

11262
13



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Medicas,
Odontologicas y de la salud**

**MICROAMBIENTE INMUNOLÓGICO CELULAR EN LOS GRANULOMAS
DE LA TUBERCULOSIS CUTÁNEA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO:

MAESTRA EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA:

ALUMNA :

MARIA DE LA LUZ DIAZ SOBERANES

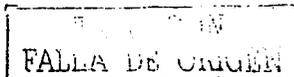
**TUTOR
COTUTOR:**

**DR. CESAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA*
DR. LEOPOLDO FLORES ROMO**
DRA. JOSEFA NOVALES SANTA COLOMA*****



MÉXICO D.F.

MARZO 2003



A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

MICROAMBIENTE INMUNOLÓGICO CELULAR EN LOS GRANULOMAS DE LA
TUBERCULOSIS CUTÁNEA

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Médicas
presenta la alumna:

Ma. de la Luz Díaz Soberanes

Tutor
Cotutor

Dr. César Raúl González Bonilla*
Dr. Leopoldo Flores Romo**
Dra. Josefa Novales Santa Coloma***

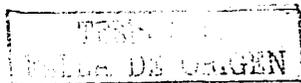
México, D.F., 17 de marzo de 2003

Aviso a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a fin de registrar en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo referencial.
NOMBRE: Ma. de la Luz Díaz Soberanes
FECHA: 05 de marzo de 2003
FIRMA: [Firma]

Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico "La Raza"
Departamento de Patología Experimental (Inmunología celular) CINVESTAV**
Departamento de Dermatopatología del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" (CDP) de la Secretaría de Salud***

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social; en el Departamento de Patología Experimental, Laboratorio de Inmunología celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), y en el Departamento de Dermatopatología del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" (CDP) de la Secretaría de Salud.



Para la realización de este trabajo, se contó con
financiamiento del FOFOI con el No. de Proyecto FP
0038/1273.

La alumna recibió apoyo económico por parte de CONACYT,
con el número de beca 153298.

TEMIS CON
FALDA DE ORIGEN

Agradezco a la Dra. Obdulia Rodríguez Rodríguez, Directora del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua", las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo; doy las gracias al histotecnólogo Alberto Castillo Naranjo por su asistencia técnica; también a la Dra. Guadalupe García Elorriaga por su amable instrucción en el laboratorio, así como a la QFB Juana Calderón, a la MC Mónica Heras Chavarria, a la MC Gina Stella García Romo, al MC Alexander Pedroza González y a la IBQ Milena Saqui Salces por su apreciable ayuda en el trabajo de laboratorio. Igualmente agradezco a las doctoras Silvia Mora Ruiz y Mima Rodríguez Acar por parte del material iconográfico clínico.

También deseo hacer un agradecimiento al tutor, cotutores y revisores de este trabajo, especialmente al Dr. Leopoldo Flores Romo.

TESIS CON
PALA. DE ORIGEN

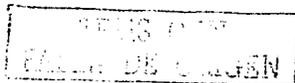
Dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mi querido

Rodrigo.

TESIS CON
VALOR DE GRADUACIÓN

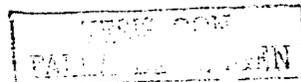
Abreviaturas

Tb: tuberculosis
OMS: Organización mundial de la salud
BCG: bacilo Calmette-Guérin
PPD: Derivado proteico purificado
TBC: tuberculosis cutánea
APC: célula presentadora de antígenos
DC: células dendríticas
MHC-II: moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II
LcT: Linfocito T
NK: células citocidas naturales (del inglés: natural killer)
LC: células de Langerhans
CD: Grupos de diferenciación (del inglés: "Clusters of Differentiation")
Ag: antígeno
AEC: Amino etil carbazol
ZN: Ziehl-Neelsen
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
IL: Interleucina
INF- γ : Interferón gama
TGF- β : Factor transformante de crecimiento beta
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de monocitos granulocíticos
RANTES: regulated on activation, normal, T cell expressed
MCP 1: proteína quimiotáctica monocítica
MMP: metaloproteínasa de matriz extracelular
MDC: quimiocina derivada de macrófago
MIP: proteína migratoria de macrófago
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular
LFA-1: molécula de adhesión leucocitaria
BM: médula ósea (del inglés: bone marrow)
FDCs: células dendríticas foliculares
CDS: células dendríticas dérmicas
IL-3R: receptor de la IL-3
FcR: receptores para Fc
SIS: sistema inmune cutáneo (del inglés: skin immune system)
BCG: Bacilo Calmette Guérin
MIL: *Mycobacterium lepraemurium*
SLC: quimiocina de tejido linfóide secundario (del inglés: secondary lymphoid tissue chemokine)



Índice

Resumen	8
Summary	9
Antecedentes	10
Planteamiento del problema	21
Justificación	23
Objetivos del estudio	24
Sujetos, material y métodos	
Diseño del estudio	25
Grupos de estudio	25
Criterios de selección	26
Definición de variables	26
Descripción general del estudio	28
Análisis de datos (plan de)	29
Factibilidad y aspectos éticos	31
Recursos	32
Resultados	
Selección de casos	33
Aspectos clínicos	34
Tinción ácido-alcohol resistente	36
Histología	36
Inmunohistoquímica para DCs en epidermis	38
Inmunohistoquímica para APCs en dermis	46
Inmunohistoquímica para linfocitos T	47
Discusión	51
Conclusiones	60
Perspectivas de estudio	61
Anexo 1	62
Anexo 2	63
Anexo 3 (técnicas de laboratorio)	65
Bibliografía	68



RESUMEN

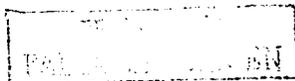
Introducción. La tuberculosis es un problema de salud pública mundial. En México, entre el 1 y 3% de los padecimientos de piel son tuberculosis. Existen variedades clínicas de tuberculosis cutánea, e histológicamente hay tres tipos de granulomas: el tuberculoso, tuberculoide y el crónico inespecífico. El primero se caracteriza por una zona central de necrosis caseosa, rodeada de histiocitos, y estos a su vez rodeados por linfocitos; el granuloma tuberculoide a diferencia del anterior, carece de necrosis; el granuloma crónico contiene las mismas células pero en forma no organizada, además de carecer también de necrosis. Si bien se conocen los tipos celulares por microscopía de luz, no se sabe exactamente qué tipo de linfocitos son, ni tampoco cómo se encuentran las células presentadoras de antígenos en piel en este padecimiento.

Objetivos. Determinar cuales son las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T presentes en la tuberculosis cutánea con diferentes tipos de granulomas (tuberculosos caseificados, sólidos inespecíficos), específicamente evaluar por inmunohistoquímica: 1. Las células dendríticas; mediante la determinación de MHC-II, CD1a y Langerina; 2. Macrófagos mediante MHC-II, CD14, CD11b y CD68; y 3. Lc T CD4+, CD8+.

Material y métodos. Se incluyeron biopsias cutáneas embebidas en parafina, de pacientes con diagnóstico clínico e histológico de tuberculosis cutánea, todos con PCR anidada positiva para *Mycobacterium tuberculosis*, además de un grupo control de personas sin dermatosis y controles positivos adecuados para las diversas inmunohistoquímicas. Los marcajes se realizaron con técnica de peroxidasa, previa "recuperación antigénica" con buffer de citratos o EDTA. Se analizaron 10 campos por corte y por marcador, las células en epidermis se contabilizaron de forma cegada con un analizador semiautomatizado (únicamente cuerpos celulares). Se compararon medianas con una prueba de ANOVA no paramétrica de una vía.

Resultados. Hay un mayor número de DC en la epidermis de los pacientes ($p < 0.001$). Existen algunas células de Langerhans en la dermis papilar de los pacientes. El tamaño de los cuerpos celulares es significativamente mayor ($p < 0.001$) en la tuberculosis cutánea. Los queratinocitos en la tuberculosis cutánea tienden a ser de mayor tamaño que los queratinocitos de piel normal. Algunos queratinocitos de los pacientes expresan MHC-II, así como CD68. La mayoría de las células en los granulomas son CD68+, la mayoría de los linfocitos T presentes en la tuberculosis cutánea son CD8+, algunos de los cuales infiltran la epidermis, además de ubicarse en los granulomas, se disponen de forma muy importante a nivel perivascular y perianexial.

Conclusiones. Hay una importante participación de las LC y posiblemente DDCs en la TBC, pero se desconoce que es lo que permite la gran cantidad de estas células en las lesiones. Los queratinocitos presentan cambios que probablemente indiquen activación de los mismos y posiblemente funcionen como células reguladoras de la respuesta inmune local. El predominio de Lc T CD8+ puede ser debido a la cronicidad de las lesiones.



SUMMARY

Introduction. Tuberculosis is a world public health problem. In Mexico, between 1 to 3% of cutaneous affects people are tuberculosis. Clinical varieties of cutaneous tuberculosis exist, and histological there are three types of granulomas: tuberculous, tuberculoideas and unspecific chronic. The first one is characterized by a central area of caseous necrosis, surrounded of histiocytes, in turn surrounded by lymphocytes; the tuberculoideas granuloma lacks necrosis; and the chronic granuloma contains the same cells but in a non organized manner; it also lacking necrosis. Although the cellular types are known by light microscopy, it is not known exactly which lymphocytes type are or what subset of antigen-presenting cells localize in these lesions.

Objectives. To determine which are the antigen-presenting cells and the T lymphocytes are present in the cutaneous tuberculosis with different kinds of granulomas (caseous tuberculous, solid and unspecific), specifically to determine for immunohistochemistry: 1. Dendritic cells; by means of the determination of MHC-II, CD1a and Langerina; 2. Macrophages by means of MHC-II, CD14, CD11b and CD68; and 3. T lymphocytes CD4+, CD8+.

Material and methods. Cutaneous biopsies were included in paraffin, of patient with clinical diagnosis and histological of cutaneous tuberculosis, all with positive nested PCR for *Mycobacterium tuberculosis*, besides a group control of people without dermatosis and appropriate positive controls for the diverse immunohistochemestry. The markers was carried out with peroxides technique, previous "recovery antigenic" with citrates buffer or EDTA. 10 fields were analyzed by court and for marker; the cells in epidermis were counted in way blinded with an analyzing semiautomatizado (only cellular bodies). They were compared medium with a test of non-parametric ANOVA of one road.

Results. There is a bigger number of Dendritic cells in the epidermis of the patients ($p < 0.001$). Some exist Langerhans cells in the dermis papillary of the patients. The size of the cellular bodies is significantly bigger ($p < 0.001$). The keratinocytes in the cutaneous tuberculosis spreads to be of more size that the keratinocytes of normal skin. Some of the keratinocytes in cutaneous tuberculosis express MHC-II, as well as CD68. Most of the cells in the granulomas are CD68+, most of the T lymphocytes present in the cutaneous tuberculosis are CD8+, some of which infiltrate epidermis, and besides being located in the granulomas, they have very important form to level perivascular and perianexial.

Conclusions. There is an important participation of the LC and possibly DDCs in the TBC, but it is ignored that it is what allows the great quantity of these cells in the lesions. The keratinocytes presents changes that probably indicate activation of the same ones and possibly work as cells regulatory of the local immune answer. The prevalence of LC T CD8+ can be due to the lesions chronic.

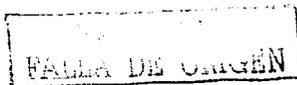


Antecedentes

La tuberculosis (Tb) resulta de la infección por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) afecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial. Esta enfermedad origina entre 8 y 10 millones de nuevos casos cada año, y 3 millones de muertes durante el mismo período (1). En los países desarrollados su prevalencia había disminuido notablemente (2), sin embargo en los últimos años ha aumentado el número de casos debido a organismos resistentes a los fármacos utilizados para el tratamiento, a la migración de la población (3), y a la pandemia producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (4;5); lo que ha incrementado la incidencia de esta patología. En 1999, la Secretaría de Salud de México registró 919 casos extrapulmonares (6), y aunque no se especifica el número de casos cutáneos, se sabe que del total de pacientes que demandan atención por una dermatosis (enfermedad de la piel), entre el 1 al 3% son tuberculosis cutánea (7).

La tuberculosis cutánea (TBC) se debe a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y bajo ciertas condiciones al bacilo Calmette-Guérin (BCG), cepa atenuada de *M. bovis* (5); que dan origen a múltiples cuadros clínicos. Por su mecanismo de infección, la TBC puede ser: a) endógena, cuando los focos primitivos extracutáneos preexistentes, invaden la piel por contigüidad o por vía hematógena; y b) exógena, ya sea por primoinfección, que es muy rara, o por reinfección o sobreinfección mediante inoculación directa del bacilo a la piel, a través de productos contaminados del propio paciente (infección autógena) o ajenos al mismo (infección heterógena) (2). Existen diversas clasificaciones de la TBC, algunas se basan en la forma de infección (8) (Anexo 1), y en otras además se toma en cuenta el estado inmunológico del huésped (3) (Anexo 2).

En la escuela mexicana de dermatología, la TBC se clasifica de acuerdo al criterio inmunológico del huésped, y se distinguen dos tipos: las tuberculosis verdaderas y las tuberculides (Figura 1). Las primeras también son llamadas localizadas, fijas, típicas o habitadas y resultan de la colonización y reproducción local de la bacteria; en ellas la respuesta al derivado proteico purificado (PPD) es normérgica. Las tuberculides



también se denominan formas diseminadas, hematógenas, recidivantes y no habitadas, se cree que son debidas a la respuesta hiperérgica del individuo ante el bacilo, más que por la acción de éste; en ellas de manera general no es posible encontrar a los bacilos y la respuesta al PPD es hiperérgica (2).

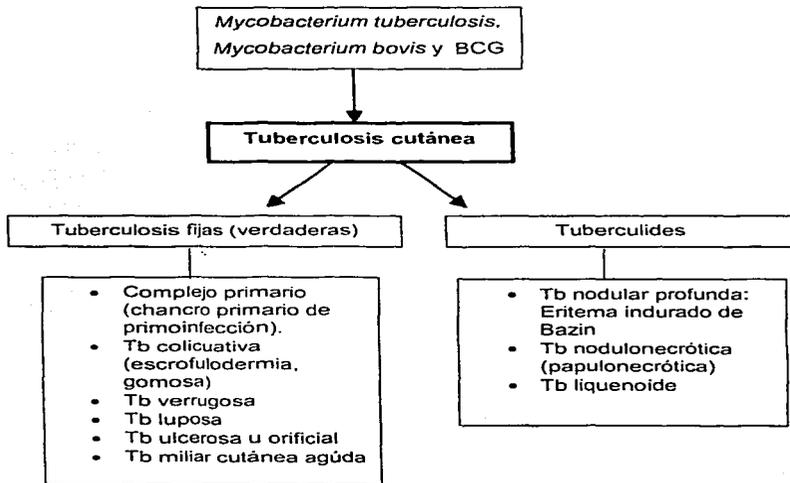


Figura 1. Clasificación de la TBC. Basada en el "criterio inmunológico" (2;9).

Como se muestra en la figura anterior, de los dos grupos de tuberculosis (fijas y tuberculides) se derivan diversas presentaciones clínicas (Figura 2).

SE
FALLA DE ORIGEN



Figura 2. Aspectos clínicos de la tuberculosis cutánea. A: Placas verrugosas correspondientes a una tuberculosis verrugosa. B: Tuberculosis colicuvativa o escrofulodermia, con úlcera en base de cuello. C: Tuberculosis luposa con lesiones en lóbulo de la oreja y punta de la nariz (lupomas). D: Placa con pequeños nódulos (flecha) de una tuberculides de la cara.



Figura 3. Imágenes de los granulomas en la TBC. Se muestran dos de las variedades de los granulomas más comunes en la TBC. A: Granuloma tuberculoso a 4X donde puede observarse una extensa zona de necrosis caseosa (flecha), rodeada de células claras que corresponden a histiocitos, a su vez rodeados de linfocitos (triángulos). B: Granuloma tuberculoide, nótese la ausencia de necrosis y la zona de linfocitos que rodean a los histiocitos (células más claras).

11-9

Desde el punto de vista histológico y de acuerdo con los criterios de los dermatopatólogos, la tuberculosis cutánea se puede caracterizar por la presencia de infiltrados de tipo granuloma tuberculoso, granuloma tuberculoide (9-11) y en algunos casos infiltrados granulomatosos crónicos inespecíficos; todos ellos representan el sitio de defensa ante la micobacteria, y son resultado de una respuesta inmune (12). El granuloma tuberculoso está constituido por una zona de necrosis central, cúmulos de células epitelioides (macrófago tisular activado) (13), células gigantes multinucleadas tipo Langhans (células epitelioides unidas) (12), todo ello rodeado por células mononucleares, (2;3;14) ocasionalmente se observan bacilos ácido alcohol resistentes; el granuloma tuberculoide a diferencia del anterior, carece de necrosis caseosa, así como de bacilos; y en el granuloma crónico se encuentran las mismas células pero en forma de agregados irregulares (Figura 3).

Una vez que el *Mycobacterium* entra en contacto con el organismo, se genera primero una respuesta inmune innata (15), después ocurre la captación de la bacteria por las células presentadoras de antígenos (APCs, de las siglas en ingles: antígen-presenting cells). Las APCs son células accesorias de la respuesta inmune (Figura 4) procesan los antígenos en fragmentos peptídicos que se acoplan a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); además, las APCs estimulan a las células T. Las APCs mejor definidas incluyen: 1) Linfocitos B, 2) Macrófagos y 3) Células Dendríticas (DC); estos tipos de células se llaman APCs Profesionales.



Figura 4. Interacción entre APCs y Linfocito T. Los Linfocitos T sólo pueden reconocer al antígeno proteico cuando éste es acoplado en forma de péptidos a las moléculas de histocompatibilidad de clase II de las APCs.



Los Linfocitos B son importantes sobre todo en la respuesta humoral, aunque en la tuberculosis su participación es mínima. Una de las APCs mas estudiadas son los macrófagos, que expresan una serie de moléculas por las cuales pueden ser reconocidos con inmunomarcajes, tales como **CD11b**, **CD14**, **CD64**, **CD68** y **CD115** (16). Los macrófagos actúan contra el bacilo mediante tres mecanismos básicos: 1) producen enzimas proteolíticas y otros metabolitos con efectos micobactericidas, 2) producen citocinas y quimiocinas, y 3) actúan como APCs, ya que procesan y presentan los antígenos micobacterianos a los linfocitos T (17;18) , mediante moléculas de superficie codificadas en el MHC de clase II (19), los cuales interactúan con los receptores $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (18;20) en los linfocitos T (Lc T). Estos a su vez producen citocinas que activan a los macrófagos, quienes se convierten en células efectoras capaces de destruir a las bacterias (13), hecho que implica inmunidad específica de tipo celular (Figura 5).

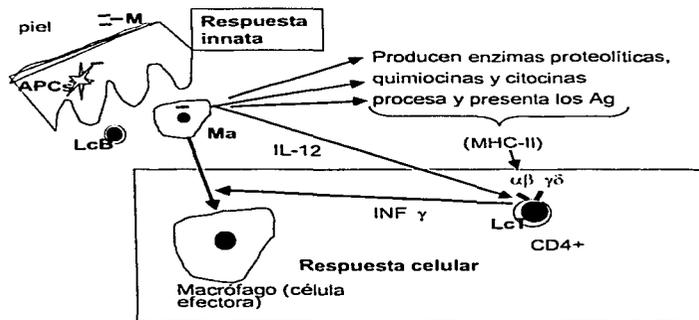


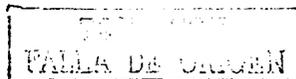
Figura 5. Respuesta inmune ante *M.tuberculosis*. Esquema que representa principalmente la respuesta celular (rectángulo inferior). Para detalles ver el texto. M: micobacteria, APCs: células presentadoras de antígenos, Ma: macrófagos, LcT: Linfocitos T, LcB: Linfocito B.

Por otro lado, existen diferentes vías de presentación de antígeno, dos de ellas reconocidas como clásicas; la vía MHC clase I, que característicamente presenta antígenos proteicos de origen citosólico, y cuya célula respondedora es el linfocito T CD8+, aunque se sabe que existe la presentación de antígenos exógenos por clase I ("presentación cruzada") (21). La otra vía clásica es mediante MHC clase II, que presenta antígenos proteicos de origen extracelular, y cuya célula respondedora es el linfocito T CD4+. Otra vía independiente de MHC, recientemente descrita es la familia CD1, con cuatro isoformas en los humanos: CD1a, CD1b y CD1c conforman el grupo I, y CD1d es el único miembro del grupo II (22). La familia CD1 presenta fundamentalmente antígenos de tipo lipídico a distintos tipos de Lc T: CD4, CD8 (23), y NK (24) (Cuadro 1). Esta última vía parece ser de gran importancia en las infecciones por micobacterias, ya que su pared celular es muy rica en antígenos lipídicos (glicolípidos, micolatos, lipoarabinomananas, arabinogalactanas y peptidoglicanas) (22;23;25).

Cuadro 1. Vías de presentación de antígeno.

Vías	Tipos de Antígeno	Célula Respondedora
MHC-I	⇒ proteínas citosólicas	⇒ CD8
MHC-II	⇒ proteínas extracelulares	⇒ CD4
CD1a	⇒ lipídicos	⇒ LcT CD4, CD8, NK

Las únicas APCs que cuentan con estas tres vías de presentación de antígenos son las DC. En humanos existen diferentes tipos de DC, que pueden ser generadas de una variedad de progenitores y precursores. Con excepción de las células dendríticas foliculares (FDC) que se localizan exclusivamente en los folículos (no se observan en



tráfico), todos los tipos de DC se derivan de médula ósea (BM) (26), tanto de la serie linfóide como de la mieloide. De la serie linfóide (con fenotipo CD11c-, CD1a-, receptor IL-3+) se originan las DC plasmacitoides; el linaje mieloide consiste en 1) Células de Langerhans (LC) y 2) células intersticiales o dendríticas dérmicas (DDCs) (27) (Figura 6).

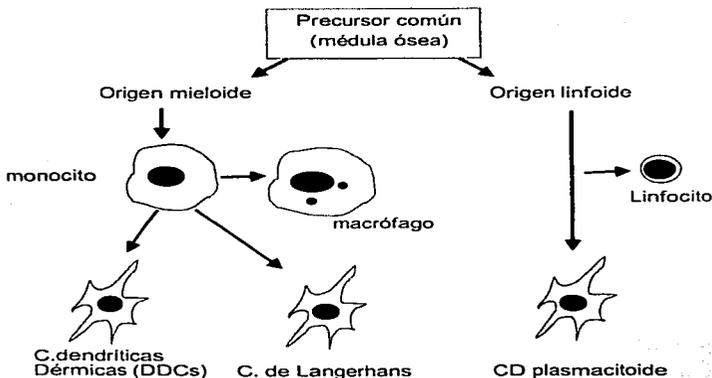


Figura 6. Origen de las Células Dendríticas. Esquema que representa el origen de la mayoría de las DC, así como otras células que derivan de la serie mieloide y la linfóide.

Las DC que se encuentran en los tejidos periféricos del cuerpo (piel, intestino, epitelio genital y epitelio de vías respiratorias) se encuentran en estado inmaduro. Las DC inmaduras están especializadas en la captura y procesamiento de antígenos, pero tienen poca capacidad para activar a los Lc T. Estas células inmaduras se caracterizan por tener grandes cantidades de MHC-II a nivel intracelular, pueden fagocitar, expresan grandes cantidades de receptores para Fc (FcR) y tienen baja expresión de moléculas relacionadas con la activación de Lc T (28). Una vez que las DC inmaduras se exponen a cualquier tipo de stress o daño, incluyendo estímulos inflamatorios, se induce su



maduración. Esencialmente la maduración de las DC significa el cambio de captura del antígeno a presentación del antígeno a las células T (26), por ello, en éste estado las DC expresan moléculas de adhesión (ICAM 1, 3) que favorecen la unión con los Lc T, y además, expresan moléculas accesorias que interactúan con los Lc T para ser activados (CD80, CD86, CD54); en general las DC maduras producen grandes cantidades de IL-12 (28).

Las LC se encuentran en el estrato espinoso de la piel a nivel suprabasal y representan entre el 1 y 4 % de las células de la epidermis (29), es una población de células que normalmente (aún en ausencia de daño) migra hacia los ganglios linfáticos (26;30) aunque en su mayoría permanecen en la piel por largos periodos (26;31). Estas DC se caracterizan por la presencia de un organelo citoplasmático en forma de raqueta de tenis, llamado Gránulo de Birbeck, observable por microscopía electrónica, aunque hasta la fecha se desconoce su función precisa. Las LC expresan diversas moléculas como MHC de clase II, moléculas CD1a y Langerina (Figura 7 y tabla 1). Esta última es una lectina tipo C expresada exclusivamente en las LC, se sabe que se asocia a la formación de gránulos de Birbeck, y está relacionada con la captación e internalización de antígenos (32;33).

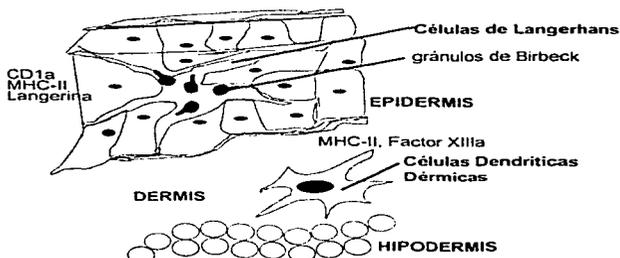


Figura 7. Esquema de la disposición de las DC en piel. También se muestran las principales moléculas expresadas por las DC en las diferentes capas de la piel. La escala del tamaño celular no corresponde al real.

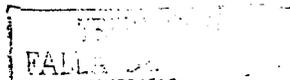
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
FALLA DE ORIGEN

En la siguiente tabla se enlistan las características de las LC y se contrastan con otras DC humanas.

Tabla 1. Subgrupos de DC humanas (27;29)

Linaje linfóide	Linaje mioide	
DC Plasmacitoide	DC Intersticiales	Células de Langerhans
Fenotipo en DCs maduras		
CD11c-	CD11c+	CD11c+
IL-3R+	IL-3R-	IL-3R-
MHC-II+	MHC-II+	MHC-II+
CD11b-	CD11b+	CD11b+
CD13-	CD13+	CD13+
CD33-	CD33+	CD33+
CD4++	CD4+	CD4+
CD1a-	CD1a-	CD1a+
Gránulos de Birbeck-	Gránulos de Birbeck-	Gránulos de Birbeck+
Langerina-	Langerina-	Langerina+
Factor XIIIa-	Factor XIIIa+	Factor XIIIa-
CD86+	CD86+	CD86+
CD40+	CD40+	CD40+
DC-LAMP+	DC-LAMP+	DC-LAMP+
FUNCIÓN		
Secreción de IL-12 +/-	Secreción de IL-12 ++++	Secreción de IL-12 ++++
Secreción de IL-10 -	Secreción de IL-10 ++++	Secreción de IL-10 +/-

Los estudios que han evaluado la presencia de DC en los infiltrados de la tuberculosis cutánea humana son pocos y contradictorios. Estos se han valido de la identificación de la proteína S-100 por inmunohistoquímica en cortes en parafina, aunado a la morfología dendrítica. Entre ellos está el trabajo de Smolle y Kneifel (34), quienes determinaron que el 11% de las células de los granulomas eran DC en la vasculitis nodular profunda (Eritema indurado de Bazin), un tipo de tuberculides; mientras que Crieber, en la misma entidad nosológica sólo encuentran escasas células positivas (<1%) (35). En otro tipo de tuberculides, la papulonecrótica, Jordan y cols. encuentran también muy escasas



células S-100 positivas (36).

Con la utilización de CD1, un marcador más confiable para DC en piel (37), existe un reporte (38) en Lupus vulgar (una variedad de tuberculosis verdadera), en el que los autores observaron escasas DC CD1a+ en dermis, y un incremento de las mismas en epidermis.

Existen muchas otras moléculas que aún no se han investigado en la tuberculosis cutánea, como la Langerina.

Otras células importantes en el infiltrado granulomatoso de las tuberculosis cutánea son los Lc T. Ya se describió parte de la función de éstos linfocitos como células que ayudan a los macrófagos a convertirse en células efectoras mediante la producción de citocinas como el IFN γ (citocina Th1) (39). De estas células también se han descrito linfocitos CD4+ capaces de matar directamente a los macrófagos infectados por *M. tuberculosis*, mediante la producción de proteínas como la granulicina y la perforina (25).

Así mismo, los linfocitos T CD8+ están implicados en la respuesta inmune ante *M. tuberculosis* (40); estos linfocitos citotóxicos al igual que los CD4+ producen citocinas tanto de tipo 1 (Tc1) como 2 (Tc2), y probablemente su principal función sería destruir a los macrófagos infectados del granuloma (25;41).

En escasos trabajos, los tipos de Lc T se han evaluado en algunas variedades de TBC y los resultados no son del todo consistentes. Ramesh y cols. (38) encontraron que los linfocitos predominantes en los granulomas del 78% de sus pacientes estudiados con Lupus Vulgar tuvieron un predominio de CD4+ sobre los CD8+, mientras que en el resto de sus pacientes el predominio celular fue inverso. Por otro lado, Sehgal y cols. (42;43) en el mismo tipo de tuberculosis (Lupus Vulgar) sólo encontraron un predominio de Lc T CD4+. Además, ellos sugieren, que al igual que en la Lepra, existe un espectro de respuesta inmunológica en la TBC, donde en un polo se ubicaría al Lupus Vulgar con un predominio de CD4+ y un incremento de la relación CD4+/CD8+, lo que sería análogo a la respuesta inmunológica celular en la Lepra Tuberculoide; en el otro polo se ubicaría a la Escrofulodermia o Tuberculosis Colicuativa, con un predominio de CD8+ y



disminución de la relación CD4+/CD8+ como sucede en la Lepra Lepromatosa; al centro del espectro se encontraría a la tuberculosis verrugosa (42).

Existen diferentes métodos para determinar marcadores celulares, en este caso moléculas englobadas en los grupos de diferenciación (CD), uno de ellos es la inmunohistoquímica. Para dicho método, existen anticuerpos específicos (generalmente disponibles de manera comercial) acoplados a fluorocromos o a enzimas. Ello no sólo permite la identificación fenotípica de la célula a analizar, sino también su morfología, su ubicación tisular precisa, así como la cuantificación de las células positivas para dicho marcador, en un corte de tejido dado.

Con el uso de la metodología previa se pretendió determinar cuales son las APCs y los Lc T presentes en la TBC con diferentes tipos de granulomas.

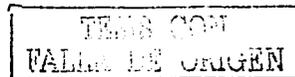
FALLA DE

Planteamiento del problema

La tuberculosis es una enfermedad compleja que al igual que la lepra, es producida por una micobacteria, esta última enfermedad representa un modelo inmunológico en la que cada uno de sus cuadros clínicos concuerda con una imagen histológica, que a su vez son representados por una respuesta inmunológica distinta; por un lado se encuentran los pacientes con Lepra Lepromatosa en quienes las lesiones clínicas suelen ser diseminadas con una insuficiente respuesta inmune celular e histológicamente con infiltrados mal delimitados; en el otro extremo se encuentran los pacientes con Lepra Tuberculoide, cuyas lesiones cutáneas son menos diseminadas, cuentan con una respuesta inmune celular más adecuada que les confiere protección, e histológicamente se caracterizan por infiltrados bien delimitados en forma de granulomas semejantes a los encontrados en algunos de los pacientes con tuberculosis. Si bien se conoce que células participan en la formación de los granulomas mediante microscopia de luz, algunas de las células importantes para la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, no se aprecian con tinciones habituales; por otro lado, aunque se conoce la participación de los Lc T en la conformación de los granulomas, no se sabe con claridad que subgrupos de los mismos se encuentran en los infiltrados granulomatosos, tampoco se conocen cómo se encuentran otras células importantes para la respuesta inmune (células de Langerhans) en la piel (epidermis); por ello, nosotros nos preguntamos de manera general:

¿Cuál es el microambiente inmunológico celular en la tuberculosis cutánea?

Con la siguiente pregunta específica:

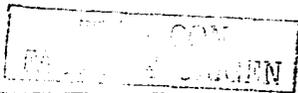


¿Qué tipo de APCs (DC y macrófagos) y de Lc T están presentes en las lesiones de la tuberculosis cutánea, con diferentes tipos de granulomas (tuberculosos caseificados, tuberculosos sólidos o no caseificados, y granulomas inespecíficos)?

TRABAJO
FALLA DE ORDEN

Justificación

La tuberculosis cutánea es producto de una interacción entre el agente microbiano, el ambiente y el huésped; de ahí la importancia de conocer cada uno de estos aspectos. Aunque existe un amplio conocimiento del agente causal (cepas resistentes, mecanismos de evasión de la destrucción por macrófagos, interacción con el virus de la inmunodeficiencia humana, etc.) y de las modificaciones de las condiciones del ambiente (desnutrición, marginación, etc.); el microambiente a nivel del huésped ha sido poco explorado in situ, en el ámbito cutáneo; ahondar en conocimiento del microambiente inmunológico celular en los granulomas de la tuberculosis cutánea, aportaría una herramienta más para el entendimiento de la interacción entre la micobacteria y el huésped.



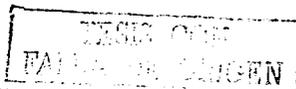
Objetivos del Estudio

Objetivo General

Conocer el microambiente inmunológico celular en la tuberculosis cutánea con diferentes tipos de granulomas (tuberculosos caseificados, tuberculosos sólidos o no caseificados y granulomas inespecíficos).

Objetivos Específicos

1. Determinar el tipo de APCs: células dendríticas y macrófagos, así como:
2. Determinar el tipo de linfocitos T presentes en las lesiones de la tuberculosis cutánea con diferentes tipos de granulomas (tuberculosos caseificados, tuberculosos sólidos o no caseificados y granulomas inespecíficos).



Sujetos, Material y Métodos

Lugar donde se realizó el estudio.

Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social; Departamento de Patología Experimental, laboratorio de Inmunología celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), y Departamento de Dermatopatología del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" (CDP) de la Secretaría de Salud.

Diseño del estudio: Clínico-básico

Grupos de Estudio

Cortes de biopsias embebidas en parafina de los pacientes con diagnóstico de tuberculosis cutánea del año 1999 y el primer semestre del 2000. El diagnóstico de TBC se había establecido previamente en el Centro Dermatológico Pascua, con base en el protocolo de estudio para este tipo de dermatosis. Este consta de historia clínica dermatológica, con énfasis en la topografía y morfología de las lesiones cutáneas, así como con la concordancia de la imagen histológica general (al microscopio de luz) de la biopsia, la respuesta al PPD, y los resultados de otros estudios como baciloscopías, cultivo y estudios radiográficos; y en ocasiones, a la respuesta al tratamiento antifímico (7).

Las biopsias se dividieron inicialmente de acuerdo al tipo de infiltrado en:

Granulomas tuberculosos (5 bloques), granulomas tuberculoides (11 bloques) y granulomas crónicos inespecíficos (7 bloques).

Una vez realizada la PCR para *M. tuberculosis* y corroborar la presencia de la micobacteria, se reclasificaron los grupos en las siguientes categorías:

- A. Granulomas tuberculosos caseificados (2 bloques)
- B. Granulomas tuberculosos sólidos o no caseificados (3 bloques)
- C. Granulomas inespecíficos (2 bloques).



Además, como grupo control de comparación, se agregaron biopsias de personas sin dermatosis (3 bloques).

Criterios de selección

- Criterios de inclusión

Biopsias cutáneas con las siguientes características:

Provenientes de pacientes con tuberculosis cutánea. (Diagnóstico establecido previamente)

Provenientes de pacientes de sexo femenino o masculino

- Criterios de exclusión

Biopsias con material insuficiente

- Criterios de eliminación

Un bloque tuvo que ser eliminado por extravío del mismo.

Definición de las variables

- Variable: Granulomas de la tuberculosis cutánea

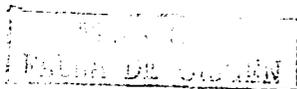
Definición conceptual. Infiltrado celular en el ámbito cutáneo, secundario a la infección por *M. tuberculosis*.

Definición operacional. Imagen histológica al microscopio de luz, de los cortes de biopsias de los pacientes con diagnóstico previamente establecido de tuberculosis cutánea, teñidos con hematoxilina-eosina.

Escala de medición. Cualitativa, nominal

Categorías de la variable:

- A. Granulomas tuberculosos caseificados. Constituido por una zona de necrosis central, cúmulos de células epitelioides con células gigantes multinucleadas tipo Langhans, todo ello rodeado por células mononucleares. Con ausencia de bacilos.
- B. Granulomas tuberculosos sólidos o no caseificados. Igualmente, constituido por cúmulos de células epitelioides con células gigantes multinucleadas tipo



Langhans, todo ello rodeado por células mononucleares. No hay necrosis caseosa, ni bacilos.

C. Granulomas inespecíficos. Constituido por cúmulos de células epitelioides, linfocitos, y en algunos casos con polimorfnucleares y plasmocitos. Al igual que el anterior carece de necrosis y bacilos.

• Variable: Microambiente inmunológico celular

Definición conceptual. Representación de una respuesta inmunitaria tras la introducción de una sustancia extraña.

Definición operacional. Se determinó con base en la medición de las siguientes subvariables:

1. Células profesionales presentadoras de antígenos (APCs).

Definición conceptual. Células con proteínas de superficie codificadas en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que interactúan con los receptores de los linfocitos T en el momento de la presentación del antígeno.

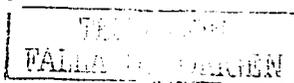
Definición operacional. Se determinaron células dendríticas y macrófagos (APCs) mediante técnicas inmunohistoquímicas. (Ver apartado de técnicas de laboratorio). Cada una de las células se determinó por separado y se contrastó con un anticuerpo control negativo (control de isotipo) y en su momento, también con un control positivo.

Anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Dilución	Marca comercial
Langerina	1: 25	SM *
CD1a	1: 10	SM *
MHC-II	1: 50	DAKO M746
CD 68	1: 50	DAKO M0814

SM: sin marca, * Donados por los Doctores S. Lebecque y S. Saeland de Lyon Francia.

Una vez obtenidas las marcas en epidermis, con la finalidad de no conocer la



identificación de los cortes, se cubrieron los números de biopsias; de esa forma, se capturaron a 40X 10 campos de cada corte y para cada uno de los marcadores (barriendo toda la epidermis) se procedió a cuantificar el número de células positivas por campo con el auxilio de un analizador de imágenes semiautomatizado.

Escala de Medición: Cuantitativa discreta.

Unidad de Medición: Número de células positivas por campo.

2. Linfocitos T

Definición conceptual: Células mononucleares que específicamente reconocen antígenos extraños.

Definición operacional: Se determinaron mediante inmunohistoquímica mediante el sistema peroxidasa biotina-avidina (ver apartado de técnicas de laboratorio), utilizando los siguientes anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Dilución	Marca comercial
CD 4	SD	Ventana 250-2712
CD 8	1:100	DAKO M7103

SD: sin diluir.

Escala de medición: Cualitativa ordinal.

Categorías de las variables:

- ausente
- escasas
- cantidad moderada
- abundantes

Descripción general del estudio

De la libreta de registro de biopsias del Departamento de Dermatopatología del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua" del año 1999 y el primer semestre del 2000, se buscaron y seleccionaron 23 biopsias de pacientes con diagnóstico de tuberculosis cutánea. Las biopsias ya habían sido tomadas como motivo de la dermatosis de los



pacientes, así mismo, el diagnóstico de tuberculosis cutánea ya había sido establecido con base en el protocolo de estudio de dichos pacientes (7). Posteriormente se buscaron los bloques correspondientes así como los cortes teñidos con HE para clasificar a los grupos dependiendo de la imagen en los infiltrados inflamatorios, establecidos por el dermatopatólogo (el referido en el registro escrito de la biopsia). Los grupos iniciales fueron: 1) granulomas tuberculosos, 2) granulomas tuberculoideos y 3) granulomas crónicos inespecíficos.

Los casos no contaban con estándar de oro (cultivo para *M. Tuberculosis*), por lo que se realizó PCR múltiple en tubo para *Mycobacterium*, en un corte de cada uno de los bloques en parafina (previa desparafinación), seguida de PCR anidada para *M. tuberculosis* (44) (Ver apartado de técnicas de laboratorio). Sólo se incluyeron para inmunohistoquímica aquellos bloques con PCR anidada positiva. Con los resultados de PCR, se reclasificaron los grupos en: 1) granuloma tuberculoso caseificado, 2) granuloma tuberculoso sólido o no caseificado y 3) granuloma inespecífico. Se conformó un grupo de piel de personas sin dermatosis (grupo control) con la finalidad de establecer parámetros basales o iniciales de las células a medir.

Se realizaron inmunohistoquímicas mediante el sistema peroxidasa biotina-avidina (previa "recuperación antigénica") para CD1a, MHC-II, Langerina, CD4, CD8 y CD68.

Con auxilio de un analizador de imágenes semiautomatizado se obtuvo el número de células positivas por campo.

Finalmente se realizó el análisis de hallazgos.

Análisis de datos

a) Estadística descriptiva:

- Medidas de resumen: frecuencias, porcentajes: para las variables clínicas (edad, sexo, tipo de TBC).
- Medidas de tendencia central: media para variables con distribución normal: CD1a y mediana para variables sin distribución normal: Langerina y MHC-clase II.
- Medidas de dispersión: desviación estándar para variables con distribución normal: CD1a y rango intercuartílico para variables sin distribución normal: Langerina y MHC-clase II.



b) Estadística analítica: Fue utilizada para comparar el número de DCs con marcas positivas en la epidermis.

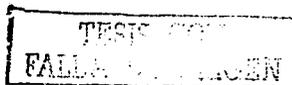
- ANOVA de una vía para tres grupos independientes, en aquellas variables con distribución normal (CD1a).
- Prueba de Kruskal-Wallis, para comparar aquellas variables sin distribución normal (el resto de los marcadores: Langerina y MHC-clase II).
- Como comparación a posteriori se utilizó el procedimiento de Scheffe.

Los resultados se consideraron significativos si el valor de $p < 0.05$.

Para establecer la **concordancia intraobservador** en las mediciones de las células positivas, se recontaron 30 campos al azar para células CD1a+. Se practicó la prueba de Spearman, clasificándose de la siguiente forma: 1) <0 pobre, 2) 0 a 0.20 leve, 3) 0.21 a 40 mediana, 4) 0.41 a 0.60 moderada 5) 0.61 a 0.80 sustancial y 6) 0.81 a 1.00 casi perfecta.

