.

Definición de los grupos: (reproducibilidad de 95%)

TT – Granuloma de células epitelioideas con un significativo número de linfocitos y evidencia de respuesta tisular hiperreactiva. a) profunda y extensa erosión de la epidermis; o b) caseación central de fibras nerviosas en la dermis; o c)

importante aumento en tamaño de las fibras nerviosas (más de 400 μ m en diámetro) circundado por una zona de linfocitos; o d) células gigantes combinadas con la ausencia de zona subepidérmica clara. AFB 0-1+.

BT- Granuloma de células epitelioides añadido a la presencia de células gigantes o moderado número de linfocitos o ambos (pero no ambos en la ausencia de zona subepidérmica clara. No hay respuesta tisular hiperreactiva. Las células gigantes son típicamente más del tipo cuerpo extraño que del tipo Langhans. Los nervios pueden estar moderadamente edematizados por el granuloma o mostrar solamente proliferación de células de Schwann. AFB 0- 2^{1/2}+ .*

* (ver anexo 1 – AFB (Índice de bacilos ácido-resistente)

BB- Granuloma de células epitelioides sin células gigantes y solamente escasos linfocitos distribuidos difusamente. La zona subepidérmica es clara. Los nervios no están muy edematizados por el granuloma y puede ser normal; puede mostrar laminación del perineurio, con infiltración de células epitelioides. AFB 3-4^{1/2}+.

BL- Granuloma de macrófagos con: a) números linfocitos densamente organizados en por lo menos 1 segmento del granuloma; y/o b) un ocasional pequeño grupo de células epitelioides (menos común). Hay algunos cambios espumosos pero no grandes vacuolas. La zona subepidérmica es clara. Los nervios comúnmente muestran perineurio piel-cebolla con alguna infiltración celular. AFB 4-5^{1/2}+.

LL- Granulomas de macrófagos sin células epitelioides y no muchos linfocitos. Cambios espumosos variables. Zona subepidérmica clara. Nervios muestran perineurio con piel-cebolla sin mucha infiltración o normal. AFB 5-6^{1/2}+.

1.7- RELACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

En un estudio de concordancia clínico-histopatológica, Singh y cols (26) examinaron 111 biopsias de pacientes con diagnóstico clínico de lepra utilizando

2 diferentes escalas clínicas (criterios de Ridley-Jopling y criterios de la Organización Mundial de la Salud) y una escala de clasificación histopatológica (criterios de Ridley). Las biopsias mostraron evidencia de lepra en 104 de los 111 pacientes (93.69%). La concordancia entre la clasificación histológica y la clasificación clínica varió de acuerdo a la escala clínica utilizada: para la escala de Ridley fue de 58.6% y para la escala de la OMS fue 85.6%. La prueba de kappa mostró una concordancia significativa entre el diagnóstico histopatológico y clínico ($Z=11.77$, $P<0.001$). Además al combinar los subtipos la concordancia varió del 72.5% al 100% (42). En otro estudio, Porichha et al (27) analizaron 482 biopsias de piel de pacientes con lepra con diferentes formas clínicas y encontraron que 72.2% de las biopsias tenían histología con diagnóstico definitivo de lepra, 14.1% diagnóstico sugestivo y los restantes 13.7% que no tuvieron evidencia histológica de lepra correspondían en su mayoría a biopsias de lesiones resueltas.

1.8- REACCIÓN DE LEPROMINA

La prueba de lepromina fue introducido por Mitsuda en 1919. Se realiza una intradermorreacción con micobacterias (*M. leprae*) obtenidas de nódulos lepromatosos y muertas por el calor. La reacción se caracteriza por una reacción papulo-nodular en el sitio de la inyección que alcanza su máximo en 3 a 4 semanas (reacción de Mitsuda) (2). La prueba sirve para clasificar los pacientes con BL y LL como no reactivos (induración menor a 3mm al 21º día), pero pacientes con BT y TT tienen una reacción positiva (\geq a 3mm) (25). La prueba indica la habilidad del paciente en montar una respuesta inmunológica específica mediada por células para los antígenos de *M.leprae* (1).

1.9- RESPUESTA TH1 Y TH2

La inmunidad protectora anti-micobacteriana depende de la coordinación de la actividad de linfocitos y macrófagos. Los macrófagos matan y degradan las

micobacterias ingeridas y sintetizan y secretan citoquinas como interleucina (IL) 1, IL6, IL12 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Además, los macrófagos exponen una diversidad de epitopes microbianos en sus membranas celulares en el contexto de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)-I o MHC-II (Rojas-Espinosa). Estos epitopes expuestos en la membrana de macrófagos son reconocidos por células T cooperadoras o helper (Th), las cuales bajo la influencia de factores derivados de macrófagos, proliferan y secretan citocinas (1,27). Dependiendo de la reacción de las células T, la respuesta resultante puede ser humoral, mediada por células, citotóxica o supresiva. La activación de células T helper 1 (Th1) induce la proliferación y secreción de un conjunto de factores que incluye el interferon γ (INF γ), IL2 y IL12, mientras que la activación de células TH2 resulta en la proliferación y secreción de IL4, IL5, IL6, IL10 y otras citoquinas (28,29,30,31). *In vitro*, el INF γ suprime la proliferación de células Th2 (32), mientras que IL4 y IL10 inhiben las células Th1 (30). La IL12 derivada de macrófagos es clave como molécula co-estimuladora de las células TH1, pues estimula ellas a sintetizar INF γ y otras citocinas.

El INF γ estimula la síntesis de Factor de Necrosis Tumoral (TNF) α por los macrófagos, este factor induce a los macrófagos a producir óxido nítrico, un potente metabolito citotóxico, capaz de matar los microorganismos intracelulares fagocitados, incluyendo el *M. leprae* (33). Por otro lado, las citocinas secretadas en un perfil de tipo TH2 (IL4, IL6, IL10) estimulan las células B a la producción de altos niveles de anticuerpos, específicamente de Inmunoglobulinas IgG-1 e IgE (34). La inmunidad humoral es generalmente protectora contra microorganismos extracelulares, pero no protege contra microorganismos intracelulares como es el caso de la *M. leprae*.

1.10- TH1 Y TH2 EN LEPROSIS

Varios investigadores han estudiado las citocinas que expresan las células T en ambas sangre y lesiones de pacientes con lepra LL y TT. Se piensa que las citoquinas juegan un papel inmunoregulatorio en ambos protección del huésped e

inmunopatogenesis de la enfermedad.

Es bien conocido que la producción local de citoquinas es diferente en lesiones lepromatosas de aquellas de la lepra tuberculoide (35,36). Las lesiones de lepra tuberculoide tienen un predominio en la respuesta de tipo Th1 con altos niveles de producción de IL2, Interferon γ , IL12 y TNF- α . En contraste, IL4, IL5 y IL10 predominan en la lepra lepromatosa, consistiendo en una respuesta de tipo Th2 (35,36,37,38,39,40). Los trabajos más importantes que demostraron estos resultados fueron los de Yamamura (35) y Salgame (36). En el primero se utilizó la técnica de RT-PCR para estudiar las citoquinas traducidas de lesiones de lepra TT, donde se encontró alta expresión de INF γ y bajos niveles de IL4 (35). En el trabajo de Salgame y cols se aislaron clones de células T CD8+ en lesiones de lepra BL que inhibieron la respuesta proliferativa de células CD4+ al *M.leprae*. Estas células T CD8+ produjeron predominantemente IL4 y IL5, característica de una respuesta de tipo Th2 (36). De forma similar, en modelos experimentales de tuberculosis murina se identifica durante la fase de infección crónica una disminución de la expresión de IL1 y TNF α contrastando con la aparición de niveles elevados de TGF β (41,42). Además, el desarrollo de ratones *knock out* ha permitido establecer una clara asociación entre protección y la producción de citocinas de tipo 1 (43,44). Por lo anterior, se acepta que en la lepra TT la inmunidad celular es más eficiente que la inmunidad humoral y que las células Th1 inhiben la activación de células Th2. En contraste, para la lepra lepromatosa polar LL, la inmunidad celular específica es completamente ausente, mientras que la inmunidad humoral es elevada (1).

Muchos investigadores han tratado de interferir en este perfil inmunológico, buscando como resultado de esta modulación, la transformación de la forma diseminada de la enfermedad en la forma autolimitada. Citoquinas recombinantes y INF γ han sido utilizadas en la regulación experimental de la LL, con algún grado de éxito (1). En 1986, Nathan y cols inyectaron intradermicamente 1-3 μ g de INF γ recombinante por un periodo de 3 días adentro de una lesión única de piel en 6 pacientes con LL y 6 días más tarde colectaron biopsias de piel para estudio

histopatológico (45). El INF γ recombinante indujo cambios en las características locales de la respuesta inmune celular, incluyendo infiltración por células mononucleares, disminución de las células de Langerhans, aumento de la expresión de HLA-DR y en algunos casos reducción del número de bacilos intralesionales. En un estudio similar, en 1997, con 7 pacientes con LL, se inyectaron varias dosis de IL2 en cinco lesiones del dorso. Veintiun días más tarde, se observó el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada, incluyendo eritema e induración, infiltrados ricos en células CD4+, monocitos, células de Langerhans y granulomas epitelioides en los sitios que recibieron altas dosis (150 μ g) de IL2 recombinante (46). En otro trabajo con un modelo inmunológico similar, el IL12 recombinante redujo la parasitemia y aumentó significativamente la supervivencia de ratones infectados por 2 diferentes cepas de Plasmodios (47,48). Estas observaciones han despertado interés en la posibilidad de terapia coadyuvante con agentes inmunomoduladores y podría ser crucial para el desarrollo futuro de vacunas no solo para la lepra pero también para otras enfermedades que tengan el mismo modelo inmunológico, como es el caso de la tuberculosis, leishmaniasis, toxoplasmosis, malaria, micetomas y otras (41,42,43,49,50,51).

Por lo tanto, resulta importante determinar cuales son los agentes moleculares que están disregulando la respuesta inmunológica de tipo 1 (además de las mencionadas anteriormente), guiándola hacia un perfil de tipo 2, con la finalidad de poder manipularlos y restablecer un perfil inmunológico protector, el cual podría coadyuvar con la disminución del tiempo de tratamiento con drogas antifúngicas. Entre los agentes moleculares que disregulan a la respuesta inmunológica de tipo 1, guiándola hacia la Lepra Lepromatosa, podríamos considerar el TGF β y las prostaglandinas.

