

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**EFFECTO IN VITRO DE LA 4,4'- DIAMINODIFENILSULFONA (DDS)
SOBRE LA PROLIFERACION DE LOS LINFOCITOS T ACTIVADOS
CON FITOHEMAGLUTININA (PHA), DE PACIENTES CON
LEPRA LEPROMATOSA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

OMAR RENE VELAZQUEZ FLORES

ZAPOPAN, JALISCO. MARZO DE 1995

14865
B446
1003425
97



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....

Número

Sección

C. OMAR VELAZQUEZ FLORES

P R E S E N T E . -

Manifiestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "EFECTO in vitro DE LA DDS (4.4'-Diaminodifenilsulfona) SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS T-ACTIVADOS CON FITOHEMAGLUTININA (PHA), DE PACIENTES CON LEPROMATOSA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la Dra. Mary Fafutis Morris.

C.U.C.B.A.



**DIV. DE CS.
BIOLOGICAS Y
AMBIENTALES**

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. EULOGIO PIMENTEL BARRIOS

EL SECRETARIO

M. EN C. MA. GEORGINA GUZMAN GODINEZ

c.c.p.- Dra. Mary Fafutis Morris, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

Al contestar este oficio cite fecha y número

C. DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y AMBIENTALES.
CUCBA

PRESENTE:

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Ud., que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante C. Velázquez Flores Omar R. con código 086017105, con el título: Efecto in vitro de la 4,4'-Diaminodifenilsulfona (DDS) sobre la proliferación de los linfocitos T activados con Fitoemaglutinina (PHA), 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 haye lugar.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Nextipac, Zap., Jal.
20 de Febrero de 1995.

DIRECTORA DE TESIS

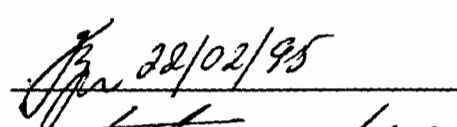
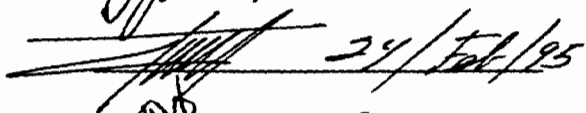
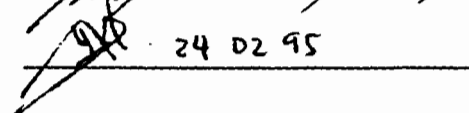

M. en C. MARY FAFUTIS MORRIS

SINODALES:

1. M. en C. GALINA PETROVNA Z.

2. DR. EDUARDO VAZQUEZ V.

3. DR. ALFONSO ISLAS R.

**EFECTO *IN VITRO* DE LA 4,4'-DIAMINODIFENILSULFONA
(DDS) SOBRE LA PROLIFERACION DE LOS LINFOCITOS T
ACTIVADOS CON FITOHEMAGLUTININA (PHA),
DE PACIENTES CON LEPROMATOSA**

A la memoria de mi hermano Víctor...

A mis padres por ser lo que soy.

A nuestra Universidad

*A mi directora de tesis M. en C. Mary Fafutis,
al Dr. y maestro Alfonso Islas,
compañeros y amigos del CIINDE.*

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La lepra lepromatosa es una enfermedad infecto-contagiosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*. esta enfermedad afecta principalmente a humanos y además también se ha demostrado la infección en forma natural de armadillos (*Dasypus novemcinctus*) y monos mangabey (*Cercocebus atys*) (1).

La lepra es propia de países tropicales, se ha visto con frecuencia relacionada con la pobreza, promiscuidad, falta de servicios sanitarios y desnutrición. Esta enfermedad constituye un problema de salud pública; se estima que en el mundo hay 15 millones de enfermos distribuidos en ciento cincuenta y cuatro países de los cinco continentes; en especial la India y el continente Africano (1). En Latinoamérica afecta a 33 países, predominantemente; Brasil, Argentina, México, Colombia, Costa Rica y Venezuela (2). En México la endemia es de tipo medio con prevalencia menor de 0.5 por cada 1000 habitantes, se han reportado treinta y dos mil enfermos, sin embargo las citas oficiales pueden estar subestimadas. En la República Mexicana predominan principalmente tres focos: el centrooccidental: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero; el peninsular: incluye a Yucatán y Campeche; el nororiental: Nuevo León y Tamaulipas (3). El estado de Jalisco tiene el primer lugar en el país con dos mil doscientos treinta y cuatro casos registrados hasta 1993 (4).

Se cree que la transmisión de la infección, en la mayoría de los casos, es por la inhalación de gotas nasales de personas infectadas, pero también puede ocurrir por el

depósito de bacilos en heridas producidas por piquetes de artrópodos (1). Los primeros síntomas de la enfermedad pueden manifestarse después de tres a diez años de haber adquirido la infección. Los signos generales de la infección son: lesiones, anestesia en la piel y engrosamiento de nervios periféricos (1.5).