Se calculó la **correlación** entre el número de células positivas con el área de la epidermis mediante correlación de paramétrica de Pearson.

Los datos fueron analizados con el paquete para computadora SPSS, de las siglas en ingles Statistics Profesional Social Sciences versión 10 para Windows.



Factibilidad y Aspectos Éticos

El estudio fue factible ya que se contaba con las biopsias de los pacientes y sus expedientes clínicos, igualmente, se contaba con la infraestructura y material necesarios para la realización de las diversas técnicas de laboratorio (PCR, inmunohistoquímicas, etc.). Se recibió financiamiento del FOFOI, con No FP 0038/1273.

Desde el punto de vista ético, se apegó a las normas establecidas por el Instituto Mexicano del Seguro Social, que incluye el reglamento de la Ley General de Salud, en materia de investigación en salud, así como con la Declaración de Helsinki.

No se requirió carta de consentimiento informado, ya que el material histológico se tomó como parte del estudio de la dermatosis del paciente, que fue el motivo de consulta.

El proyecto fue enviado y aceptado por el Comité Local de la Unidad participante (Hospital de Infectología del CMR del IMSS).

Recursos

Humanos

Investigadores, dermatopatólogos, químicos, histotecnólogos, biopsia de pacientes con tuberculosis cutánea.

El investigador principal se dio a la tarea de buscar en los registros de histopatología las biopsias que corresponden al diagnóstico de tuberculosis cutánea, a la búsqueda de los expedientes clínicos, registró de éste último, los datos correspondientes a la investigación; auxilió en la búsqueda de los bloques histológicos y en la obtención de los cortes correspondientes (conjuntamente con los histotecnólogos). Aprendió y realizó las técnicas de laboratorio necesarias para el proyecto. Realizó el análisis histológico y morfológico de las imágenes obtenidas, así como su análisis estadístico.

Los dermatopatólogos evaluaron los cortes histológicos, conjuntamente con el investigador principal.

Los tutores condujeron la investigación y discutieron los hallazgos junto con el alumno.

Físicos

Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Laboratorio de Inmunología celular del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV, y el Departamento de Dermatopatología del CDP; donde se cuenta con microscopios, microtomo, laminillas, tinciones, material para PCR, anticuerpos específicos para las técnicas inmunohistoquímica, computadora para captación y análisis de la información, etc.

Financieros

El proyecto recibió financiamiento por parte del FOFOI, además se utilizaron los recursos propios de las instituciones participantes, y de los investigadores principales.

Resultados

Selección de casos. De los 23 bloques de biopsias elegibles para el estudio, el 65% de los casos correspondieron a tuberculides, un caso (4%) no fue posible clasificar por ausencia del dato en la libreta de registro, el resto correspondieron a tuberculosis fijadas. Las características más relevantes de los 23 pacientes iniciales se encuentran en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Casos de TBC sometidos a PCR.

Caso	Variedad clínica de TBC	Tipo de TBC	Edad	Sexo	granuloma*	PCR-a
1	Nodulonecrótica	T	40	F	tuberculoso	
2	Colicuvativa	F	19	F	tuberculoso	+
3	?	?	32	F	tuberculoso	
4	Nodular profunda	T	62	F	tuberculoso	
5	Eritema nudoso	T	27	F	tuberculoso	+
6	Tuberculides (cara)	T	26	M	tuberculoide	
7	Verrugosa	F	12	M	tuberculoide	+
8	Tuberculidos micronodular	T	36	F	tuberculoide	
9	Luposa	F	14	M	tuberculoide	+
10	Tuberculides (cara)	T	30	F	tuberculoide	
11	Nodular profunda	T	39	F	tuberculoide	
12	Micronodular	T	27	F	tuberculoide	
13	Tuberculides	T	44	F	tuberculoide	
14	Nodular profunda	T	66	F	tuberculoide	+
15	Micronodular	T	31	F	tuberculoide	
16	Nodular profunda	T	29	F	tuberculoide	
17	Colicuvativa	F	30	M	Crónico	+
18	Tuberculides	T	19	F	Crónico	
19	Tuberculides	T	30	F	Crónico	
20	Ganglionar	F	12	M	Crónico	
21	Ulcerosa	F	73	M	Crónico	
22	Verrugosa	F	86	M	Crónico	+
23	Nodular profunda ulcerada (Tipo Hutchinson)	T	70	F	Crónico	+

TBC: Tuberculosis cutánea, T: tuberculides, F: tuberculosis fija o verdadera, S: sexo, PCR-a: PCR andada. ? se ignora. *El tipo de granuloma se obtuvo de los reportes de dermatopatología (clasificación utilizada por dermatopatólogos). + Resultado positivo. Se realizó PCR múltiple para *Mycobacterium*, en la muestra elegible, por carecer de estándar de oro (cultivo) todos fueron negativos en esa primera fase. Sólo hubo 8 casos positivos a la PCR-a (35%) para *Mycobacterium tuberculosis*, el 71% de las tuberculosis fijadas fue positivo, mientras que sólo el 20% de las clasificadas clínicamente como tuberculides.

De los ocho casos positivos a la PCR-a (Ver figura 8 para la imagen de los productos de la PCR), un caso de tuberculosis nodular profunda fue eliminado del estudio por extravío. Finalmente se incluyeron 10 bloques, 2 de granuloma tuberculoso caseificado, 3 de granuloma tuberculoso sólido o no caseificado, 2 de granuloma inespecífico, y 3 de piel sin dermatosis (piel normal). En la figura 9 se muestran algunos ejemplos clínicos de los pacientes estudiados.

Aspectos clínicos. Las características clínicas más importantes de los 7 pacientes estudiados con TBC se encuentran en el cuadro 3. El 57% de los pacientes fue del sexo masculino, el rango de edad fluctuó entre 12 y 86 años, y el tiempo de evolución de la tuberculosis fue de 6 a 24 meses.

El 63% de las tuberculosis incluidas fueron de tipo verdadero (2 Colicuativas, 2 Verrugosas y una Luposa); el resto de los casos correspondieron a tuberculosis Nodular Profunda.

Cuadro 3. Características clínicas de los pacientes estudiados con TBC.

Tipo de tuberculosis	Edad	Sexo	Tiempo de evolución	Topografía	Tiempo ELB
Colicuativa	19	F	13 meses	Cuello en cara lateral izquierda	1m
Nodular profunda	27	F	3 meses	Piernas	3
Verrugosa	12	M	11 años	Antebrazo y mano izquierdos	?
Luposa	14	M	6 meses	Cara anterior de piernas	6m
Nodular profunda	86	F	30 años	Submandibular y glúteo derecho, región lumbar izquierda	?
Colicuativa	30	M	4 meses	Brazo y antebrazo izquierdo	4m
Verrugosa	86	M	2 años	Pierna izquierda	2a

ELB: evolución de la lesión biopsiada, m: meses, a: años, ?: se ignora.



Tinción ácido-alcohol resistente. Se realizó tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) en todos los bloques analizados, y en ninguno de los casos fue francamente positivo, aunque en algunos casos se observaron marcas de color rojo que recuerdan estructuras bacilares (Figura 10).



Figura 10. Microfotografía a gran aumento (100 X), de la zona de un granuloma teñido con Ziehl-Neelsen, las flechas señala una estructura probablemente bacilar, ácido alcohol resistente (color rojo).

Histología. Por hematoxilina y eosina se observó afectación de todas las capas de la piel (cuando la profundidad de la biopsia lo permitió), el grado de daño dependió de la variedad clínica. Por ejemplo, hubo cambios más notorios en la epidermis de los pacientes con Tuberculosis Verrugosa, mientras que en los casos de Tuberculosis Nodular Profunda las alteraciones más relevantes se observaron en dermis profunda e hipodermis. El 70% de los casos estudiados mostró hiperqueratosis, cuya mayoría fue de tipo paraqueratósico (con células o restos de las mismas). La hiperkeratosis se acompañó de hipergranulosis en dos casos. La gran mayoría de los cortes evaluados mostraron grados variables de acantosis, excepto en uno de T. Nodular Profunda. En los casos de T. Verrugosa, la acantosis fue más marcada y se acompañó de papilomatosis, originando una franca distorsión morfológica, llegando a la hiperplasia

pseudoepiteliomatosa. En el siguiente cuadro se describen los aspectos histológicos de los aspectos histológicos de las biopsias de los pacientes estudiados.

Cuadro 4. Características histológicas de las biopsias estudiadas (TBC)

Tipo de TBC	Granuloma	Epidermis	Cambios en:	
			Dermis	Hipodermis
Coicuativa	Tuberculoso	Acanosis	Denso infiltrado a nivel medio y profundo, alrededor de vasos y anexos	No se observo
Nodular profunda	Tuberculoso	Hiperqueratosis ortoqueratósica, acantosis de leve a moderada	Infiltrado a nivel superficial y medio, alrededor de vasos y anexos	Infiltrado lobulillar Vasculitis
Verrugosa	Tuberculoide	Hiperqueratosis paraqueratósica, hipergranulosis, hiperplasia pseudoepiteliomatosa	Denso infiltrado a nivel superficial y medio	No se observo
Luposa	Tuberculoide	Zonas de hiperqueratosis paraqueratósica y de acantosis leve	Infiltrado en todas las áreas, vasos dilatados y congestionados	Con infiltrado
Nodular Profunda	Tuberculoide	Ligero aplastamiento de procesos interpapilares	Infiltrado en todas las niveles, perivascular y perianexal, vasculitis	Denso infiltrado lobulillar
Coicuativa	Crónico	Hiperqueratosis ortoqueratósica, hipergranulosis, acantosis	Infiltrado en todas las áreas, vasos dilatados y congestionados	No se observo
Verrugosa	Crónico	Hiperqueratosis paraqueratósica, hiperplasia pseudoepiteliomatosa	Denso infiltrado e nivel superficial y medio, vasos dilatados y congestionados	No se observo

Los infiltrados característicos de la TBC se distribuyeron en dermis e hipodermis (Figura 11). Tanto las tuberculosis cutáneas verdaderas como las tuberculides (según la clasificación clínica), tuvieron granulomas tuberculosos caseificados y granulomas tuberculosos sólidos no caseificados. Los granulomas inespecíficos sólo se presentaron en la Tuberculosis Verdaderas (Figura 12).

RECIBIDO
 10 DE JUNIO DE 1981
 DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA

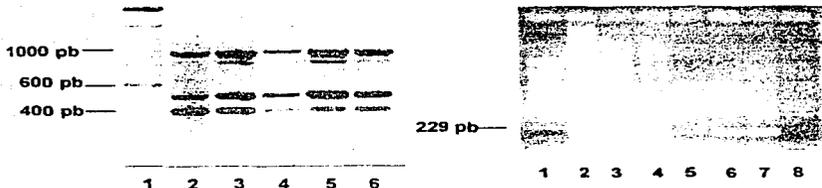
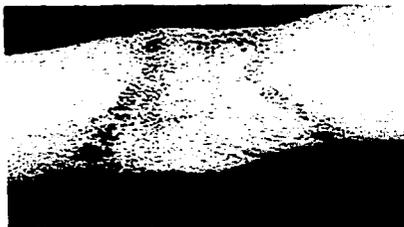


Figura 8. Productos de PCR. En la imagen de la izquierda se muestra un gel de agarosa al 2% con los productos de PCR múltiple, las bandas corresponden a controles positivos (DNA de *M. tuberculosis*) en el momento de la estandarización, utilizando diferentes concentraciones de cloruro de magnesio, se trabajaron con las condiciones del carril 4 (1.5 mM). En el gel de la derecha se muestran las bandas obtenidas en la PCR-anidada. Carril 1 control de pesos moleculares (100 pb), carril 8 control negativo, el resto son productos obtenidos de las biopsias de los pacientes con TBC.



Tuberculosis Verrugosa



Tuberculosis Nodular Profunda

Figura 9. Tuberculosis cutánea, ejemplos clínicos. La Tuberculosis Verrugosa corresponde a un tipo de tuberculosis verdadera o fija según la clasificación clínica, mientras que la Nodular profunda a un tipo de tuberculides, en este caso tipo Hutchinson.

Inmunohistoquímica para DC en epidermis. Se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) en el número de DC en la epidermis de los pacientes con TBC en comparación con los cortes de piel sin dermatosis (Cuadro 5).

Cuadro 5. Media de LCs en epidermis

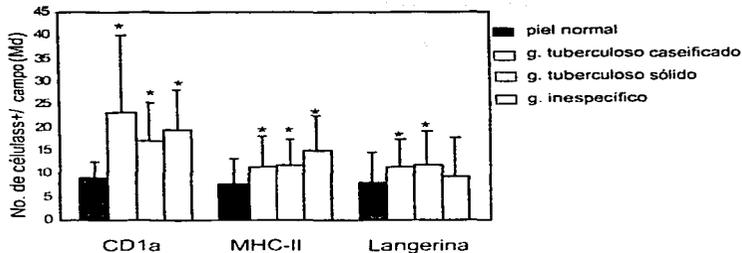
Molécula	Piel normal		Tuberculosis cutánea	
	Media	IC 95	Media	IC 95
CD1a	8.30	6.74-9.86	20.20	18.08-22.32
MHC-II	9.15	7.69-10.61	13.36	12.16-14.56
Langerina	8.30	5.78-10.82	12.37	11.02-13.72

IC 95: Intervalo de confianza del 95%. Las medias para las distintas moléculas son muy similares en la piel normal. Las medias de la piel normal, difieren con mucho de la piel con tuberculosis cutánea. Los intervalos de confianza entre la piel normal y la piel con TBC nunca se superponen.

La diferencia entre la piel normal y los pacientes con TBC en las células que expresan CD1a y MHC-II es muy aparente. En cambio, respecto a la expresión de la molécula Langerina, dicha diferencia no es tan evidente, y no existe con el granuloma inespecífico. En las Figuras 13-15 pueden observarse las DCs de epidermis identificadas con las marcas de las diferentes moléculas (CD1a, MHC-II y Langerina). En la Gráfica 1 se muestra que CD1a se expresa en mayor cantidad en los pacientes con TBC que tienen granuloma tuberculoso caseificado.

La correlación entre el número de células positivas y el área de la epidermis fue de 0.45.

FALLA DE



Gráfica 1. Marcadores positivos para DC en epidermis. De forma cegada se capturaron a 40X 10 campos de cada corte y para cada uno de los marcadores (barriendo toda la epidermis). Con un analizador de imágenes semiautomatizado se obtuvo el número de células positivas (sombras), cada barra representa la mediana (Md) de 20 o 30 campos por biopsia). * $p < 0.01$. Existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en la expresión de CD1a entre los granulomas, dada por el grupo de granuloma tuberculoso caseificado. Se recontaron al azar 30 campos para el cálculo de la concordancia intraobservador $r=0.83$ (Spearman).

Además de observarse un incremento de las células que expresaron CD1a, MHC-II y Langerina en la epidermis de los pacientes con TBC, dichas células se encontraron muy por arriba de la capa basal de queratinocitos, incluso en la capa cornea de la epidermis, en contraste con lo que sucede en la piel normal, donde sólo se ubican a nivel basal o ligeramente por arriba de dicha capa. El hallazgo anterior fue más aparente con células positivas a CD1a, seguidas de las células que expresaron MHC-II, y en menor cuantía para las células positivas a Langerina (Figuras 16-18).

El tamaño de los somas celulares con marcaje positivo a CD1a en la epidermis de los pacientes con tuberculosis cutánea fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en comparación con los encontrados en piel normal (Gráfica 2 y Figura 19); aún cuando el tamaño de los cuerpos celulares fue mayor en los granulomas inespecíficos, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.



Figura 11. Imagen de los granulomas. Microfotografías a 10 X de biopsias de pacientes con TBC, teñidos con hematoxilina-eosina. **A:** se muestra un granuloma tuberculoso caseificado la flecha señala la zona de necrosis caseosa, **B:** granuloma tuberculoide sólido o no caseificado en dermis profunda e hipodermis.



Figura 12. Granuloma inespecifico. Corte teñido con HE que corresponde a una biopsia de un paciente con tuberculosis verrugosa. Los histiocitos se entremezclan con los linfocitos (núcleos más pequeños y pigmentados). Hay ausencia de necrosis caseosa.

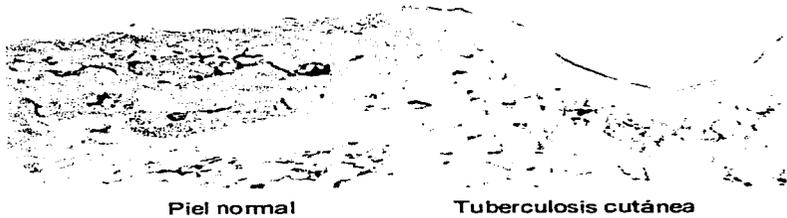


Figura 13. CD1a en Epidermis. Imágenes a 40X, obsérvese el notable engrosamiento de la epidermis (acantosis), así como el mayor número de células positivas en el corte de piel con tuberculosis cutánea.

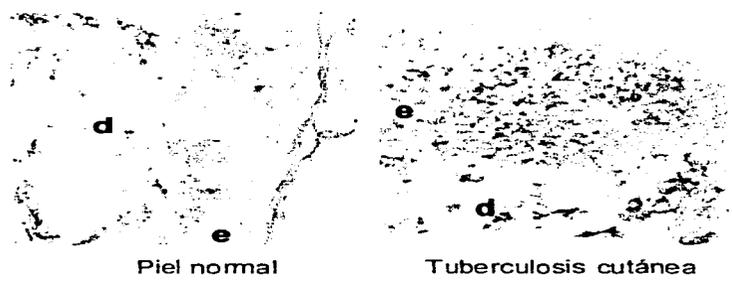


Figura 14. MHC-II en Epidermis. Imágenes a 20X. En piel normal existen escasas células positivas (marcas oscuras) en la epidermis (e), a diferencia de la piel de pacientes con tuberculosis cutánea, el mismo fenómeno se puede observar en dermis papilar (d).

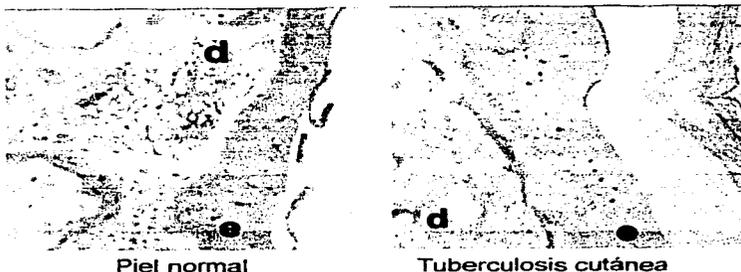


Figura 15. Langerina en Epidermis. Imágenes a 10X. Se observa un ligero incremento en las células positivas (marcas oscuras) en la epidermis (e) de los pacientes con tuberculosis cutánea. Las células positivas se delimitan a la epidermis.



Figura 16. LC en capa cornea de la epidermis. Secuencia de microfotografías a 20, 40 y 100X de izquierda a derecha respectivamente. La parte superior corresponde a piel normal y la de abajo a piel con TBC, donde se observan células positivas para CD1a muy cercanas a la capa cornea de la epidermis (flecha). A inmersión, destaca un cuerpo celular dentro de la capa cornea que no se desprendió del resto de la epidermis en el proceso del marcaje (triángulo).



Figura 17. LC en proximidad a capa córnea. Microfotografías a inmersión (100X), la izquierda corresponde a piel normal y la derecha a piel con TBC. En este último caso se observa un cuerpo celular que expresa CD1a muy próximo a la capa córnea (flecha).

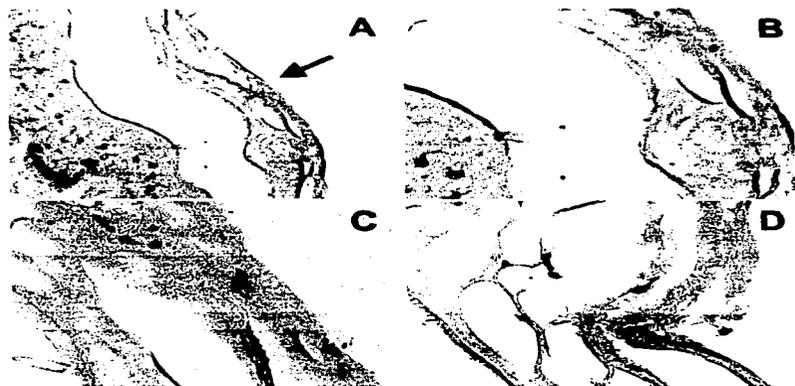


Figura 18. DC CD1a+ en capa córnea de piel con TBC. A: microfotografía a bajo aumento (10X), donde se observan las diferentes capas de la piel (epidermis con capa córnea -flecha- y dermis (esquina inferior izquierda). B: magnificación a 20X, C: mismo campo en la zona de la córnea a 100X, D: 100X de otro campo del mismo corte en donde se aprecian otras células positivas al marcador ubicadas en la córnea.



Figura 19. Tamaño de DC en epidermis. Microfotografías a 100X, se observan células positivas a CD1a. A la izquierda corte de piel normal, a la derecha un corte de piel con tuberculosis cutánea. Los cuerpos celulares (flechas) son mayores en los pacientes que en los controles (piel normal).

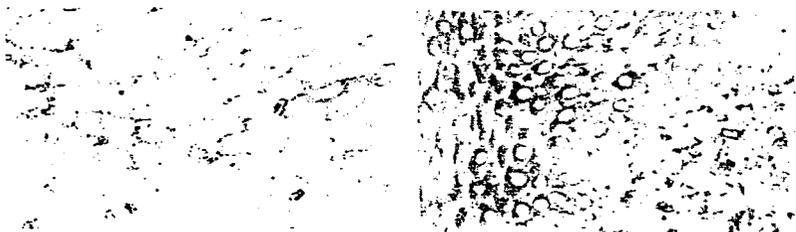
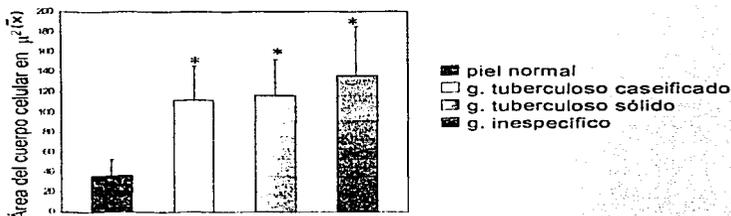


Figura 20. Queratinocitos en Tuberculosis cutánea. Microfotografías a 40X que muestran la expresión de MHC-II (izquierda) y la positividad intracitoplasmática de CD68 por los queratinocitos (derecha). Ambos marcadores son negativos en piel normal.

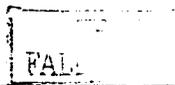
En la TBC, los queratinocitos tienden a ser de mayor tamaño en relación a los queratinocitos de la piel normal, además, algunos de dichos queratinocitos en los pacientes con TBC, expresan MHC-II así como CD68 (Figura 20).



Gráfica 2. Tamaños de los somas de las DC CD1a+ en epidermis. El área del cuerpo celular se midió de forma cegada con un analizador de imágenes en 67 campos al azar (25, 19, 11 y 12 en los distintos grupos respectivamente). Existe un aumento en el tamaño de las DCs en la TBC (* $p < 0.01$ con ANOVA de 1 vía).

Inmunohistoquímica para APCs en dermis. A nivel de dermis en las biopsias de piel normal, las células positivas para MHC-II fueron escasas y sólo se ubicaron en dermis superficial, en cambio, en los pacientes con TBC, se encontraron numerosas células localizadas en todas las capas de la dermis (superficial, media y profunda) y en la hipodermis de algunos casos. Adicionalmente, algunas de estas células positivas en dermis de los pacientes tuvieron una morfología francamente dendrítica.

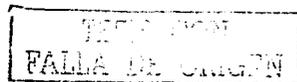
En algunos de los pacientes con TBC se observaron escasas células positivas para Langerina en la dermis papilar (Figura 21), en contraste con las biopsias de piel normal donde la expresión se restringe exclusivamente a la epidermis. Un fenómeno similar se presentó con la expresión de CD1a; ésta molécula se encontró positiva en el 57% de las biopsias de los pacientes con TBC a nivel de dermis superficial y media, las células positivas fueron escasas en la mitad de los pacientes, y en la otra mitad hubo un mayor

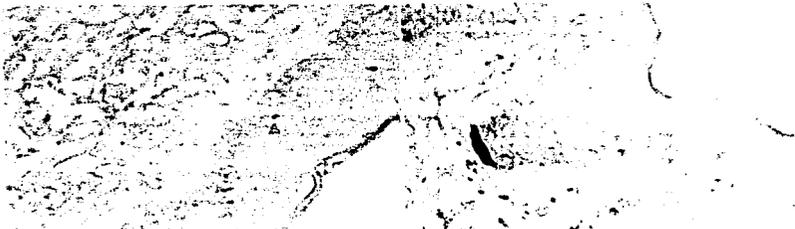


número de células positivas (Figura 22).

Por otro lado, en la zona de los granulomas, la mayoría de las células son CD68 positivas como se observa en la Figura 23.

Inmunohistoquímica para Lc T. Prácticamente no se detectaron CD4+, y los Lc T predominantes fueron CD8+ en todos los casos (Figura 24). Algunos de los Lc T son infiltrantes (Figura 25) ya que se encuentran en la epidermis; además de encontrarse localizados en la zona de los granulomas se ubicaron de manera muy importante a nivel peri vascular (Figura 25) y perianexial (Figura 26).





Piel normal **Tuberculosis cutánea**
Figura 21. Langerina en dermis de piel con TBC. Imágenes a 40X. Pueden observarse algunas células positivas en la dermis superficial (flechas rosas) en los pacientes con tuberculosis cutánea, mientras que en piel normal se confinan a la epidermis (marcas oscuras en triángulos).



Piel normal



Tuberculosis cutánea

Figura 22. Molécula CD1a en dermis de piel con TBC. Microfotografías a 10X que muestran la disposición de LC (marcas oscuras). En el corte de la derecha se observan cúmulos de células positivas a CD1a en la dermis (d), mientras que en la piel normal hay ausencia de dicha expresión a ese nivel. La línea punteada marca la unión dermoepidérmica. e: epidermis.



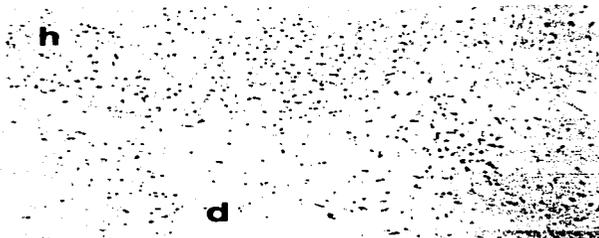


Figura 23. Células CD 68+. Microfotografía a 10X en zona de los granulomas, en este caso se afecta la dermis profunda (d) e hipodermis (h) y hay un predominio de células positivas para CD68.

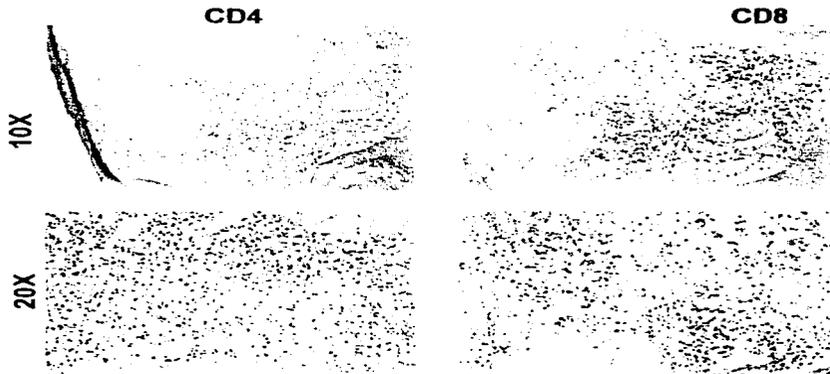
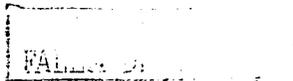
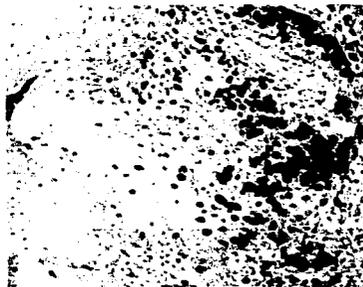


Figura 24. Linfocitos T en TBC. En las microfotografías superiores se observa de manera panorámica la disposición de los linfocitos. Hay una escasa cantidad y débil positividad de células CD4+, a diferencia de CD8+ cuya positividad es muy aparente.





20x

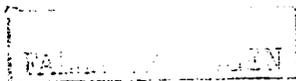


10x

Figura 25. Linfocitos T CD8+ en TBC. En la microfotografía de la izquierda se muestran linfocitos a nivel perivascular (flechas). En la imagen derecha, las células se observan en la epidermis (linfocitos infiltrantes).



Figura 26. Linfocitos CD8+ con distribución perianexial. Microfotografía a 10X, en la que se observan linfocitos que rodean a un folículo y glándulas sebáceas de un corte de piel de un paciente con TBC.



Discusión

En general, la TBC es más frecuente en el sexo femenino. En nuestro grupo de pacientes finalmente estudiados, hubo un ligero predominio del sexo masculino, lo cual se puede deber al número pequeño de biopsias estudiadas, como ha ocurrido en otras series (11;38).

En la TBC, el porcentaje de biopsias positivas a la tinción de Z-N suele ser bajo, debido a que el número de bacilos presentes en las lesiones cutáneas son escasos y se necesitan al menos 1000 bacilos/ml (38) para poder ser detectados por Z-N. Sin embargo, Farina y colaboradores (11) reportan resultados positivos por arriba del 50%, seguramente debido a que estudiaron sólo casos severos de TBC. Algunos de los casos estudiados en nuestra serie presentaron estructuras rojas que pudieran corresponder a bacilos no íntegros, degradados o a restos de los mismos; por lo que se consideraron negativos.

Las características histológicas generales encontradas en nuestros casos, no difieren de lo reportado en la literatura (8,14).

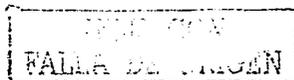
Existen diversos trabajos que han demostrado la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la TBC, utilizando tejido embebido en parafina; sin embargo, los resultados son variables, desde aquellos que niegan su utilidad en casos "paucibacilares" (sin bacilos ácido-alcohol resistentes por Z-N) (45), pasando por trabajos con resultados intermedios (60%) (46) y hasta aquellos con 100% de resultados positivos en tuberculosis orificial, tuberculosis diseminada y tuberculosis de inoculación primaria (47). Las diferencias pueden estar dadas principalmente por las diversas formas clínicas estudiadas, que a su vez influyen en la cantidad de bacilos presentes en las lesiones. Otros factores que modifican los resultados son: el tipo de tejido, necrosis o autólisis del tejido, la densidad del estroma, un tiempo de fijación prolongado (mayor de 24 horas), el tipo de iniciadores utilizados, la sensibilidad del sistema y el contenido de nucleasas (47).



Nosotros utilizamos un sistema múltiple, que permite la identificación en una sola prueba de cualquier micobacteria perteneciente al llamado "Complejo" de micobacterias patógenas para el ser humano, seguida de una segunda amplificación específica de la especie *tuberculosis*. La proporción general de resultados positivos fue menor que la encontrada por otros autores en nuestro medio (44), quienes reportaron un 80% de pruebas positivas en general (prácticamente el doble que nosotros), además, para las tuberculides su resultado fue cercano al 90%, mientras que para las tuberculosis verdaderas fue del 67%. Nosotros encontramos una proporción similar en éstos últimos casos (tuberculosis fijas o verdaderas), lo que es de esperarse, debido a que en estos casos suelen encontrarse bacterias en el material de análisis. Sin embargo, encontramos un baja proporción en las tuberculides (37%). Dicha diferencia pudo haberse dado por la cantidad de tejido utilizado, pues ellos usaron 4 veces mayor cantidad por prueba, y en las tuberculides la cantidad de bacterias suele ser muy bajo, así, al aumentar la cantidad de tejido las posibilidades de encontrar DNA bacteriano se incrementa.

Respecto al aumento en el número de DC en epidermis se ha descrito que en ratones NIH que tienen susceptibilidad intermedia a la infección por *Mycobacterium lepraemurium* (MIL) al ser inoculados con BCG o con MIL se observa un incremento de LC en su epidermis, sin embargo en ratones BALB/c que son susceptibles a la infección con MIL y en ratones C57BL7/6 que son resistentes a la infección por MIL, al ser infectados con MIL presentan una disminución de LC en su epidermis, lo cual correlaciona con un aumento de dichas células en los ganglios linfáticos (48). Nosotros al igual que en la cepa NIH encontramos un aumento de las LC en la epidermis de los pacientes con TBC. Dicho aumento si bien se vio relacionado con un mayor tamaño de la epidermis (acantosis), muy probablemente no sólo se debe a una relación directamente proporcional al notorio engrosamiento de la epidermis, dado que la correlación entre el número de células positivas y el área de la epidermis fue de moderada-baja (0.45), lo que indica que otros factores intervienen en dicho incremento.

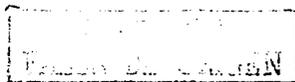
Para que las DC se localicen en la epidermis se deben cubrir cuatro aspectos: 1) una



producción por parte de la médula ósea, que garantice un número de células que puedan salir y arribar a la piel. 2) una serie de mecanismos probablemente locales, que permitan la llegada de las células, 3) otros mecanismos que favorezcan su permanencia en la epidermis y 4) factores ("constantes") de salida de las LC de la epidermis. Con estas consideraciones podría intentarse explicarse el aumento en el número de las DC en los pacientes con TBC. Si el primer punto fuera responsable del incremento celular, implicaría una mayor producción de células por parte de la médula ósea, creemos que ello es poco probable, ya que se ha demostrado en estudios de tuberculosis pulmonar que existe una compartimentalización del antígeno a nivel regional (49), lo que evita que los cambios locales se generalicen a sangre periférica y posiblemente tampoco a otros tejidos como sería la médula ósea. Wagh y cols.(50) encontraron en la mayoría de sus pacientes estudiados con diversas formas de TBC los niveles periféricos de linfocitos no se alteran, hecho que sugiere que la producción de las células no se incrementa en este proceso patológico. Sin embargo no se ha estudiado para DCs o sus precursores.

Por otro lado, no se sabe con exactitud que es lo que permite la colonización y residencia de las DCs en los tejidos periféricos, posiblemente estén implicadas quimiocinas. Los queratinocitos producen una serie de quimiocinas (MIP-3 α , MCP-1, RANTES) y citocinas (TGF β , IL-10) bajo situaciones de daño, que son importantes para el reclutamiento de las LC hacia la epidermis. La quimiocina MIP-3 α (proteína migratoria de macrófago), guía a las LC (con su apropiado receptor, CCR6) desde la corriente sanguínea hacia la epidermis (30). Existen ratones que sobreexpresan MCP-1 (proteína quimotáctica monocítica) y en ellos se observa un reclutamiento de LCs y otras DCs en su piel. In vitro se ha demostrado que las DCs tienen respuesta quimioatrayente a otra C-C quimiocina llamada RANTES (regulated on activation, normal, T-cell expressed) (29).

Los queratinocitos producen de forma constitutiva pequeñas cantidades de TGF β (37) y también su producción se incrementa al perturbarse la homeostasis epidérmica, dicha citocina juega un papel crítico en el arribo de las LC a la epidermis como se demuestra en los ratones knockout para esta citocina, quienes carecen de LC en su epidermis



(30). Un mecanismo que puede explicar la permanencia de las células de Langerhas en la epidermis, es la expresión en su superficie de altos niveles de Cadherina-E, molécula de adhesión dependiente de calcio, que también se expresa en los queratinocitos basales, y que juega un importante papel en la morfogénesis e integridad tisular. Las DC que se encuentran en los nódulos linfáticos de drenaje cutáneo, tienen bajos niveles de Cadherina-E (51). Si los niveles de dicha molécula de adhesión permanecen elevados, posiblemente las LC se quedarían en la epidermis. Se sabe que ciertas citocinas como la IL-1 β y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) inducen la migración de las LC, y parece ser que estas citocinas pro inflamatorias disminuyen la expresión de la Cadherina-E por parte de las células de Langerhans (52). Así en ausencia de estas citocinas, la presencia de las DC aumentaría en la epidermis. La producción de IL-10 podría por sí misma, perturbar la migración de las LC, debido a su efecto inhibitorio sobre la migración de las mismas (53).

Además de la disminución de la Cadherina E y la presencia de citocinas, para que las LC salgan de la epidermis, requieren identificar y atravesar la membrana basal de la epidermis (puerta de salida hacia la dermis). Ello parece ocurrir mediante el reconocimiento por parte de LC de los componentes de dicha membrana, a través los receptores para integrina- α_6 , del que es ligando la Laminina (principal componente de la membrana basal). Esta interacción, a su vez, induce la producción de moléculas con actividad proteolítica (MMP: metaloproteinasa de matriz) (30), permitiendo así la digestión de la membrana basal y la salida de las DC hacia el sistema linfático (29). Si alguno de estos mecanismos se altera, las LC verían alterada su salida de la epidermis.

Una vez que las LC han logrado salir de la epidermis, son guiadas hacia los linfáticos por quimiocinas tales como MIP-3 β /CCL19 (producida por células endoteliales) y quimiocina de tejido linfoide secundario (SLC)/CCL21 (30); además de las quimiocinas, es necesaria la presencia del receptor (CCR7), el cual sólo es expresado por LCs maduras (30).

Finalmente no sabemos si alguno (s) de los procesos que permiten la salida de las LC

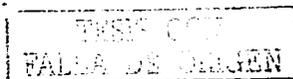


de la epidermis éste alterado, tampoco sabemos si la población local de LC se renueva desde una población local en la epidermis como sucede en ratones radiados (31) y que sumado a las células que van arribando desde la dermis pueda explicar el incremento de la DC en la epidermis de los pacientes con TBC.

Aunque las DC que en epidermis expresan CD1a, MHC-II y Langerina, de manera general se encontraron incrementadas en los pacientes con TBC, dicho incremento no es igual en todas las moléculas. Por ejemplo, la expresión de CD1a fue mayor en comparación con la expresión de MHC-II y Langerina, y además, fue mucho mayor en el grupo con granuloma tuberculoso caseificado. Lo anterior podría deberse a las funciones de cada una de las moléculas y al estado de maduración de las DCs. La Langerina es una molécula asociada con la captación e internalización de los antígenos (32;33), por lo que se hace necesaria en dicha fase (captura de antígeno), por ello probablemente su expresión es menor a las otras moléculas analizadas, incluso en el granuloma inespecífico (posiblemente un granuloma más antiguo) la expresión de Langerina es prácticamente igual que en la piel normal.

La diferente expresión de MHC-II en las DCs esta relacionada a su estado de maduración. Se sabe que la síntesis de MHC-II se ve incrementada en células maduras (21) porque estas moléculas se hacen necesarias para la presentación de antígenos, por ello se incrementa la expresión de MHC-II en la TBC. La diferente expresión entre MHC-II y CD1a en TBC posiblemente se debe a que la población de LCs en la epidermis de los pacientes no es homogénea, mientras algunas células se encuentran maduras, otras posiblemente no, debido a que no todas las LCs MHC-II+ expresan CD1a, molécula que en experimentos in vitro donde las DCs son infectadas con *M. tuberculosis*, se expresan predominantemente en la superficie celular y en estado endosomal temprano de fagosomas micobacterianos (22), posiblemente la persistencia del antígenos lipídicos de origen micobacteriano sean un estímulo para la continua expresión de CD1a.

En este trabajo se observaron algunas LC en las capas más superficiales de la piel, lo cual no sucede en condiciones normales, ya que el movimiento de las LC residentes de



la piel normal es a la inversa; migran de la epidermis hacia los linfáticos dérmicos para finalmente arribar a los ganglios linfáticos. En cambio, la cinética migratoria de los queratinocitos en la piel normal va de la capa basal hacia la capa córnea, proceso que dura aproximadamente 3 semanas y que se conoce con el nombre de queratinopoyesis (54). En algunos de los casos estudiados, las LC parecían llevar una dirección inversa a su trayectoria normal, como normalmente sucede con los queratinocitos, esto es, de la capa basal de la epidermis hacia el exterior. Este hallazgo puede ser debido a que la queratinopoyesis se encuentra probablemente alterada. En general el grosor de la epidermis tiene una correlación inversa con el rango de movimiento (55), lo que significa que a mayor grosor de la epidermis, menor tiempo para llegar a la córnea. La cinética alterada de los queratinocitos podría probablemente "arrastrar" consigo algunas LC hacia la córnea. Esto, aunado a las alteraciones locales que permiten la permanencia de las LC en la epidermis, podría favorecer el arribo de las mismas a las capas más superficiales de la piel. La alteración en la dirección del movimiento de las LC podría comprometer su función como APCs, aunque el número de LC observadas en la capa córnea fue pequeño.

Fue evidente que algunas de las DC que se encontraron en la epidermis de los pacientes con TBC estaban hipertróficas, fenómeno que ya ha sido observado en ratones infectados con BCG o con MIL, (48) es posible que la hipertrofia de las células refleje la activación temprana de las mismas, (48) como sucede en las células epitelioides (macrófagos tisulares activados). Sería útil conocer cuales son los organelos, implicados en el aumento del soma.

A diferencia de otros autores (34;35), nosotros no pudimos determinar el porcentaje de DC en la zona de los granulomas, debido a la incapacidad de obtener un marcaje específico para distinguir macrófagos, así como a la imposibilidad técnica de realizar dobles marcajes que nos permitieran distinguir a las DC de los macrófagos que expresaron MHC-II. Sin embargo la morfología dendrítica y la positividad de dicho marcador, nos hace pensar que efectivamente hay DCs en la dermis superficial, media y profunda de los pacientes con TBC y posiblemente correspondan en su mayoría a

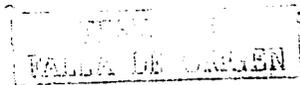
FALLA

DDCs, pero deben hacerse otros marcajes para corroborarlo, así como evaluar el estado de maduración de dichas células mediante la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86).

