

11212
26
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO SS

"COMPARACION DE NIVELES DE TNF- α Y ANTICUERPOS
ANTI Mycobacterium leprae EN PACIENTES CON LEPROA
LEPROMATOSA CON Y SIN REACCION LEPROSA TIPO II"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGIA

P R E S E N T A :

DR. MARIO RAMON GOMEZ MELGAR

JEFE DE SERVICIO: DR. AMADO SAUL CANO

ASESORES DE TESIS: DR. AMADO SAUL

ORA. IRIS ESTRADA GARCIA



MEXICO, D. F.



DIRECCION DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION CIENTIFICA

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

		Página
I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Generalidades	3
IV.	Manifestaciones agudas de la lepra	11
V.	Inmunología de la lepra	18
VI.	Factor de necrosis tumoral	23
VII.	Justificación	28
VIII.	Hipótesis	29
IX.	Objetivos	31
X.	Material y métodos	32
XI.	Resultados	40
XII.	Discusión	47
XIII.	Conclusiones	53
XIV.	Referencias	55

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF) en el suero de pacientes lepromatosos con y sin reacción leprosa (RL), utilizando como grupo control pacientes con cualquier tipo de lepra sin RL. Además, investigamos la posible existencia de un patrón diferencial en el reconocimiento de antígenos de *Mycobacterium leprae* en el suero de pacientes con y sin RL.

A pesar de cuatro semanas de tratamiento con talidomida y de la resolución clínica del episodio reaccional, encontramos que los niveles de TNF no fueron significativamente diferentes entre pacientes con y sin reacción (muestras apareadas con un mes de diferencia), ya que en ambos casos se detectaron cifras elevadas ($x=235.7$ U/ml para sueros con reacción y $x=214.2$ U/ml para sueros sin reacción).

Observamos que los niveles de TNF de estos pacientes sí disminuyeron después de cuatro meses de tratamiento con talidomida, siendo semejantes, a los observados en pacientes con LL sin historia de RL.

Al analizar el patrón de anticuerpos anti-proteínas de *M. leprae* no se observaron diferencias entre los sueros con y sin reacción.

INTRODUCCION

La lepra es una enfermedad bacteriana crónica cuyo curso depende de la respuesta inmune del huésped. En la clasificación de los casos destacan dos polos extremos: la lepra lepromatosa (LL) y la lepra tuberculoide (TT). Los pacientes lepromatosos y los cercanos al polo L pueden cursar con reacción leprosa (RL). Esta se considera un fenómeno inmunológico único en patología. A pesar de que se sabe que durante la RL existe aumento de los parámetros de actividad de la respuesta inmune humoral y celular, aún se desconoce a ciencia cierta su patogénesis. Mediante Western blot (inmunoelctrotransferencia) y determinación de niveles de TNF- α pretendemos caracterizar inmunológicamente a los pacientes con RL para diferenciarlos de aquellos que no la presentan. El establecimiento de un patrón particular de reconocimiento de antígenos en pacientes con RL podría contribuir al esclarecimiento de su patogénesis, su diagnóstico temprano y/o su tratamiento específico.

GENERALIDADES

La lepra es una enfermedad infectocontagiosa crónica causada por un bacilo, el *Mycobacterium leprae*. Afecta primariamente la piel y nervios periféricos aunque puede ser sistémica (1).

Es una enfermedad tan antigua como la humanidad misma. Se cree que se originó en la India desde donde se propagó al mundo antiguo y quizá llegó a América con la conquista en el siglo XVI. La era científica de su estudio inicia en el siglo XIX con Danielssen y Boeck quienes publican un tratado sobre la misma (2). En nuestro país Lucio y Alvarado dan a conocer en 1852 su obra "El opúsculo sobre el mal de san Lázaro o elefanciasis de los griegos" (3). Hansen, en 1873, aísla al *M. leprae* y Neisser describe sus características tintoriales. En 1897 Virchow describe los histiocitos vacuolados característicos de la lepra lepromatosa. Mitsuda introduce en 1919 la intradermoreacción con lepromina y Faget y Pogge (1941) inician el uso de sulfonas en la enfermedad. En 1960 Shepard multiplica, tras su inoculación, al bacilo en el ratón y en 1971 Storrs y Kirchheimer logran reproducir la enfermedad en el armadillo de nueve bandas. En 1965 Sheskin utiliza por primera vez la talidomida en leproreacción y 2 años más tarde Saúl la introduce en México con este fin (4,5).

El bacilo de Hansen pertenece a la clase *Actinomyetales*, orden *Mycobacteriales*, familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium*. Es un organismo Gram positivo, y ácido-alcohol resistente (por la presencia de ácidos micólicos). Tiene forma de bastón y mide 1-8 x 0.5 micras. Posee granulaciones citoplásmicas, de Lutz-Unna, asociadas a formas reproductivas o de resistencia. Muestra gran actividad fosfolipásica que puede ser inhibida por el antígeno glicolípido-fenólico I (GLF-I) que es específico del bacilo (6). Tiende a agruparse en globias y es un patógeno intracelular obligado que infecta preferentemente a macrófagos y células de Schwann en cuyo citoplasma se reproduce. Su membrana está compuesta por peptidoglicanos, peptidoglicolípidos y arabinolactanos que le confieren rigidez (7). La imposibilidad de ser cultivado en medio artificial se ha compensado con la inoculación en el ratón y el armadillo que se han constituido en fuentes de producción de bacilos (8).

La única fuente natural de bacilos es el hombre. Para adquirir la infección es necesaria la convivencia íntima y prolongada con un enfermo bacilífero. Para adquirir la enfermedad se requiere la ausencia de un factor constitucional, N de Rotberg, que confiere resistencia al individuo expresada

en la positividad a la reacción de Mitsuda (1). La transmisión tiene lugar a través de las gotitas de Pflüge aunque no se descarta que pueda efectuarse por contacto cutáneo directo. Recientemente se ha señalado como factible la transmisión transplacentaria (9). Una vez en el organismo, el bacilo se localiza en macrófagos y células de Schwann. En contraste con la afectación periférica, prácticamente no existe invasión del sistema nervioso central. Sin embargo, se han detectado antígenos de *M. leprae* en el líquido cefalorraquídeo (10) pero su presencia no necesariamente implica enfermedad.

La lepra es una enfermedad cosmopolita con alta endemicidad en países subdesarrollados. Se calcula que hay aproximadamente 15 millones de enfermos en el mundo. En México existen entre 50 y 100 mil afectados distribuidos en tres focos principales que incluyen, entre otros, a los estados de Sinaloa, Nayarit, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos y Guerrero. La enfermedad afecta generalmente a adultos jóvenes (de 20 a 30 años) con mayor frecuencia en el medio familiar aunque la lepra conyugal constituye solamente del 2 al 5% de los casos. La forma lepromatosa es más frecuente en hombres y la tuberculoide en mujeres. No existe predilección por raza alguna (1).

Tras un período de incubación que se estima de meses a cinco años, aparecen en el enfermo una gran variabilidad de manifestaciones clínicas, histológicas e inmunológicas. Estas han hecho posible establecer una clasificación espectral de los casos en la que destacan dos polos extremos de la enfermedad: el "maligno" o lepra lepromatosa (LL) y el "benigno" o lepra tuberculoide (TT). Además de estos dos tipos, existen dos grupos de casos inestables: 1) casos indeterminados (I) que corresponden al inicio de la lepra y 2) casos dimorfos o interpolares (B, de "*borderline*" en inglés) que son casos que comparten características de ambos polos, LL y TT. A su vez, los casos B se subclasifican en BB (dimorfo puro) y BL ó BT según al polo al que más se acerquen. La polaridad de la enfermedad está determinada por el tipo e intensidad de la respuesta inmune (11).

La LL es sistémica, multibacilar y cursa con deterioro de la inmunidad celular traducida en negatividad al Mitsuda. Afecta primordialmente piel, mucosas y nervios periféricos donde se observan los típicos histiocitos vacuolados. Frecuentemente cursa con reacción leprosa tipo II. Existen dos formas clínicas: la nodular y la difusa. La primera, 60% de todos los casos, está constituida por lepromas o nódulos que predominan en cara (facies

leonina), tronco, nalgas y extremidades. También pueden observarse placas infiltradas rojo-violáceas o máculas hipocrómicas con trastornos de la sensibilidad. La segunda, 10 a 15% de los casos de LL en México, fue descrita por Lucio y clasificada en el polo L por Latapí. Cursa con infiltración difusa de la piel de predominio en cara. No hay elementos circunscritos y se produce, en etapas tardías, atrofia de piel y pabellones auriculares y madarosis.

La afección de la mucosa nasal puede preceder a las lesiones cutáneas. Se observa desde rinorrea hialina hasta perforación del tabique cartilaginoso nasal. En la variedad nodular hay afección de diversas estructuras oculares que puede conducir a la ceguera. Existen abundantes bacilos en prácticamente todo el organismo aunque raramente su presencia muestra traducción clínica.

La TT solo afecta piel y nervios periféricos, es paucibacilar e inmunológicamente hiperérgica (Mitsuda positivo) con formación de granulomas tuberculoides. Clínicamente se observan placas infiltradas con hipoestesia o anestesia que pueden llegar a curar espontáneamente. La

afección neural es importante con trastornos tanto sensitivos como motores. No es infectante, no hay reacción leprosa tipo II.

Los casos I pueden pasar inadvertidos hasta que evolucionan a formas polares. Se caracterizan por máculas anestésicas, anhidróticas y alopécicas. Existen escasos bacilos con infiltrado inflamatorio inespecífico. La reacción de Mitsuda puede ser positiva o negativa y nos indica hacia qué polo pueden migrar.

Los casos dimorfos, intermedios o bipolares incluyen todas las formas atípicas o inestables. Sus características clínicas bacteriológicas, histológicas e inmunológicas varían según al polo al que se acerquen. A su libre evolución, generalmente migran al polo L. Los casos B y L pueden migrar al polo T lo que se conoce como reacción de reversa. Por otro lado, los casos BT pueden migrar al polo L, lo que se conoce como reacción de degrado (1,2).

Actualmente la lepra es curable. El tratamiento eficaz de la misma inicia en la década de los cuarenta en que se utilizan por primera vez las

sulfonas y se establece como droga de elección a la diamino-difenil-sulfona (DDS). Es una droga bacteriostática, barata, eficaz y bien tolerada. La dosis recomendada es de 1 a 2 mg/kg/día. Es de acción lenta y produce reacción leprosa así como desarrollo de resistencia. Los efectos colaterales asociados son metahemoglobinemia, anemia hemolítica, y síndrome DDS, entre otros.

La clofazimina, derivado de la anilina, es bactericida y por su acción antiinflamatoria también es de utilidad en la reacción leprosa. Se utiliza en dosis de 50 a 100 mg/día. Ocasiona xeroftalmía, hipohidrosis y trastornos gastrointestinales además de hiperpigmentación de piel y mucosas, dosis dependiente, que remite al suspender el fármaco.

La rifampicina es altamente efectiva y produce menos reacción leprosa que las sulfonas. Bloquea la síntesis de DNA bacteriano y se usa a razón de 300 a 600 mg/día ó 1200 mg/mes con lo que disminuye el riesgo de hepatotoxicidad.

El uso combinado de estos medicamentos previene el desarrollo de resistencia. Aunque se dispone comercialmente de esquemas establecidos (COMBI) se debe individualizar cada caso pudiendo emplearse los fármacos

por separado. El tipo y duración del tratamiento dependen de la forma clínica y de la respuesta inmunológica del paciente. Los casos cercanos al polo L requieren politerapia hasta por 3 a 5 años y los cercanos al T pueden ser tratados con 1 ó 2 fármacos hasta la remisión clínica de las lesiones. Las manifestaciones neuríticas requieren de esteroides a dosis bajas que utilizados previamente evitan la paradoja terapéutica, fibrosis cicatrizal, condicionada por el tratamiento antihansénico. Además, se deben tratar específicamente las manifestaciones extracutáneas y sus secuelas (12).

MANIFESTACIONES AGUDAS DE LA LEPRO

La cronicidad de la lepra quizá se deba a la baja patogenicidad y al largo período de generación del germen causal. Sin embargo, la enfermedad cursa con diversos episodios agudos y subagudos que se presentan en todos los grupos a excepción de los casos I y están íntimamente ligados a la respuesta inmunológica del paciente. Las manifestaciones agudas se dividen en 2 grandes grupos:

1. Exacerbación de lesiones preexistentes ya sean lepromatosas o tuberculoides. Estas ocurren en casos subpolares y polares L y T respectivamente. Se produce exacerbación de las lesiones cutáneas y la neuritis preexistentes, esta última puede alcanzar gran intensidad en los tuberculoides. En la LL estos eventos se relacionan con insuficiencia o interrupción del tratamiento, y en la TT con aumento de la hipersensibilidad al bacilo. En ambos casos el tratamiento es el antileproso adecuado y en su caso esteroides.

2. Aparición de nuevas lesiones, leproreacciones propiamente dichas, que a su vez se clasifican en dos grandes grupos (Ridley & Jopling, 1966):

A. Reacciones tipo I:

a) **De Reversa.** Aparece en casos inter o subpolares cercanos al polo L que recorren el espectro acercándose al polo T, sin llegar a ser polares jamás. Puede ocurrir espontáneamente o tras el tratamiento antileproso. Aparecen nuevas lesiones con intensa neuritis y ataque al estado general. Se relaciona a la recuperación parcial de la inmunidad celular y requiere del uso de esteroides a dosis adecuadas además del tratamiento antileproso.

b) **De degrado.** Se trata de casos cercanos al polo T que por diversos motivos se deslizan al polo L, lepromatización del caso, con deterioro de la inmunidad celular. Es un proceso gradual que exige la modificación de la terapia antihanseniana instituída.

B. Reacción tipo II. Ocurre en el 22 a 75% de los casos lepromatosos polares y subpolares y está mediada por inmunidad celular. Es la clásica reacción leprosa (RL). Mal llamada eritema nudoso leproso (ENL) ya que no es el único síndrome que la caracteriza. Clínicamente la RL es impredecible y se desencadena por todo aquello que interrumpe un aparente equilibrio en el enfermo: pubertad, embarazo, menstruación, estrés, infección

intercurrente, medicamentos (yodo, el tratamiento antileproso mismo) y hasta cambios climatológicos. Hay pacientes que nunca la presentan, otros sufren varios episodios que posteriormente desaparecen y algunos la presentan en forma subintrante, es decir, siempre con la presencia de algún síntoma reaccional.

La RL contribuye a la morbilidad complicando la enfermedad y puede incidir en aspectos socioeconómicos del paciente ya que en ocasiones requiere del internamiento hospitalario para su control. Los episodios repetidos deterioran el estado general del paciente y provocan el depósito de amiloide en hígado y riñón pudiendo ocasionar glomerulonefritis crónica e insuficiencia renal terminal. Además, pueden condicionar secuelas derivadas de la iridociclitis, orquiepididimitis y la neuritis intensa.

Clinicamente se observan signos y síntomas generales tales como fiebre elevada, cefalea, mialgias y artralgias, hepato y esplenomegalia, náuseas y vómitos. A nivel cutáneo se pueden presentar 3 síndromes en forma aislada o combinados en un mismo paciente. En orden descendente de frecuencia ellos son:

1. El eritema nudoso. Se caracteriza por nudosidades que son lesiones hipodérmicas, dolorosas, resolutivas y pueden llegar a ulcerarse. Aparecen por brotes de breve duración en extremidades, tronco y cara. Se distingue del eritema nudoso de cualquier otra etiología por ser recidivante y más extenso: "eritema nudoso que repite y pasa arriba de la cintura: reacción leprosa mientras no se demuestre lo contrario" (Saúl) (1).

2. El eritema polimorfo. Similar al que se presenta por otras causas: placas eritematopapulosas, eritematovesiculosas o francamente ampollas que evolucionan en días acompañadas de ardor y que no dejan huella alguna. Aparece en tronco y extremidades y casi no afecta mucosas.

3. El eritema necrosante o fenómeno de Lucio. Aparece en el 25 a 30% de los casos difusos y es excepcional en los nodulares. Es una vasculitis leucocitoclástica que necrosa los vasos pequeños de la dermis. Evoluciona en 3 a 4 semanas pasando por las siguientes etapas: mácula eritematosa mal definida, máculas purpúricas rojo-vinosas, ardorosas y de figuras zoomórficas o geográficas, escara, ulceración y cicatriz. Cuando las lesiones ascienden a cara indican mal pronóstico (Lucio) (1).

Las neuritis preexistentes se exacerban con intensa inflamación de los

nervios, dolor y repercusión en la sensibilidad, motilidad y troficidad de las áreas afectadas.

En los exámenes de laboratorio se detectan anemia, leucocitosis marcada y aumento importante de la eritrosedimentación, esta última de utilidad como índice evolutivo de la RL. Hay también hipergamaglobulinemia, hipocomplementemia, reacciones serológicas falsas positivas y autoanticuerpos contra tiroides, núcleo, etc.

Si bien las baciloscopías se negativizan, la reacción a la lepromina nunca se vuelve francamente positiva y se reneгатiviza tras la desaparición de la RL. La imagen histológica de los tres síndromes cutáneos revela vasculitis leucocitoclástica con intenso infiltrado compuesto por polimorfonucleares, linfocitos y escasos bacilos. En la inmunofluorescencia directa se detectan depósitos de inmunoglobulinas, complejos inmunes y fracciones de complemento en las paredes vasculares y alrededor de las mismas (13).

El tratamiento comprende el uso de varios medicamentos. A pesar de sus peligros teratogénicos, el de elección es la talidomida que no posee

efecto contra la lepra misma (14). Además de sus acciones sedante y antiinflamatoria posee efecto inmunosupresor (15,16). Dosis de 300 mg/d. de inicio y 50 mg/d. de sostén controlan las crisis en pocos días: fiebre, lesiones cutáneas, neurales y viscerales. Se ha demostrado que las proteínas micobacterianas inducen la síntesis de interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (17). El rápido y dramático efecto de la talidomida podría estar relacionado con la inhibición selectiva de la producción de TNF- α (18). Además se ha señalado que la talidomida inhibe la producción de IgG e IgM, la llegada de polimorfonucleares y la relación de linfocitos T cooperadores/supresores (5,12,19). En mujeres de edad fértil deben tomarse las medidas anticonceptivas adecuadas.

La clofazimina (100 mg/día), la colchicina (1 mg/día), los antimonioales, el plasma o sangre total, los antiinflamatorios no esteroideos y el tratamiento sintomático pueden ser útiles en algunos casos cuando se carece de talidomida. Los esteroides no deben ser utilizados a menos que exista neuritis intensa o fracaso con la talidomida.

Neuritis reaccionales. Son producidas por mecanismos inmunológicos (20). Se clasifican en tipo 1 ó 2 no solo con fines académicos, sino terapéuticos. La tipo 1 aparece en la reacción de reversa y se relaciona con activación de linfocitos T y producción de enzimas que pueden condicionar daño y secuelas neuromusculares irreversibles. No cede a la talidomida y si a los esteroides.

La neuritis tipo 2 acompaña a la reacción leprosa tipo II. Es más aguda, bilateral, menos dolorosa que la anterior y cede con talidomida y esteroides.

La mano reaccional es un cuadro muy aparatoso que puede afectar manos y/o pies. Aparece en casos severos de reacción tipo II. Condiciona reabsorción ósea y osteoporosis con gran invalidez del paciente. Requiere del uso de esteroides ya que la talidomida no es de gran utilidad (21).

INMUNOLOGIA DE LA LEPROA

La capacidad del individuo para montar una respuesta inmune que limite la multiplicación bacilar, tras la infección con *M. leprae*, determina en qué polo del espectro la enfermedad se manifestará. Aunque la inmunidad humoral (IH) y celular (IC) son simultáneamente activadas, es esta última la de mayor relevancia dado que el bacilo es un organismo intracelular. La lepra es considerada un modelo inmunológico único en patología. Los casos lepromatosos muestran una dicotomía que no se observa en la TT. En los primeros, la IC se encuentra deteriorada y aún se discute si este defecto es o no específico contra el bacilo de Hansen. Para su esclarecimiento se ha utilizado al dinitroclorobenceno (DNCB), contactante potente que sensibiliza a los linfocitos T. Por lo tanto, el desarrollo de dermatitis por contacto al DNBCB es un buen índice del estado de la IC. Existen reportes (22,23) que no muestran diferencia alguna en la respuesta al DNBCB entre enfermos de lepra y controles sanos por lo que se concluye que no existe alteración de la IC inespecífica. Sin embargo, otros autores (24,25) han señalado que existe un déficit mínimo de la IC en la TT que se acentúa al acercarse al polo L. Estos hallazgos se han relacionado con la carga bacilar y con la duración de la enfermedad.

En 1919 Mitsuda introdujo la reacción que lleva su nombre. Esta consiste en la inyección intradérmica de tejido leproso tratado con calor. Tres a cuatro semanas más tarde se observa localmente una reacción eritematodular en pacientes del polo T y cercanos que no se presenta en los lepromatosos. La reacción de Mitsuda brinda una mejor comprensión del estado inmunológico del individuo. No es una prueba diagnóstica, es de utilidad en la clasificación de los casos. Es fuertemente positiva en la TT y negativa en LL, en el grupo B es débilmente positiva o negativa y en los casos I puede ser positiva o negativa indicándonos hacia qué polo migrarán (26). La negatividad de la respuesta traduce anergia al bacilo y puede acompañarse de inadecuada respuesta a otros antígenos intradérmicos (27).

Los linfocitos T son el componente celular terminal de la IC. Ellos y sus subpoblaciones han sido estudiados en sangre periférica en distintos tipos de lepra. La relación de linfocitos cooperadores/inductores (T4) y supresores/citotóxicos (T8) refleja el balance linfocítico periférico y se considera un índice más adecuado que el conteo individual de las células T4 y T8 (28). Se han encontrado cifras bajas de células T, deficiente transformación de linfoblastos y déficit de linfocinas como el MIF en

pacientes lepromatosos por lo que se ha sugerido la presencia de un factor supresor de la IC a nivel sérico (29,30,31). También, se ha reportado depleción de células T del área paracortical de ganglios linfáticos involucrados en pacientes lepromatosos junto con una disminución significativa de la población sanguínea de células T (32). Las alteraciones periféricas de los linfocitos parecen ser directamente proporcionales a la carga bacilar (33).

El estudio del infiltrado celular a nivel lesional, ej. lepromas, permite valorar la respuesta local del huésped al agente infeccioso. El porcentaje de células T4 disminuye en tanto que el de las T8 aumenta del polo T al L. En granulomas tuberculoideos hasta el 95% del infiltrado corresponde a células T cooperadoras mientras que en las lesiones lepromatosas hasta el 85% de la población celular está constituido por células T supresoras/citotóxicas (34,35,36). En lesiones de neuropatía hanseniana se ha reportado disminución de células T tanto en pacientes BT paucibacilares como en LL con índice multibacilar (37).

Los macrófagos desempeñan un papel importante en el desarrollo de

la respuesta inmune. Además de lisar microorganismos, regulan la intensidad de la respuesta de las células linfoides a diferentes antígenos. Activan células T antígeno-específicas ya sea mediante la presentación de antígenos o la producción de IL-1. Esta induce, en cierto grupo de células T, a la producción de un factor de crecimiento linfocítico denominado interleucina-2 (IL-2). En tanto que en otro grupo de células T origina la aparición de receptores de IL-2. La interacción IL-2-receptor inicia la respuesta proliferativa para combatir al antígeno (38). En la lepra lepromatosa, se han detectado alteraciones en la capacidad macrófaga para destruir al bacilo lo que no se observa en la TT (39). En estudios *in vitro* (40), se ha demostrado que los linfocitos periféricos de pacientes con LL que no reaccionan contra el *M. leprae* en pruebas de estimulación, se vuelven reactivos al ser combinados con macrófagos de contactos sanos. Además, cuando las células T de estos últimos se combinan con macrófagos de pacientes que no responden a la estimulación, las primeras dejan de activarse. Se ha propuesto que tales defectos obedezcan a una falla en la presentación de antígenos y/o a una disminución en la síntesis de proteínas por los macrófagos en presencia del bacilo (41).

Otros autores (42) atribuyen la falta de respuesta de los pacientes lepromatosos a un déficit de IL-2. Esta disminución provoca fallas en la proliferación clonal de células cooperadoras con pobre destrucción y remoción de bacilos (43). El déficit podría ser originado por un factor soluble o por la presencia de células supresoras específicas (44). Sin embargo, la administración de IL-2 no corrige la falta de respuesta al GLF-I por lo que se sugiere que la estimulación linfocítica inducida por la IL-2 es inespecífica (45).

En cambio, la inmunidad humoral no solo puede estar normal sino incluso exacerbada, quizá por un desbalance en las subpoblaciones de linfocitos T (29,46). Esto condiciona la producción policlonal de una gran cantidad de anticuerpos (reacción de hipersensibilidad tipo 3 de Gell y Coombs) (47) que forman complejos inmunes y atraen polimorfonucleares con liberación de enzimas responsables de un estado inflamatorio que conduce a la RL (48,49).

Se ha demostrado que los títulos de anticuerpos contra el GLF-I disminuyen durante la RL en comparación con los valores observados en

etapa prerreaccional. Se considera que esta disminución podría ser debida a la formación y depósito de complejos inmunes (50). Sin embargo, en su patogenia también podría participar la activación transitoria de la IC que ha sido evidenciada por: respuesta parcial a la lepromina, incremento del índice de transformación de linfocitos T, del MIF, y del número de linfocitos y células epiteloides en la zona paracortical de los ganglios linfáticos (21).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o caquectina es una hormona polipeptídica de 17 kd que comparte el 30% de la secuencia de aminoácidos de la linfoxina o TNF- β . La producción de ambas citocinas es regulada por genes distintos del brazo corto del cromosoma 6 (51). Aunque ambas se unen a los mismos receptores y poseen acciones biológicas similares, difieren en que la linfoxina es producida principalmente por linfocitos mientras que el TNF- α es producido básicamente por monocitos y macrófagos. El TNF es sintetizado y liberado en respuesta a varios estímulos (virus, bacterias, hongos, parásitos, etc.) y se degrada rápidamente en la circulación. Su vida media es de aproximadamente 6 a 30 minutos (52). La dexametasona puede inhibir su liberación si es administrada previo a la

exposición a endotoxinas. Los inhibidores de las prostaglandinas no inhiben la liberación de TNF, pero previenen la fiebre, el ataque al estado general y la producción de ACTH. Esto sugiere que las prostaglandinas, en particular la E2, son mediadoras de algunos efectos del TNF (53). El interferón gama (IFN- γ) aumenta la síntesis de TNF y la expresión de sus receptores (54). Existen receptores membranales de TNF en muchos tejidos pero predominan a nivel pulmonar y cutáneo. En la piel se han detectado en células endoteliales y fibroblastos (55,56) y ocupa un lugar relevante entre las citocinas secretadas por los queratinocitos. Su papel en la fisiología y la patología cutánea es objeto de gran interés en la actualidad (57). El complejo TNF-receptor sufre exocitosis y degradación pero se desconoce la secuencia de eventos intracelulares que desencadena. Llama la atención que el mismo receptor en diferentes células pueda promover el crecimiento de alguna línea celular (ej. fibroblastos) y ser citotóxico para otro tipo de células (ej. células tumorales) (58). Para explicar esta paradoja se ha postulado la existencia de subclases de receptores para TNF.