1.11- FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF- β) Y SUS RECEPTORES

Desde que se describió por primera vez la capacidad del TGF- β en inhibir la

activación macrafágica, se ha analizado su papel en la regulación de la respuesta inmune. Se le ha estudiado en una variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo virus, bacterias, protozoarios y levaduras. La mayor parte de esos estudios han involucrado microorganismos que infectan macrófagos (52). Los parásitos intracelulares de macrófagos tienden a inducir la producción de citocinas por el macrófago, como o TGF- β y la IL-10, evitando así ser completamente eliminados parásitos y huésped (52).

El TGF- β es un importante regulador de la inflamación, siendo proinflamatorio en bajas concentraciones y antiinflamatorio en elevadas concentraciones. Este factor consiste de una proteína dimérica con peso molecular de 25 kDa y es producido por una amplia variedad de células, incluyendo macrófagos, células "Natural Killer" (NK), células B y T (51). Descubierta en 1978, el TGF- β fue llamado "factor de crecimiento de sarcoma". De este péptido se conocen 5 isoformas, en los mamíferos existen 3 de ellas: las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Las 3 isoformas de TGF β están codificadas en cromosomas distintos en el humano como sigue: TGF- β 1 en 19q13, TGF- β 2 en 1q41 y TGF- β 3 en 14q24. Todas las isoformas del TGF- β se sintetizan como precursores diméricos, que se secretan en el medio extracelular como sus formas inactivas, de las cuales se originan las formas activas maduras (53,54,55,56,57,58,59).

El TGF- β utiliza receptores con actividad de cinasa, los cuales detectan la presencia del TGF- β en la superficie celular, iniciando con ello una serie de fosforilaciones que son mediadores bioquímicos de las respuestas celulares inducidos por el TGF- β (58,59,60). Se conocen por lo menos 3 diferentes tipos de receptores para TGF- β : T β -RI, T β -RII, T β -RIII. Los receptores de TGF- β tipo I y II son receptores de señalización de TGF- β (58,59,60,61). La secuencia de aminoácidos derivadas del cDNA de los receptores tipo I y II reveló que son proteínas con una región transmembranal, otra extracelular localizada hacia el extremo amino y una citoplasmática localizada en el extremo carboxilo, esta última con secuencias que la definen como una cinasa de proteínas con especificidad para serinas y treoninas (58,60,61). La propagación intracelular de

la señal de TGF- β se inicia cuando TGF β -RII forma un complejo mediado por el ligando con TGF β -RI. Esta asociación permite al receptor II fosforilar los residuos de la región GS del receptor I, causando la activación de la cinasa del último (53,54,55,58,59,60,61). La cinasa activada del receptor 1 fosforila a miembros de la familia SMAD y forma un complejo que es capaz de activar transcripcionalmente genes inducibles por TGF- β (55,60). Existen en la superficie celular otras proteínas capaces de unirse al TGF- β con alta afinidad. Dos de estas proteínas, el receptor III, también llamado betaglicano y la endoglina, se clonaron y tienen papeles especiales dentro del sistema de receptores del TGF β (56,57,58,61). El papel del TGF β -RIII está en la regulación, pues es capaz de modular el exceso del factor a los receptores tipo I y II (56,57,58). Un aspecto importante es que su forma membranaral sirve como precursor de la forma soluble. De hecho, cuando se encuentra unido a la membrana es un potenciador de los efectos de TGF- β y cuando se encuentra de manera soluble es un antagonista de esos efectos (56,57,58).

Importantes propiedades pro-inflamatorias del TGF- β incluyen su habilidad en reclutar monocitos, células T y neutrófilos en el sitio de inflamación inicial de la infección, a través de la modulación de la expresión de moléculas de adhesión por células endoteliales, además de activar monocitos para que secreten IL-1, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF (factor de crecimiento fibroblástico), TNF y el propio TGF- β (control autócrino) (51,62). Sin embargo, en altas concentraciones, el TGF- β suprime la producción de TNF α y óxido nítrico (NO) a partir de macrófagos, e inhibe la producción de INF γ y TNF α a partir de células NK. Antagonismo de IL4, IL2 y IL12 por TGF- β también ha sido documentado (63). La habilidad del TGF- β en inhibir la actividad lítica de los macrófagos, por la supresión de la producción de factores que median radicales libres del oxígeno y nitrógeno, conduce a la progresión de la infección (51). En modelos experimentales, se ha demostrado que la liberación de TGF- β 1 durante la infección macrófágica resulta en la inhibición de sus actividades citotóxicas y co-estimula la proliferación de células CD8+ (62). Estes efectos pueden ser

aumentados por la regulación positiva ("*upregulation*") de IL10 derivada de macrófagos, eventualmente guiando la respuesta de tipo Th1 en dirección a Th2 (51).

1.12- EL SISTEMA CICLOOXIGENASAS-PROSTAGLANDINAS

Se reconoce a la ciclooxigenasa como la enzima que orquesta la producción de prostaglandinas (PGs). Dos isoformas enzimáticas han sido purificadas y clonadas: la ciclooxigenasa 1 (COX 1) y la ciclooxigenasa 2 (COX 2), las cuales poseen pesos moleculares similares (70Kda) (64). Estas enzimas se encuentran codificadas por dos secuencias génicas únicas, localizadas en cromosomas diferentes. La información genética de la COX2 está contenida en 10 exones y la secuencia de aminoácidos ya es conocida (64). El promotor contiene una caja TATA y muchos elementos regulatorios (65,66). En los diferentes microambientes COX2 se encuentra ausente en condiciones basales, pero su producción puede ser inducida en ciertas poblaciones celulares (polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células cebadas, células endoteliales) en respuesta a varios estímulos: mitógenos, citocinas, lipolisacáridos, hormonas, productos bacterianos, suero y transformación oncogénica (64,67). La COX2 está involucrada en la producción de PGs a través de la oxidación del ácido araquidónico y sus análogos. El ácido araquidónico está normalmente presente en las membranas celulares y conectado a fosfolípidos. El primer paso en la síntesis de PGs es la liberación del ácido araquidónico por la acción de la fosfolipasa A2. El ácido araquidónico puede, entonces, seguir 2 caminos, el de lipooxigenasa o de la ciclooxigenasa. La acción de esta última enzima crea un precursor de prostaglandina que dará origen a las prostaciclina, tromboxanos y a las prostaglandinas de la serie E (PGE) y F (PGF) (68). Dentro de las células productoras de PGE están los macrófagos, células dendríticas, fibroblastos y en el microambiente de linfocitos B y otros linfocitos (69,70). Medicamentos como la

aspirina, la indometacina y los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) actúan inhibiendo la ciclooxigenasa (68). Actualmente es conocido que las PGs tienen, además de acción pro-inflamatoria, una importante acción en la inmunidad (68). Se ha identificado un patrón de respuesta para las (PGE) y agentes que promueven un incremento en la concentración de AMPc intracelular, el cual está relacionado con una disminución drástica en la expresión de interleucinas del perfil tipo Th1 como el $IFN\gamma$ y la IL2, pero no afecta la producción de IL4 por las células Th2 (64,65,70,71,72,73,74,75,76,77). IL12 es considerada un mediador llave para direccionar la respuesta de células Th para un fenotipo Th2. PGE2 inhibe la producción de IL12 en cultivos de sangre total (78).

A nivel inmunológico, la síntesis de COX 2 es promovida por la presencia en el microambiente de citocinas proinflamatorias ($TNF\alpha$, $IL1\beta$) o la presencia de productos bacterianos (LPS) (79). En general la regulación negativa de sus síntesis es favorecida por la presencia en el microambiente de citocinas de carácter antiinflamatorio como IL4, IL10 y IL13 (73,74,80). Por otro lado, las prostaglandinas afectan negativamente la producción de $INF\gamma$. Esta inhibición reduce los efectos antagónicos de $INF\gamma$ en la producción de IL4 y IL1.

Estudios demostraron que el tratamiento de animales infectados crónicamente con micobacterias y leishmanias con bloqueadores de COX2 presentaron cambio en el perfil de interleucinas hacia el polo Th1, con mejoría clínica (70,81,82).

En suma, la expresión de COX2 estará aumentada en los casos en que los niveles de PGE2 estuvieren elevados. La PGE2 promueve el desarrollo de la respuesta Th2 por inhibición de la producción de citoquinas Th1, o que favorece a su vez la producción de citoquinas Th2. Por ese motivo, PGE2 tiene la capacidad de polarizar la respuesta hacia el perfil Th2.

2- JUSTIFICACIÓN PARA EL ESTUDIO

La lepra ha despertado el interés de inmunólogos, pues aportando un modelo para la comprensión de la respuesta inmune celular en humanos. Ya está bien descrito que en las formas crónicas de lepra que corresponden al polo lepromatoso predomina la respuesta de tipo Th2. Por otro lado, en el polo opuesto de lepra tuberculoide predomina la respuesta de tipo Th1, teniendo los pacientes una forma auto limitada de la enfermedad, con tendencia a la curación.

Por lo tanto, resulta importante determinar cuales son los agentes moleculares que están desregulando la respuesta de tipo 1, guiándola hacia un perfil de tipo 2. Entre los agentes moleculares moduladores de la respuesta inmunológica, podríamos considerar el TGF β y las prostaglandinas.

El TGF β está siendo estudiado actualmente como un inductor de la respuesta de tipo Th2 en modelos animales de tuberculosis murina. Por otro lado, la COX2 es una importante enzima en la producción de prostaglandinas que también han sido implicadas en la inducción de la respuesta de tipo Th2.

Es muy importante determinar la expresión de estos factores en las formas polares de lepra para la mejor comprensión del comportamiento inmunológico de esta enfermedad. Con eso, sería posible generar nuevos conocimientos acerca de la inmunopatogenia de esta enfermedad. Además, este trabajo de investigación podría abrir paso para que en el futuro se realicen ensayos clínicos con pacientes.

3- OBJETIVOS:

3.1- OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión de TGF β en sus 3 isoformas y sus receptores y COX2 en lesiones cutáneas de las formas polares de lepra humana.

3.2- OBJETIVO ESPECÍFICOS

Comparar la expresión de TGF β en sus 3 isoformas y sus receptores (a través del conteo de células positivas para el factor utilizando técnica de inmunohistoquímica) encontrado en lesiones cutáneas de lepra polar (lepromatosa y tuberculoide).

Comparar la expresión de COX2 (a través del conteo de células positivas a la inmunohistoquímica) encontrado en lesiones cutáneas de lepra lepromatosa polar y lepra tuberculoide.

3.3- OBJETIVO SECUNDARIO

Identificar por medio de rt-PCR otras posibles fuentes locales del factor transformante beta en la piel.

4- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1- POBLACION ESTUDIADA

Criterios de inclusión:

Biopsias de pacientes mexicanos originarios del Estado de Sinaloa diagnosticados como lepra polar (tuberculoide y lepromatosa) clasificadas de acuerdo a los criterios de Ridley (ver anexo 2).