Ramesh y su grupo de colaboradores, con el uso de (38) CD1a como marcador para evaluar las DCs en 9 pacientes con Lupus Vulgar, encontraron algunas células positivas en dermis. Nosotros encontramos células positivas a CD1a en casi el 60% de las biopsias analizadas, tanto a nivel superficial de dermis, como en la dermis media; al igual que el trabajo reportado (38) estas células positivas fueron escasas, salvo en dos de nuestros pacientes. Se ha sugerido que la presencia de moléculas CD1 (a, b y c) están relacionadas con una adecuada respuesta inmune debido a que se localizan en los granulomas de la Lepra Tuberculoide y su expresión esta disminuida o ausente en las lesiones de Lepra Lepromatosa (25). En este tipo de trabajos (incluyendo el nuestro), se tiene la desventaja de ser estáticos, por lo que al encontrar en la dermis DCs CD1a+ no sabemos si dichas células están arribando o saliendo de la epidermis.

En relación a la expresión de MHC-II por parte de los queratinocitos, se sabe que en condiciones normales no se expresa, pero puede ser inducida tanto en vitro como en vivo por INF- γ ; dicha citocina puede ser de origen linfocitario debido a que la producción de MHC-II por parte de los queratinocitos está asociada a infiltración linfocitaria (37). En nuestros casos efectivamente hubo infiltración linfocitaria en la epidermis. No se sabe si los queratinocitos al expresar MHC-II puedan fungir como células presentadoras de antígenos a nivel local (56). La expresión de MHC-II en células que normalmente no lo expresa se considera aberrante e indica que los Lc T se han activado en el entorno inmediato (57).

Previamente se ha descrito que los queratinocitos normales no expresan CD68, pero se puede manifestar en lo queratinocitos de algunas dermatosis y que dicha expresión refleja el estado de activación o diferenciación de los queratinocitos (58). Adicionalmente se ha observado mediante análisis ultraestructural, que la expresión de CD68 se encuentra asociada a grandes cantidades de fagolisosomas, así mismo se sabe que los queratinocitos basales contienen estas estructuras (59), por lo que la expresión de CD68, aunado al aumento del tamaño de estas células en los pacientes



con TBC podría estar reflejando la cualidad de fagocitar. Habría que hacer otro tipo de estudios para corroborar dicha hipótesis.

Con respecto a los Lc T en TBC, hay controversias en relación a la cantidad y a los diferentes tipos de Linfocitos T encontrados en los granulomas. En una serie estudiada de pacientes con Lupus vulgar (38) la mayoría de los casos tuvo un predominio de Lc T CD4+, aunque en dos pacientes el predominio fue de CD8+. Otros autores (42;43) coinciden en encontrar un predominio de Lc T CD4+ en los granulomas de los pacientes con la misma forma de TBC (Lupus vulgar), sin embargo, los Lc T CD8 predominaron en los pacientes con tuberculosis colicuativa. Nosotros encontramos un predominio de Lc T CD8+ independientemente de la variedad clínica y del tipo de granuloma. Estas inconsistencias pueden deberse al pequeño número de pacientes estudiados, lo que hace difícil generalizar los resultados directamente a la clínica.

Se sabe que en modelos murinos de tuberculosis pulmonar existen claramente dos fases. Una fase aguda que va del primer día de infección al 28, en ella un predominio de Lc T CD4 en las células del lavado bronquial, mientras que en la siguiente fase crónica que inicia después de 1 mes de infección y en la que hay progresión de la enfermedad, se caracteriza por un predominio Lc T CD8; por lo que se sugiere los subgrupos de Lc T cambian a lo largo del tiempo (60). Todos los casos estudiados en esta serie fueron crónicos con un mínimo de 4 meses a un máximo de 30 años de evolución de la infección, lo que probablemente permitiría un predominio de CD8. En humanos infectados con *Mycobacterium leprae*, se ha observado que aquellos pacientes con resistencia inmunológica a la micobacteria tienen predominio de mRNA para citocinas Th1 en los sitios de lesión y una adecuada formación de granulomas, mientras que aquellos con enfermedad extensa, predomina el mRNA de citocinas Th2, en estos mismos pacientes hay un mayor número de LcT CD8+ (61). Sin embargo, también existe evidencia de que los LcT CD8+ son necesarios para la respuesta inmune protectora ante *M. tuberculosis* (40). Se ha observado que en pacientes con lepra tuberculoides, la forma inmunoresistente de la enfermedad, tienen linfocitos CD8+ en la periferia de los granulomas y se ha sugerido que estas células podrían contribuir al confinamiento de los bacilos en los granulomas debido a su actividad citotóxica (25).

TESIS CON
FALLA DE PAGEN

Además, ratones deficientes en MHC-I, así como en CD8+, son más susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* (62). También se ha demostrado que clones de LcT citotóxicos CD8+ murinos, generados para la proteína de choque hsp65 de *M. tuberculosis* pueden conferir inmunidad parcial para la infección de dicha micobacteria. En humanos, los Lc T citotóxicos CD8+ restringidos para CD1b son capaces de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* in vitro (62) y matar directamente a la bacteria (23;63). Los Lc T citotóxicos pueden jugar un papel importante en la inducción de apoptosis de las células infectadas con *M. tuberculosis*. Adicionalmente, los linfocitos CD8+ pueden funcionar como "células cooperadoras" debido a su patrón de citocinas que secretan (Tc1) (25), por ello se debe investigar el patrón de citocinas in situ en las lesiones de la TBC.

Los queratinocitos son fuente de IL-1, citocina que induce un aumento en la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Otras citocinas que aumentan la expresión de ICAM-1 son el INF- γ y el TNF- α . La IL-1 activa a las células endoteliales de los vasos contiguos de la dermis papilar, que expresan ICAM-1, lo que permite interactuar con los LcT, mediante su ligando, la molécula de adhesión linfocitaria 1 (LFA-1) así, los linfocitos son "atrapados" en los capilares, para posteriormente ser atraídos a los sitios dañados por un gradiente quimiotáctico (64). Lo anterior explicaría la presencia de infiltrados linfocitarios en zonas peri vasculares, en los sitios del granuloma, así como la infiltración intra epidérmica, ya que en dicho sitio los queratinocitos son fuente de MIP, MCP y RANTES, quimiocinas que favorecen el arribo de los linfocitos hacia la epidermis (64). A nivel intraepitelial, los Lc T predominantes en condiciones normales son CD8 (56), también se sabe que las DC persuaden a los Lc T citotóxicos a expresar CD8 y aumentar la interacción con MHC-I para que proliferen vigorosamente, lo cual es inusual en los Lc T CD8 (28), lo que podría explicar parcialmente el predominio de CD8 en la epidermis de los pacientes con TBC.

Conclusiones

1. Aunque desconocemos que es lo que permite el incremento de las DC en la TBC consideramos que por este hecho existe una importante participación de dichas células en la respuesta inmune ante *M. tuberculosis*, independientemente del granuloma que conforman las lesiones de las biopsias de los pacientes, así como de la variedad clínica de TBC.
2. En la epidermis de los pacientes con TBC hay un predominio de LC CD1a+ probablemente debido a la persistencia de antígenos lipídicos provenientes de *M. tuberculosis*.
3. En la dermis de los pacientes con TBC existen en general escasas LC, pero en algunos casos parecen ser parte de los granulomas
4. Seguramente las DDCs forman parte del infiltrado inflamatorio en las lesiones de los pacientes con TBC.
5. Los queratinocitos posiblemente funcionen también como células reguladoras de la respuesta inmune ante *M. tuberculosis* en la piel, debido a los cambios que presentan.
6. Los linfocitos que predominan en las lesiones de la TBC son de tipo CD8+, probablemente debido a la cronicidad de las lesiones. Aunque desconocemos el tipo funcional al que pertenecen.

Perspectivas

- ¿ Hay DC que contengan bacilos o material Z-N positivo, dentro de ellas?
- ¿ Hay DC (u otras células) apoptóticas en epidermis /dermis /granulomas?
- ¿ Hay algún receptor TLR alterado o sobre-expresado?
- ¿ Como se encuentra la IL-12 (y el IL12-R); o el IFN γ in situ en la TBC?
- Se podría (¿valdría la pena?) estudiar la clonalidad (o no) de los Lc T CD8+ en la TBC?
- ¿Cómo se encuentran funcionalmente las DC in situ en la TBC?
- ¿Qué organelos están implicados en la hipertrofia de las DCs y de los queratinocitos?

IMPRESA DE
VALLE DE URGEN

Anexo 1

Tabla 1. Clasificación de la TBC de Beyt (8)

TBC por inoculación exógena

Chancro tuberculoso (primoinfección tuberculosa)

Tuberculosis verrugosa

Lupus vulgar (algunos casos)

TBC de origen endógeno

Por contigüidad: Escrofulodermia

Por autoinoculación: Tuberculosis orificial

TBC de origen hematógeno

Tuberculosis miliar

Tuberculosis gomosa

Lupus vulgar

Tuberculosis eruptivas (tuberculides)

Micropapulares: liquen escrofulosorum

Papulares: tuberculides papulonecróticas

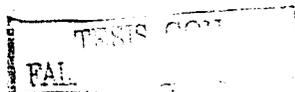
Nodulares: eritema indurado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 2

Tabla 2. Clasificación de TBC (según el modo de infección y estado inmunológico (3))

Infección exógena	Tuberculosis por inoculación primaria (infección de huésped no inmune) Tuberculosis verrugosa cutis (infección de huésped inmune)
Infección endógena	Lupus vulgar Escrofulodermia Abscesos tuberculosos metastásicos Tuberculosis miliar aguda Tuberculosis oficial
Tuberculosis debida a la vacuna BCG	
Tuberculides	Tuberculides Liquen escrofulosorum Tuberculides papulonecróticas Tuberculides facultativas Vasculitis nodular Eritema nudoso No tuberculides Condiciones que no están relacionadas a la tuberculosis.



Anexo 3

TÉCNICAS DE LABORATORIO

OBTENCIÓN DE LOS CORTES DE BIPOSIAS EN PARAFINA.

En tubos eppendorf estériles se colocó un corte de 4 μ de espesor. Cada uno de los bloques fue cortado con una cuchilla individual para evitar contaminación cruzada.

EXTRACCIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO EMBEBIDO EN PARAFINA.

Se agregó 1 ml de xileno a cada tubo eppendorf que contenían las biopsias (un corte de 4 μ), se agitó suavemente en vórtex durante 10 segundos e incubó 10 minutos a temperatura ambiente sobre una placa oscilante. Se centrifugó a 14,000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 5 minutos a 4°C. Se removió cuidadosamente el sobrenadante y decantó. Se repitió en dos ocasiones el procedimiento anterior. Posteriormente se lavó el botón con 1.0 ml de etanol absoluto, e invirtió el tubo varias veces y se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Eliminamos cuidadosamente el sobrenadante. Repetimos el lavado anterior. Se lavó el botón con 1 ml de etanol al 75% invirtiendo varias veces y se centrifugó nuevamente a 14,000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se secaron las muestras al vacío.

RECONSTITUCIÓN DE LAS MUESTRAS DEL TEJIDO DESPARAFINADO Y EXTACCIÓN DEL DNA.

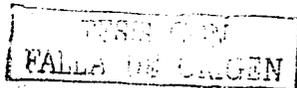
Se reconstruyó el tejido en 250 μ l de agua inyectable y se sometió a 70°C durante 30 minutos en baño María, seguido de centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 15 minutos y eliminación cuidadosa del sobrenadante.

El botón fue digerido mediante la aplicación de 500 μ l del reactivo TRIzol® y se homogenizó durante 2 minutos en vórtex (se observó que la muestra de tejido siempre fuera menor o igual al 10% del volumen del TRIzol®). Posteriormente se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente, al término, se les agregó 100 μ l de cloroformo y se taparon los tubos herméticamente, fueron agitados vigorosamente en vórtex durante 1 minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Acto seguido, se centrifugaron los tubos a 14 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a un tubo limpio, para aislar el RNA.

Para precipitar el DNA de la fase orgánica se agregaron 150 μ l de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 minutos, después se centrifugó a 7 500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se removió cuidadosamente la fase acuosa (fenol-etanol).

Se lavó dos veces el botón de DNA con 500 μ l de solución de Citrato de Sodio 0.1 M en etanol al 10%, y se colocaron los tubos en un rotor a 0.3 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 7 500 r.p.m. durante 4°C y se removió el sobrenadante en cada lavado.

Se lavó el botón de DNA con 750 μ l de alcohol al 75%, y se mantuvo en rotor a 4°C durante 20 minutos, seguido de centrifugación a 7 500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C y decantación del sobrenadante.



Se secó el botón de DNA durante 10 minutos mediante centrifugación al vacío.

Se disolvió en 50 µl de NaOH 8 mM, y se removió el material insoluble mediante centrifugación a 7 500 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C. Transferimos a un tubo nuevo el sobrenadante que contenía el DNA, el cual se calentó a baño María a 55° C durante 20 minutos.

Se tomó una alícuota para hacer una dilución 1:100 y leer a 260/280 nm en un espectrofotómetro, con la finalidad de determinar la pureza y concentración del DNA de las muestras obtenidas.

El DNA se conservó a -70° C.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En la tabla siguiente se muestran los genes amplificados, la localización de dichos genes, los iniciadores correspondientes (denominación) y la longitud del producto amplificado.

Gen amplificado	Iniciador	Secuencia	Longitud de la banda en pb	Ubicación
Antígeno alfa	MT1	5'-TCC CTG ACC AGC GAG CTG	506	Presente en todas las micobacterias
	MT2	CCG-3' 5'-CCC CAG TAC TCC CAG CTG TGC-3'		
Secuencia de inserción ISG110	IS5	5'-CGG AGA CGG TGC GTA AGT	948	Presente en micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i>
	IS6	GG-3' 5'-GAT GGA CCG CCA GGG CTT GC-3'		
mtp-40	PT1	5'-CAA CGC GCC GTC GGT GG-	396	Especie específico para: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	PT2	3'- 5'-CCC CCC ACG GCA CCG C-3'		
mtp-40 Fragmento interno*	PT3	5'-CAC CAC GTT CGG GAT GCA	223	
	PT4	CTG C-3' 5'-CTG ATG GTC TCC GAC ACG TCG-3'		

pb: pares de bases

* Este fragmento se amplificó en una segunda PCR (PCR anidada).