El efecto global del TNF parece depender de la concentración de la citocina. Sus efectos van de la remodelación tisular a dosis bajas, al choque y muerte a niveles elevados (59). Existen numerosos reportes sobre efectos

serios y potencialmente letales de la secreción de TNF en el curso de enfermedades infecciosas severas (60). Sin embargo, parece ser que el TNF también desempeña un papel protector a los niveles que se secreta durante la mayoría de los procesos infecciosos. El TNF promueve la quimiotaxis y la actividad antimicrobiana de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos (61)

La disponibilidad de TNF recombinante (rTNF) y de anticuerpos monoclonales frente al mismo, ha permitido un rápido avance en el conocimiento de sus múltiples funciones. Participa en la respuesta inmune e inflamatoria, la defensa frente algunas neoplasias e infecciones, en el choque endotóxico, la activación endotelial y la coagulación, el control del crecimiento celular, la hematopoyesis y la regulación de diversas funciones metabólicas, así como en interacciones entre los sistemas inmune y endócrino. Sus acciones *in vivo* están moduladas por otras citocinas que regulan su expresión o son reguladas por él. En conjunto, constituyen una intrincada red de interacciones moleculares y celulares (62).

El TNF y las IL-1 e IL-6 son las principales citocinas inducidas por endotoxinas que producen los síntomas de la sepsis por gérmenes Gram

negativos (fiebre, hipotensión, acidosis, coagulación intravascular diseminada y muerte) (63). Se considera que los niveles discretamente elevados persistentes de TNF observados en distintas infecciones crónicas, son los responsables de la producción de caquexia. En los pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana los niveles de TNF se incrementan a medida que progresa la enfermedad y se deteriora el estado general del paciente (64,65). El síndrome de desgaste producido por el TNF se debe a la inhibición de enzimas lipogénicas y prevención de acumulación de lípidos (66). Así mismo, puede incrementar la tasa metabólica de reposo y depletar los depósitos de glucógeno muscular. Algunos de estos efectos podrían ser debidos a la inducción de mediadores secundarios tales como IL-1 y corticoides endógenos.

Recientemente se han encontrado niveles séricos elevados de TNF- α e IL-1 en la RL lo que sugiere que algunas de sus manifestaciones podrían relacionarse con la producción de citocinas derivadas de macrófagos (67,68). Además, como se señaló anteriormente se sabe que las proteínas micobacterianas inducen la producción de TNF- α (17) y que la talidomida inhibe selectivamente la misma (18).

El desconocimiento del mecanismo desencadenante y de la etiopatogenia de la RL ha impedido su tratamiento etiológico y la prevención de importantes secuelas que pueden llevar al paciente a la muerte.

JUSTIFICACION

La lepra es una infección crónica que constituye un problema de salud pública en nuestro país, se calcula que pueden existir entre 50 y 100 mil pacientes. A pesar de que la enfermedad se conoce desde la antigüedad, aún se desconocen a ciencia cierta los mecanismos inmunológicos involucrados en su patogénesis.

La lepra lepromatosa constituye el 60% de todos los casos. La RL, presente en el 60 a 75% de los casos lepromatosos, es un evento agudo con repercusión sistémica que interrumpe la evolución crónica de la enfermedad. Clínicamente la RL es impredecible y se desencadena por todo aquello que interrumpe un aparente equilibrio en el enfermo. Contribuye a la morbilidad complicando la enfermedad y puede conducir al paciente a la muerte. En la actualidad el tratamiento de elección de la RL es la talidomida, que a pesar de su alta efectividad es de difícil obtención por sus efectos teratogénicos. Ello motiva que estos enfermos deban ser atendidos en centros especializados en su control.

El entendimiento de la naturaleza de este fenómeno podría evitar su presentación y/o permitir su tratamiento etiológico.

HIPOTESIS

Se ha observado que los pacientes con RL muestran un aumento de los parámetros indicativos de respuesta inmune celular y humoral, lo que sugiere su participación en este evento.

El mecanismo mediante el cual la respuesta inmune se activa, participa o regula la RL, es aún desconocido. se sugiere que antígenos inmunodominantes de *M. leprae* podrían inducir la producción de anticuerpos críticos para la formación de complejos inmunes que activen a otros elementos de la respuesta inmune o que ejerzan un efecto nocivo directo sobre sustratos tisulares.

Dado el carácter sistémico del evento, si la inmunidad humoral y celular desencadenan la reacción, deberán encontrarse serológicamente elementos de las mismas que desaparezcan o retornen a niveles prerreaccionales al resolverse el cuadro.

Dado que existe evidencia de la activación de macrófagos en la RL creemos que citocinas derivadas de los mismos como el TNF- α podrían

encontrarse elevados durante el evento agudo. Además, como se ha señalado que la talidomida inhibe selectivamente la producción de $\text{TNF-}\alpha$, éste deberá retornar, tras el uso de talidomida, a niveles prerreaccionales al resolverse el cuadro. Esto permitiría quizá, evaluar el efecto inmunosupresor del fármaco en la entidad.

Por lo anterior, consideramos que los pacientes en RL presentan un patrón particular de reconocimiento de antígenos que no muestran en estadios no reaccionales, y que tampoco ocurre en pacientes con cualquier otro tipo de lepra que no curse con episodios reaccionales.

OBJETIVOS

- 1) Clasificar la RL tipo II a fin de correlacionarla con los hallazgos inmunológicos a detectar.
- 2) Caracterizar inmunológicamente pacientes susceptibles de presentar reacción leprosa.
- 3) Identificar antígenos de *M. leprae* que induzcan la producción de anticuerpos desencadenantes de la RL.
- 4) Establecer un patrón diferencial de antígenos en pacientes con y sin reacción leprosa.
- 5) Conocer con mayor exactitud la patogénesis inmunológica de la RL, mediante la determinación del TNF para quizá poder prevenir su presentación y/o instituir su tratamiento oportuno.
- 6) Evaluar el efecto inmunosupresor de la talidomida.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES. Inicialmente incluimos 25 pacientes con diagnóstico de lepra captados de la Clínica de Leprología del Servicio de Dermatología del Hospital General de México, SS. Las muestras serológicas recolectadas en ellos, fueron enviadas para su procesamiento a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.

Excluimos del estudio a 5 pacientes (casos: 6, 7, 12, 23, 24) con diagnóstico de lepra lepromatosa nodular en quienes no se pudieron obtener muestras serológicas con y sin reacción leprosa por lo que no pudieron ser incluidos como casos. Por lo tanto, solo 20 pacientes concluyeron el estudio.

El diagnóstico de lepra fue realizado mediante criterios clínicos, bacteriológicos, histológicos e inmunológicos universalmente aceptados (1).

La clasificación de los casos se realizó de acuerdo al modelo espectral de Ridley & Jopling (11).

La reacción leprosa fue definida como la presencia de 1 ó más

síndromes cutáneos característicos de esta entidad acompañados o no de manifestaciones extracutáneas y/o sintomatología general y de velocidad de eritrosedimentación elevada (mayor de 20 UW). Esta última se determinó tanto para corroborar el diagnóstico de RL como para valorar la evolución de los casos.

Los 20 pacientes fueron divididos en dos grupos:

A) **Grupo de casos**, 10 pacientes con diagnóstico de lepra lepromatosa nodular o difusa (8 hombres, 2 mujeres con edad promedio de 42 años; rango de 18 a 66 años), que durante el estudio cursaron con reacción leprosa tipo II (uno o más episodios) y fueron estudiados con y sin leproreacción una vez remitida mediante el uso de talidomida. La primera muestra fue obtenida con RL tipo II y sin recibir talidomida. La segunda fue tomada ya sin RL y en tratamiento con talidomida aproximadamente 1 mes después de la primera. En algunos pacientes (casos: 2, 13, 14, 15, 18 y 21) fue posible obtener una tercera muestra (2a postreaccional) posterior a los 4 meses de tratamiento con talidomida. En ellos se investigaron las características clínicas de la RL: tipo y número de lesiones existentes en el momento de la valoración clínica, evolución de la enfermedad y tratamiento antihanseniano recibido (ver tabla 1).

TABLA 1. CARACTERISTICAS DEL GRUPO DE CASOS

Paciente No.	Sexo	Edad (años)	Clasificación*	Evolución (años)	RL** tipo	Lesiones (No.)	Tratamiento+
2	M	66	LLN	4	ENL	18	R,D,C
9	M	46	LLN	10	ENL	26	R,D,C
10	F	53	LLD	28	ENL	12	R,D
11	F	18	LLN	14	ENL	5	R,D, C+T
13	M	47	LLN	3	ENL	45	R,D,C
14	M	36	LLN	5	ENL	20	R,D,C
15	M	29	LLN	1	ENL	35	R,D
18	M	42	LLD	7	FL+ENL	8+7	R,D,C
20	M	37	LLN	15	ENL	20	C
21	M	46	LLD	30	ENL	38	R,D, C,T

* LLN= lepra lepromatosa nodular; LLD= lepra lepromatosa difusa.

** ENL= eritema nudoso leproso; FL= fenómeno de Lucio.

+ R= rifampicina 1200 mg/mes; D= DDS 100 mg/día; C= clofazimina 100 mg C/3er día; T= talidomida 100 mg/día.

B) **Grupo control**, 10 pacientes con diagnóstico de lepra polar o subpolar L ó T (5 mujeres, 5 hombres con edad promedio de 57.3 años; rango 35 a 71 años), sin reacción leprosa tipo II durante el estudio y en quienes se obtuvo muestra serológica única tanto para la determinación de TNF como para la velocidad de sedimentación globular (ver tabla 2).

TABLA 2. CARACTERISTICAS DEL GRUPO CONTROL

Paciente No.	Sexo	Edad (años)	Clasificación*	Evolución (años)	Tratamiento**
1	M	35	LLN	19	R,D,C
3	M	61	LT	18	D,C
4	F	59	LLN	30	R,D
5	F	56	LLN	8	D
8	F	42	BT	4	R,D
16	M	66	LLN	26	R,D
17	M	64	BT	23	R,D
19	F	71	BL	2	R,D
22	F	68	BT	3	D,P
25	M	51	LLD	24	R,D

* LLN= lepra lepromatosa nodular; LT= lepra tuberculóide; BT= dimorfo tuberculóide; BL= dimorfo lepromatoso; LLD= lepra lepromatosa difusa.

** R= rifampicina 1200 mg/mes; D= DDS 100 mg/día; C= clofazimina 100 mg C/3er día; P= prednisona 20 mg/día.

Incluimos un segundo grupo control constituido por 10 sujetos sanos en quienes se determinó la concentración de TNF como parámetro de referencia (ver tabla 3).

El procedimiento técnico empleado incluyó:

- 1) Obtención de 2 ml de sangre venosa periférica para la determinación de velocidad de sedimentación globular expresada en unidades Wintrobe.
- 2) Obtención de 20 ml de sangre periférica sin anticoagulación mediante venopunción en ayunas, con la que se realizó el siguiente procedimiento:
 - a) Separación del suero mediante centrifugación.
 - b) Congelación de alícuotas del suero a - 70°C (congelador Revco) hasta su uso (una vez reunido el total de muestras para ser analizadas bajo las mismas condiciones).
 - c) Comparación del patrón de reconocimiento de antígenos del *M. leprae* por los sueros de los pacientes (Grupo I "casos") reaccionales y postreaccionales, por Western-blot.
 - d) Bioensayo de citotoxicidad de L929 con TNF (ver adelante).

WESTERN BLOT. Como antígeno se utilizó un extracto soluble de bacilos de *M. leprae* obtenido de armadillos infectados con bacilos provenientes de lepromas humanos. Brevemente, este extracto se obtuvo al centrifugar bacilos rotos mediante sonicación a 100 Watts (15 min en baño de hielo/agua); los bacilos fraccionados se centrifugaron a 10,000 *g* durante 10 min; el sobrenadante de esta muestra se designó como extracto soluble de *M. leprae* (MLSE), y se ajustó a una concentración de 1 mg/ml de proteína.

Veinte microgramos de MLSE se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS 0.1%) y ditiotreitol 5mM. Los antígenos separados se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ en regulador de transferencia (glicina 140 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5), durante 16 h a 100 mA. Esta membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBST durante 30 min, se lavó 3 veces con PBST y se incubó durante 16 h con el suero del paciente diluido 1:100 en PBST. Nuevamente se lavó 3 veces con PBST, para después incubarla 2 h con suero de cabra anti IgG e IgM humanas (en forma individual) conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:3000 en PBST). La membrana fue lavada 4 veces con PBST y una

vez con PBS (todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente). Las reacciones antígeno-anticuerpo se pusieron de manifiesto con el sustrato: 3-amino-9-etil-carbazolona (6 mg en 1.25 ml de N,N-dimetil formamida, mezclados con 25 ml de regulador de acetatos 0.05M pH 5, con 2.5 μ l de peróxido de hidrógeno 30%). Las bandas reveladas con el anticuerpo enzima se observaron de color ocre intenso.

BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD. Para determinar la citocina TNF presente en suero, utilizamos un ensayo estándar con células tumorales de ratón L929 (69). Brevemente, las células L929 en medio RPMI 1640 con 5% (vol/vol) de suero fetal de ternera, fueron colocadas a una concentración de 3×10^4 células por pozo en placas de microcultivo de 96 pozos (Nunc) e incubadas durante toda la noche a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Los sueros de los pacientes fueron diluidos en forma seriada en RPMI 1640 con 1.0 μ g/ml de emetina, y volúmenes de 100 μ l de cada dilución fueron agregados a los pozos en presencia o ausencia de un antisuero TNF policlonal de conejo a una dilución 1:1000. Tras 20 horas de cultivo, la supervivencia celular fue evaluada mediante la fijación con glutaraldehído al 2.5% y tinción de las células con cristal violeta (2% en metanol al 20%)

solubilizando las células teñidas con 0.1 ml de ácido acético al 33% por pozo y leyendo la absorbancia de cada pozo a 470 nm con un autolector microelisa. El porcentaje de citotoxicidad fue calculado como $(1 - \text{absorbancia de la muestra} / \text{absorbancia del control}) \times 100$. Se utilizó RPMI 1640 en los pozos control. Una unidad TNF fue definida como la cantidad de TNF que permitió la supervivencia del 50% de las células. Una muestra de suero fue considerada TNF-positiva si la diferencia en supervivencia celular fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con ausencia y presencia de antisuero TNF. El ensayo de supervivencia celular se realizó por triplicado y con desconocimiento de las características clínicas y laboratoriales de los pacientes; durante el estudio las muestras fueron aleatoriamente seleccionadas para su colocación en las placas. Se incluyó un estándar interno en el ensayo de TNF encontrándose que 1 unidad de TNF es igual a 0.43 pg de TNF.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. El análisis estadístico de los resultados del bioensayo se realizó por la prueba de Fisher y en su caso con la prueba de T pareada. (El nivel de significancia fue de $\alpha = 0.01$).

RESULTADOS

La primera parte del estudio consistió en la determinación de los valores de TNF medidos por bioensayo empleando la línea de fibroblastos de ratón L929. En la tabla 3 se observan los valores expresados en U/ml tanto del grupo de casos (con RL y sin talidomida, y sin RL y con talidomida) como del grupo control y de sujetos sanos.

En la segunda parte del estudio determinamos la presencia de antígenos inmunodominantes de *M. leprae* mediante Western Blot o inmunoelectrotransferencia. A continuación se muestran los resultados del mismo.

TABLA 3

VALORES DE TNF-alfa (EN U /ml) MEDIDOS POR BIOENSAYO

GRUPO DE CASOS CON LL Y RL							GRUPO DE CONTROLES SIN RL Y SIN TALIDOMIDA						SUJETOS SANOS	
No. DE MUESTRA:														
PACIENTE	1*	VSG+	2**	VSG	3***	VSG	PACIENTE	LL / BL	VSG	PACIENTE	TT / BT	VSG	CLAVE	TNF
2	244.2	ND++	252.8	ND	89.4	17	1	85.7	ND	3	261.1	ND	A	16.0
9	478.4	57	478.4	47		ND	4	178.8	ND	8	203.3	ND	B	43.1
10	217.6	47	108.0	21		ND	5	178.8	ND	17	306.9	28	C	≤5.0
11	178.8	8	171.4	8		ND	16	90.7	7	22	283.7	14	D	51.0
13	87.5	55	27.5	43	<5.0	30	19	164.3	18				E	≤5.0
14	201.1	20	208.2	16	117.1	6	25	148.4	19				F	52.0
15	113.1	62	217.0	34	44.7	8							G	41.1
18	263.5	56	263.5	32	192.9	46							H	32.7
20	320.0	57	190.2	12		ND							I	31.6
21	252.8	70	226.2	64	105.8	67							J	≤5.0

* TOMADA CON RL II Y SIN INGESTA DE TALIDOMIDA

** TOMADA 4 SEMANAS DESPUES DE LA 1a., SIN RL II Y CON TALIDOMIDA SIN RL

*** TOMADA CON 4 O MAS MESES DE TRATAMIENTO CON TALIDOMIDA

+ VSG=VELOCIDAD DE SEDIMENTACION GLOBULAR EN UNIDADES WINTROBE

++ ND=VSG NO DETERMINADA

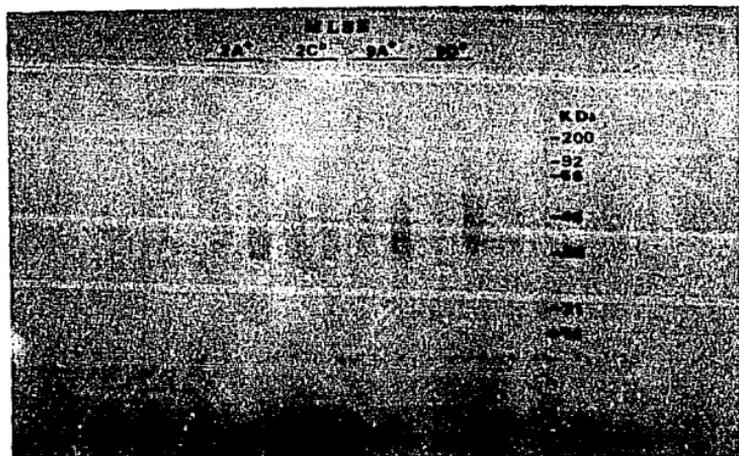


Fig. 1. Western blot de extracto soluble de *M. leprae* (MLSE) revelado con los sueros de pacientes lepromatosos 2 y 9 con (+) ó sin (°) reacción tipo II. Como segundo anticuerpo se usaron conjugados de cabra anti-IgM (M) ó anti-IgG (G) humanas, marcados con peroxidasa.

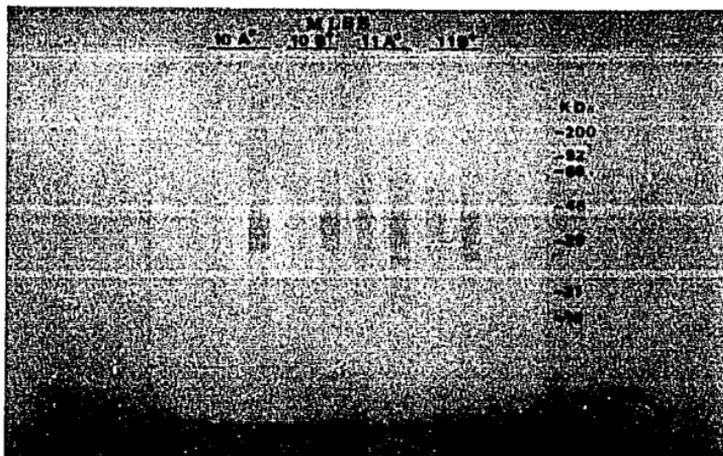


Fig. 2. Western blot de extracto soluble de *M. leprae* (MLSE) revelado con los sueros de pacientes lepromatosos 10 y 11 con (+) ó sin (°) reacción tipo II. Como segundo anticuerpo se usaron conjugados de cabra anti-IgM (M) ó anti-IgG (G) humanas, marcados con peroxidasa.

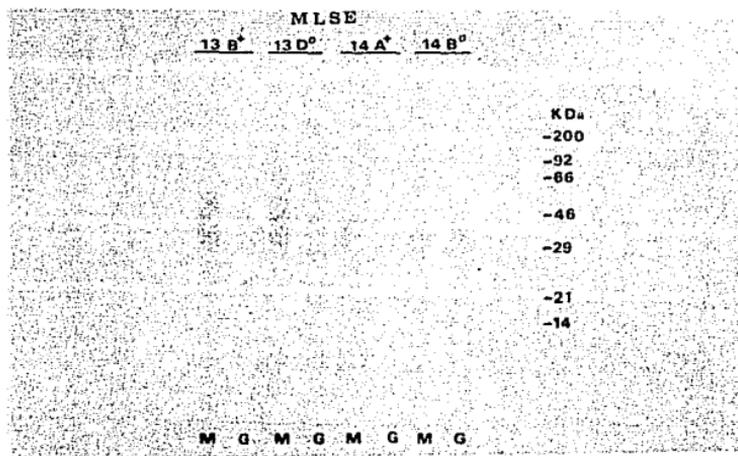


Fig. 3. Western blot de extracto soluble de *M. leprae* (MLSE) revelado con los sueros de pacientes lepromatosos 13 y 14 con (+) ó sin (°) reacción tipo II. Como segundo anticuerpo se usaron conjugados de cabra anti-IgM (M) ó anti-IgG (G) humanas, marcados con peroxidasa.

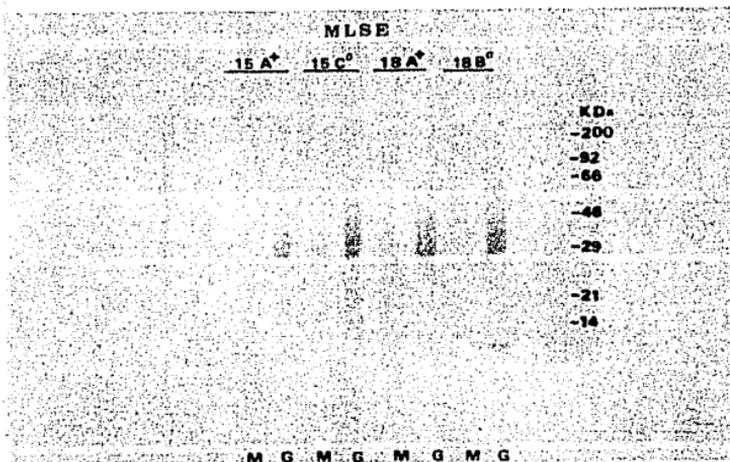


Fig. 4. Western blot de extracto soluble de *M. leprae* (MLSE) revelado con los sueros de pacientes lepromatosos 15 y 18 con (+) ó sin (-) reacción tipo II. Como segundo anticuerpo se usaron conjugados de cabra anti-IgM (M) ó anti-IgG (G) humanas, marcados con peroxidasa.

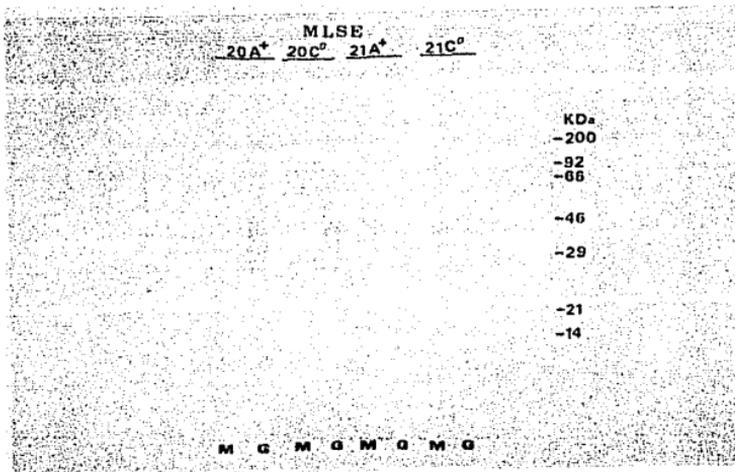


Fig. 6. Western blot de extracto soluble de *M. leprae* (MLSE) revelado con los sueros de pacientes lepromatosos 20 y 21 con (+) ó sin (°) reacción tipo II. Como segundo anticuerpo se usaron conjugados de cabra anti-IgM (M) ó anti IgG (G) humanas, marcados con peroxidasa.

DISCUSION

La cronicidad de la lepra puede verse interrumpida por episodios agudos, reacción leprosa (RL), que deterioran el estado general del paciente (21). Estos episodios han sido relacionados con la presencia de complejos inmunes (70). Sin embargo, existe evidencia de una activación transitoria de la respuesta inmune celular (29,46). El tratamiento de elección de la RL es la talidomida, que además de sus efectos sedante y antiinflamatorio, posee efecto inmunosupresor (18), mediante la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

De acuerdo con lo anterior, decidimos realizar un estudio temporal de un grupo de pacientes con diagnóstico de lepra lepromatosa nodular o difusa y presencia de episodios reaccionales tipo II, en los cuales el tratamiento instituido para su resolución consistió en el uso de talidomida (5). En ellos, pretendimos valorar el estado tanto de la inmunidad celular (IC) como de la inmunidad humoral (IH) a través de la determinación de los niveles séricos de TNF y el esquema de reconocimiento antigénico de *M. leprae* por Western blot, respectivamente. Como marco de referencia incluimos sujetos sanos y pacientes con lepra lepromatosa sin RL, así como pacientes con BT y TT.

En la primera parte del estudio encontramos que los niveles séricos de TNF en sujetos sanos alcanzaron valores máximos de hasta 52 U/ml. Mientras que en los otros grupos, tanto de casos como de controles, los niveles observados alcanzaron cifras hasta de 478.4 U/ml, diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0.01$, (ver tabla 3), acorde con lo señalado por otros autores (71,72).

En la primera muestra del grupo de casos (pacientes con reacción leprosa y sin talidomida), observamos que los niveles de TNF se encontraban elevados, siendo semejantes a los observados en el grupo de controles con lepra TT o BT (diferencia estadísticamente no significativa). Es interesante mencionar que el grupo de casos tuvo niveles muy por encima de los del grupo control con lepra lepromatos (sin historia de episodios reaccionales), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.01$).

Al realizar el análisis estadístico entre los valores de TNF del grupo de casos con reacción leprosa (muestra 1, sin talidomida) y primera postreaccional (muestra 2, con talidomida, 4 semanas después de la 1a) no se observaron diferencias significativas. Nos llama la atención que los niveles de TNF tras un mes de tratamiento con talidomida, no mostraron

un descenso significativo, a pesar de la resolución clínica del cuadro reaccional. Esto difiere a lo planteado originalmente (hipótesis de trabajo), en que suponíamos que la mejoría clínica de la RL se debería correlacionar con una disminución en los niveles de TNF. El planteamiento original de nuestra hipótesis se basó en los trabajos de Kaplan y col. (18) quienes en estudios *in vitro* demostraron que la talidomida inhibe "selectivamente" la síntesis del ácido desoxirribonucleico mensajero (RNAm) que codifica para el TNF- α . Es importante recalcar que en este estudio en particular, la inhibición de esta citocina se demostró en un sistema *in vitro*, usando concentraciones de talidomida muy por encima de los niveles terapéuticos habitualmente empleados. En nuestro trabajo no cuantificamos la capacidad de inducción de TNF- α , sino que nos avocamos a medir las concentraciones séricas de la citocina, que pensamos es más representativo de las condiciones fisiopatológicas de la RL.

Nuestros hallazgos sugieren que la resolución clínica de la RL no depende exclusivamente del descenso del TNF, por lo que consideramos que: 1) la talidomida actúa *in vivo* a través de más de un mecanismo. Como ha sido ampliamente documentado, la talidomida tiene efectos muy diversos, inhibiendo la síntesis de inmunoglobulinas (Ig's) (19), la reacción de injerto

contra huésped (GvH) (16) y la quimiotáxis de polimorfonucleares (5), entre otros. 2) la reacción leprosa es un fenómeno multifactorial, siendo ilógico suponer que su aparición dependa en forma exclusiva de la alteración de una sola citocina.

En el seguimiento de los casos en que fue posible obtener una segunda muestra postreaccional, 4 ó más meses después de tratamiento con talidomida y sin evidencia de RL, observamos que los niveles de TNF, si bien no alcanzan valores normales, sí descienden significativamente ($p \leq 0.01$ entre casos). Al ser comparados con el grupo control (exclusivamente con LL), no se detectan diferencias significativas.

Es importante mencionar que en un principio el grupo control se había considerado en conjunto (TT, BT, LL y BL sin RL y sin talidomida). Sin embargo, dado que los pacientes del polo T mostraron niveles significativamente más elevados que los del polo L, decidimos conformar dos subgrupos control. Los pacientes en el polo T mostraron niveles de TNF tan elevados como los del grupo de casos con RL y sin talidomida. Esta aparente contradicción, en la que se esperaría que los niveles de TNF en el grupo T fueran significativamente menores a los del grupo L con reacción leprosa, sugiere que el umbral daño-beneficio causado por TNF es muy

estrecho, pudiéndose observar cuadros fisiopatológicos distintos. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por Silva y Foss (71) y Sarno y col. (73) quienes demostraron niveles elevados de TNF en suero tanto en pacientes con LL como TT.

En la segunda parte de este trabajo se analizó la inmunidad humoral, mediante el análisis del patrón de reconocimiento de antígenos de *M. leprae*, empleando la técnica del Western blot. Analizamos la respuesta exclusivamente en el grupo de casos en estado reaccional y no reaccional, considerando que los pacientes en el polo T y los individuos sanos, no reconocieron importante (resultados no mostrados) los antígenos de *M. leprae*. La respuesta de anticuerpos se diseñó empleando conjugados anti-IgM e IgG humanas. En el caso de la respuesta primaria (IgM), se pudo identificar un pobre reconocimiento de antígenos, encontrándose la respuesta dirigida fundamentalmente contra la lipoarabinomana (LAM) (banda con peso molecular (PM) de 60 a 45 KDa) (ver fotos 1 a 6, carriles M). Solamente el paciente 18 (con fenómeno de Lucio y ENL) reconoció una banda de ~28 KDa con anticuerpos de la clase IgM. Desconocemos el significado de este reconocimiento, sin embargo, dos proteínas con este PM han sido descritas en *M. leprae*, una de ellas es la superóxido dismutasa

(SOD) (74) y la otra es una proteína reguladora de hierro (75), ambas reconocidas por pacientes lepromatosos.

La respuesta de anticuerpos de la clase IgG fue más diversa, reconociéndose antígenos en un rango de PM más amplio: de 200 a 14 KDa. Es importante mencionar que hay una predominancia de reconocimiento de la LAM y de bandas de PM bajo (29-14 KDa). Desafortunadamente, no fue posible confirmar nuestra hipótesis de trabajo, el que la reacción leprosa se induce por el reconocimiento de un antígeno, que posiblemente se libera previo a la reacción, ya que no observamos patrones diferentes de reconocimiento, entre los sueros durante y después del episodio reaccional. No podemos descartar el que sí exista un reconocimiento particular, ya que únicamente empleamos dos clases de Ig's, por lo que proponemos que una posible extensión de este trabajo podría ser la utilización de conjugados anti-subclases de IgG humana (*i.e.* IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), lo que ampliaría el universo de reconocimiento.

Es obvio y necesario que se requiere también un estudio de la participación y regulación de otras citocinas, como las IL-1, 2, 6 y 10, en la patogénesis de la reacción leprosa.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes con lepra lepromatosa en reacción muestran niveles elevados de TNF.
2. Al menos a un mes postratamiento con talidomida y ya sin evidencia clínica de RL, los valores de TNF son prácticamente iguales a los reaccionales.
3. A cuatro meses o más de tratamiento con talidomida, los niveles de TNF de los pacientes reaccionales descendieron significativamente, y son semejantes a los de pacientes lepromatosos sin historia de episodios reaccionales.
4. Los pacientes TT mostraron niveles tan elevados como los pacientes LL en reacción.
5. Los sueros (IgM e IgG) de un mismo paciente con y sin reacción leprosa no muestran un patrón de reconocimiento antigénico diferente.
6. Las muestras del paciente con fenómeno de Lucio y ENL mostraron anticuerpos de la clase IgM que reconocieron una proteína en el extracto de *M. leprae* con un PM de 28 KDa.
7. Nuestros hallazgos sugieren que la reacción leprosa es un proceso multifactorial que no depende aparentemente de la alteración de una

sola citocina (TNF), sino de la compleja interacción que debe existir entre citocinas, células, anticuerpos y mediadores de la inflamación.

8. El efecto de la talidomida, al menos *in vivo*, no parece estar relacionado con el descenso de los niveles de TNF sérico en la resolución clínica de la reacción leprosa.

REFERENCIAS

1. Saúl A. Lecciones de dermatología. México: Méndez Cervantes ed. 12a ed. 1990:257-332.
2. Danielssen DC, Boeck CW. Traite de Ig Spedalskhed O elephantiasis des grecs. Translated by Cosson Pares (1847). Quoted by Skisnes OK. Immunopathology of leprosy: The century in review. Pathology, pathogenesis and the development of classification. Int J Lepr 1973;41:329-360.
3. González-Uruña J. La lepra en México. Buenos Aires: El Ateneo 1941:199-231.
4. Terencio de las Aguas J. Lecciones de leprología. España: Fontilles 1973:49-68.
5. Saúl A. Talidomida en dermatología. Dermatol Rev Mex 1988;XXXII:39-41.
6. Wheeler PR, Ratledge C. Phospholipase activity of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected armadillo tissue. Infect Immun 1991;59:2781-2789.
7. Brennan PJ. New found glycolipid antigen of mycobacteria. In: Microbiology. Washington: Lieve & Schlesinger 1984:366-375.
8. Lucas SB. Mycobacteria in the tissues of man. In: Ratledge C, Stanford JR, Grange JM, eds. Biology of mycobacteria. London: Academic Press Inc. 1989:108-176.
9. Job CK, Sánchez RM, Hastings RC. Lepromatous placentitis and intrauterine fetal infection in lepromatous nine-banded armadillos (*Dassypus novemcinctus*). Lab Invest 1987;56:44-48.

10. Patil SA, *et al.* Antigens of *Mycobacterium leprae* in the cerebrospinal fluid of leprosy patients: detection by monoclonal antibody-based sandwich immunoradiometric assay and avidin/biotin immunoblotting. *Clin Exp Immunol* 1991;**84**:515-521.
11. Rodríguez O. Clasificación de la lepra. *Dermatol Rev Mex* 1972;**XVI**:73-81.
12. Rodríguez O. Tratamiento actual de la lepra. *Dermatol Rev Mex* 87;**XXXI**:29-33.
13. Quismorio FP, *et al.* Lucio's phenomenon: an immune complex deposition syndrome in lepromatous leprosy? *Clin Immunol* 1978;**9**:184.
14. Barnhill RL, McDougall AC. Thalidomide: use and possible mode of action in reactional lepromatous leprosy and in various other conditions. *J Am Acad Dermatol* 1982;**7**:317-323.
15. Moncada B, *et al.* Thalidomide-effect on T cell subsets as a possible mechanism of action. *Int J Lepr* 1985;**53**:201-205.
16. Vogelsang GB, *et al.* Thalidomide, a potent agent for the treatment of graft-versus host disease. *Transplant Proc* 1986;**23**:904-908.
17. Wallis RS, Amir-Tahmassebi M, Ellner JJ. Induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte Western blot. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:3348-3352.
18. Sampaio EP, *et al.* Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991;**173**:699-703.
19. Shannon LJ, *et al.* Inhibition of the *novo* IgM antibody synthesis by thalidomide as a relevant mechanism of action in leprosy. *Scand J Immunol* 1981;**13**:553-562.

20. Carayon A, Languillon J, Girandeu P. Névrites microangiopathiques d'origine auto-immune probable après migration inverse dans la zone borderline du spectre de la lèpre. *Med Trop* 1976;**36**:16-33.
21. Saúl A. Manifestaciones agudas de la lepra. *Dermatol Rev Mex* 1989;**XXXIII**:256-261.
22. Rea TH, *et al.* Quantitative Dinitrochlorobenzene (DNCB) responsivity and phytohaemagglutinin (PHA) induced lymphocyte transformation in patients with lepromatous leprosy. *Int J Lepr* 1976;**44**:250-255.
23. Jaysing K, Bhatia VN. DNCB contact sensitisation in leprosy: Its comparison with other CMI tests. *Ind J Lepr* 1984;**86**:209-211.
24. Rea TH, Levan NE. Dinitrochlorobenzene responsivity throughout the granulomatous spectrum of leprosy: (abstract). *Int J Lepr* 1979;**47**:389.
25. Kumar B, *et al.* Cutaneous responses to antigens and irritants in patients of leprosy. *Lepr India* 1980;**52**:405-410.
26. Sehgal VN, Joginder MD, Sharma VK. Immunology of leprosy. *Int J Dermatol* 1989;**28**:574-584.
27. Botasso O, Poli O, Morini JC. La respuesta cutánea tardía a diferentes antígenos en convivientes de pacientes lepromatosos y testigos. *Med Cut ILA* 1987;**XV**:504-510.
28. Mshana RN, *et al.* Thymus dependent lymphocytes in leprosy. T lymphocyte subpopulation defined by monoclonal antibodies. *Int J Lepr* 1982;**50**:291-296.
29. Dwyer JM, Bullock WE, Fields JP. Disturbances of the blood T:B lymphocytes ratio in lepromatous leprosy. *N Engl J Med* 1973;**288**:1036-1039.
30. Salgame P, Mahadevan P, Antia N. Mechanism of immunosuppression in leprosy: presence of suppressor factor (s) from macrophages of lepromatous patients. *Infect Immun* 1983;**49**:1119-1126.

31. Yamamura M, *et al.* Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991;**254**:277-279.
32. Mendes NF, Koperszytz R, Mota NGS. T and B lymphocytes in patients with lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol* 1974;**16**:23-30.
33. Gerraud O, Ribierre O, Bach MA. A follow up of T cell subsets and of anti *M. leprae* antibody titre as measured by the FLA-ABS test in melanesian leprosy patients under polychemotherapy. *Int J Lepr* 1986;**54**:38-45.
34. van Voorhis WC, *et al.* The cutaneous infiltrates of leprosy. Cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N Engl J Med* 1982;**307**:1593-1595.
35. Modlin BL, *et al.* *In situ* characterisation of T lymphocytes subsets in leprosy granulomas (letter). *Int J Lepr* 1982;**50**:361-362.
36. Narayan RB, Bhutani LK, Sharma AK. T cell subsets in leprosy lesions, *in situ* characterisation using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1983;**51**:421-424.
37. Nilsen R, *et al.* Composition of the cellular infiltrates in lesions of peripheral leprosy neuropathy. *Lepr Rev* 1986;**57**:177-187.
38. Dick HM, Wilkinson P, Powis S. Normal immune system. In: Wilson G, Dick HM, eds. *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity*. London: Edward Arnold 1983:296-318.
39. Pisani RCB, Beiguelman B, Opromolla DVA. *In vitro* behaviour of blood derived macrophages against *M. leprae*. *Int J Lepr* 1973;**41**:14-24.
40. Hirschberg H. The role of macrophages in the lymphoproliferative response to *M. leprae* *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 1978;**34**:46-51.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

41. Salgame PR, *et al.* Role of macrophages in defective cell mediated immunity in lepromatous leprosy: I. Factor(s) from macrophages affecting protein synthesis and lymphocytes transformation. *Int J Lepr* 1980;**48**:172-177.
42. Haregewoin A, *et al.* T cell conditioned media reverse T cell unresponsiveness in lepromatous leprosy. *Nature* 1983;**303**:342-343.
43. Longley J, *et al.* *In vivo* responses to *Mycobacterium leprae* antigen presentation. Interleukin-2 production and immune cell phenotypes in naturally occurring lesions. *Int J Lepr* 1985;**53**:385-394.
44. Puck JM, Rich RR. Regulatory interactions governing the proliferation of T cells subsets stimulated with pokeweed mitogen. *J Immunol* 1984;**132**:1106-1112.
45. Locnisker M, *et al.* Assesment of the immune deficit in leprosy patients and the effects of recombinant IL-2 *in vitro*. *Int J Lepr* 1987;**55**:249-260.
46. Bullock WE, *et al.* Aberrant immunoregulatory control of B lymphocytes function in lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol* 1982;**49**:105-114.
47. Chiewsilp P, *et al.* Immunoglobulins in leprosy. *Int J Lepr* 1985;**53**:28-32.
48. Bloom BR. Learning from leprosy: a perspective on immunology and the third world. *J Immunol* 1986;**137**:1-10.
49. Sehgal VN, Srivasta G, Sundharam JA. Immunology of reactions in leprosy. *Int J Dermatol* 1988;**27**:157-162.
50. Andreoli A, *et al.* Changes in circulating antibody levels to the major phenolic glycolipid during erythema nodosum leprosum in leprosy patients. *Int J Lepr* 1985;**53**:211-217.
51. Beutler B. The tumor necrosis factors: cachectin and lymphotoxin. *Hosp Pract* 1990;**18**:45-56.

52. Frei E, Spriggs D. Tumor necrosis factor: still a promising agent. *J Clin Oncol* 1989;**7**:291-294.
53. Dinarello CA, *et al.* Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* 1986;**163**:1433-1450.
54. Piguet FP, *et al.* Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft- vs-host disease. *J Exp Med* 1987;**166**:1280-1289.
55. Beutler B, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. *J Immunol* 1985;**135**:3972-3977.
56. van Hinsberg VWM, *et al.* Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Blood* 1988;**72**:1467-1473.
57. Luger TA, Schwarz T. Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol* 1990;**95**:100-104.
58. Vilcek J, *et al.* Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986;**163**:632-643.
59. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet* 1989;**1**:1122-1126.
60. Grau GE, *et al.* Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 1989;**320**:1586-1591.
61. Rampart M, *et al.* Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin *in vivo*. *J Exp Med* 1989;**169**:2227-2232.
62. Wakefield PE, *et al.* Tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 1991;**24**:675-685.

63. Tracey KJ, *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant cachectin. *Science* 1986;**234**:470-474.
64. Lahdevirta J, Maury CPJ, Teppo AM. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1988;**85**:289-291.
65. Vith R, *et al.* Differential gene expression of IFN-alpha and tumor necrosis factor-alpha in peripheral blood mononuclear cells from patients with aids-related complex and AIDS. *J Immunol* 1990;**144**:970-975.
66. Fried SK, Zechner R. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J Lipid Res* 1989;**30**:1917-1923.
67. Tracey KJ, *et al.* Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anaemia and inflammation. *J Exp Med* 1988;**267**:1211-1227.
68. Girardin E, *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 1988;**319**:397-400.
69. Matthews N, Neale M. Cytotoxicity assays for tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing AHJ, eds. *Lymphokines and Interferons*. Washington: IRL Press 1987:221-225.
70. Rojas-Espinosa O, Méndez-Navarrete I, Estrada-Parra S. Presence of C1q-reactive immune complexes in patients with leprosy. *Clin Exp Immunol* 1972;**12**:215-223.
71. Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *J Infect Dis* 1989;**160**:787-789.
72. Barnes PF, *et al.* Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect Immun* 1992;**60**:1441-1446.

73. Samo EN *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991; **84**:103-108.
74. Thangaraj HS *et al.* Identification, sequencing and expression of *M. leprae* superoxide dismutase, a major antigen. *Infect Immun* 1990;**58**:1937-1942.
75. Cherayil BJ & Young RA. A 28 KDa protein from *M. leprae* is a target of the human antibody response in lepromatous leprosy. *J Immunol* 1988;**141**:4370-4375.