Mycobacterium leprae

Mycobacterium leprae se encuentra dentro de la clase *Actinomycetales*, en el orden *Micobacteriales*, en la familia Micobacteriáceas y dentro del género *Mycobacterium* (6).

M.leprae, es un bacilo ácido-alcoholresistente que mide de 1 a 8 μ de largo por 0.3 μ de ancho, de forma rectilínea o curvada, no forma esporas y es anaerobio (6). Es un parásito intracelular obligado que vive en macrófagos, células de Schwann, piel y membranas mucosas, tiene preferencia por temperaturas inferiores a 37°C (1).

Se ha demostrado que la composición de la pared micobacteriana es rica en macromoléculas lipídicas y una estructura común en todas las micobacterias es el peptidoglicano. La pared de las micobacterias está constituida básicamente por 4 capas: la más interna, formada por el peptidoglicano (Mur) que confiere rigidez a la pared; la capa L3 inmediata al peptidoglicano está constituida principalmente por micolatos; la siguiente capa L2 que es inmediata a la L3, está constituida básicamente por el lipopolisacárido micolil-glucosa y el peptidoglicano, esta capa tiene una

apariencia más arrugada por el posible plegamiento del peptidoglicano. La capa L1 está formada por filamentos que están constituidos por un C-micósido. (7) Fig. 1. Cabe destacar que el glicolípido fenólico I (PGL-1) es el componente antigénico activo más notable, específico de especie y actúa como factor de virulencia. Este antígeno representa el 2% de la masa del bacilo. Está formado por un trisacárido (3'6-di-O-metilglucosa unido por alfa-1-4 a un 2'3-di-O-metilramnosa), se localiza en las paredes del bacilo, en los espacios vacuolares de los fagolisosomas y, ocasionalmente en el citoplasma y membrana celular de la bacteria (8).

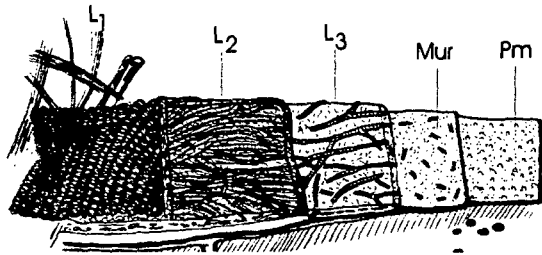


Figura 1

En *M. leprae* el peptidoglicano contiene una sustitución no usual del aminoácido glicina por el aminoácido L-alanina (9,10). esta sustitución puede permitir alguna ventaja en la patogenicidad, en cuanto a que el bacilo resiste a la degradación (1). El complejo ácido micólico-arabinogalactano está covalentemente unido al peptidoglicano

y constituye el 70% de la masa celular y forma una región externa muy importante del peptidoglicano que es anfipática. En *M. leprae* las largas cadenas de ácidos grasos forman dos grupos: los alfa-micoatos y los beta-micoatos, éstos pueden ser usados con propósitos taxonómicos para diferenciar a *M. leprae* de otras micobacterias (11,12).

INMUNOLOGIA DE LA LEPRO

La lepra es una enfermedad que puede manifestarse de diferentes formas que pueden atribuirse a la interacción de múltiples factores, de los cuales los inmunológicos parecen ser de los más importantes (13).

La clasificación más empleada para el diagnóstico de los pacientes con lepra es la de Ridley y Jopling (14), señalando que la lepra se desarrolla a lo largo de un espectro continuo cuyos límites extremos son estables y bien definidos: la TT (lepra tuberculoide) y la LL (lepra lepromatosa); además existen dos estadios intermedios: lepra limítrofe y lepra indeterminada.

Lepra indeterminada (LI). Se caracteriza principalmente por que el 75% de los pacientes sanan espontáneamente y el 25% restante permanecen indeterminados por largos períodos de tiempo y pueden progresar a uno de los extremos de la enfermedad, bien a lepra lepromatosa (LL) o a lepra tuberculoide (TT).

Lepra tuberculoide (TT). Esta es la forma localizada de la enfermedad, la imagen clínica de la lepra TT depende de la relación entre la proliferación del bacilo y la respuesta inmune del paciente. En los pacientes TT, su respuesta inmune celular (RIC) es semejante a la observada en individuos sanos. En la respuesta humoral, los niveles de anticuerpos frente a antígenos no relacionados a *M. leprae* se encuentran normales, mientras que los anticuerpos específicos anti-*M. leprae* están en concentraciones altas.

Lepra lepromatosa (LL). Es la forma anérgica más extendida de la enfermedad, con gran proliferación de bacilos que causan lesiones en la piel y ganglios, la RIC de estos pacientes está significativamente suprimida, esta inmunodeficiencia que caracteriza al paciente LL, se debe en parte a una baja proliferación de sus linfocitos T ante estímulos antigénicos y/o mitogénicos y una deficiente producción y/o liberación de interleucina-2 e interferón gamma. Además la respuesta humoral está inespecíficamente elevada.

Lepra limitrofe. Es el tipo de lepra comprendida entre los dos extremos polares LL y TT, es rara debido a su inestabilidad pudiendo un paciente con lepra limitrofe desarrollar clínica bacteriológica e histopatológicamente características pasajeras de tipo TT pero con el tiempo manifestarse como LL (1).

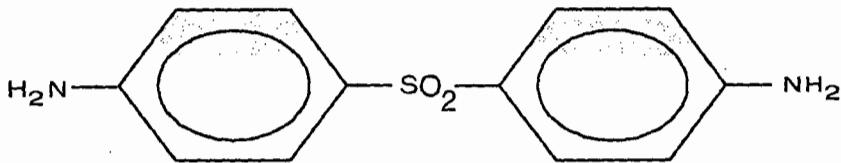
En condiciones normales los linfocitos T cooperadores, que se caracterizan por tener el marcador de membrana CD4, a través de receptores de superficie (RCT)

reconocen antígenos que previamente han sido procesados y presentados en asociación a moléculas clase II del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) por células presentadoras de antígeno (CPA). La interacción entre el linfocito T y la CPA estimula a que ésta produzca interleucina 1 (IL-1) que complementa la activación del linfocito T. Como resultado, este linfocito produce interleucina 2 (IL-2) que se libera e incrementa la expresión de receptores de membrana para esa citocina, de modo que se autoactiva, prolifera y se diferencia. La infección por *M. leprae* en pacientes LL, está relacionada con baja producción de IL-2 y de IFN-gamma, por lo que se presenta una falta de activación y proliferación de linfocitos T.

Nahid Mohaghehpour (15), ha clasificado en dos grupos a los pacientes LL de acuerdo a su respuesta ante estímulos antigénicos y/o mitogénicos: a) los pacientes respondedores donde su índice de estimulación es mayor de 5; b) los pacientes no respondedores con índice de estimulación menor que 5.

DAPSONA

La 4,4'-diaminodifenilsulfona también llamada dapsona o DDS, es el compuesto más utilizado de la familia de las sulfonas en el tratamiento de la lepra. El grupo funcional sulfa (SO_2) es necesario para la actividad bacteriostática de la dapsona pero también es responsable de su toxicidad (16,17) Fig. 2.

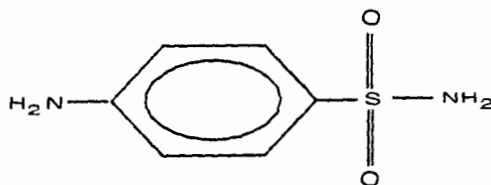


4-4'- Diaminodifenilsulfona

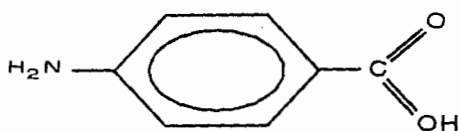
La dapsona representa actualmente una de las drogas más importantes en el tratamiento de la lepra. Este medicamento tiene un efecto antimetabólico durante la síntesis de folatos en las bacterias. El mecanismo de acción de las sulfonas es inhibir indirectamente la última etapa, o sea la formilación del 5'-fosforribosil-4-carboxamida-5-aminoimidazol.

Las sulfonas son análogos estructurales del ácido P-aminobenzoico, que es uno de los compuestos principales en la formación del ácido fólico Fig. 3.

La sulfona impide la incorporación del ácido P-aminobenzoico durante la biosíntesis del ácido fólico por inhibición competitiva (18).



Sulfanilamida



Ac. P-aminobenzoico

Existe una controversia respecto al uso de la DDS y su efecto sobre la RIC, Sengupta, Ghei y Beiguelman manifiestan que ésta inhibe *in vitro* la transformación blastoide y señalan por lo tanto que posiblemente afecta *in vivo* la RIC, ya sea bloqueando los receptores de membrana de los linfocitos T o compitiendo por un componente nuclear de éstos (17,19,20).

Por otra parte, el grupo de Anderson menciona que la DDS en concentraciones de 0.1 mM o menores no tienen ningún efecto sobre la transformación blastoide *in vitro* mientras que en concentraciones de 1 mM o mayores se observó una inhibición de $28.3 \pm 5.5\%$ en el promedio de tres experimentos (22). En base a los trabajos realizados por los grupos antes mencionados, no se tienen datos concluyentes sobre los efectos que tiene la DDS sobre la transformación blastoide en los pacientes LL.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

La DDS (4,4'-diaminodifenilsulfona) inhibe la proliferación de linfocitos T, de pacientes con lepra lepromatosa (LL) ante estímulo de PHA.

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos *in vitro* de la DDS sobre la proliferación de linfocitos T activados con PHA, de pacientes con lepra lepromatosa (LL).

OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVOS PARTICULARES

Realizar cultivos de linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa (LL) y de individuos sanos similares en edad y sexo.

Medir índices de estimulación de linfocitos T activados con mitógeno PHA mediante la incorporación de timidina tritiada (^3H).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

GRUPOS DE ESTUDIO

El primer grupo consistió en 17 pacientes con lepra lepromatosa (LL) diagnosticados de acuerdo a la clasificación internacional de Ridley y Jopling (14), provenientes del Instituto Dermatológico de Jalisco "José Barba Rubio".

El segundo grupo consistió en 17 individuos sanos, similares en sexo y edad (± 5 años) con los pacientes LL.

OBTENCION DE CELULAS

A partir de 10 ml de sangre periférica heparinizada, se obtuvieron células mononucleares mediante la separación por gradientes de concentración Lymphoprep (Nycomed)(21), se centrifugaron por 20 minutos a 1300 rpm, se obtuvo el anillo blanco formado por los linfocitos, se colectaron y se lavaron con solución salina Hank's 3 veces a 1500 rpm.

ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR

Las células se incubaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo); suplementado con suero fetal de ternera al 10%, en cajas de microcultivos de 96 pozos a una concentración de 2×10^5 células en 100 μ l de RPMI-1640 por pozo, por triplicado bajo las siguientes condiciones:

a) 2×10^5 células con 100 μ l de RPMI-1640 suplementado sin estímulo. b) 2×10^5 células con 100 μ l de RPMI-1640 suplementado y estimuladas con 100 μ l de PHA, (10 μ g/ml). c) 2×10^5 células con 100 μ l de RPMI-1640 suplementado más 10 μ l de DDS (200 μ g/ml). d) 2×10^5 células con RPMI-1640 suplementado estimuladas con 100 μ l de PHA (10 μ g/ml) más 10 μ l de DDS, (200 μ g/ml).

Las células se incubaron por 72 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de O₂ y 5% de CO₂. A las 48 horas se les aplicó un pulso de 1 μ Ci de timidina tritiada [³H]. Después de 24 horas las células se colectaron mediante un cosechador de células automático (Nunc Cell Harvester 8). La timidina incorporada por los linfocitos T se midió en un contador de radiaciones β -Beta (Minaxi β Tri-Carb 4000 Series) en cuentas por minuto (cpm). Los índices de estimulación se obtuvieron bajo la siguiente fórmula:

I.E. Índice de estimulación:

$$I.E. = \frac{\text{cpm cultivo de células estimuladas}}{\text{cpm cultivo de células no estimuladas}}$$

El índice de estimulación observado en sujetos sanos es mayor que 5.

Se aplicó la prueba T de student's para el análisis estadístico.

RESULTADOS

RESULTADOS

En la gráfica A se resumen los promedios obtenidos de la respuesta de los linfocitos T a PHA de individuos sanos I.E. $X= 25.13 \pm 5.12$ y de pacientes LL no respondedores NR $X= 4.76 \pm 0.68$, en esta gráfica se puede observar que existe una diferencia estadística significativa con una $P < 0.01$, cuando se compararon ambos grupos siendo menor la del grupo de LL NR.

En la gráfica B se muestra el promedio de los I.E. de los linfocitos T de pacientes LL NR, incubados sólo con PHA $X= 4.76 \pm 0.68$ y se comparó con el promedio obtenido del estímulo con la combinación DDS+PHA $X= 13.92 \pm 4.40$, se observa que la combinación incrementó significativamente los I.E. con una $P < 0.03$.

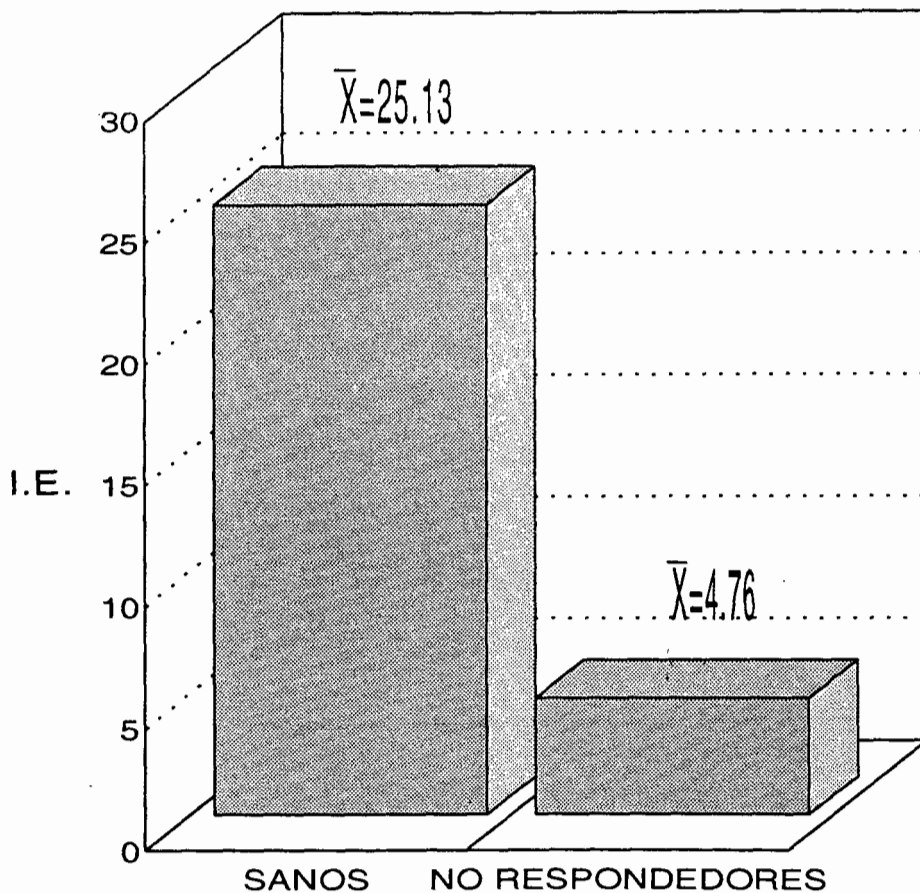
En la gráfica C se muestra la comparación entre los promedios de los I.E. de los linfocitos T de pacientes LL NR $X= 13.92 \pm 4.40$, contra los linfocitos T de sujetos sanos $X= 20.2 \pm 3.40$, estimulados con la combinación de DDS+PHA, donde se observó que no existe diferencia estadística significativa.

En la gráfica D se muestra el promedio de los I.E. de los linfocitos T de sujetos sanos, incubados sólo con PHA $X= 25.13 \pm 5.12$ y se compararon con los incubados con la combinación DDS+PHA $X= 20.2 \pm 3.40$, en esta gráfica se puede observar que no existe una diferencia estadística significativa de los I.E.

En la gráfica E se observa la comparación entre los promedios de los I.E. de los

linfocitos T de pacientes LL respondedores, incubados con PHA $X= 23.18 \pm 2.32$ y el promedio obtenido del estímulo con la combinación DDS+PHA $X= 25.41 \pm 5.39$, en esta gráfica se puede observar que en los I.E. bajo ambos estímulos no existe diferencia estadística significativa $P= NS$.

RESPUESTA DE LINFOCITOS T DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES LL NR A PHA

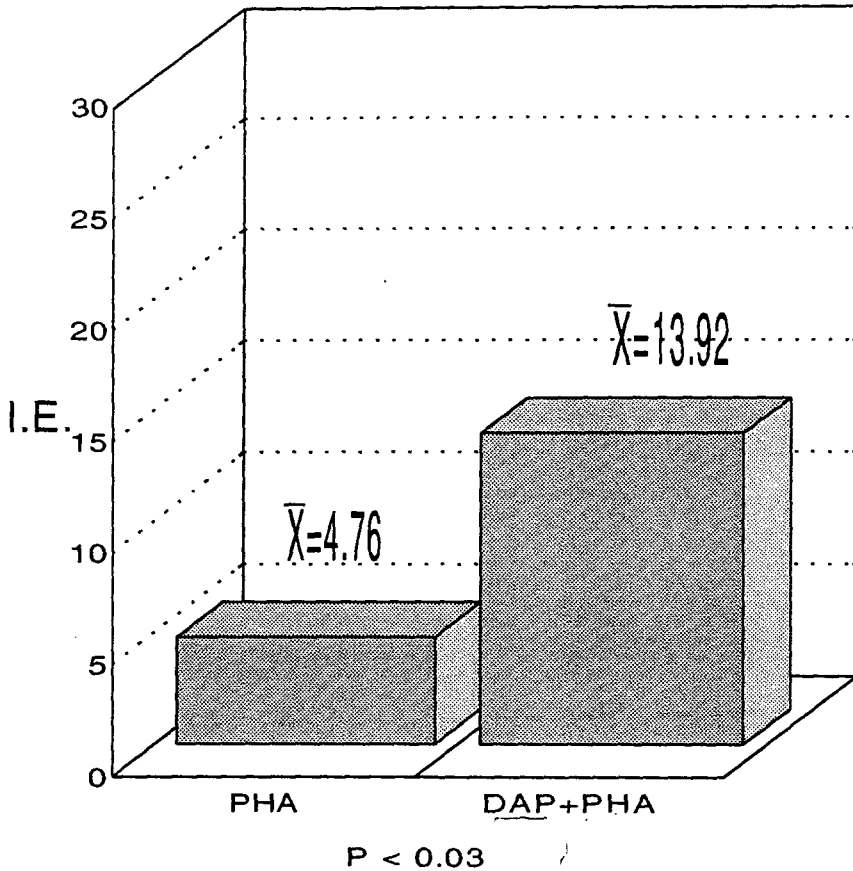


$P < 0.01$

A

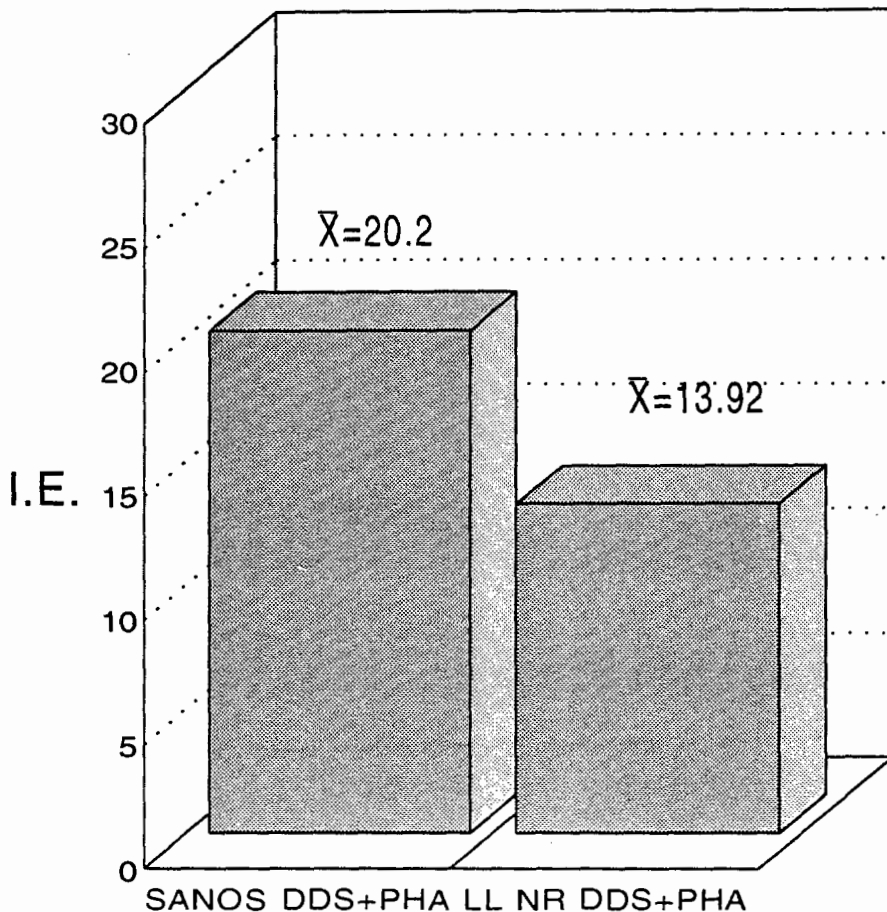
1) COMPARACION DE LOS I.E. ENTRE SUJETOS SANOS Y PACIENTES LL NR ANTE ESTIMULO CON PHA

RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T DE PACIENTES LL NR A PHA Y DDS+PHA



B) COMPARACION DE LOS I.E. DE PACIENTES LL NR ANTE ESTIMULO CON PHA Y DDS+PHA

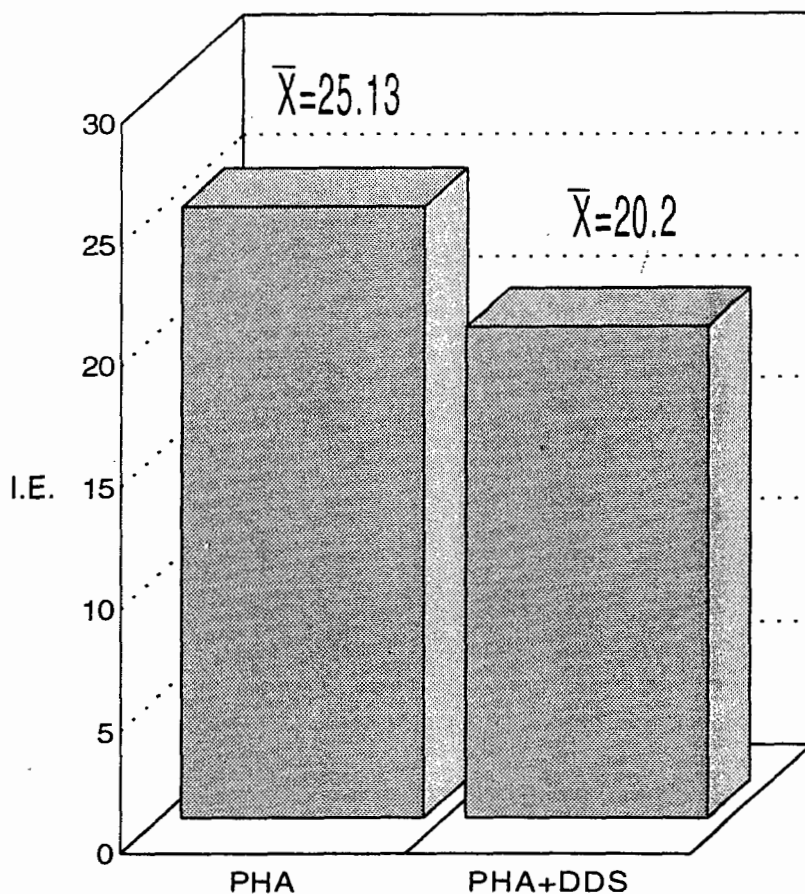
RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T DE SUJETOS SANOS Y PACIENTES LL NR ANTE ESTIMULO CON DDS+PHA



P = NS

C) COMPARACION DE LOS I.E. DE SUJETOS SANOS Y PACIENTES LL NR ESTIMULADOS CON LA COMBINACION DDS+PHA

RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T DE INDIVIDUOS SANOS ANTE PHA Y DDS+PHA

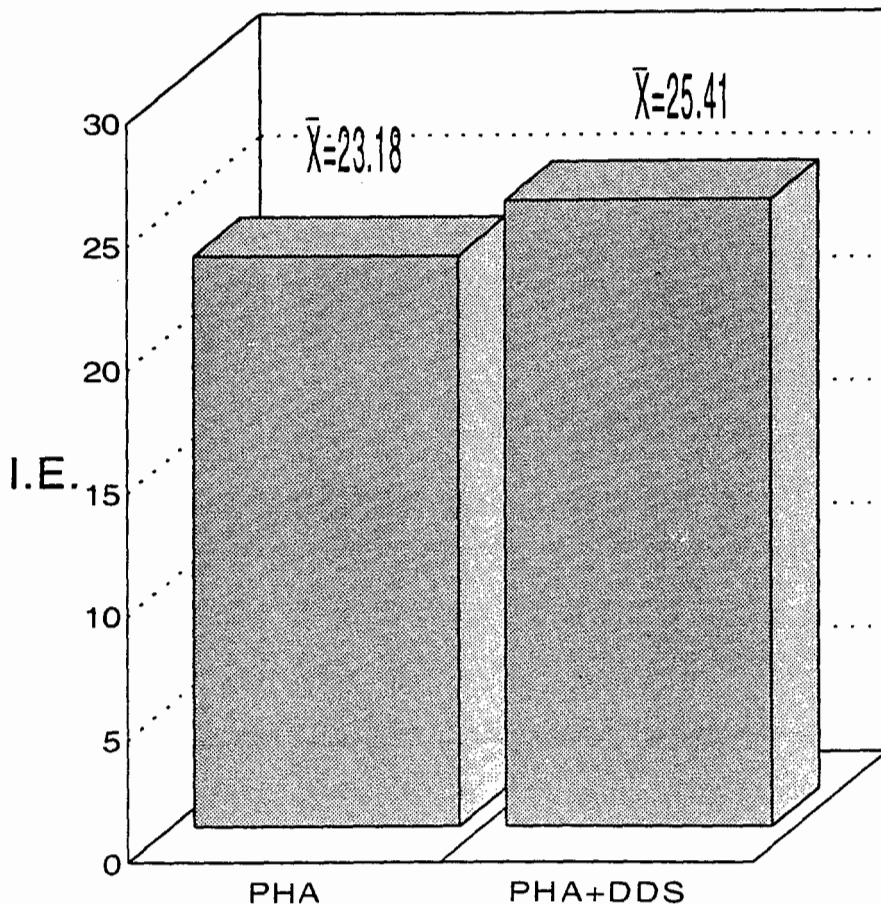


P = NS

D

D) COMPARACION DE LOS I.E. DE LINFOCITOS ESTIMULADOS CON PHA Y LA COMBINACION DDS+PHA EN SUJETOS SANOS

RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T DE PACIENTES LL RESPONDEDORES A PHA Y DDS+PHA



P = NS

E

E) COMPARACION DE LOS I.E. DE PACIENTES LL RESPONDEDORES ANTE ESTIMULO CON PHA Y LA COMBINACION DDS+PHA

DISCUSSION

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran claramente que el I.E. inducido por PHA en linfocitos T de LL NR se incrementó significativamente cuando se incubaron en presencia de DDS.

Sin embargo, los I.E. tanto de individuos sanos como de los pacientes R no sufrieron cambios significativos ante la presencia de DDS.

Los resultados mostrados en este trabajo son controversiales con los obtenidos por otros grupos; Sengupta (17) y Ghei (19), señalan que la administración de DDS tanto *in vivo* como *in vitro* reduce significativamente la transformación blastoide inducida por PHA. También Beiguelman (21) señalan que la frecuencia de transformación blastoide inducida por PHA se redujo significativamente cuando se usó DDS en cultivos de linfocitos T. Cabe señalar que estos tres grupos emplearon para obtener sus resultados una metodología semicuantitativa y no es comparable con la empleada en la actualidad. además de que los estudios se hicieron sólo en individuos sanos y no en pacientes LL.

Por otro lado, el grupo de Anderson (22) trabajó tanto en individuos sanos como en pacientes LL y encontró un ligero aumento en la proliferación después de la administración de DDS, en ambos grupos pero no estadísticamente significativo. Este autor emplea la misma metodología que nosotros para la realización del presente trabajo

lo que permite la comparación con nuestros resultados, sin embargo, los pacientes LL son R ya que ante sólo el estímulo de PHA se comportaron de manera similar que los normales, a diferencia de nuestro grupo LL NR cuyos I.E. están muy por debajo de los LL R y de los individuos sanos.

Los primeros grupos (Ghei, Sengupta y Beiguelman) señalan mecanismos de acción de supresión de la DDS tales como; bloqueo del receptor para PHA o la combinación de dicha droga con un componente nuclear que inhibe la síntesis de DNA.

Nuestros resultados no apoyarían ninguno de los mecanismos planteados previamente, ya que por el contrario la DDS en lugar de inhibir la proliferación de los linfocitos T en el caso de los LL NR ejerció una influencia de tal modo que el I.E. se incrementó ampliamente; sin embargo en los individuos sanos y en los LL R no ejerció ningún efecto. Queda aún sin comprender el mecanismo real de acción ejercido sobre los linfocitos T *in vitro*; sería interesante mediante técnicas de biología molecular tratar de elucidar lo que está sucediendo en estas células.

Es posible que el efecto antimetabólico que la DDS tiene sobre *M.leprae* le impida bloquear la progresión del ciclo celular de los linfocitos T en los individuos LL.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los linfocitos T de pacientes LLNR tienen una muy baja respuesta a estímulos mitogénicos (PHA) *in vitro*.
2. Los linfocitos T de pacientes LLNR aumentaron significativamente su I.E. cuando se incubaron con la combinación PHA+DDS.
3. La DDS no ejerció ningún efecto sobre la proliferación de linfocitos T tanto de sujetos sanos como de individuos LL respondedores ante el estímulo de PHA.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Hasting, R.C., Thomas, P. Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L. & Franzblau, S.G. "Leprosy". *Clin. Microbiol. Rev.* 1:1988. pp. 330-348.
2. Arenas, Roberto. *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. 1a. ed. 1987. pp. 327-337. Editorial Mc Graw Hill.
3. Latapi, F. *Lepra: Dermatología Clínica*, 2a. ed. de J.L. Cortes. 1972. pp. 583-620.
4. Estadísticas del sector salud, de 1 de enero de 1993 a 31 de diciembre de 1993.
5. Clark-Curtis, J.E. "Benefits of recombinant DNA technology for the study of *Mycobacterium leprae*". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 138(1988). pp. 61-79.
6. Genevieve, G.Y. *Microbiología*. 3a. ed. 1980. C.E.C.S.A. p. 731.
7. Barksdale, L. and Kim, K.S. "*Mycobacterium*". *Bacteriol. Rev.* 41:1977. pp. 217-223.
8. Castells Rodellas, A., García-Patos Briones, V., Repiso, M. T., Terencio de las Aguas, J. "Inmunología de la Lepra". *Revista de Leprología*. Vol. XIX. Núm. 5 mayo-agosto 1994. pp. 447-531.
9. Draper, P. "Cell walls of *Mycobacterium leprae*". *Int. J. Lepr.* 44:1976. pp. 95-101.
10. Draper, P., Kandler, O., Darbe, A. "Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*". *J. Gen. Microbiol.* 133:1987. pp. 1187-1194.
11. Goren, M.B. "Mycobacterial lipids: selected topics". *Bacteriol. Rev.* 36:1972. pp. 33-40.
12. Jenkins, P.A. "Lipids analysis in the identification of Mycobacterial an appaissal". *Rev. Infect. Dis.* 3:1987. pp. 862-870.
13. Amezcua, C.M. *Lepra: pasado, presente y perspectivas para el futuro*. Indre #15. 1992.
14. Ridley, D.S. and Jopling, W.H. "Classification of leprosy according to inmunity; a five group system". *Int. J. Lepr.* 34(1966). pp. 255-273.

15. Mohaghehpour, Nahid., Gelber, Robert R. and Edgar, G., Engleman. "T cell defected in lepromatous leprosy is reversible *in vitro* in the absence of exogenous growth factors". *J. Immunol.* Vol. 138(1987). pp. 570-574.
16. Jack Uetrecht, MD, PHD. "Dapsone and Sulfapyridine". *Clinics in Dermatology.* Vol. 7 number 3 Jul-Sep. 1989. pp. 111-120.
17. Sengupta, U. Ghei, SK. Venkatesan, K. and Bharadwaj, VP. "*In vivo* effect of DDS on phytohemagglutinin (PHA) induced lymphocyte transformation cultures in normal healthy volunteers". *Int. J. Lepr.* Vol. 47:(1978). pp. 167-179.
18. Leningher. *Bioquímica.* 2a. ed. Ed. Worth. pp. 260-262.
19. Ghei, S.K. *et. la.* *In vitro* effect of DDS on phytohemagglutinin (PHA) induced lymphocyte transformation. *Hansen. Int.* 5(2):1980. pp. 112-118.
20. Beiguelman, B. and Pisani, R.C.B. "Effect of DDS on phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation". *Int. J. Lepr.* 42(4):1974. pp. 412-415.
21. Boyum, A. "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood". *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 21 supp. 197(1988). pp. 77-85.
22. Anderson R; Gartner, EM; Van-Rensburg, CE; Grabow, G; Imkamp, FM; Kok, DK; Van-Rensburg, AJ. "*In vitro* and *in vivo* effects of dapsone on neutrophil and lymphocyte functions in normal individuals and patients with lepromatous leprosy". *Antimicrob. Agents. Chemother.* Apr; 19(4):1981. pp. 495-503.