Se trabajó con las siguientes temperaturas:

1. Para la PCR múltiple:

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO en minutos	No. de CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineación	71	2	
Extensión	72	3	
Extensión final	72	10	1

2. Para la PCR anidada:

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO en minutos	No. de CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineación	75	2	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	10	1

El volumen final de cada amplificación fue de 50 μ l. Se utilizó Buffer para PCR 1X (sin magnesio), MgCl₂ a 1.5 mM, dNTP 0.2mM (cada uno), mezcla de iniciadores; MPT1-MPT2 10 pmol (cada uno), IS5-IS6 15 pmol (cada uno), PT1-PT2 y PT3-PT4 20 pmol (cada uno); Taq polimerasa 2U (2 μ l), H₂O estéril cbp 50 μ l, se utilizaron 100 ng de DNA en cada reacción. Tanto la extracción de DNA, así como la ejecución de la PCR fue por grupos de estudio, con la finalidad de evitar contaminación. En cada una de las corridas se utilizaba un control negativo (sin DNA) y un control positivo (DNA de *M. tuberculosis hominis* obtenido de un cultivo, utilizando la misma técnica de extracción de DNA señalada anteriormente).

Los tubos se colocaron en el termociclador (Amplifitron II) con el programa correspondiente para cada producto a amplificar. Después de terminar la PCR los tubos se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la siguiente PCR.

INMUNOHISTOQUÍMICA (Tejido en parafina)

Las laminillas que contenían los tejidos estaban previamente cubiertas con silano y se utilizaron cortes entre 3 y 4 μ de diámetro.

Se desparafinó a 60°C toda la noche. Para desparafinar e hidratar se utilizaron 2 baños de xilol durante 7 minutos, un baño de alcohol-xilol por 5 minutos, dos baños de alcohol absoluto de 1 minuto, y un baño de agua destilada.

Se utilizó recuperador antigénico Citraplus 1X (Biogenics®) 1:10 en agua desionizada, las laminillas se sometieron a baño Maria con dicho recuperador durante 30 minutos y 20 minutos fuera del baño, se lavó con agua destilada. En el caso de anticuerpos para linfocitos se utilizó como recuperador EDTA a pH 9 en olla de presión para horno de microondas a 120°C, aproximadamente a 10 - 12 atmósferas durante 6 minutos.

Para bloquear la peroxidasa endógena se utilizó agua oxigenada 30% 1:5 durante 7 minutos, lavado con Buffer (PBS con Tween) para bloquear uniones inespecíficas se utilizó un suero bloqueador (Biogenics®) durante 5 a 10 minutos, se retiraba el exceso y se aplicaba el primer anticuerpo con la dilución correspondiente (ver tabla) entre 10 y 20 minutos a 37°C, seguido de lavado con buffer, se colocaba el segundo anticuerpo (conjugado a biotina para unirse a streptavidina-peroxidasa -HPR-) por 10 minutos a 37°C. Lavado con Buffer, colocación de conjugado estreptavidina-peroxidasa por 10 minutos a 37°C, lavado con Buffer, colocación de sustrato + cromógeno (azul-gris para peroxidasa, o amino etil carbazol -AEC-) durante 1 a 20 minutos (según el anticuerpo primario). La reacción se detuvo con agua destilada. La contratinción se realizó con verde brillante al 30% dilución 1:25 para las marcas azules, y con hematoxilina de Meyer para marcas rojas.

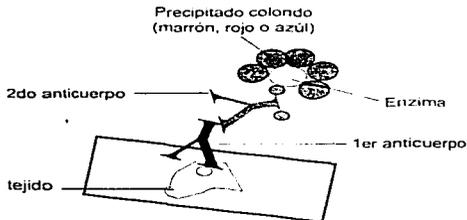


Figura 27. Inmunohistoquímica. Esquema que representa la reacción inmunohistoquímica. El círculo en la laminilla corresponde al antígeno en el tejido, al que se le une un anticuerpo específico, y a éste un segundo anticuerpo, el resto representa la reacción enzimática que produce el precipitado coloreado e insoluble.

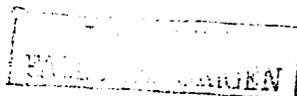
Bibliografía

- (1) Bloom BR. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington DC: ASM Press, 1994: XIII-XIV.
- (2) Rodríguez O. Tuberculosis cutánea. Revista del Centro Dermatológico Pascua 1993; 2:53-64.
- (3) Gehard T, Wolff K. Tuberculosis and other mycobacterial infections. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, editors. Dermatology in General Medicine. New York: McGraw-Hill, 1995: 2274-2292.
- (4) Snider Jr DE, Ravignone M, Kochi A. Global burden of tuberculosis. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington DC: ASM Press, 1994: 3-11.
- (5) Morval-Caus J. Tuberculosis cutánea Piel 1991; 6:330-338.
- (6) Secretaría de Salud M. Boletín del sistema nacional de salud. <http://www.ssa.gob.mx>, editor. 2000. SS.
- (7) Saúl A. Dermatitis bacterianas (tuberculosis cutánea) In: S. editor. Lecciones de dermatología. México,D.F.: Méndez Cervantes. 1993. 72-85
- (8) Velazco PM. Tuberculosis cutánea. Piel 1999; 14:397-410.
- (9) Rodríguez O. Tuberculosis diseminadas II. Revista del Centro Dermatológico Pascua 1994; 3:6-14.
- (10) Schneider JW, Jordaan HF. The histopathologic spectrum of erythema induratum of bazin. Am J Dermatopatol 1997; 19:323-333.
- (11) Farina MC, Gegúndez MI, Pique E, Esteban J, Martín L, Requena L. Cutaneous tuberculosis: a clinical, histopathologic and bacteriologic study. J Am Acad Dermatol 1995; 33:433-440.
- (12) Kaufmann JC, Kaufmann S. Immune mechanisms of protection. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control Washington, D.C.: ASM Press, 1994: 389-415.
- (13) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Células y tejidos del sistema inmunitario. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. Inmunología celular y molecular. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999 16-48
- (14) Lever WF, Schamburg-Lever G. Enfermedades bacterianas. Histopatología de la piel. Buenos Aires. Inter-Médica. 1991 310-317
- (15) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Propiedades generales de las respuestas inmunitarias. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. Inmunología celular y molecular. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999 3-15
- (16) Rojas-Espinosa O. Inmunidad específica: el sistema linfóide. In: Rojas-Espinosa O, editor. Inmunología (de memoria). 2002: 31-55
- (17) Barnes PF, Modlin RL, Ellner JJ. T-cell response and cytokines. In: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, D.C.: ASM Press, 1994: 417-435.

- {18} Barnes PF, Modlin RL. Human cellular responses to *Mycobacterium tuberculosis*. In: Shinniek TM, editor. Tuberculosis. Germany: Springer, 1996: 197-219.
- {19} Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. El complejo principal de histocompatibilidad. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. Inmunología celular y molecular. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999: 149-185.
- {20} Fujita M, Miyachi Y, Nakata K, Imamura S. Gamma- δ T-cell receptor-positive cells in human skin I. Incidence and V region gene expression in granulomatous skin lesions. J Am Acad Dermatol 1993; 28:46-50.
- {21} Théry C AS. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. Current Opinion in Immunology 2001; 13:45-51.
- {22} Schable UE, Hagens K, Fisher K, Collins HL, Kaufmann SH. Intersection of grup I CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. J Immunol 2000; 164:4843-52.
- {23} Sugita M van del Well N, Rogers RA, Peters PJ, Brener MB. CD1c molecules broadly survey the endocytic system. PNAS 2000; 18:8445-50.
- {24} Carbone E, Terrazano G, Melian A, Zanzi D, Morreta L, et al. Inhibition of human NK cell-mediated killing by CD1 molecules. J Immunol 2000; 164:6130-6137
- {25} Rojas EO MC. Lepra y tuberculosis: algunas correlaciones inmunológicas. Dermatología Rev Mex 44, 181-90 2000.
- {26} Flores-Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. Immunology 2001; 102:255-62.
- {27} Pulendran B, Maraskovsky E, Banchereau J, Maliszewski C. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. TRENDS in immunology 2001; 22:41-47.
- {28} Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392:245-252
- {29} Maurer D SG. Dendritic cells in the context of skin immunity. Dendritic cells: biology and clinical applications. Academic Press, 1999. 111-22.
- {30} Romani N, Rätzinger G, Pfaller K, Salvenmoser W, Stossel H, Koch F, et al. Migration of dendritic cells into lymphatics- the langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. International Review of Cytology 207, 237-70. 2001
- {31} Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peter W, Charo I et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. Nature immunology 2002; 3:1135-1141.
- {32} Valladeau J, R Odile, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of birbeck granules. Immunity 2000; 12:71-81.
- {33} Valladeau J, Clair-Monnot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpffenning A, Mattéi MG, et al. Identification of mouse langerin/CD207 in langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. J Immunol 2001; 167:1-11.
- {34} Smolle J, Kneifel H. S-100-protein-positive dendritic cells in nodular vasculitis. Dermatologica 172, 139-43. 1986.

ESTATÍSTICO NO CLIP
 DEPARTAMENTO DE ORÇEN

- (35) Cribier B. Étude immunohistochimique de la vasculite nodulaire rôle possible d'une hypersensibilité retardée cellulaire. *Ann Dermatol Venereol* 1992; 119:958-63.
- (36) Jordaan HF, Niekerk V, Louw M. Papulonecrotic tuberculid a clinical, histopathological, and immunohistochemical study of 15 patients. *Am J Dermatopathol* 1994; 16:474-85.
- (37) Stingl G, Maurer D, Hauser C, Wolff K. The epidermis, an immunologic microenvironment. In: Fitzpatrick T, Eisen A, Wolff K, Freedberg I, Austen K, editor. *Dermatology in general medicine*. New York: Mc-Graw - Hill, 1995: 343-70.
- (38) Ramesh V, Samuel B, Shyam MR, Nath I. In situ characterization of cellular infiltrates in lupus vulgaris indicates lesional T-cell activation. *Arch Dermatol* 1990; 126:331-5.
- (39) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T. *Inmunología celular y molecular*. Madrid. McGraw-Hill Interamericana, 1999: 124-148.
- (40) Flynn JL, Goldstein MM, Tiebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to mycobacterium infection. *J Immunol* 1995; 155(2515):2524
- (41) Lewinson DM, Briden AL, Reed SG, Grabstein KN, Alderson MR. *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD8⁺ T lymphocytes: the relative contribution of classical versus nonclassical HLA restriction. *J Immunol* 2000; 165:925-30.
- (42) Sehgal VN, Grupta RP, Karmakar S, Logan KB, Jain S. In situ characterization of lymphocytic immunophenotypes and interleukin-2 receptors in cutaneous tuberculosis an leprosy- a comparative evaluation. *Clin Exp Dermatol* 19, 312-6 1994.
- (43) Sehgal VN, Grupta RP, Bose M, Saha K. Immunohistopathological spectrum in cutaneous tuberculosis. *Clin Exp Dermatol* 18, 309-13. 1993.
- (44) Maldonado BC. Tuberculosis cutánea: la biología molecular en la etiología de las tuberculides. Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico, 1998.
- (45) Tan SH, Tan BH, Goh CL, Tan KC, Tan MF, Ng WC et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA using polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis and tuberculids. *Int J Dermatol* 1999, 38 122-7.
- (46) Arora SK, Kumar B, Shegal. Development of a polymerase chain reaction dot-blotting system for detecting cutaneous tuberculosis. *Br J Dermatol* 2000; 142:72-6.
- (47) Margall N, Baselga E, Coll P, Barnadas M, Moragas JM, Prats G. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA by the polymerase chain reaction for rapid diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Br J Dermatol* 1996; 135:231-6
- (48) Sandra Bajaña Miranda. Papel de las células dendríticas en la lepra murina. CINVESTAV, IPN, 2002
- (49) Schwander SK, Torres M, Sada E, Carranza C, Ramos E, Tary-Lehmann M. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1998; 178:1434-1445.
- (50) Wagh SA, Bhattacharya M, Sharma VK. Peripheral T lymphocytes and their subsets in cutaneous tuberculosis. *In J Dermatology* 1992, 31:110-2.
- (51) Udey MC. Cadherins and Langerhans cell immunobiology. *Clin Exp Immunol* 1997; 107 Suppl



1:6-8.

- (52) Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol* 25, 413-8. 2000.
- (53) Wang B, Zhuang L, Fujisawa H. Enhanced epidermal Langerhans cells migration in IL-10 knockout mice. *Immunology* 1999; 102:255-62.
- (54) Saúl A. La piel. In: Saúl A PJ, editor. *Lecciones de dermatología*. México, DF: Méndez editores, 1993: 1-28.
- (55) Ebling FJ, Eady RA, Liegh IM. Organization and kinetics of the epidermis. In: Champion RH, Borton JL, Ebling FL, editor. *Textbook of dermatology*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1992. 61-84.
- (56) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Anatomía funcional de las respuestas inmunitarias. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. *Inmunología celular y molecular*. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill, 1999: 254-274.
- (57) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Lesión tisular y enfermedad mediada por mecanismos inmunitarios. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors. *Inmunología celular y molecular*. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill, 1999: 474-491.
- (58) Hunyadi J, Miklós S, Kenderessy A, Dobazy A. Expression of monocyte/macrophage markers (CD13, CD14, CD18) on human keratinocytes in healthy and diseased skin. *J Dermatol* 1993; 20:341-345.
- (59) Lever WF. Histología de la piel. In: Lever WF, Schamburg-Lever G, editors. *Histopatología de la piel*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica, 1991: 11-41.
- (60) Hernández-Pando, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89:26-33.
- (61) Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sielg PA, Rea TM, Modlin RL. Patterns of cytokine production by Mycobacterium-reactive human T cell clones. *Infect Immun* 1993, 61:197-203.
- (62) Lewinsohn DM, Zhu L, Madison VJ, Dillon DC, Fling SP, Reed SG et al. Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from mycobacterium tuberculosis - infected cells: definition of antigenic specificity. *J Immunol* 2001; 166:439-46.
- (63) Giuliani A, Prete SP, Graciani G, Aquino A, Balduzzi A, Sugita M et al. Influence of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin on in vitro induction of CD1 molecules in human adherent mononuclear cells. *Infect Immun* 2001; 69:7461-7470.
- (64) Editorials. Mechanisms of cutaneous inflammation interactions between epidermal cytokines, adhesion molecules and leukocytes. *Arch Dermatol* 1989; 125:1406-12.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN