

1991 - B

COD. No. 084786756

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



CUC



DETERMINACION DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 4 (IL - 4 )  
EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LINFOCITOS T Y EN  
SUEROS DE PACIENTES CON LEPROMATOSA.

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROSARIO HUIZAR LOPEZ

GUADALAJARA, JAL.,

1994

14562/019001  
B394  
69-7



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**

Expediente.....

Número .....

Sección .....

**C. MARIA DEL ROSARIO HUIZAR LOPEZ**

**P R E S E N T E . -**

Manifetamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "DETERMINACION DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 4 (IL-4) EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LINFOCITOS T ACTIVADOS Y EN SUEROS DE PACIENTES CON LEPROA LEPROMATOSA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Alfonso Islas Rodríguez.

**A T E N T A M E N T E**

**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas Zapopan, Jal. 13 de Enero de 1994

**EL DIRECTOR**

**DR. EULOCIO PIMIENTA BARRIOS**



**FACULTAD DE  
 CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EL SECRETARIO**

**M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ**

c.c.p.- M. en C. Alfonso Islas Rodríguez, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

Al contestar este oficio cítese fecha y número

C. Dr. Bulogio Pimienta Barrios.

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) Pasante Ma. Del Rosario Huizar López código número 34786756 con el título Determinación de los niveles de interleucina 4 (IL-4) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activados y en sueros de pacientes con Lepra Lepromatosa. consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 4 de Enero 1994

EL DIRECTOR DE TESIS



SINDDALES

1. M. en C. Carlos Alvarez Moya

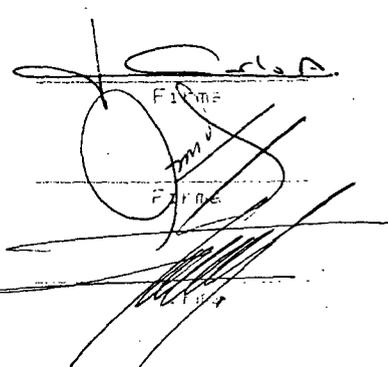
Nombre completo

2. Q.F.B. Rosa María Domínguez Arias

Nombre completo

3. Dr. Eduardo Vazquez Valls

Nombre completo



Esta tesis fué realizada en el Instituto  
Dermatologico de Guadalajara / Centro de  
Investigación en Inmunología y Dermatología.

1

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE  
INTERLEUCINA 4 (IL-4) EN  
SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE  
LINFOCITOS T Y EN SUEROS DE  
PACIENTES CON LEPROA  
LEPROMATOSA.

## DEDICATORIAS

A mis padres J. Jesús Huizar y Ma. del Pilar López por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles, por su esfuerzo, confianza y apoyo incondicional, espero no haberlos defraudado.

A todos mis hermanos por su apoyo que siempre me han brindado.

A Dios por haberme dado la fortaleza necesaria para lograr mi objetivo.

CUCBA



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy especialmente a mi director de tesis M. en C. Alfonso Enrique Islas Rodríguez por su valioso apoyo y dedicación para la realización de este trabajo.

Agradezco también a M. en C. Fernando Alfaro Bustamante a la M. en C. Mary Fafutis Morris y a la Q.F.B. Cecilia Magdalena Guillen Vargas, por su valiosa cooperación.

A todos y a cada uno de mis amigos del CIINDE que de alguna manera contribuyeron a la elaboración de esta tesis.

## I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
I.1 Epidemiologia de la Lepra	1
I.2 Agente causal	2
I.3 Aspectos clinicos	3
I.4 Respuesta inmune	5
I.5 La Lepra y la respuesta inmune	8
II. JUSTIFICACION	9
III. HIPOTESIS	10
IV. OBJETIVO GENERAL	11
V. OBJETIVOS PARTICULARES	12
VI. MATERIAL Y METODOS	13
VII. RESULTADOS	17
VIII. DISCUSION	19
IX. BIBLIOGRAFIA	21

# INTRODUCCION

## I. INTRODUCCION

### I.I. Epidemiología de la Lepra.

La enfermedad de Hansen (Lepra) es una infección crónica causada por Mycobacterium leprae. Se ha estimado que el número total de enfermos con Lepra en el mundo es de 12 millones, encontrándose la mayoría de los casos en países de Africa y Asia (1,2). En América se presenta ésta enfermedad desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, excepto Chile. En México se piensa que puedan existir entre 50 y 100 mil pacientes, aunque solo se encuentran registrados de 15 a 20 mil. Existen casos reportados en todo el país, sin embargo predominan 3 regiones con un índice mayor de casos reportados: la principal es la centro-occidental, que comprende Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Guerrero, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, Durango, Querétaro, Estado de México y Distrito Federal. La región peninsular incluye Yucatán y Campeche; y la nororiental formada por Nuevo León y Tamaulipas (3). El estado de Jalisco tiene el primer lugar en el país con el mas alto número absoluto de casos (3193 casos registrados). En 1991 Jalisco presentó una prevalencia de 0.48 x 1000, lo cual lo sitúa en el 5o lugar después de Sinaloa, Colima, Nayarit y Guanajuato (4). En general se considera al país como de mediana endemia, con una prevalencia de menos de 0.5 x 1000 (3).

La Lepra se presenta en regiones tropicales y semitropicales, especialmente en países subdesarrollados, aunque la prevalencia de la enfermedad varía marcadamente de un país a otro (5).

La enfermedad se expresa predominantemente en humanos, pero se ha observado la infección natural en armadillos salvajes (Dasypus novemcinctus). Casos espontáneos de Lepra también se han descrito en dos monos mangabey (Cercocebus atys) además, experimentalmente se ha transmitido a monos rhesus (1,6,7).

#### I.2. Agente causal.

Mycobacterium Leprae: es un bacilo alcohol ácido-resistente, parásito obligado intracelular que se multiplica en fagocitos mononucleares, piel, mucosas y células de Schwann. Tiene preferencia por temperaturas ligeramente por debajo de los 37°C (35°C) (1,8). El mayor impedimento para el estudio de M. leprae radica en la incapacidad de cultivar la bacteria in vitro. El bacilo tiene que cultivarse in vivo en tejidos de ratas, cojinetes plantares de ratones y en armadillos infectados experimentalmente. También crece en nódulos de la piel de humanos con la enfermedad (1,8).

Se clasifica como micobacteria en base a los constituyentes de su pared celular, como son: ácido micólico, arabinogalactano y glicolípido fenólico.

Posee características propias que la distinguen de otras micobacterias como la presencia del aminoácido glicina en lugar de L-alanina en el peptidoglicano de su pared celular, esta sustitución puede estar asociada con la patogenicidad (por su resistencia a la desecación). Unido covalentemente al peptidoglicano se encuentra el complejo ácido arabinogalactanmicólico, el cual constituye el 70% de la masa de la pared celular (1). La molécula glucolipídica más notable de la pared celular de M. leprae es el glucolipídico fenólico (PGL-I), que ha resultado ser un buen inmunógeno. Otra molécula de esta familia es la lipoarabinomanana B (LAM-B), que también es altamente inmunogénica, y por lo tanto provoca una fuerte respuesta de anticuerpos humorales.

### **I.3. Aspectos clínicos.**

La Lepra afecta predominantemente la piel, nervios periféricos y mucosas. La transmisión es de persona a persona y hay evidencias de que puede ocurrir por inhalación y depósito del bacilo dentro de la mucosa nasal intacta o a través de heridas producidas por picaduras y mordeduras de artrópodos (1).

Las manifestaciones de la Lepra están relacionadas con la respuesta inmune del individuo: la Lepra indeterminada normalmente se cura espontáneamente, y sólo en algunos casos progresa hacia unos de los polos extremos de la enfermedad:

la Lepra Tuberculoide (LT) o Lepra Lepromatosa (LL) (9).

En la LT, los pacientes tienen una buena Respuesta Inmune Celular (RIC). hay pocos bacilos alcohol ácido-resistentes detectables en tejidos y secreciones, los cuales producen pocos anticuerpos circulantes. En la LL La RIC a los antígenos de M. leprae se encuentra suprimida, poseen altos títulos de anticuerpos circulando y gran cantidad de bacilos en sus secreciones (1,8,9). Debido a la naturaleza intracelular de M. leprae los anticuerpos humorales no son importantes en la resistencia a la micobacteria, pero participan en la patogénesis de las reacciones del eritema nodoso leproso (1). Los pacientes con Lepra tienden a desarrollar distintas reacciones o "Estados reactivos", que se caracterizan por una respuesta de su sistema inmune que curiosamente, perjudica a sus propios tejidos. Existen basicamente 2 tipos: 1. reacción reversa que afecta a pacientes con LT, se caracteriza por edemas y eritemas preexistentes, las manifestaciones cutáneas son alarmantes, pero es raro que generen lesiones permanentes, en cambio pueden quedar gravemente perjudicadas las fibras nerviosas, por lo que esta clase de reacción es una de las principales causas de incapacidad y deformidad en el paciente con Lepra.

2. eritema nodoso leproso. se presenta en pacientes con LL, debido a una combinación de antígenos de M. leprae y anticuerpos, formando inmunocomplejos provocando daños a sus propios tejidos, produciendo nódulos con dolor continuo sobre la piel de brazos, piernas, tronco y cara, además de fiebre, pérdida de peso, dolor en articulaciones, pudiendo afectar ojos, mucosa nasal y producir complicaciones renales (1,2).

#### I.4. Respuesta inmune.

En condiciones normales las células accesorias (macrófagos o monocitos) producen interleucina 1 (IL-1) antes conocida como factor activador de linfocitos, cofactor de la producción de interleucina IL-2 (IL-2) en las células T estimuladas por antígenos específicos in vivo o in vitro por lectinas como la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina (Con A) (10). La RIC mediada por los linfocitos T, requieren de la interacción de la IL-2 con su receptor para su adecuada proliferación. Mossman y Coffman, desde 1986, reportaron en líneas celulares murinas, dos tipos de células T cooperadoras CD4+ basándose principalmente en el tipo de linfocinas secretadas. Estos subconjuntos de células T CD4+ murinas clonadas y no clonadas se denominaron TH1 y TH2. La primera característica encontrada en las células CD4+TH2, fue su especial producción de IL-4 y su cooperación con linfocitos B para la síntesis de anticuerpos.

Posteriormente se encontró que producían también interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), mientras que la subpoblación CD4+TH1 se caracterizaba por producir IL-2 e IFN-gamma y su función se correlacionaba con la respuesta inflamatoria, la cooperación a fenómenos como la lisis y la hipersensibilidad retardada, requeridos para una inmunidad efectiva contra patógenos intracelulares (11). Se ha observado una regulación cruzada entre estas dos subpoblaciones: las células TH2 por medio de la IL-10 y probablemente la IL-4 inhiben la proliferación de células TH1, las que a su vez por medio del IFN-gamma inhiben la proliferación de TH2 (12, 13). La IL-2 es una glicoproteína de 15.5 KD producida por células T, células asesinas naturales (NK) y linfocitos granulares (LGLs), actúa como un factor de crecimiento y diferenciación autocrino de células T, además induce la proliferación de células B y NK, puede activar macrófagos y oligodendrocitos (12). La Respuesta Inmune Humoral (RIH), mediada por los linfocitos B requieren de la interacción de la interleucina 4 (IL-4) con su receptor para su adecuada proliferación. La IL-4 fue descrita en 1982 por William Paul y col. (14). Los genes que codifican para la producción de IL-4 junto con varias citocinas como la IL-3 y la IL-5 se encuentran en el cromosoma humano número 5 (10, 12, 13).

Al principio fué llamada factor estimulador de células B (BSF-1). Se trata de una glicoproteína de 20 KD producida principalmente por células TH2 y algunos mastocitos, fué inicialmente descubierta como un coestimulador en la proliferación de células B tratadas con anticuerpos anti IgM, juega un papel muy importante en la producción de Inmunoglobulinas especialmente el isotipo IgG<sub>1</sub> y en mayores concentraciones la IgE. Al mismo tiempo suprime la IgM y algunos isotipos de IgG en células B murinas estimuladas con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (12, 13, 15).

En estudios con células B humanas se ha encontrado que la IL-4 es un regulador crítico en la producción de IgE y de IgG, y en combinación con esteres de forbol o anticuerpos CD40 inducen la producción específica de IgG4 así como de la IgE (13). Además la IL-4 regula la función de otros tipos de células dentro de la línea hematopoyética: actúa de manera autócrina sobre células T, en macrófagos estimula la expresión de CD23 y antígenos de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (efectos similares en células B). induce la estimulación de citotoxicidad en macrófagos de médula ósea y suprime la producción de IL-1 estimulados por LPS.

Se ha demostrado su actividad sobre granulocitos, mastocitos, precursores de eritrocitos y megacariocitos (12, 13).

La IL-4 también inhibe la producción de superóxido en fagocitos mononucleares humanos. esto implica un papel importante de esta citocina en la regulación de la respuesta antiinflamatoria y antimicrobiana (16). El receptor de IL-4 (140 KD) se presenta en distintos tipos celulares, incluyendo células B (200 a 500 por célula). T y otras líneas de células hematopoyéticas . }

#### I.5. La Lepra y la Respuesta Inmune.

La mayoría de las personas resisten la infección a M. leprae aún en áreas altamente endémicas. se piensa que de 200 individuos que llegan a infectarse solo un caso se desarrolla y detecta. Como se ha mencionado anteriormente los pacientes con LL muestran un estado de depresión en su RIC por lo que son incapaces de responder a los antígenos de M. leprae. En estudios publicados por nuestro grupo y por otros autores se ha demostrado que efectivamente en dichos pacientes se encuentran concentraciones disminuídas de linfocitos T cooperadores y un incremento en los linfocitos T supresores (17, 18) y que este transtorno es debido a la subproducción de IL-2 que causa que las células T no proliferen adecuadamente (19).

Se ha demostrado que al adicionar IL-2 exógena a los cultivos de linfocitos T de pacientes con LL, estos recuperan la capacidad de proliferación. aclarandose con estos experimentos que las células T de los pacientes LL no producen niveles suficientes de IL-2 pero si poseen receptores para IL-2 (19, 20).

## JUSTIFICACION

## II. JUSTIFICACION

Debido a que los pacientes LL cursan con inmunodeficiencia, que incluye la baja proliferación de sus linfocitos T ante estímulos antigénicos y mitogénicos, baja producción de IL-2, baja producción de IFN-gamma (21) así como una relativa alta concentración de anticuerpos (1) se puede pensar que las subpoblaciones TH1 y TH2 participan de manera importante en la patogenia de la LL. La subpoblación TH1 estaría produciendo bajos niveles de IL-2 e IFN-gamma y la subpoblación TH2 estaría propiciando que los linfocitos B produjeran altos niveles de anticuerpos observados en la LL.

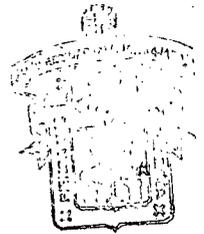
En este trabajo se determinarían los niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activados así como en el suero, provenientes de pacientes LL, para deducir en principio si la propuesta arriba descrita basada en el esquema de Mosmann y Coffman es correcta para la lepra.

HIPOTESIS

### III. HIPOTESIS

Los pacientes con Lepra Lepromatosa poseen niveles elevados de IL-4 producidos por la subpoblación de linfocitos TH2.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

OBJETIVOS

#### IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activados así como en suero de pacientes con Lepra Lepromatosa.

## V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar si los niveles de IL-4 tienen relación causa-efecto en el eritema nodoso leproso.
- 2.- Analizar preliminarmente si los niveles de IL-4 son la causa de una posible desregulación de las subpoblaciones TH1 y TH2.

## MATERIAL Y METODOS

## VI. MATERIAL Y METODOS

### SUJETOS DE ESTUDIO

Se formaron tres grupos de estudio. El primero consistió en 25 pacientes con Lepra Lepromatosa, diagnosticados en base a la clasificación de Ridley y Jopling (9) en el Instituto Dermatológico de Guadalajara, a 8 de ellos se les realizó cultivo de linfocitos y al resto se les obtuvo suero.

El segundo grupo consistió en 6 individuos sanos sin ninguna relación con el paciente, apareados en sexo y edad ( $\pm$  5 años).

El tercer grupo lo formaron 4 individuos contactos (familiares) de pacientes LL.

### OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES

La sangre periférica heparinizada (20 UI/ml) fué obtenida de los sujetos por punción venosa. La sangre se separó por gradientes de densidad según la técnica de Böyum (22) en Lymphoprep (Nycomed). Se separó el anillo rico en células mononucleares y se lavaron con solución salina balanceada de Hank's (HBSS), se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Chemical, Co., St Louis MO) suplementado con suero fetal de ternera 10% inactivado, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Se ajustaron las células a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml (20).

## ENSAYO DE LINFOPROLIFERACION

Se colocaron  $2 \times 10^5$  células en cada pozo de una caja de cultivo de 96 pozos y se les adicionó por sextuplicado: medio RPMI 1640 suplementado (no estimuladas), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fitohemaglutinina (PHA) (estimuladas), se dejaron incubar las células 48 hrs. a  $37^\circ\text{C}$  en una atmosfera húmeda con 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ . Al término de este tiempo se obtuvo el sobrenadante de 3 pozos de cada condición, los cuales se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis, y como indicador de actividad mitogénica se les adicionó a los pozos restantes un pulso de timidina tritiada (1  $\mu\text{Ci}$ ) y a las 24 hrs. se cosecharon para medir la incorporación de timidina tritiada en un contador de centelleo beta (Packard) (20).

## OBTENCION DE SUERO

La sangre periférica obtenida por puncion venosa, se centrifugó a 1 500 RPM durante 15 min., se obtuvo el suero y se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

## CUANTIFICACION DE IL-4 POR ELISA

La placa de ELISA (Inter test-4<sup>™</sup> Human IL-4 ELISA kit Genzyme) se cubrió con 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo monoclonal anti-IL-4 humana a  $4^\circ\text{C}$  por 96 hrs.

para constituir la fase sólida, se lavó 3 veces con buffer de fosfatos (PBS) tween 20 al 1% y Albumina pH 6.75. posteriormente se colocaron por duplicado 100  $\mu$ l de sobrenadante de cultivos así como los sueros de los pacientes LL y controles, con la finalidad de capturar la IL-4 presente, se incubó 2 hrs. a temperatura ambiente, se lavó la placa con PBS se adicionó enseguida 100  $\mu$ l de un segundo anticuerpo policlonal anti-IL-4 humana hecho en conejo, incubándose 2 hrs. a temperatura ambiente, se lavó nuevamente con PBS. Los complejos inmunes (anticuerpo monoclonal anti-IL-4 -IL-4 humana - anticuerpo policlonal anti-IL-4) se incubaron con 100  $\mu$ l de anti-inmunoglobulina G de conejo hecha en cabra, marcada con biotina (reactivo amplificador) incubándose 45 min. a temperatura ambiente, se lavó con PBS, enseguida se colocó 100  $\mu$ l de streptavidina conjugada con peroxidasa durante 40 min. que se unió al complejo marcado con biotina, se lavó y por último se colocaron 100  $\mu$ l del sustrato que contiene peróxido de hidrógeno y el cromógeno ortofenilendiamina (OPD), para el desarrollo de color, esperando 10 min. aprox., enseguida se detuvo la reacción agregando a cada pozo 100  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  1M. Posteriormente se leyó en un lector de ELISA (Behring) a 492 nm (14).

#### CURVA ESTANDAR DE IL-4

Para determinar la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los cultivos y sueros, sus lecturas de absorbancia se compararon con las obtenidas en una curva estándar, que se realizó utilizando concentraciones conocidas IL-4, por diluciones seriadas de 3 a 0.045 ng/ml (14).

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por la prueba T de Student con el objeto de determinar diferencias significativas entre los diferentes grupos.

## RESULTADOS

## VII. RESULTADOS

En la tabla 1-A se puede observar que los promedios ( $\bar{X}$ ) de los niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activados de sujetos sanos, no fueron significativamente más elevados ( $\bar{X}= 0.30\pm 0.044$  ng/ml) que los promedios de los niveles de IL-4 de los sobrenadantes de los mismos linfocitos pero incubados con medio solamente ( $\bar{X}= 0.21\pm 0.058$  ng/ml). De una manera semejante, la tabla 1-B muestra también que cuando se midieron los niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos activados de sujetos contactos comparado con la IL-4 presente en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos con medio, no fueron significativamente diferentes:  $\bar{X}= 0.36\pm 0.013$  ng/ml VS  $\bar{X}= 0.34\pm 0.008$  ng/ml. Por último, la IL-4 presente en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos activados de pacientes LL ( $\bar{X}= 0.34\pm 0.039$  ng/ml) comparados con los sobrenadantes de cultivos de linfocitos con medio solamente ( $\bar{X}= 0.29\pm 0.040$  ng/ml) no hubo diferencias significativas (Tabla 1-C). Cuando se analizaron los niveles promedio de IL-4 en el suero de pacientes LL ( $0.30\pm 0.015$  ng/ml) comparados con los niveles de IL-4 presente en el suero de sujetos normales ( $0.37\pm 0.010$  ng/ml) no se observó diferencia significativa. (Tabla 2).

En la tabla 3 se puede observar que el análisis estadístico de t de Student no reveló diferencias significativas cuando se compararon los promedios de los niveles de IL-4 en los

sobrenadantes de linfocitos T activados y no activados entre todos los grupos arriba mencionados, excepto cuando se compararon los promedios de los niveles de IL-4 en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos no activados de sujetos sanos ( $\bar{X}=0.21 \pm 0.058$  ng/ml) comparados con los niveles de IL-4 de linfocitos no activados de contactos ( $\bar{X}=0.34 \pm 0.008$  ng/ml).

En la Fig. 1 se muestran los resultados (mencionados arriba en la tabla 1) en barras comparando la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T activados y no activados de los diferentes grupos de estudio.



**TABLA 2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE IL-4 EN SUERO DE PACIENTES LL**

<u>PACIENTES</u>		<u>NORMALES</u>	
(ng/ml)			
1	0.37±0.003	10	0.22±0.025
2	0.40±0.010	11	0.30±0.010
3	0.37±0.020	12	0.24±0.025
4	0.28±0.015	13	0.26±0.010
5	0.28±0.000	14	0.27±0.005
6	0.40±0.005	15	0.41±0.010
7	0.30±0.015	16	0.28±0.005
8	0.22±0.025	17	0.24±0.075
9	0.30±0.010		
			$\bar{X} = 0.37 \pm 0.010$
			$\bar{X} = 0.30 \pm 0.015$
			p N.S.

**TABLA 3. ANALISIS ESTADISTICO ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS, DE LOS NIVELES DE IL-4 (ng/ml) EN LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS T ACTIVADOS Y NO ACTIVADOS.**

---

**NO ACTIVADOS**

SANOS $\bar{X} = 0.21$	<b>VS</b>	PAC. $\bar{X} = 0.29$	<b>p N.S.</b>
SANOS $\bar{X} = 0.21$	<b>VS</b>	CON. $\bar{X} = 0.34$	<b>p &lt; 0.05</b>
CON. $\bar{X} = 0.34$	<b>VS</b>	PAC. $\bar{X} = 0.29$	<b>p N.S.</b>

**ACTIVADOS**

SANOS $\bar{X} = 0.30$	<b>VS</b>	PAC. $\bar{X} = 0.34$	<b>p N.S.</b>
SANOS $\bar{X} = 0.30$	<b>VS</b>	CON. $\bar{X} = 0.36$	<b>p N.S.</b>
CON. $\bar{X} = 0.36$	<b>VS</b>	PAC. $\bar{X} = 0.34$	<b>p N.S.</b>

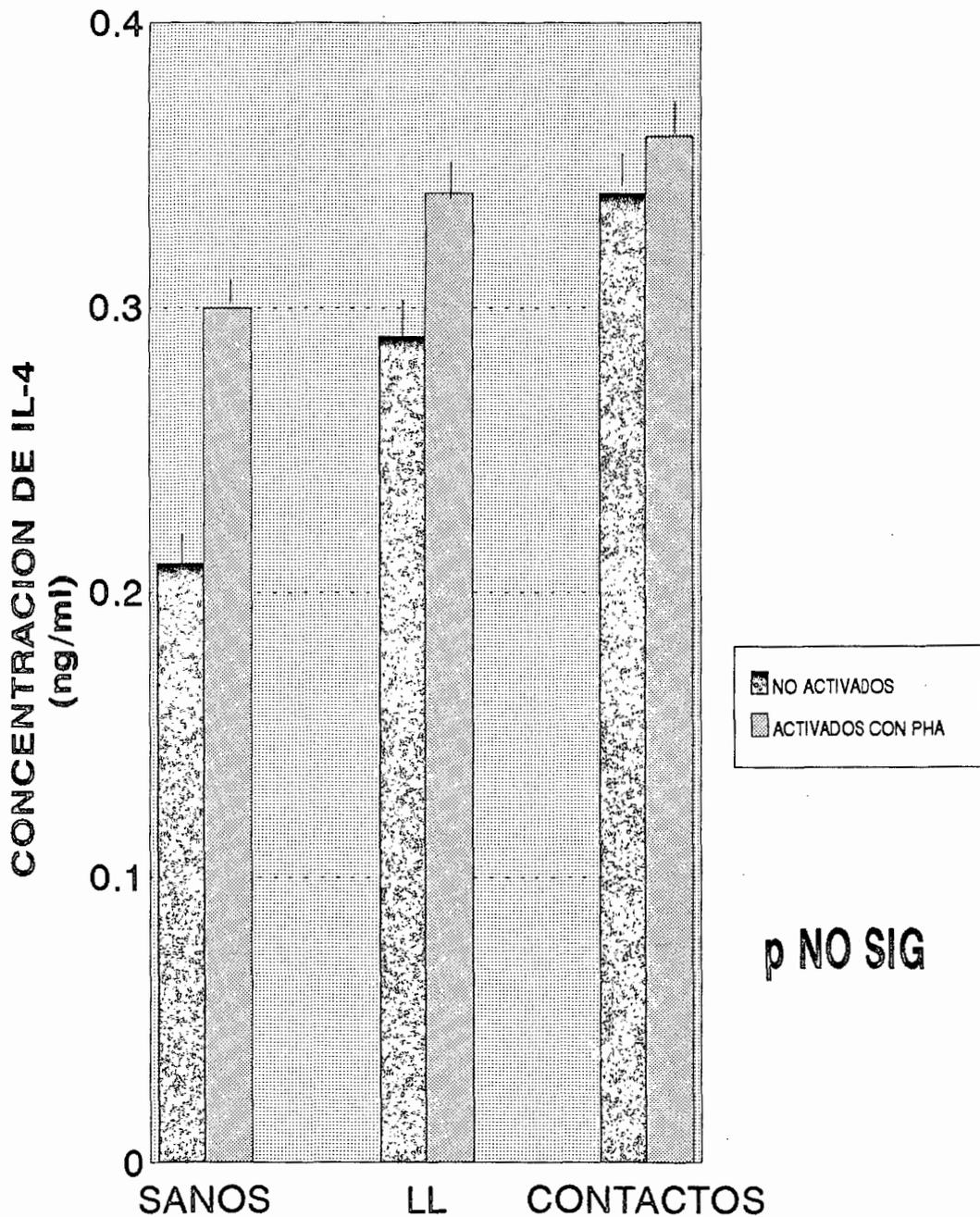


FIG 1. CONCENTRACION DE IL-4 EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LINFOCITOS T.

CUCBA



BIBLIOTECA GENERAL

DISCUSSION

## VIII. DISCUSION

La intención de realizar este estudio, fué desde el principio, obtener datos que apoyaran la existencia de las subpoblaciones TH1 y TH2 en pacientes LL. Desde 1991 el grupo de Bloom (Salgame y Yamamura) habian publicado sus resultados en este sentido apoyando con sus datos (que mostraban elevación de la IL-4) la existencia de las dos subpoblaciones mencionadas, sin embargo ellos trabajaron con clonas y líneas de linfocitos T así como con biopsias de las lesiones de pacientes con LL ( 23, 24). En este estudio se utilizaron linfocitos de sangre periférica, más accesibles para nosotros. Por otro lado consideramos que la investigación no se debe limitar a un compartimiento biológico u otro, sino que resulta de interés estudiar y saber que está pasando con los linfocitos de sangre periférica y así lo hicimos. No obstante que los datos reportados aquí son preliminares, podemos observar que la funcionalidad de las células TH1 y TH2 de sangre periférica de pacientes con lepra lepromatosa está cuestionada. Los resultados indican que los niveles de IL-4 en los sobrenadantes de cultivos de células T activadas aislados de pacientes LL no fueron como se esperaba significativamente más altos (Tabla 1, 3). Lo mismo sucedió cuando se midió la IL-4 en el suero de los mismos pacientes (Tabla 2).

Por supuesto hay que aumentar la muestra, pero si los resultados se confirman, se podrían invocar otros mecanismos de supresión diferentes a los sugeridos por Mosmann y Coffman (11), tales como el propuesto recientemente por Ottenhoff (25) en el sentido de que no debe aún descartarse la posibilidad de que las células CD8+, puedan ejercer supresión, ya que en ese trabajo se reporta que por medio del anticuerpo anti IL-4, no fue posible inhibir la actividad de clonas T supresoras, aisladas de pacientes LL. Para resolver esta pregunta son necesarios más estudios.

c

## BIBLIOGRAFIA

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hastings, R.C., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L. and Franzblau, S.G. Leprosy. Clin. Microbiology Reviews I (1988) 330-348.
- 2.- Mc Dougall A.C. y Yawalkar S.J., La lepra información básica y tratamiento, Edit. CIBA-GEIGY, (1989) 42-60.
- 3.- Saul, A. Lecciones de Dermatología. Cap. II, Edit. F. Méndez Cervantes (1986) 321 y 322.
- 4.- Manual de procedimientos operativos para el control de la Lepra. Dirección general de medicina preventiva. Secretaría de Salud. México, D.F. (1991).
- 5.- Braude A.F. Enfermedades Infecciosas, Edit. Médica Panamericana, Argentina, Buenos Aires (1988) 650-661.
- 6.- Walsh, G.P., Storrs, E.E., and Burchfield, H.P. Leprosy like disease occurring naturally in armadillos. Res. J. Reticuloendothel. Soc. 18 (1985) 347-351.
- 7.- Walsh, G., Meyers, W. and Binford C. Naturallyacquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience. J. Leprosy Biol. 40 (1986) 645-656.
- 8.- Clark-Curtiss, J.E. Benefits of recombinan DNA technology for the study of Mycobaterium leprae. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 138 (1988) 61-79.
- 9.- Ridley, D.S. and Jopling, W.H. Classification of leprosy according to immunity a five-group system. Int. Lepr. 34 (1966) 255-273.
- 10.- Meager, A. Cytokines Edit. Open University Press, Cap. 1 Great Britain (1990) 115-125.

- 11.- Mosmann, T. R., Cherwinski, M. W., Giedlin M. A. and Coffman R. L. Two types of murine t cell clone. I. Definition according to profiles of cytokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136 (1986) 2348.
- 12.- Male, D. Champion, B. Cooke A. Owen M. *Advanced Immunology*, Edit. Gower Medical Publishing Ltd. Cap. 1 Cytokines, England (1991). 11.5-11.7.
- 13.- Isakson, P. *Advances in Neuroimmunology*. Vol. 2 Interleukin-4 Edit. Pergamon press Ltd. Great Britain (1992) 55-65.
- 14.- Human IL-4 ELISA Test Kit, InterTest-4. Genzyme Corporation, catalog number IT-4. (1991) 1-27.
- 15.- Hu-Li, J. Shevach E. M. B cell stimulatory factor 1 (interleukin-4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165 (1987) 157-172.
- 16.- Stuart L. A. and Galin, J. I. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 144 (1990) 625-630.
- 17.- Bloom, B.R. and Mehra, V. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol. Rev.* 80 (1984) 5-28.
- 18.- Castellanos, C., Islas, A. E., González, A., Zambrano, S. and Ortiz-Ortiz, L. Lepromatous leprosy: Study of some subpopulation of lymphocytes and its functional analysis. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* 16 (1985) 217-224.
- 19.- Islas, R.A., Morales, O. R., Fafutis M. M., González M A., and Ortiz, O. L. Deficiency in the biosynthesis of interleukin-2 and functional presence of the IL-2 receptor in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* 55 (1987) 566-569.

- 20.- Fafutis, M.M., Mejia, S. A., González M. A. Detection of interleukin-2 Receptor (IL-2R) by indirect immunofluorescence with Anti- Tac monoclonal antibody on the surface of T lymphocytes from patients with lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* 58 (1990) 126-128.
- 21.- Nogueira, N., Kaplan, G., Levy, E., Sarno, E.N., Kushner, P., Granelli-Piperno, A., Vierira, L. Colomer Gould, V., Levis, W., Steinman, R., Yip, Y.K. and Cohn, Z.A. Defective gamma-interferon production in leprosy; reversal with antigen and interleukin 2. *J. Med.* 158 (1983) 2165-2170.
- 22.- Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *S Cand. J. Clin Lab. Invest.* 21 Suppl. 197 (1988) 77-85.
- 23.- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R.J., Weinberg, K., Rea, T.H., Bloom, B.R. and R.L. Modlin, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 254 (1991) 277-279.
- 24.- Salgame, P., Abrams, J.S., Clayberger, C., Goldstein H., Convit, J. Robert L., Modlin, Bloom, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 254 (1991) 279-281
- 25.- Mutis, T., Kraakman, E., Cornelisse Y., Haanen J. B., Spits H., De Vries R.R., and Ottenhoff T. M. Analysis of cytokine production by Mycobacterium-reactive T cells. *J. Immunol.* 150 (1993) 4641-4651.