Cualquier edad.

Pacientes vírgenes de tratamiento.

Criterios de exclusión:

Tejido mal conservado o dañado.

4.2- DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional, comparativo, transversal.

4.3- PROCEDIMIENTO

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Patología Experimental de Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Se buscaron los bloques de parafina que correspondían a biopsias diagnosticadas como lepra del Archivo de Patología (casos originarios del Estado de Sinaloa) y se hicieron cortes para las tinciones de Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen. Los bloques que no se presentaban como "casetes" fueron nuevamente incluidos, ya que el aparato electrónico de corte de 2 μ no acepta otro formato de bloque que no sea casete.

Se clasificaron los casos de lepra de acuerdo a la clasificación histológica (criterios de Ridley), utilizando para tal las tinciones de Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina.

La clasificación de las biopsias de lepra en polar lepromatosa o tuberculoide fue realizada por el Dr. Javier Vaquera, patólogo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y experto en patología de la lepra. Se realizó el análisis de concordancia de Kappa intraobservador después de pasados 6 meses de la clasificación de los 60 primeros casos. Para eso, fueron escogidos al azar 30 casos clasificados dentro del espectro histológico de la lepra que fueron nuevamente clasificados.

Después de la clasificación de 50% de los casos, se inició la titulación de los 7 diferentes anticuerpos en estudio hasta encontrar la titulación adecuada para el conteo de células positivas en piel. En los ensayos, la titulación varió de 1:50 hasta 1:400 (relación anticuerpo: Buffer). La titulación adecuada para cada anticuerpo fue determinada por el tutor principal de investigación.

Se hicieron cortes seriados de los bloques de parafina a un espesor de 2 μ y a seguir se realizó la inmunohistoquímica con los diferentes anticuerpos y titulaciones estandarizadas previamente. Se utilizó la técnica ABC (Avidina-

Biotina-Peroxidasa), utilizando diaminobenzidina como cromógeno y hematoxilina como tinción de contraste (método detallado en e anexo 3). Se realizaron 7 tinciones de inmunohistoquímica para cada caso estudiado: anticuerpos para TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, T β -RI, T β -RII, T β -RIII y COX2. Para los casos estudiados fueron hechos controles positivos y negativos como es de rutina en los procedimientos de inmunohistoquímica. Al final, se juntó 40 laminillas (cada laminilla es 1 caso), siendo 20 casos tuberculoides y 20 casos lepromatosos para cada anticuerpo. Siendo 7 los anticuerpos estudiados, el estudio totalizó 280 laminillas.

Análisis Morfométrico (conteo de células positivas): Para la cuantificación de las células positivas se utilizó el programa Leica Kwin Colour. Este consiste de un programa computarizado específico para el conteo de células marcadas en cortes histológicos montados en laminillas. La computadora es adaptada al microscópio por una fibra óptica. El conteo fue realizado bajo una magnificación de 400X. El campo analizado en este programa computarizado mide un área de 7177.6 μm^2 . Para el conteo se localizaron con magnificación de 200X las siguientes áreas: 1-dermis papilar, 2-dermis reticular, 3-dermis perianexial. Se cambió el aumento para 400X y se contaron las células positivas y negativas en los sitios anteriormente mencionadas. Las células positivas fueron las que estuvieron marcadas de color marrón (sea citoplasma o membrana celular de acuerdo al anticuerpo utilizado). Se realizó el conteo en quince campos por laminilla (5 campos para cada región mencionada). Al final, cada laminilla tuvo 15 campos analizados, poseyendo cada campo un número de células positivas y negativas en un total de células examinadas. Posteriormente se trabajó con porcentajes de células positivas. Por ejemplo:

Laminilla 1: Campo 1

10+ / 5- = 66.6%de células positivas

15 cél.total

Además del análisis morfométrico, realizamos rt-PCR para los receptores y moléculas del TGF β en muestras de piel lepromatosa y tuberculoide (con control de piel normal). La técnica del RT-PCR está detallada en el anexo 4.

4.4- VARIABLES DEL ESTUDIO Y MEDICIONES

Variables numéricas:

Porcentajes de células positivas en las siguientes tinciones de inmunohistoquímica:

TGF β 1

TGF β 2

TGF β 3

T β -RI

T β -RII

T β -RIII

COX2

Variables nominales:

Lepra lepromatosa polar - codificada como número 1 en la tabla de Excell.

Lepra tuberculoide polar - codificada como número 2 en la tabla de Excell.

4.5- CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para el cálculo de tamaño de muestra fue realizado un estudio piloto.

Para tal, se hizo la inmunohistoquímica con los anticuerpos para TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, T β -RI, T β -RII, y T β -RIII y COX2 en las titulaciones estandarizadas. El número de casos estudiados en el grupo piloto aparece abajo. Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó el programa EPISTAT (cálculo basado en diferencias de medias no pareadas). Analizamos los 3 compartimientos para cada anticuerpo y el número de casos utilizados para el cálculo varió de 10 a 20. Se utilizó un alfa de 0.05 y un poder de 90%. El mayor n necesario estimado fue de 13 casos en cada grupo para el RTGF β 2 en el compartimiento de la dermis

papilar. Ver detalles en la tabla 1. Así, decidimos utilizar un número de 20 casos lepromatosos y 20 casos tuberculoides en este estudio, ya que 20 fue el número de casos tuberculoides clasificados. Sin embargo, en algunos de los anticuerpos solo pudimos analizar 19 casos debido al agotamiento del material disponible.

Cálculo del tamaño de la muestra

	Localización	Nº de casos estudiados	Variancia (pool)	Menor diferencia entre medias	1-β=	α	n
TGFβ 1	reticular dermis	10 (5L+5T)	36.5	13	90%	0.05	6
TGFβ 1	papilar dermis	10 (5L+5T)	11	11.7	90%	0.05	1
TGFβ 1	periadnexial	10 (5L+5T)	29.9	7.8	90%	0.05	12
TGFβ 2	reticular dermis	10 (5L+5T)	69.2	22.9	90%	0.05	4
TGFβ 2	papilar dermis	10 (5L+5T)	99.2	17.7	90%	0.05	8
TGFβ 2	periadnexial	10 (5L+5T)	62.3	19.4	90%	0.05	6
TGFβ 3	reticular dermis	10 (5L+5T)	129.9	16	90%	0.05	12
TGFβ 3	papilar dermis	10 (5L+5T)	156.5	20.9	90%	0.05	9
TGFβ 3	periadnexial	10 (5L+5T)	47.4	13.3	90%	0.05	7
TGFβ-RI	reticular dermis	10 (5L+5T)	49.3	18.7	90%	0.05	4
TGFβ-RI	papilar dermis	10 (5L+5T)	16.7	7.8	90%	0.05	7
TGFβ-RI	periadnexial	10 (5L+5T)	22.2	14.6	90%	0.05	3
TGFβ-RII	reticular dermis	21 (10L+11T)	30.1	13.4	90%	0.05	6
TGFβ-RII	papilar dermis	21 (10L+11T)	25.6	7	90%	0.05	13
TGFβ-RII	periadnexial	21 (10L+11T)	27.6	12.5	90%	0.05	6
TGFβ-RIII	reticular dermis	10 (5L+5T)	45.1	15.7	90%	0.05	6
TGFβ-RIII	papilar dermis	10 (5L+5T)	15.4	7.7	90%	0.05	7
TGFβ-RIII	periadnexial	10 (5L+5T)	18.5	12.3	90%	0.05	3
COX2	reticular dermis	20 (10L+10T)	9.9	13.1	90%	0.05	1
COX2	papilar dermis	20 (10L+10T)	14	17.1	90%	0.05	1
COX2	periadnexial	20 (10L+10T)	13.2	15.1	90%	0.05	1

4.6-ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

Se realizó análisis de concordancia intraobservador, a través de la prueba de Kappa, esperando una concordancia específica mayor de 0.5. En esta prueba se

reanalizaron 30 laminillas escojidas por la alumna de maestría después de 6 meses de la primera clasificación de los casos. Se incluyeron los 6 tipos clasificables de lepra. En seguida se cubrió la etiqueta de las laminillas con un papel oscuro a fin de cegar el observador. Se obtuvo un valor de Kappa= 0.74 (IC 0.68 – 0.76).

4.7-ANALISIS ESTADÍSTICO

Se efectuó descripción de las variables mediante medidas de tendencia central y dispersión con cálculo de promedios \pm desviación estándar para variables continuas con distribución Gaussiana y con Medianas y valores mínimos-maximos y/o porcentajes para variables categóricas y/o con Distribución no Gaussiana.

En las medidas cuyos promedios tenían distribución normal se realizó la prueba estadística de *T de student* para muestras independientes precedida por la prueba de Levene para identificar igualdad de variancias.

En los casos cuyos promedios no tenían distribución normal, la prueba estadística escojida fue la *U de Mann-Whitney*.

La significancia se establecerá para una $p < 0.05$.

4.8- FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Todo el material necesario para realizar este protocolo fue aportado por dicho Departamento. Los anticuerpos utilizados en este protocolo ya se encontraban disponibles y el restante del material fue parte del material utilizado de forma

5- RESULTADOS

5.1- TIPOS CELULARES POSITIVOS A LA INMUNOHISTOQUIMICA

Se identificó que los tipos celulares positivos a la inmunotinción para los anticuerpos estudiados fueron:

Receptor del factor transformante beta 1

LL – Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow) e linfocitos.

Células endoteliales, epidermis y anexos

LT– Infiltrado dérmico: raras células epitelioides, poca positividad en células gigantes.

Menor positividad en epidermis y anexos.

Receptor del factor transformante beta 2:

LL – Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow).

Epidermis y anexos

LT – Infiltrado dérmico: raras células epitelioides, poca positividad en células gigantes, raros linfocitos.

Epidermis y anexos.

Receptor del factor transformante beta 3:

LL – Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow), raros linfocitos.

Epidermis y anexos

LT – Infiltrado dérmico: células epitelioides, raros linfocitos.

Epidermis y anexos.

Factor transformante beta 1

LL – Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow) y linfocitos.

Endotelio

LT – Infiltrado dérmico: células epitelioides, positividad en células gigantes.

Endotelio

Factor transformante beta 2

LL – Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow) y linfocitos.

Endotelio, fibroblastos, epidermis y anexos.

LT- Infiltrado dérmico: células epitelioides, positividad en células gigantes, raros linfocitos.

Endotelio, epidermis y anexos.

Factor transformante beta 3

LL – Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow) y linfocitos.

Endotelio, fibroblastos, epidermis y anexos.

LT – Infiltrado dérmico: células epitelioides, linfocitos.

Endotelio, fibroblastos, menor positividad en epidermis y anexos.

Obs: Se encontró positividad en epidermis, anexos y endotelio, también en piel normal en los siguientes anticuerpos: TGF β 2, TGF β 3, RTGF β 2.

Ciclooxigenasa 2

LL- Infiltrado dérmico: macrófagos (células de Virchow)

LT- Infiltrado dérmico: muy raro (células epitelioides)

5.2- ANALISIS MORFOMETRICO

Para el análisis morfométrico (conteo), solamente consideramos las células del infiltrado inflamatorio de la dermis, en 3 compartimientos distintos: dermis reticular, dermis papilar y perianexial. A continuación se describen los resultados obtenidos a partir del conteo de células positivas del infiltrado inflamatorio en la inmunohistoquímica de los 7 anticuerpos estudiados.

Receptor del factor transformante beta 1

La distribución de los datos de esta muestra fue normal (Tabla 1).

Los valores promedios (porcentajes) de células positivas para este anticuerpo así como los valores de t y significancia estadística son presentados en la Tabla 2.

En la dermis reticular, los valores promedios fueron de 37.3% ($\pm 17.7\%$) para la forma LL y de 14.0% ($\pm 9.0\%$) para la forma LT ($t=5.2$, $p < 0.001$).

Para la localización dermis papilar, fueron positivas un promedio de 45.4% ($\pm 16.5\%$) para la LL y de 13.8% ($\pm 8.9\%$) para la LT ($t=7.3$, $p < 0.001$).

En el compartimiento perianexial se verificó un promedio de 34.5% de células positivas con una desviación de 16.0% para la LL, mientras que para la LT se encontró un promedio de 12.7% con una desviación de 9.5% ($t= 5.2$ con $p < 0.001$).

Receptor del factor transformante beta 2

Los valores de esta muestra tuvieron distribución normal (Tabla 3).

Los valores promedios (porcentajes) de células positivas para este anticuerpo así como los valores de t y significancia estadística son presentados en la Tabla 4.

Los valores promedios (porcentajes) de células positivas encontrados para este anticuerpo en la dermis reticular fue de 49.9% $\pm 11.3\%$ en LL y de 16.0% $\pm 13.0\%$ en LT ($t=8.76$, $p < 0.001$).

En la dermis papilar los promedios encontrados fueron de 44.8% $\pm 15.2\%$ para LL

y $16.9\% \pm 12.8\%$ para LT ($t=6.2, p<0.001$).

Los promedios encontrados en el compartimiento perianexial fue de $50.1\% \pm 12.7\%$ para LL y $16.9\% \pm 12.6\%$ para LT ($t=8.2, p<0.001$).

Receptor del factor transformante beta 3

La distribución de los datos de la muestra no fue normal (Tabla 5).

Los valores de medianas y valores mínimos y máximos de los porcentajes de células positivas para este anticuerpo, así como valores de la U de Mann Whitney y significancia estadística se muestran en la tabla 6.

En la dermis reticular, la mediana de células positivas fue de 52.8, con valor mínimo de 26.1 y máximo de 81.0 para LL y para LT la mediana fue de 12.0 con un valor mínimo de 4.4 y máximo de 49.9 ($U=9.0, p<0.001$).

En la dermis papilar, la mediana de células positivas fue de 46.5, con valor mínimo de 23.3 y máximo de 76.6 para LL y para LT la mediana fue de 13.4 con valores mínimos de 6.9 y máximos de 30.0 ($U=4.0, p<0.001$).

En la dermis perianexial, la mediana de células positivas en LL fue de 48.8 con valores mínimos de 24.9 y máximos de 77.6 y para LT la mediana fue de 9.7 con valores mínimos de 1.5 y máximos de 41.5 ($U=4.0, p<0.001$).

Factor transformante beta 1

La distribución de los datos de la muestra fue normal (Tabla 7).

Los valores promedios (porcentajes) de células positivas para este anticuerpo así como los valores de t y significancia estadística son presentados en la Tabla 8.

Los promedios de células positivas encontrados en la dermis reticular para LL fueron $54.6\% \pm 16.6\%$ y para LT de $22.4\% \pm 9.8\%$ ($t=7.4, p<0.001$).

En la dermis papilar el promedio encontrado fue de $51.7\% \pm 15.4\%$ para LL y de $23.4\% \pm 13.4\%$ para la LT ($t=6.18, p<0.001$).

En el compartimiento perianexial los promedios obtenidos fueron de 55.6% \pm 15.8% para LL y 24.6% \pm 14.0% para LT ($t=6.5$, $p<0.001$).

Factor transformante beta 2

La distribución de los valores de la muestra fue normal (Tabla 9).

Los valores promedios (porcentajes) de células positivas para este anticuerpo así como los valores de t y significancia estadística son presentados en la Tabla 10.

Los promedios de células positivas al anticuerpo en la dermis reticular fue de 58.1% \pm 10.4% para LL y de 32.0% \pm 11.7% para LT ($t=7.3$, $p<0.001$).

En la dermis papilar los promedios fueron de 60.0% \pm 16.3% para LL y 37.7% \pm 14.4% para LT ($t=4.5$, $p<0.001$).

En dermis perianexial los promedios fueron de 54.1% \pm 8.0% para LL y 30.0% \pm 14.3% para LT ($t=6.5$, $p<0.001$).

Factor transformante beta 3

La distribución de los valores de la muestra fue normal (Tabla 11).

Los valores promedios (porcentajes) de células positivas para este anticuerpo así como los valores de t y significancia estadística son presentados en la Tabla 12.

Los promedios de células positivas al anticuerpo en la dermis reticular fue de 67.9% \pm 12.7% para LL y de 53.6% \pm 10.8% para LT ($t=3.8$, $p<0.001$).

En la dermis papilar los promedios fueron de 68.6% \pm 11.5% para LL y 54.3% \pm 12.5% para LT ($t=3.6$, $p=0.001$).

En dermis perianexial los promedios fueron de 69.1% \pm 11.7% para LL y 54.0% \pm 10.9% para LT ($t=4.2$, $p<0.001$).

Ciclooxigenasa 2

La distribución de los datos de la muestra no fue normal (Tabla 13).

Los valores de medianas y valores mínimos y máximos de los porcentajes de células positivas para este anticuerpo, así como valores de la U de Mann Whitney

y significancia estadística están en la tabla 14.

En la dermis reticular, la mediana de células positivas fue de 55.1, con valor mínimo de 35.0 y máximo de 67.0 para LL y para LT la mediana fue de 0.7 con un valor mínimo de 0 y máximo de 4.1 ($U=0$, $p<0.001$).

En la dermis papilar, la mediana de células positivas fue de 52.0, con valor mínimo de 30.0 y máximo de 78.0 para LL y para LT la mediana fue de 1.8 con valores mínimos de 0 y máximos de 7.9 ($U=0$, $p<0.001$).

En la dermis perianexial, la mediana de células positivas en LL fue de 55.6 con valores mínimos de 25.0 y máximos de 79.6 y para LT la mediana fue de 1.7 con valores mínimos de 0 y máximos de 6.1 ($U=0$, $p<0.001$)

6- DISCUSIÓN

Son pocos los estudios del TGF β en lepra humana. Los resultados encontrados en este estudio reprodujeron lo reportado en la literatura investigada, excepto para los receptores de TGF β , para los cuales no se encontró bibliografía con datos comparables. En nuestro estudio el TGF β 1 mostró alta expresión, aproximadamente dos veces más en la forma lepromatosa que en la forma tuberculoide. Lo mismo ocurrió con las otras dos isoformas (TGF β 2 y TGF β 3) pero las diferencias entre los porcentajes disminuyó siendo cerca de 1.8 veces y 1.3 más expresado, respectivamente en la LL. Goulart y cols, en Brasil (83) analizaron 41 biopsias de diferentes formas clínicas de lepra a través de inmunohistoquímica para TGF- β 1. Encontraron que en las formas lepromatosas y borderline lepromatosas, las células del infiltrado eran fuertemente positivas y la reacción no fue detectable en las formas borderline tuberculoide y tuberculoide polar. Los resultados extremos encontrados en este trabajo pueden ser resultado de la no utilización de sistemas de recuperación antigénica que disminuyen la sensibilidad del método inmunohistoquímico, además de que en ese estudio no se realizó análisis morfométrico computadorizado y se estudió un número muy pequeño de casos polares. Además, no hubo aplicación de pruebas estadísticas. En otro estudio realizado por los mismos autores (84), fue determinada la concentración de TGF- β 1 en células adherentes aisladas de células mononucleares de la sangre periférica de pacientes con diferentes formas clínicas de lepra e individuos sanos. Las células adherentes liberaron TGF- β 1 en todas las formas de lepra y también en individuos sanos, sin embargo las concentraciones fueron mas altas en lepra lepromatosa y borderline lepromatosa (con eritema nodoso leproso), mientras que las lepras tuberculoides tuvieron los niveles mas bajos incluso que los controles (84). Este estudio también apoya nuestros resultados, sin embargo, la técnica utilizada no permite interpretaciones *in situ* de lo que está pasando en los tejidos afectados.

Williams y cols (85) estudiaron el TGF β en sus tres isoformas (β 1, β 2 y , β 3) en

lesiones cutáneas polares de lepra humana. Ellos encontraron que la expresión de TGF β 1 estuvo presente en la forma lepromatosa y ausente en la forma tuberculoide. El TGF β 2 fue fuertemente positivo en macrófagos en la lepra lepromatosa, y fue también positivo en macrófagos, fibroblastos, células endoteliales en la forma tuberculoide. El TGF β 3 fue no reactivo en la forma lepromatosa y fuertemente reactivo en la forma tuberculoide. De nuevo, la discordancia entre nuestros resultados y los resultados encontrados en este estudio pueden haber sido por la falta del uso de soluciones recuperadoras de antígenos así como por el pequeño número de casos estudiados (lepromatosa n=3 y tuberculoide n=7), y por la ausencia de análisis cuantitativa de la expresión del TGF y consecuentemente de análisis estadístico. Nuestros resultados sugieren, al igual que los trabajos revisados (83,84,85), que los mecanismos supresores de la inmunidad celular en la lepra lepromatosa pueden estar mediados por TGF- β 1. El hecho de que el TGF- β este elevado en la fase crónica de infecciones por agentes intracelulares, sugiere que agentes inmunomoduladores con efectos anti-TGF- β tendrían buenas perspectivas terapéuticas futuras.

La observación de la intensa inmunoreactividad de las isoformas de TGF β 2, TGF β 3 y RTGF- β 2 en endotelio, epidermis y anexos, sugirió la posibilidad de que ellas podrían estar siendo producidas por células epiteliales y endoteliales. Para aclarar esta duda, se realizó rt-PCR *in situ* para las 3 moléculas mencionadas. El rt-PCR fue positivo para TGF β -1 y RTGF- β 2 en ambas formas lepromatosa y tuberculoide, en epidermis y anexos, y también en el control de piel normal. Esos resultados sugieren que las células epiteliales pueden ser fuentes potenciales de ambas moléculas y su producción es estimulada por determinadas interleucinas liberadas localmente.

Las diferencias encontradas en los resultados de este estudio en relación al anticuerpo COX2 fueron muy marcados. La expresión de COX2 fue cerca de 30 veces mayor en la lepra lepromatosa. Estos resultados también están de acuerdo a los resultados referidos en modelos animales en otras patologías con patógenos

intracelulares como la tuberculosis, Enfermedad de Chagas, Leishmaniasis (81,82,86,87,88). En modelos experimentales con ratones, Sibley et al encontró que macrófagos peritoneales de ratones infectados por *M. leprae* producían elevados niveles de prostaglandina E2 *in vitro*. El defecto de activación macrofágica fue seguido por el aumento en la producción de PGE2 y fue revertido por indometacina (89). En un estudio con cobayos no se detectó PGE en los sobrenadantes de cultivo de células de granulomas (90). En otro estudio, Misra y cols encontraron que los monocitos infectados de pacientes lepromatosos pero no con lepra tuberculoide liberaban factores solubles que contenían IL-10 y PGE2 (91). Por otro lado, Dhawan y cols, al medir los niveles de prostaglandina F2 α en el suero de 10 pacientes con lepra lepromatosa, la detectaron en solamente 2 de los casos (92). Los resultados de este estudio no fueron los esperados por ellos. Sin embargo, los autores dan algunas explicaciones, como una posible interferencia de la terapéutica multi-drogas recibida por los pacientes y el hecho de que la PGE2 y PGF2 α fueran mutuamente antagonistas. Esto llevaría a la hipótesis de que la PGE2 podría estar elevada en los pacientes lepromatosos (69). No hay trabajos publicados a cerca de la expresión de COX2 en lepra. Los resultados encontrados en nuestro estudio sobre COX-2 apoyan lo publicado en la literatura científica actual. La clara definición de los modelos de respuesta inmunológica en la lepra puede permitir, en un futuro muy próximo, el desarrollo de nuevos esquemas terapéuticos. La inmunomodulación promete ser en los próximos años un tratamiento revolucionario, así como fue el surgimiento de las sulfonas. Medicamentos inmunomoduladores añadidos a los quimioterápicos y antifímicos podrán acortar los esquemas de tratamiento y quizá erradicar completamente esta enfermedad milenaria del planeta.

7- CONCLUSIONES

- La expresión intensamente positiva del TGF β y sus receptores en la forma lepromatosa apoya la hipótesis de que esta familia de citocinas pueden ser factores importantes en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmunológica de tipo Th2.
- La expresión fuertemente positiva de COX2 en la lepra lepromatosa y prácticamente nula en la forma tuberculoide confirma el papel de las prostaglandinas en el mantenimiento de la respuesta de tipo Th2 en la forma diseminada e la lepra.
- Como perspectivas futura, la posibilidad de utilizar bloqueadores de COX2 y del TGF β con la finalidad de modular la respuesta inmune podrían ser benéfica para el desarrollo de terapias alternativas capaces de reconvertir una respuesta de inmunidad celular desfavorable a una favorable, con lo cual se podría combinar al esquema terapéutico convencional para hacerla mas eficiente y acortar el tiempo de tratamiento.

8- TABLAS

Tabla 1- Prueba de normalidad de los resultados del RTGF β -1

% de células positivas	Prueba de Kolmogorov-Smirnov		
	tipo de lepra	valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.099	0.20
	LT	0.123	0.20
dermis papilar	LL	0.100	0.20
	LT	0.147	0.20
Dermis perianexial	LL	0.108	0.20
	LT	0.152	0.20

Tabla 2- Análisis de los resultados del RTGF β 1.

% de positivas	células	tipo de lepra	N	média	desviación estándar	error estándar	valor de t	significancia (2 colas)
dermis reticular	LL	20	37.33	17.78	3.97	5.22	0.000	
	LT	20	14.02	9.05	2.02			
dermis papilar	LL	20	45.43	16.56	3.70	7.35	0.000	
	LT	19	13.83	8.92	2.04			
dermis perianexial	LL	20	34.53	16.02	3.58	5.22	0.000	
	LT	20	12.74	9.53	2.13			

Tabla 3- Prueba de normalidad de los resultados del RTGF β -2

% de células positivas	tipo de lepra	Prueba de Kolmogorov-Smirnov	
		valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.160	0.19
	LT	0.134	0.20
dermis papilar	LL	0.164	0.16
	LT	0.135	0.20
Dermis perianexial	LL	0.146	0.20
	LT	0.129	0.20

Tabla 4- Análisis de los resultados del RTGF β 2.

% de células positivas	tipo de lepra	n	médía	desviación estándar	error estándar	valor de t	significancia (2 colas)
dermis reticular	LL	20	49.93	11.34	2.53	8.764	0.000
	LT	20	16.09	13.01	2.91		
dermis papilar	LL	20	44.87	15.24	3.40	6.256	0.000
	LT	20	16.95	12.88	2.88		
dermis perianexial	LL	20	50.12	12.70	3.84	8.279	0.000
	LT	20	16.92	12.65	2.83		

Tabla 5- Prueba de normalidad de los resultados del RTGFβ-3

% de células positivas	Prueba de Kolmogorov-Smirnov		
	tipo de lepra	valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.106	0.20
	LT	0.228	0.01
dermis papilar	LL	0.093	0.20
	LT	0.201	0.04
Dermis perianexial	LL	0.113	0.20
	LT	0.209	0.02

Tabla 6- Análisis de los resultados del RTGFβ3.

% de células positivas	tipo de lepra	n	mediana	valores mínimos	valores máximos	valor de U	significancia (2 colas)
Dermis reticular	LL	20	52.80	26.10	81.00	9.0	0.000
	LT	20	12.10	4.40	49.90		
Dermis papilar	LL	20	46.50	23.30	76.60	4.0	0.000
	LT	19	13.40	6.90	30.0		
Dermis perianexial	LL	20	48.80	24.90	77.60	4.0	0.000
	LT	20	10.15	1.50	41.50		

Tabla 7: Prueba de normalidad de los resultados del TGFβ-1

% de células positivas	Prueba de Kolmogorov-Smirnov		
	tipo de lepra	valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.142	0.20
	LT	0.124	0.20
dermis papilar	LL	0.114	0.20
	LT	0.152	0.20
dermis perianaxial	LL	0.139	0.20
	LT	0.148	0.20

Tabla 8- Análisis de los resultados del TGFβ1.

% de células positivas	tipo de lepra	n	média	desviación estándar	error estándar	valor de t	significancia (2 colas)
dermis reticular	LL	20	54.68	16.64	3.72	7.45	0.000
	LT	20	22.44	9.86	2.20		
dermis papilar	LL	20	51.75	15.44	3.45	6.18	0.000
	LT	20	23.46	13.43	3.00		
dermis perianaxial	LL	20	55.62	15.82	3.53	6.56	0.000
	LT	20	24.61	14.01	3.13		

Tabla 9- Prueba de normalidad de los resultados del TGF β -2

% de células positivas	Prueba de Kolmogorov-Smirnov		
	tipo de lepra	valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.127	0.20
	LT	0.180	0.08
dermis papilar	LL	0.131	0.20
	LT	0.175	0.11
Dermis perianexial	LL	0.135	0.20
	LT	0.135	0.20

Tabla 10- Análisis de los resultados del TGF β 2.

% de células positivas	tipo de lepra	n	médía	desviación estándar	error estándar	valor de t	significancia (2 colas)
Dermis reticular	LL	20	58.13	10.49	2.34	7.38	0.000
	LT	20	32.07	11.78	2.63		
Dermis papilar	LL	20	60.05	16.33	3.65	4.56	0.000
	LT	20	37.79	14.46	3.23		
Dermis perianexial	LL	20	54.19	8.08	1.80	6.56	0.000
	LT	20	30.04	14.32	3.20		

Tabla 11: Prueba de normalidad de los resultados del TGF β -3

Prueba de Kolmogorov-Smirnov			
% de células positivas	tipo de lepra	valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.112	0.20
	LT	0.159	0.20
dermis papilar	LL	0.101	0.20
	LT	0.121	0.20
dermis perianexial	LL	0.105	0.20
	LT	0.143	0.20

Tabla 12- Análisis de los resultados del TGF β 3.

% de células positivas	tipo de lepra	n	médía	desviación estándar	error estándar	valor de t	significancia (2 colas)
dermis reticular	LL	20	67.97	12.76	2.85	3.81	0.000
	LT	20	53.69	10.81	2.41		
dermis papilar	LL	20	68.61	11.54	2.58	3.69	0.001
	LT	20	54.37	12.50	2.86		
dermis perianexial	LL	20	69.13	11.72	2.62	4.21	0.000
	LT	20	54.00	10.97	2.45		

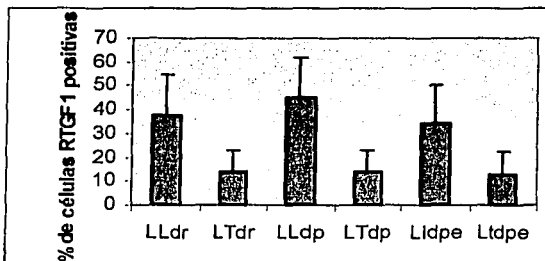
Tabla 13- Prueba de normalidad de los resultados de COX2

% de células positivas	Prueba de Kolmogorov-Smirnov		
	tipo de lepra	de valor estadístico	significancia
dermis reticular	LL	0.112	0.20
	LT	0.211	0.02
dermis papilar	LL	0.137	0.20
	LT	0.203	0.03
dermis perianaxial	LL	0.112	0.20
	LT	0.191	0.05

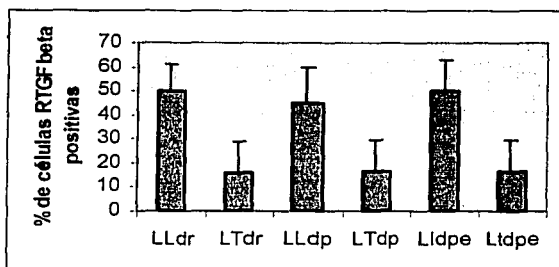
Tabla 14- Análisis de los resultados de COX2.

% de células positivas	tipo de lepra	n	mediana	valores mínimos	valores máximos	valor de U	significancia (2 colas)
dermis reticular	LL	20	55.15	35.00	67.06	0.0	0.000
	LT	20	0.70	0.00	4.12		
dermis papilar	LL	20	52.05	30.00	78.00	0.0	0.000
	LT	20	1.80	0.00	7.98		
Dermis perianaxial	LL	20	55.60	25.00	79.60	0.0	0.000
	LT	20	1.78	0.00	6.10		

9- GRÁFICAS

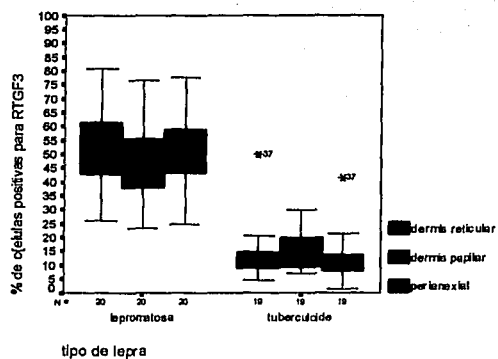


Gráfica1- Gráfica de los resultados del receptor TGF β 1.
dr=dermis reticular dp= dermis papilar
dpe=dermis perianexial

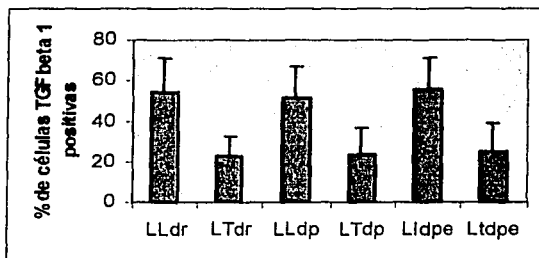


Gráfica 2- Gráfica de los resultados del receptor TGF β 2.
dr=dermis reticular dp= dermis papilar
dpe=dermis perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



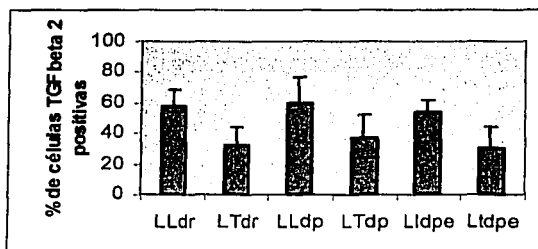
Gráfica 3- Gráfica de los resultados del receptor TGFβ3.



Gráfica 4- Gráfica de los resultados del TGFβ1.

dr=dermis reticular dp= dermis papilar

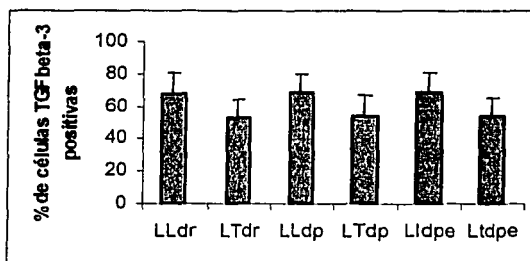
dpe=dermis perianexial



Gráfica 5- Gráfica de los resultados del TGF β 2.

dr=dermis reticular dp= dermis papilar

dpe=dermis perianexial

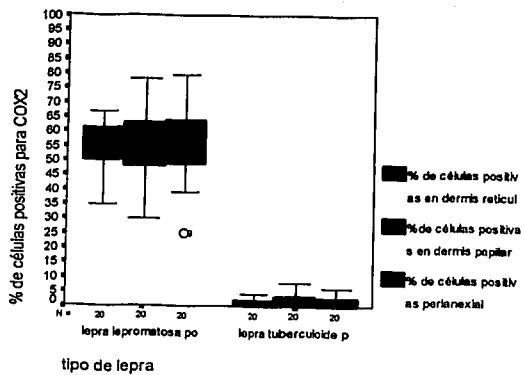


Gráfica 6- Gráfica de los resultados del TGF β 3.

dr=dermis reticular dp= dermis papilar

dpe=dermis perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 7- Gráfica de los resultados de COX2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10- BIBLIOGRAFIA

- 1- Rojas-Espinosa O, Lovik M. Mycobacterium leprae and Mycobacterium leprae murin infections in domestic and wild animals. Rev sci tech Off Int Epiz 2001;20(1):1-92.
- 2- Rea TH, Modlin RL. Leprosy. In: Freedberg MI, Elsen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB (Eds.). Dermatology in general Medicine. New York: McGraw-Hill 2000, pp 2306-2336.
- 3- Galen WK, Cohen I, Rogres M, Smith MHD. Bacterial Infections. In: Shachner LA, Hansen RC. Pediatric Dermatology. New York: Churchill Livingstone 1995, pp 1236-1242.
- 4- Naafs B. Viewpoint: Leprosy after the year 2000. Tropical Medicine and International Health 2000;5:400-403.
- 5- World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO Technical report Series 1982; 675.
- 6- World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy. Seventh Report. WHO Technical Report Series 1998; 874: 43.
- 7- World Health Organization. Leprosy. Global target attained. 2001; 76: 155-156.
- 8- World Health Organization. The leprosy unit. Risk of relapse in leprosy Indian. J Lepr 1995;67:13-26.
- 9- Castellanos G. Panorama Epidemiológico. En: Lepra: pasado, presente y perspectivas para el futuro. Ed. María Eugenia Amezcua Chavarría. Secretaría de Salud. México D.F. 1992; 15:33-38.
- 10- Noordeen SK. Leprosy 1962-1992- Epidemiology and control of leprosy- a review of progress over the last 30 year. Transactions of the Royal Society of Trop Med and Hyg 1993; 87:515-517.
- 11- Organización Panamericana de la Salud. Lepra al día. Boletín: Eliminación de la lepra en las Américas 1994;1(2).
- 12- Fine PEM. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. Epidemiol Rev 1982; 4:161-188.

- 13- World Health Organization (WHO). World Health Assembly Resolution 1991. WHA44.9.
- 14- Leprosy – global situation. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;14:226-231.
- 15- Visschedijk J, van de Broek J, Eggens H, Lever Peter et al. Review: *Mycobacterium leprae* – millenium resistant! Leprosy control on the threshold of new era. *Trop Med and Int Health* 2000;5:388-399.
- 16- Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet* 1999;353:655-660.
- 17- Job CK, Jayakumar J, Aschoff M. Large numbers of *Mycobacterium leprae* are discharged from the intact skin of lepromatous patients: a preliminar report. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1999;67:164-167.
- 18- Meyers WM, Marty AL. Current concepts in the pathogenesis of leprosy: Clinical, pathological, immunological and chemotherapeutic aspects. *Drugs* 1991; 41: 832- 856.
- 19- Ridley DS, Jopling WN. Classification of leprosy according to immunity a five group system. *Int J Lepr* 1966;34:255-273.
- 20- Ridley DS. Histological classification and immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Org* 1974;5:451-465.
- 21- Huang CLH. The transmission of leprosy in man. *Int J Lepr* 1980;48:309-318.
- 22- Wiersema JP, Binford CH. Identification of leprosy among epithelioid cell granulomas of the skin. *Int J Lepr* 1972; 40:10-32.
- 23- Kwittken J, Peck SM. Boderline leprosy. *Arch Dermatol* 1967; 95: 50-56.
- 24- Binford , Mayers. Leprosy. In: Chapman H. Bonford and Daniel H Connor. *Pathology of tropical and extraordinary diseases*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology 1976, pp 205-225.
- 25- Lever WF. *Histopatologia de la piel*. Buenos Aires: Intermédica 1991, pp 317-320.
- 26- Singh PA, Agarwal R, Misra V, Gupta SC, Bajaj Ak. Clinico-histopathological concordance in leprosy. *Trop Doct* 2000;30:228-231.
- 27- Poricca D, Misra Ak, Dhariwal AC, Samal RC, Reddy BN. Ambiguities in leprosy histopathology. *Int J of Lepr Other Mycobact Dis* 1993;61:428-432.

- 28- Kaplan G., Cohn ZA. Leprosy and cell mediated immunity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 91-96.
- 29- Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Experim Med* 1987;166:1229-1244
- 30- Mosmann TR, Moore KW. The role of IL10 in cross regulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991;12:A49-A53.
- 31- Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, Budd RO, O'Garra TA, Fong T, et al. *Immunol Rev* 1991;123:209-229.
- 32- Gajewski TH, Fitch FW. Anti-proliferative effect of $INF\gamma$ in immune regulation. $INF\gamma$ inhibits the proliferation of TH2 but not TH1 murine helper T lymphocytes clones. *J Immunol* 1998;140:4245-4252.
- 33- Liew FY, Cox FEG. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 1991;12:A17-A21.
- 34- Coffman RL, Seymour BWP, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988;102:5-28.
- 35- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277-279.
- 36- Salgame P, Abrams JS, Clayberger c, Goldstein H, Convit J, Modlin R, Boom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 154:279-282.
- 37- Goulart IMBI, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of Transforming Growth Factor- β 1 in Dermal Lesions of Different Clinical Forms of Leprosy. *Am J Pathol* 1996; 148: 911-917.
- 38- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR et al. Defining protective to responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;254:277-9.

- 39- Kaufmann SH. Cell-mediated immunity: dealing a direct blow to pathogens. *Curr Biol* 1999; 9:97-99.
- 40- Sieling PA, Modlin RL. T cell and cytokine patterns in leprosy. *Springer Semin Immunopathol* 1992; 13: 413-426.
- 41- Hernández PR, Orozco H, Sampiere A, Pavon L et al. Correlation between the Kinetics of Th1/Th2 Cells and Pathology in a Murine Model of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Immunol* 1996; 89:26-33.
- 42- Hernández PR, Orozco H, Arriaga K, Sampiere A et al. Analysis of the Local Kinetics and Localization of Interleukin 1 Alpha, Tumor Necrosis Factor Alpha and Transforming Growth Factor Beta, during the Course of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Immunol* 1997;90:607-617.
- 43- Cooper AM *γ* cols Disseminated Tuberculosis in Interferon gamma Gene-disrupted Mice. *J Exp Med* 1993; 178:2243.
- 44- Dalton DK *γ* cols. Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon-gamma Genes. *Science* 1993; 259:1739.
- 45- Nathan CF, Kaplan G, Levis WR, Nusrat A et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon γ in patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med* 1986;315:6-15.
- 46- Villahermosa LG, Abalos Em, Walsh Ds, Fajardo TT et al. Recombinant interleukin-2 in lepromatous leprosy lesions: immunological and microbiological consequences. *Clin Experim Dermatol* 1997;22:134-140.
- 47- Taylor-Robinson AW, Smith EC. A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines through immunological modulation of blood-stage infection. *Immunol Rev* 1999;171:105-124.
- 48- Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A. IL12 induced protection against blood stage *Plasmodium chabaudi* AS requires INF γ and TNF α and occur via a nitric oxide-dependent mechanism 1995; *J Immunol* 155:2545-2556.
- 49- Denis M. Recombinant interleukin-1 infusion increases resistance of BALB7c mice to murine leprosy. *Int J Immunopharmacol*, 1995; 13:897-902.
- 50- Kaplan G. Recent advances in cytokine therapy in leprosy. *J Infect Dis* 1995;

167: S18-S22.

- 51- Omer FM, Kurtzhals JAL, Riley EM. Maintaining the Immunological Balance in Parasitic Infections: A role for TGF- β ? *Parasitol Today* 2000; 16:18-23.
- 52- Reed SG. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbes and infection* 1999;1:1313-1325.
- 53- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:111-19.
- 54- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994;370:341-7.
- 55- Wrana J, Pawson T. Mad about SMADs. *Nature* 1997;388:28-9.
- 56- López-Castillas F, Wrana JL, Massagué J. Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 1993;73: 1435-44.
- 57- López-Castillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J. Structure and expression of membranes proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 1991;67:785-95.
- 58- Casillas FL. El lado oscuro y el lado brillante del TGF β . *Mensaje Bioquímico* 1998; vol XXII: 137-161.
- 59- Hartsough MT, Mulder KM. Transforming Growth Factor- β Signaling in Epithelial Cells. *Pharmacol Ther* 1997;75:21-41.
- 60- Massagué J. TGF β Signal Transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.
- 61- Massagué J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA et al. Transforming Growth Factor- β . *Cancer Surv* 1992;12:81-103.
- 62- Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF- β . *Immunol Today* 1989;10: 258-61.
- 63- Reuegener JJ et al. Regulatory effects of transforming growth factor- β on IL-2 and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J Immunol* 1990;144:1767-1776.
- 64- Mitchell JA, Akarasereenant P, Thiemermann C, Flower RJ et al. Selectivity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs as Inhibitors of Constitutive and Inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11693-11697.
- 65- Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC. Lipid Mediator Networks in cell

- signaling: Update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996;12:1147.
- 66- Wang LH, Hajibeigi A, Xu XM, Loose-Mitchell D et al. Characterization of promoter Prostaglandin H. Synthase 1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190:406-11.
- 67- Kurumbail RG, Stevens Am, Gierse JK, McDonald JJ et al. Structural basis for Selective inhibition of cyclooxygenase 2 by Anti-inflammatory Agents. *Nature* 1996;384:644-8.
- 68- Klenermann P. Prostaglandins in leprosy. A role for aspirin? *Lepr Rev* 1989;60:51-58.
- 69- Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991;12:349-351.
- 70- Kaur K, Harris SG, Padilla J, Graf BA et al. Prostaglandin E2 as a modulator of lymphocyte mediated inflammatory and humoral responses. *Adv Exp Med Biol* 1999;469:409-412.
- 71- Novak TJ, Rothenberg EV. cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not interleukin 4 in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9353-7.
- 72- Quill H, Gaur A, Phipps RP. Prostaglandin E2-dependent induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by cloned murine helper T-cells. *J Immunol* 1989;142:813-8.
- 73- Niiro H, Otsuka T, Ogami E, Yamaoka K et al. MAP kinase Pathways as a Route for the Regulatory Mechanisms of IL10 and IL4 Inhibit COX 2 Expression in Human Monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250:200-5.
- 74- Endo T, Ogushi F, Kawano T, Sone S. Comparisons of the regulations by TH2-cytokines of the arachidonic-acid Metabolic Pathway in human Alveolar Macrophages and Monocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:300-7.
- 75- Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM et al. *J Immunol* 1996;157:5512-20.
- 76- Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, Yomada H, et al. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP – elevating agents modulate IL-2 and IL2R alpha gene expression at multiple levels. *J Immunol* 1992; 148:2845-52.

- 77- Wu CY, Wang K, McDeyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and Dexamethasone Inhibit IL12 Receptor Expression and IL12 Responsiveness. *J Immunology* 1998;161:2723-2730.
- 78- Van der Pouw Kraam TCTM, Boeije LCM, Smeenk RJT, Wijdenes J et al. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp med* 1995;181:775-779.
- 79- Maloney CG, Kutchera WA, Albertine KH, McIntyre TM et al. Inflammatory Agonist Induce Cyclooxygenase Type 2 Expression by Human neutrophils. *J Immunol* 1998;160:1402-10.
- 80- Dworski R, Sheller JR. Differential sensitivities of Human Blood monocytes and Alveolar macrophages to the Inhibition of Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2 by Interleukin 4. *Prostaglandins* 1997;53:237-51.
- 81- Rangel MJ, Estrada GI, Garcia GM, Aquilar LD, Marques R and Hernández PR. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonar tuberculosis. *Immunol* 2002;106:257-266.
- 82- De Freitas LA, Mbow LM, Estay M, Bleyenber JA et al. Indomethacin treatment slows disease progression and enhances a Th1 response insusceptible BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol* 1999;21:273-277.
- 83- Goulart IMBI, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of Transforming Growth Factor- β 1 in Dermal Lesions of Different Clinical Forms of Leprosy. *Am J Pathol* 1996; 148: 911-917.
- 84- Goulart IMB, Mineo JR, Foss Nt. Production of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta 1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin Exp Immunol* 2000;122:330-334.
- 85- Williams AO, Chanock S, Flanders KC. Transforming growth factor-beta (TGF- β) isoforms in tuberculoid and lepromatous leprosy: immunohistochemical studies. *Cell Vision* 1995;2:363-372.
- 86- Edwards III CK, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam et al. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with

- macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide or interferon-gamma. *J Immunol* 1986; 1:1820-1827.
- 87- Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytoquine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 1999;10:90-8.
- 88- Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol* 2001;23:177-84.
- 89- Sibley LD, Krahenbuhl JL. Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 1988;56:1912-1919.
- 90- Montreewasuwat N, Curtis J, Turk JL. IL7 and prostaglandin production by cells of the mononuclear phagocyte system isolated from mycobacterial granulomas. *Cell Immunol* 1985;91:42-45.
- 91- Misra N, Selcakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, Nath I. Monocyte derived IL10 and PGE2 are associated with absence of Th1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* 1995;48:123-128.
- 92- Dhawan V, Vaishnavi C, Nana A, Kumar B, Kaur S, Ganguly NK. Prostaglandin F2 α in leprosy a preliminary study. *Indian journal of leprosy* 1990;62:45-49.

11- ANEXO 1

AFB – Índice de bacilos ácido-resistente

Número de bacilos por campo (objetiva de inmersión)*	AFB
>1,000	6
100 – 1,000.....	5
10 – 100.....	4
1 – 10.....	3
Número de bacilos/campos (objetiva de inmersión)	AFB
1/1-10.....	2
1/10-100.....	1
0/100.....	0

* Referencia 2

12- ANEXO 2

Complemento de la clasificación histopatológica de Ridley (para lepra)

Se debe escoger una de las alternativas para cada par (por ej. B o I para A)

I Clasificación Indeterminada

J Clasificación TT

K Clasificación BT

L Clasificación BB

M Clasificación BL

N Clasificación LL

A1- Hay la presencia de granuloma.....	B
A2- Ningún granuloma fue encontrado en la sección.....	I
B1- El granuloma está compuesto predominantemente por células epitelioides.....	C
B2- EL granuloma está compuesto predominantemente por macrófagos.....	G
C1- Hay una profunda y extensiva erosión de la epidermis.....	J
C2- La epidermis no está involucrada, o hay solamente una punta de erosión o solamente la capa basal destruida o solamente infiltración celular.....	D
D1- Hay caseación central de los nervios dérmicos o edema masivo (mayor de 400µm) con una zona de linfocitos alrededor del nervio.....	J
D2- aumento menos severo del nervio.....	E
E1- (1) células gigantes están presentes (2) moderado numero	

de linfocitos están presentes con cierto agrupamiento	
(3) no está clara la zona subepidérmica.....	J
E2- una o más de las características anteriores es perdida.....	F
F1- Hay o células gigantes o un moderado infiltrado	
de linfocitos o ambos.....	K
F2-No hay ni células gigantes ni linfocitos.....	L
G1-Granuloma muestra uno o dos grupamientos de células epiteliodes.....	L
G2- Células epitelioides están ausentes.....	H
H1- Linfocitos son numerosos cubriendo todo el granuloma	
o varios segmentos del granuloma.....	M
H2 -Linfocitos son solamente moderado en número	
en pequeños agrupamientos o escasos.....	N
O para subdivisiones de LL	
R subgrupo LLp	
S subgrupo LLs	
01 – La lesión es histologicamente activa.....	P
02 – La lesión es histológicamente regresiva.....	Q
P1 - Los macrófagos tienen abundante citoplasma espumoso	
(difuso o en pequeñas vesículas); linfocitos son escasos.....	S
Q1 – Linfocitos son escasos (excluyendo lesiones de ENL),	
vacuolas gigantes, se presentes, presentan membrana delgada.....	R
Q2 – Hay un número apreciable de linfocitos (excluyendo ENL)	
Cualquier vacuolas gigantes son mas	
comunes en células multinucleadas.....	S

12- ANEXO 3

Método ABC (Complejo Avidin-Biotina)

Este método aprovecha la gran afinidad que tiene la avidina para unirse a cuatro moléculas de biotina y el complejo de tres peroxidases unidas a la avidina.

El cromógeno utilizado como revelador en este método la diaminobenzidina (DBA); la reacción positiva es de color ocre la cual puede variar de intensidad y estar localizada en el núcleo, en el citoplasma o en la membrana.

- 1- Se utilizan tejidos fijados en formol amortiguado a 10% durante 24 a 48% e incluidos en parafina.
- 2- Cortar en microtomo a 2 micra.
- 3- Colocar en laminilla tratada con adhesivo (poli-L-lisina o silano)
- 4- Las laminillas con los cortes se meten el horno a 60°C durante 30 minutos.
- 5- Desparafinar y hidratar pasando por xilol, alcohol absoluto, alcohol 96°, agua común y agua destilada.
- 6- Recuperación antigénica: Se utilizará Target (lab Dako) diluido 1:10 , en baño Maria a temperatura de 98° durante 40 minutos.
- 7- Enfriar hasta la temperatura ambiente.
- 8- Lavar con PBS (pH 7.6) durante 5min.
- 9- Bloquear peroxidasa endógena con H2O2 al3% durante 1 hora.
- 10- Decantar
- 11- Lavar con PBS durante 5 min.
- 12- Bloquear proteínas y incubar por 10 min.
- 13- Decantar
- 14- Aplicar en anticuerpo primario a dilución y incubación estandarizada para el procedimiento
- 15- Decantar
- 16- Lavar con PBS a chorro.

- 17- Lavar con PBS durante 6 minutos.
- 18- Adicionar el anticuerpo secundario biotinilado y incubar por 20 min.
- 19- Lavar con PBS durante 6 min.
- 20- Aplicar el complejo avidina-peroxidasa y incubar por 20 minutos.
- 21- Lavar con PBS durante 6 min.
- 22- Agregar el cromógeno (DBA)
- 23- Observar al microscópio hasta obtener la reacción positiva.
- 24- Poner en agua destilada
- 25- Contrastar con Hematoxilina de Meyer durante 10 min.
- 26- Lavar con agua común
- 27- Virar con agua amoniacal
- 28- Desidratar pasando por: alcohol a 96°, alcohol absoluto y xilol
- 29- Cubrir

13- ANEXO 4

Método de rt-PCR

- 1- Cortes de piel (3 μ) fueron montados en laminillas slianzadas
- 2- Desparafinar a 60°C por 18 hs
- 3- Xileno 37°C media hora
- 4- Xileno temperatura ambiente por 10 minutos
- 5- Xileno temperatura ambiente por 10 minutos
- 6- Alcohol absoluto temperatura ambiente por 10 minutos
- 7- Alcohol 75° temperatura ambiente por 10 minutos
- 8- Alcohol 50° temperatura ambiente por 10 minutos
- 9- Alcohol 25° temperatura ambiente por 10 minutos
- 10- Água con dietil (temperatua ambiente) por 10 minutos
- 11- Lavar con PBS 7.35 molar por 3 minutos.
- 12- Proteína AK (enzima) – 30 a 37 minutos hasta 10 milimolar
- 13- Inactivar con calor , dejar hervir por 15 segundos y retirar del microondas.
- 14- Ácido áctico 20% - 15 segundos y lavar con PBS otra vez.
- 15- Tratar con DNAase (Lab Gibco) al 1%
- 16- Se incuba a 37/ durante 20 minutos y luego inactivar a 65°C por 10 minutos
- 17- Lavar otra vez con PBS (todos los lavados son de 3 min)
- 18- Poner incubando por 1 hora a 37°C: 50 μ l de buffer con RT (Transcriptasa Reversa) (1x, Gibco BRL), DTT 0.01 M, dNTP mix 0.05mM (Gibco BRL), 1.25 μ g de oligo dt y 400 U de MMLV (Maloney Murine Leukemia virus Reverse Transcriptase)- (Gibco BRL)
- 19- Los cortes fueron sellados utilizando el "Assembly toll" (Perkin Elmer)
- 20- El RNA fue eliminado por incubación con 3 U RNAase y fijado nuevamente por inmersión con 4% de paraformaldeído en buffer sorensen durante 3 min a 4°C.

- 21- La reacción en cadena de la polimerasa fue realizado incubando los cortes de tejido con 50 μ l de buffer para reacción 1x (Gibco BRL) 1.5 U Taq polimerasa, 2 mM HgCL y dNTPs etiquetadas con digoxigenio (Boehringer Mannheim)
- 22- Lavar con PBS por 3 minutos
- 23- Meter al PCR en el termociclador (Touch Down Hybaid) por 94°C por 4 min para desnaturación, después 1min a 60°C para anelamiento y por 1 min por 72°C para extensión por 35 ciclos.
- 24- Lavar con PBS por 3 minutos
- 25- Lavar con tris-burato sódico (TBS) por 10 minutos – 2 lavados
- 26- Poner el anticuerpo
- 27- Incubar por 30 minutos
- 28- Lavar tres veces con TBS (10 minutos cada lavado)
- 29- Revelar con fosfatasa Alcalina 30 minutos
- 30- Lavar con TBS (2x) 10 minutos cada
- 31- 1 lavado con agua destilada
- 32- Fast Red por 30 minutos
- 33- 3 lavados con agua (rápidos)
- 34- Alcohol 96° por 5 minutos
- 35- Alcohol absoluto por 3 minutos
- 36- Xileno por 3 minutos
- 37- Montar

OBS: La expresión de actina fue utilizado como control positivo y el control negativo fue piel normal em la cual se realizó todos los procedimientos, excepto la colocación de los *primers* de citoquinas.

FOTOS

Receptor TGF β 1 - Lepra lepromatosa

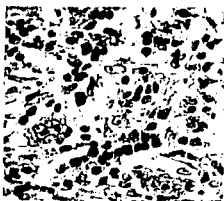


Fig.1 Dermis reticular

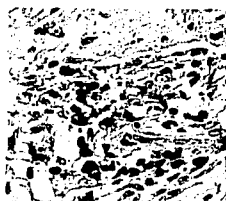


Fig. 2 Dermis papilar

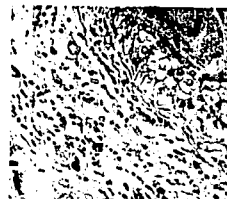


Fig. 3 Perianexial

Receptor TGF β 1 - Lepra tuberculoide

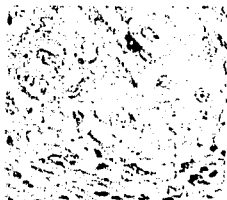


Fig. 4 Dermis reticular

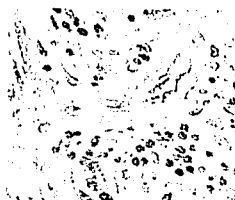


Fig. 5 Dermis papilar



Fig. 6 Perianexial

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Receptor TGF β 2 – Lepra lepromatosa



Fig.7 Dermis reticular

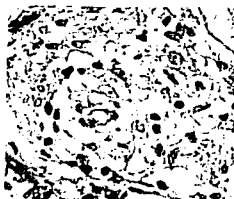


Fig.8 Dermis papilar



Fig.9 Perianexial

Receptor TGF β 2 – Lepra tuberculoide

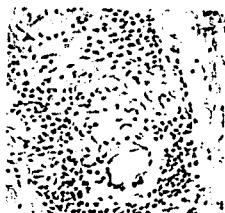


Fig.10 Dermis reticular



Fig.11 Dermis papilar



Fig. 12 Perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Receptor TGF β 3 – Lepra lepromatosa

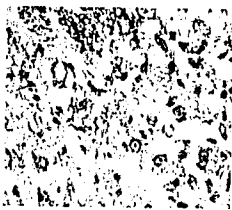


Fig. 13 Dermis reticular

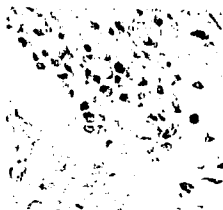


Fig.14 Dermis papilar



Fig. 15 Perianexial

Receptor TGF β 3 – Lepra tuberculoide

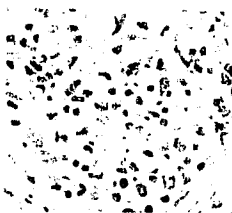


Fig.16 Dermis reticular

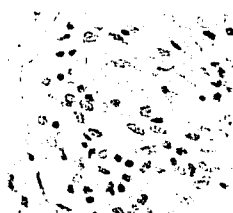


Fig.17 Dermis papilar



Fig.18 Perianexial

TGF β 1 – Lepra lepromatosa

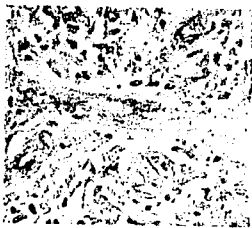


Fig.19 Dermis reticular

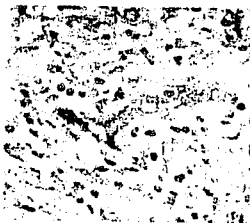


Fig. 20 Dermis papilar

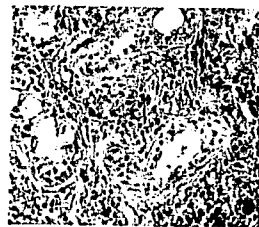


Fig.21 Perianexial

TGF β 1 – Lepra tuberculoide



Fig.22 Dermis reticular



Fig.23 Dermis papilar

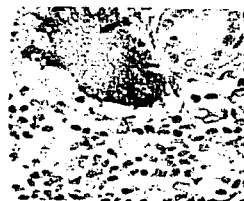


Fig. 24 Perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TGF β 2 – Lepra lepromatosa

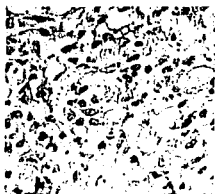


Fig. 25 Dermis reticular

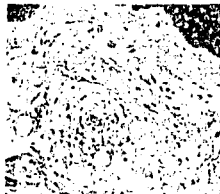


Fig.26 Dermis papilar



Fig. 27 Perianexial

TGF β 2 – Lepra tuberculoide

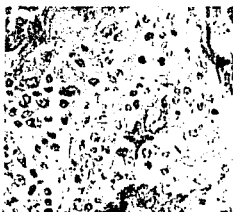


Fig. 28 Dermis reticular

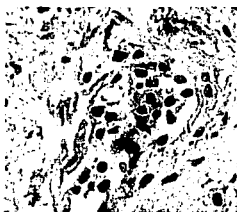


Fig.29 Dermis papilar

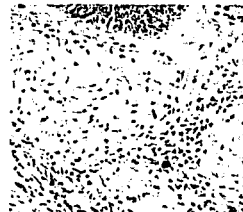


Fig.30 Perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TGF β 3 – Lepra lepromatosa



Fig.31 Dermis reticular



Fig.32 Dermis papilar



Fig. 33 Perianexial

TGF β 3 – Lepra tuberculoide

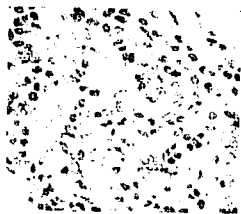


Fig.34 Dermis reticular

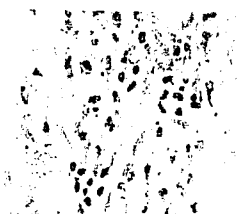


Fig. 35 dermis papilar



Fig. 36 Perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COX2 - Lepra lepromatosa

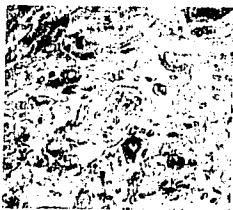


Fig.37 Dermis reticular



Fig.38 Dermis papilar

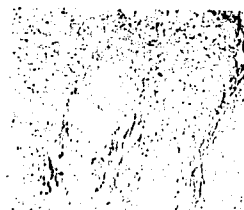


Fig.39 Perianexial

COX2 - Lepra tuberculoide



Fig.40 Dermis reticular



Fig.41 Dermis papilar



Fig.42 Perianexial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN