

1991 - B

084945323

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

---

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



ESTUDIO DE LA EXPRESION DE RECEPTORES A TRANSFERRINA  
EN LINFOCITOS T ACTIVADOS DE PACIENTES CON LEPROA  
LEPROMATOSA (LL)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

ALMA ANGELICA RIVERA GUTIERREZ

ZAPOPAN, JAL. JULIO DE 1995



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

Expediente.....

Número .....

751/94

Sección .....

**C. ALMA ANGELICA RIVERA GUTIERREZ**  
**P R E S E N T E . -**

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO DEL PATRON DE EXPRESION DE LOS RECEPTORES A TRANSFERRINA EN LINFOCITOS T ACTIVADOS DE PACIENTES CON LEPROA LEPROMATOSA (LL)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Directora de dicha Tesis la M. en C. Mary Fafutis Morris.

**A T E N T A M E N T E**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal. 14 de Julio de 1994

**EL DIRECTOR**

**DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES**

*Fernando Alfaro Bustamante*

**DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE**

**EL SECRETARIO**

*Guillermo Barba Calvillo*  
**BIOL GUILLERMO BARBA CALVILLO**



**FACULTAD DE**  
**CIENCIAS BIOLOGICAS**

c.c.p.- M. C. Mary Fafutis Morris, Directora de tesis.-pte.  
c.c.p.- El expediente del alumno.

**FAB>GBC>Cglr.**

Al contestar este oficio cítese fecha y número

C. DR. Alfonso Islas Rodríguez.  
Director de la División de Ciencias  
Biológicas y Ambientales de la  
Universidad de Guadalajara.

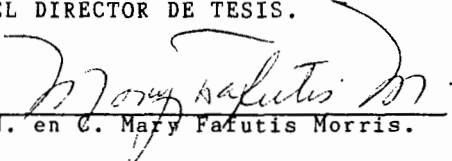
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos solicitar a Usted el cambio de título del trabajo de tesis, realizado por la pasante C. Rivera Gutiérrez Alma Angélica código número 084945323 titulado " ESTUDIO DEL PATRON DE EXPRESION DE LOS RECEPTORES A TRANSFERRINA EN LOS LINFOCITOS T ACTIVADOS DE PACIENTES CON LEPROMATOSA (LL)" por " ESTUDIO DE LA EXPRESION DE RECEPTORES A TRANSFERRINA EN LINFOCITOS T ACTIVADOS DE PACIENTES CON LEPROMATOSA (LL)" consideramos que este último es de mayor claridad para los fines del trabajo.

A T E N T A M E N T E .

Guadalajara, Jal. a 18 de Mayo de 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS.

  
M. en C. Mary Farutis Morris.

El Alumno.

  
Alma Angélica Rivera Gutiérrez.



*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*  
*División de Ciencias Biológicas y Ambientales*  
**Biología**

982/95

**C. ALMA ANGELICA RIVERA GUTIERREZ**  
**P R E S E N T E . -**

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el cambio de título de tesis "ESTUDIO DEL PATRON DE EXPRESION DE LOS RECEPTORES A TRANSFERRINA EN LOS LINFOCITOS T ACTIVADOS DE PACIENTES CON LEPROMATOSA (LL)" por "ESTUDIO DE LA EXPRESION DE RECEPTORES A TRANSFERRINA EN LINFOCITOS T ACTIVADOS DE PACIENTES CON LEPROMATOSA (LL)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Directora de dicha tesis la M. en C. Mary Fatutis Morris.

**A T E N T A M E N T E**  
**" PIENSA Y TRABAJA "**

Las agujas, Zapapan, Jal., 22 de Mayo de 1995

**EL DIRECTOR**

  
**M. EN C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ**

**EL SECRETARIO**

  
**OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA**

c.c.p.- M.C. Mary Fatutis Morris, Directora de tesis.-  
c.c.p.- El expediente del alumno.

**C.U.C.B.A.**



**DIV. DE CS.**  
**BIOLOGICAS**  
**AMBIENTALE**

AEIR/SVM/mahs.

C. D.R. Alfonso Islas Rodríguez.  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E .

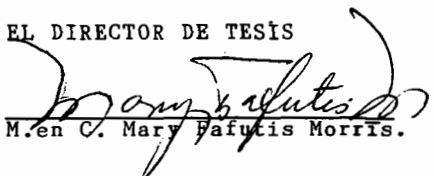
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante C. Rivera Gutiérrez Alma Angélica código número 084945323 con el título Estudio de la expresión de receptores a transferrina en linfocitos T activados de pacientes con lepra lepromatosa (LL) 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 de lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 23 de Mayo de 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS

  
M.en C. Mary Dafutis Morris.

SINODALES

1. D.R. Alfonso Islas Rodríguez.

  
Firma

2. DR. Eduardo Vázquez Valls.

  
Firma

3. DRA. Galina Zaitzeva P.

  
Firma

**Este trabajo se realizó en el CIINDE,  
Universidad de Guadalajara / Inst. Dermatológico de Jalisco  
"Dr. José Barba Rubio"**

## AGRADECIMIENTOS.



A Dios, por permitirme alcanzar otra meta.

A Oscar, por su amor, apoyo y colaboración.

A Cristi, por ser un motivo para seguir adelante.

A mis Padres y Hermano, por su cariño y apoyo.

A la M. en C. Mary Fafutis Morris, por la dirección y asesoría de este trabajo

Al M. en C. Alfonso Islas Rodríguez, por sus aportaciones y sugerencias para este trabajo.

A todo el grupo de trabajo del CIINDE.

Al Dr. Luis Santoscoy, de la Unidad de Patología Clínica, por su colaboración en la realización de este trabajo.

## **DEDICATORIAS.**

A quien es fuente y dador de sabiduría y conocimiento.

A la memoria de mi Mamá Kiqui.

A mi Esposo e Hija.

A mis Padres y Hermano.

A mis amigos y compañeras; especialmente a Gaby.



# ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.	2
HIPÓTESIS.	15
OBJETIVO.	17
MATERIAL Y MÉTODOS.	19
RESULTADOS.	23
DISCUSIÓN.	27
CONCLUSIONES.	30
BIBLIOGRAFÍA.	32

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN.

La lepra o enfermedad de Hansen, es una infección crónica causada por Mycobacterium leprae, que afecta predominantemente al humano, aunque también se ha encontrado en armadillos (Dasypus novemcinctus), chimpancés (Pan troglodytes) y monos mangabey (Cercocebus atys) infectados naturalmente (1).

M. leprae pertenece al grupo de las micobacterias, éstas tienen forma bacilar y no forman esporas, son aerobias y se tiñen con dificultad por ser ácido-alcohol resistentes, pero una vez teñidas resisten la decoloración por los ácidos o por el alcohol. Su resistencia a la tinción así como su tendencia a formar una película en la superficie de medios acuosos es debido a su elevado contenido de lípidos (2). Se ha demostrado en análisis extensos que la pared micobacteriana es altamente rica en macromoléculas lipídicas; la estructura común en todas las micobacterias es sin duda el PEPTIDOGLICANO. En M. leprae el peptidoglicano contiene una sustitución no usual de glicina por alanina en su tetrapéptido (3,4). Esta sustitución puede permitir alguna ventaja en la patogenicidad, en cuanto a la resistencia del bacilo a la degradación, lo que la distingue de otras micobacterias (5). M. leprae es un parásito intracelular obligado, descrito por Hansen en

1874; que crece preferentemente a temperaturas menores de 37°C, por lo que afecta aquellas regiones del organismo con bajas temperaturas, como la piel, nervios periféricos superficiales y mucosa nasal. El mecanismo más aceptado de transmisión de la lepra es aquel en el que el bacilo excretado de la nariz de un paciente con enfermedad activa penetra a la mucosa nasal de otro individuo (1,6).

En 1990, la OMS estimó el número de pacientes con lepra entre 12 y 15 millones en todo el mundo, de los cuales solo están registrados entre 4 y 5 millones. De éstos cerca del 62% se encuentran en Asia y un 34% en Africa, predominando en países subdesarrollados (7).

En México se calcula que pueden existir entre 50 y 100 mil pacientes con lepra, aunque los registros hablan de 15 a 20 mil casos, sin embargo la OMS recomienda multiplicar por 5 el número de casos registrados (8).

La lepra existe en todo el país, aunque es predominante en tres focos; el principal es el centro-occidental, que comprende los estados de: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, Durango, Querétaro, Estado de México y el Distrito Federal.

El foco peninsular incluye a los estados de Yucatán y Campeche; el Nororiental, formado por los estados de Nuevo León y Tamaulipas. En general se considera al país como de mediana endemia, con una prevalencia del 0.2x1000 (8).

El Estado de Jalisco ocupa el primer lugar en el país con el más alto número absoluto de casos (3177 casos registrados); en el año

de 1991 presentó una prevalencia del 0.60x1000 por lo que se sitúa en el quinto lugar después de Sinaloa, Colima, Nayarit y Guanajuato (9).

La lepra presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas e inmunológicas las cuales se utilizan para su clasificación, de acuerdo a Ridley y Jopling: se definen dos tipos polares de enfermedad llamados así por ser clínicamente estables, éstos son la lepra tuberculoide (TT) y la lepra lepromatosa (LL); los tipos limítrofes que son muy inestables, forman un espectro continuo entre los dos polos anteriores y son: la lepra limítrofe tuberculoide (BT) y la lepra limítrofe lepromatosa (BL) (10).

La lepra lepromatosa (LL), forma anérgica más extendida de la enfermedad, desarrollada sólo por algunos pacientes en los cuales el bacilo parece crecer sin ninguna restricción; la gran proliferación de bacilos causa lesiones en la piel y ganglios llamados lepromas que están simétricamente distribuidos en todo el organismo del individuo afectado. Esta forma de la lepra afecta también los nervios periféricos y todos los órganos exceptuando los del Sistema Nervioso Central (SNC). Las respuestas inmunológicas tanto humoral como celular están alteradas. En lo que respecta a la inmunidad humoral hay presencia de factor reumatoide, proteína C reactiva, hipergamaglobulinemia, complejos inmunes circulantes y falsas positivas a VDRL (11).

La respuesta inmune celular (RIC) se encuentra disminuida, no hay respuesta a antígenos de M.leprae, y la respuesta linfoproliferativa hacia diferentes mitógenos es deficiente (12). Estudios recientes han demostrado que las células T activadas de

pacientes con LL no producen interleucina-2 (IL-2) suficiente lo que influye en su deficiente capacidad proliferativa; se ha observado también que al adicionar IL-2 a los cultivos de células T de estos pacientes la respuesta proliferativa se corrige demostrando así la presencia funcional del receptor a IL-2 (RIL-2) en dichas células (13).

La activación de células T juega un papel central en la iniciación y regulación de la respuesta inmune. Esta activación se inicia con la interacción entre el complejo TcR-CD<sub>3</sub> y el antígeno (Ag) presentado por las células accesorias como los macrófagos, los cuales sintetizan la citocina interleucina-1 (IL-1).

El complejo TcR-CD<sub>3</sub> es un receptor para Ag localizado en la superficie del linfocito T, que induce la síntesis de linfocinas inmunorregulatorias y glicoproteínas de superficie celular como el RIL-2 y el receptor a transferrina (RTf). La unión del Ag a este complejo propicia el rompimiento (catalizado por la fosfolipasa C, (PLC)) y resíntesis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) presente en la membrana del linfocito T. Los productos finales de su rompimiento son muy importantes para el desarrollo del ciclo celular del linfocito T, éstos son: el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que moviliza calcio de los almacenes intracelulares y permite además su entrada del medio extracelular, lo que incrementa las concentraciones intracelulares del mismo (14,15,16). El otro producto es el 1,2-diacilglicerol (DAG) que induce la traslocación de la proteína cinasa C (PKC) desde el citosol a la membrana celular en donde se activa en presencia de fosfatidilserina y calcio. Esta enzima fosforila algunas proteínas celulares que influyen en

la transcripción de ciertos genes, entre ellos, el de la IL-2 y el del RIL-2 (14,15,17,18). Después de la transcripción del gene de IL-2, ésta empieza a sintetizarse por el incremento de las concentraciones intracelulares de calcio en el linfocito T, incremento que está determinado por la acción del inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) que permite la entrada de calcio del medio extracelular (ver figura 1).

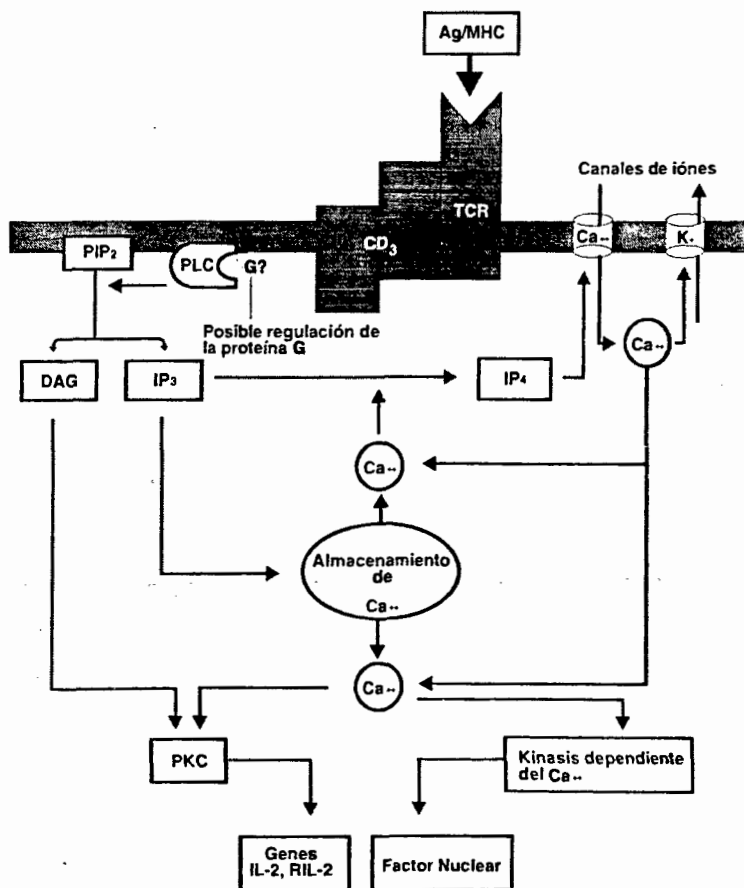


Figura 1. Activación de células T (tomado de Male, D. *Advanced Immunology* (1991)).

Posteriormente ocurre la transcripción del gene del RIL-2 y dicho receptor es expresado por las células T. La unión de IL-2 con su receptor se dá al inicio de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular de células T, dicha unión genera la expresión del RTf al final de la misma fase G<sub>1</sub>. Enseguida la unión de la Tf con su receptor permite que las células T entren a la fase de síntesis, prosiguiendo G<sub>2</sub> e iniciando así la proliferación. El complejo Tf-RTf toma el mando de la proliferación al menos por una vuelta (19) (ver figura 2).

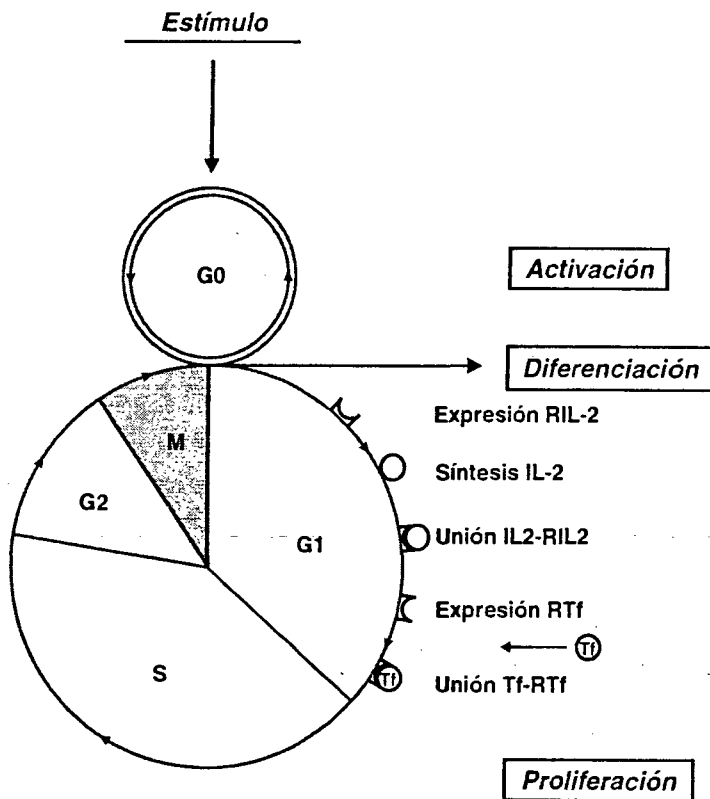


Figura 2. Ciclo celular del linfocito T (tomado de Salgado, A. Manual de Geriatria (1992)).



La transferrina (Tf), es una glicoproteína de ligamiento y transporte de metales, con especificidad para hierro; se encuentra en mamíferos superiores y transporta hierro de sitios de absorción y almacenaje a tejido celular, es un coestimulador de la proliferación de células T y activa la PKC en dichas células (20,21,22). El sitio de mayor síntesis de Tf es el hígado, otros sitios donde también se sintetiza pero en menor cantidad son el cerebro, el corazón, el bazo, el riñón, el músculo, el testículo, la glándula mamaria y el timo, mientras que los niveles de síntesis celular han sido reportados por un subgrupo de linfocitos T activados, los CD<sub>4</sub> o cooperadores y los macrófagos (20).

El receptor a transferrina (RTf) es un miembro de la clase de receptores de transporte, ejemplificado como un receptor lipoproteico de baja densidad que capta al ligando constituyendo una endocitosis mediada por receptor (23).

Esta forma especial de endocitosis mediada por receptor, permite la entrada de hierro a la célula a través de moléculas de Tf cargadas de hierro que se unen fuertemente al receptor y son endocitadas por vesículas recubiertas de clatrina estas vesículas se funden para formar un endosoma en el cual el pH baja por impulso de un protón, lo que da como resultado la liberación de hierro de la molécula de Tf la cual sigue fuertemente unida a su receptor. El complejo receptor-transferrina es segregado en una vesícula separada; la cual regresa el complejo a la membrana celular probablemente después de atravesar el aparato de Golgi (20, 21). Ahí la Tf se disocia de su receptor, debido al pH neutro que favorece esta disociación. El receptor libre queda sobre la

superficie celular disponible para otro ciclo de endocitosis mediada por receptor, la Tf es transportada por la sangre a un sitio donde 2 iones férricos se le readicionan para el siguiente ciclo (21) y el hierro es transferido por mecanismos desconocidos a la mitocondria para incorporarse a las hierro-proteínas o a la ferritina (multisubunidad proteica que sirve como almacenadora de hierro) (20).

Se han realizado estudios sobre la concentración de Tf en suero de pacientes con LL para saber si este factor se encuentra relacionado con la falla que presentan las células T de estos pacientes para proliferar adecuadamente, comparandolos con la concentración de Tf en suero de individuos sanos. Los resultados no mostraron diferencia significativa entre los dos grupos; por lo que se concluyó que la deficiencia inmunológica de dichos pacientes parece no estar relacionada con la síntesis de Tf (Fafutis y cols. comunicación personal).

En células T en reposo, el gene para el receptor a Tf está aparentemente "apagado" por lo que no se expresa dentro de condiciones normales o si hay ausencia de hierro; después de un estímulo mitogénico, las células T son reprogramadas dentro del ciclo celular, lo que implica la síntesis del receptor a Tf (24).

Se ha observado que concentraciones óptimas del mitógeno fitohemaglutinina (PHA), inducen en células T humanas una buena respuesta proliferativa, incrementan el  $Ca^{++}$  citosólico, propician la expresión del receptor a IL-2, la producción de IL-2 y la síntesis del receptor a Tf. Así mismo utilizando bajas concentraciones de PHA y al adicionar IL-2 a los cultivos de

células T se reconstituye la respuesta proliferativa y la expresión del receptor a IL-2. La expresión de receptores a Tf está modulada principalmente por el nivel de hierro intracelular (25).

El número de receptores a Tf en la superficie celular, es el principal factor que determina la tasa de captura de hierro y se correlaciona con los requerimientos celulares de hierro, como consecuencia los receptores a Tf son expresados abundantemente en células proliferantes (23).

Experimentos realizados con diferentes inductores de señales en linfocitos T humanos han aportado un camino independiente de IL-2, al demostrar la acumulación temprana del RNAm del RTf en células T estimuladas con una combinación de 12,13-dibutirato (PDB)/ionomicina; el RNAm del RTf fué detectado 1 hora después de la estimulación alcanzando su máxima expresión 6hrs después, la IL-2 3hrs después y el RIL-2 entre las 24 y 48hrs después de la estimulación lo que demuestra que no fué necesaria la interacción de la IL-2 con su receptor para la expresión del RTf (26).

También en otros estudios se ha observado que un anticuerpo monoclonal (Acm) dirigido a un epítipo del receptor a Tf es capaz de provocar la proliferación de células T y la secreción de IL-2 en presencia de ésteres de forbol; lo que representa una ruta diferente para la activación de células T (27).

En estudios recientes del ciclo celular de células T de individuos sanos y de factores que contribuyen para su progresión, inhibición o alteración, se ha encontrado lo siguiente:

1. La expresión y/o alta regulación de algunos genes de activación temprana que participan en la progresión del ciclo celular de células T, demostraron que la expresión del gene c-myc y su proteína es constante durante todo el ciclo; la proteína c-myc es requerida para que las células T pasen de la fase  $G_1$  a la fase S y la presencia del gene c-myc para la transición de S a  $G_2/M$  (28).
2. En presencia de super antígenos bacterianos las células T proliferan y expresan un incremento en el RTf, en RIL-2 y en el antígeno de histocompatibilidad (29).
3. El interferón beta (IFN-B), en concentraciones mayores o iguales a 10U/ml inhibe la proliferación de células periféricas mononucleares (PBMC), así como la expresión de el RIL-2, de el RTf y de  $CD_2$  (30).
4. El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), homodímero de 25 KDa es producido por monocitos y linfocitos T y B éste posee propiedades inmuno-regulatorias potentes, entre ellas: inhibe la progresión del ciclo celular de células T por una regulación baja de las señales de proliferación mediadas por el RIL-2 o por la IL-2 (31).
5. Un subgrupo de linfocitos T cooperadores reportado como células T anérgicas, mediadoras de supresión, que poseen efectos inmuno-regulatorios sobre otras células T, compiten por

la especificidad para las células presentadoras de antígeno (APCs) y por la producción de IL-2 local con las células T respondedoras (que son inhibidas); lo que impide que el ciclo de células T se realice en forma adecuada (32).

En cuanto a la falta de respuesta de los linfocitos T de pacientes con LL se han reportado algunas alteraciones en el sistema inmune de éstos pacientes que podrían ser la causa de dicha anergia :

1. Los macrófagos (MO) alteran su metabolismo debido a una gran carga bacilar causando disminución en la expresión de algunas moléculas de membrana como: a) los receptores para el Fc de inmunoglobulinas (FcR) (que evita la fagocitosis por opsonización) y b) las moléculas DR (que afecta el reconocimiento de antígenos micobacterianos por el linfocito T evitando la respuesta anti-*M.leprae*), por lo que realiza una presentación incorrecta de antígenos, provocando una respuesta inadecuada de los linfocitos T (8,11).
2. Las células T citotóxicas poseen la capacidad de destruir macrófagos infectados; lo que representaría una baja en el número de macrófagos funcionales, provocando un desbalance en el individuo, que se expresa al final como anergia (8,33).
3. Las células T supresoras liberan interleucina-4 (IL-4); la IL-4 es un mediador de supresión, de acuerdo al modelo de células Th-1 y Th-2 (33).

4. La anergia de los linfocitos T está relacionada con la falla en la producción de IL-2 (requerida para inducir y regular la respuesta proliferativa), la deficiencia de interferón gamma (IFNg) (que provoca la incapacidad funcional de macrófagos) y con un posible exceso de la capacidad supresora de los linfocitos (12,13,33).

En base a lo anterior, y teniendo en cuenta que la respuesta inmune depende de la realización adecuada del ciclo celular del linfocito T, nuestro grupo de trabajo se ha interesado en estudiar en los pacientes con LL, los eventos que tienen lugar en cada una de las etapas (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) de dicho ciclo, para conocer las causas que originan la deficiencia inmunológica en éstos.

Habiendo encontrado baja producción de IL-2, expresión adecuada del RIL-2, y niveles normales de Tf y hierro en estos pacientes, lo siguiente es conocer la expresión de receptores a Tf, para lo cual se realizó el presente trabajo.

# H I P Ó T E S I S

## **HIPÓTESIS.**

Los linfocitos T activados de pacientes con lepra lepromatosa expresan receptores a transferrina, independientemente de su falla en la producción de IL-2.



# O B J E T I V O

## **OBJETIVO.**

Objetivo :

Identificar la expresión de receptores a transferrina en linfocitos T activados de pacientes con lepra lepromatosa, mediante la técnica de citofluorometría de flujo.

MATERIAL Y  
MÉTODOS

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

*SUJETOS DE ESTUDIO.*- Se estudiaron 12 pacientes con lepra lepromatosa (LL), diagnosticados de acuerdo al criterio internacional de Ridley y Joplin (10). Todos con baciloscopia positiva. El grupo testigo constó de 12 sujetos sanos no relacionados con los enfermos, apareados en sexo y edad  $\pm 5$  años.

*PREPARACION DE LAS CELULAS MONONUCLEARES PARA EL CULTIVO DE LINFOCITOS.*- Se obtuvo sangre periférica (heparinizada) de cada sujeto, por punción venosa. La sangre se procesó mediante gradientes de densidad en Ficoll-Hypaque por la técnica de Boyüm, (34) se obtuvo el anillo celular rico en mononucleares, el cual se lavó en solución salina de Hank's (HBSS). Estas células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO.) suplementado con suero fetal de ternera (SFT) inactivado, glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM, aminoácidos no esenciales 0.1mM, Hepes 10mM, 2-Mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, 100U/ml de penicilina y 100ug/ml de estreptomicina y finalmente se ajustaron a una concentración de 1 millón de células por ml.

*ENSAYO DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS.*- Las células se cultivaron en 2 condiciones: a) Sin estímulo, b) Bajo estímulo mitogénico con fitohemaglutinina(PHA) 10ug/ml; ambos grupos de células se incubaron en cajas de cultivo (Falcon Tissue Cultures) con medio RPMI 1640 durante 48h en atmósfera húmeda, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, a 37°C.

Al término de la incubación se pulsaron con timidina tritiada (1u Ci) 3 pozos (triplicado) de cada condición y a las 24h se cosecharon para medir incorporación de timidina tritiada en un contador de radiaciones beta (Packard).

Los datos sobre proliferación se obtuvieron en cuentas por minuto (cpm) y la proliferación se analizó en base a los índices de estimulación (I.E.) obtenidos a partir de la siguiente fórmula :

$$\text{índice de estimulación} = \frac{\text{cpm estimulado}}{\text{cpm no estimulado}}$$

La prueba de t de student para muestras pareadas que se aplicó a los índices de estimulación, permitió conocer la diferencia entre los grupos de estudio.

*DETECCION DEL RECEPTOR A TRANSFERRINA MEDIANTE CITOFUOROMETRIA DE FLUJO.*- Transcurrido el tiempo de incubación ambos grupos de células (a y b), se recuperaron mediante centrifugación, el botón resultante fué resuspendido en 0.1 ml de medio de cultivo RPMI 1640, se adicionaron 10 ul del

anticuerpo monoclonal, anti-receptor a Tf marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-Conjugated DAKO-CD71, Ber-T9), mediante el cual se reveló la presencia de receptores para Tf, las células se incubaron por 30 min. a 4°C, después de la incubación las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos, y se fijaron con 0.5ml de solución de paraformaldehído.

Las células se leyeron en un citofluorómetro de flujo (EPICS V COULTER ELECTRONICS), se obtuvo el porcentaje de células (+), de aquéllas que expresaron el Ac. monoclonal CD71, tanto en las células sin estímulo como en las células estimuladas.

# RESULTADOS

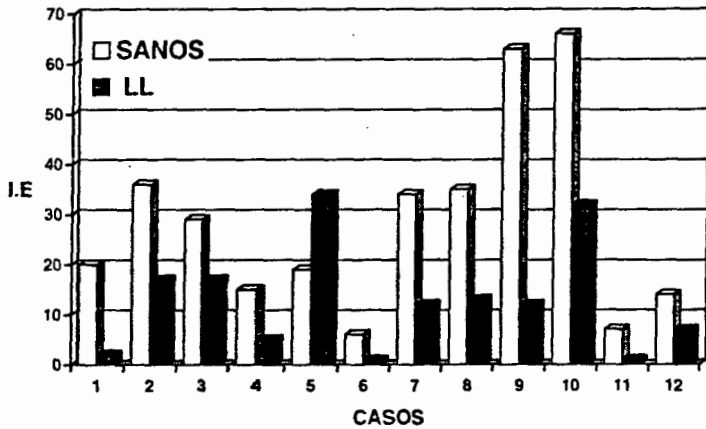
## RESULTADOS.

El I.E. de los linfocitos T de pacientes con LL fué muy bajo ( $\bar{X}_{LL}=12.75\pm 3.19$ ), comparado con el I.E. de estimulación de los linfocitos T de individuos sanos ( $\bar{X}_{SANOS}=28.66\pm 5.67$ ), con una diferencia significativa de ( $p<0.002$ ) cuando se estimularon con PHA (tabla 1).

La expresión de receptores a Tf en los linfocitos T de pacientes con LL fué muy baja ( $\bar{X}_{LL}=16.27\pm 2.44$ ), comparada con la de los linfocitos T de individuos sanos ( $\bar{X}_{SANOS}=44.25\pm 5.41$ ) observandose diferencia significativa de ( $p<0.00001$ ) (tabla 2); para la obtención de estos datos se aplicó la prueba paramétrica t de student.



**TABLA 1. Respuesta de linfocitos T de individuos sanos y pacientes con LL a PHA.**



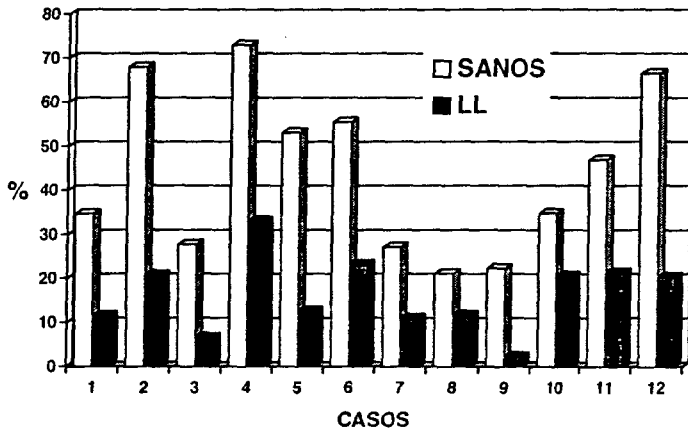
$$\bar{X}_{SANOS} = 28.66 \pm 5.67$$

$$\bar{X}_{LL} = 12.75 \pm 3.19$$

$$p < 0.002$$

**Comparación de los I.E. de linfocitos T de individuos sanos y pacientes con LL estimulados con 10ug/ml de PHA.**

**TABLA 2. Porcentaje de linfocitos T activados con PHA que expresan RTf.**



$$\bar{X}_{SANOS} = 44.25 \pm 5.41$$

$$\bar{X}_{LL} = 16.275 \pm 2.44$$

$$p < 0.00001$$

Medición del RTf mediante el anticuerpo monoclonal anti-CD71, 72h después de la estimulación con 10ug/ml de PHA.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN.

El índice de estimulación (I.E.) observado en los linfocitos T de pacientes con LL fué muy bajo en comparación con el I.E. de los linfocitos T de individuos sanos, ésto permitió confirmar su deficiente proliferación celular, reportada ya en otros trabajos (12).

La expresión del RTf es determinante en la proliferación de células T, ya que la unión de dicho receptor con la Tf permite que las células T entren en la fase de síntesis, pasen a G<sub>2</sub> y dé inicio la proliferación (19). En base a lo anterior se planteó que la deficiencia proliferativa de los linfocitos T de pacientes con LL podía estar relacionada también con la expresión de este receptor; para comprobarlo se realizó este trabajo .

Las pruebas de citofluorometría de flujo para la detección de RTf, mostraron que los linfocitos T de pacientes con LL expresan un porcentaje muy bajo de receptores a Tf en comparación con los linfocitos T de sujetos sanos, por lo cual la diferencia entre ambos grupos de trabajo resultó significativa en el análisis estadístico.

Estos datos sugieren que los linfocitos T de pacientes con LL siguen la ruta de proliferación dependiente de IL-2 , en donde la

baja producción y/o liberación de dicha interleucina, provoca una respuesta proliferativa deficiente, y en este caso también influye en la baja expresión del RTf, ya que esta expresión es el resultado de la unión de la IL-2 con su receptor, por lo tanto si los niveles de IL-2 no son adecuados los procesos celulares que dependen de ella también se alteran, aún cuando exista una expresión adecuada del RIL-2 y de que los niveles de Tf sérica sean normales (12,13).

La ruta de proliferación alterna e independiente de IL-2 que proponen Kumagai y su grupo (26) es interesante debido a que ellos plantean que en ésta, no se requiere de IL-2 y RIL-2 para que  $G_1$  progrese a S, sino que directamente Tf-RTf hacen que  $G_1$  pase a S; para abordarla sería necesario realizar un trabajo que permitiera conocer si los linfocitos T de los pacientes lepromatosos pueden seguir dicha ruta y expresar receptores a Tf adecuadamente.



BIBLIOTECA CENTRAL

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES.

- 1) El I.E. de los linfocitos T de pacientes con LL fué significativamente menor respecto al I.E. de los linfocitos T de individuos sanos, lo que confirmó su deficiencia para proliferar .
- 2) Los linfocitos T de pacientes con LL expresan receptores a Tf en menor porcentaje que los linfocitos T de individuos sanos, cuando son activados con PHA.
- 3) La baja expresión de receptores a Tf en los linfocitos T de pacientes con LL aunado a la falla en la producción y/o liberación de IL-2, son factores que influyen en la deficiente respuesta proliferativa de estos pacientes.

# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA.

1. Hastings, R.C., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L. and Franzblau, S.G. Leprosy. *Clin. Microbiol.Rev.* 1(1988) 330-348.
2. Pattyn, S.R. Bacteriology of *Mycobacterium leprae*. *Lepr. Rev Special. issue.* (1983) 17-22.
3. Draper, P. Cell walls of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 44(1976) 95- 98.
4. Draper, P., Kandler, O. and Darbre, A. Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 133(1987) 1187-1191.
5. Warren, H.S., Vogel, F.R. and Chedid, L.A. Current status of immunological adyuvants. *Annu. Rev. Immunol.* 4(1986) 369-373.
6. Bullok, W.E. Leprosy: A model of immunological perturbation in chronic infection. *J. Infect. Dis.* 137 (1981) (3) 341-354.
7. Jacobson, M.D., Gillis, W. The face of leprosy in the United States today. *Arch. Dermatol.* 126 (1990) 1627-1630.
8. Subsecretaria de Coordinación y Desarrollo; Instituto Nacional de diagnóstico y referemcia epidemiológicos. "Dr.

Manuel Martínez Baez". editado por: Ma. Eugenia Amezcua Chavarria. México D.F. LEPRA: pasado, presente y perspectivas para el futuro. Publicación técnica del INDRE (1992) # 15 .

9. Dir. General de Medicina Preventiva Secretaria de Salud. México D.F. (1991). Manual de procedimientos operativos para el control de la Lepra.
10. Ridley, D.S. and Jopling, W.H. Clasification of leprosy according to immunity: a five group. system. *Int. J. Lepr.* 34(1986) 255-273.
11. Castellanos, C., Islas, R.A., González, A., Zambrano, S, y Ortiz-Ortiz, L. Lepra lepromatosa : Estudio de algunas subpoblaciones de linfocitos T y su análisis funcional. *Arch. Invest. Med.* 16(1985) 217-224.
12. Islas, R.A., Morales, O.R., Fafutis, M.M., González, M.A. and Ortiz-Ortiz, L. Deficiency in the biosynthesis of interleukin-2(IL-2) and functional presence of the receptor in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* 55(1987) 566-569.
13. Fafutis, M.M., Mejía, A.S., González, M.A., Morales, O.R. and Islas, R.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) [1] 126-128.
14. Modiano, J.F., Kolp, R., Lamb, R.J. and Nowell, P.C. Protein Kinase regulate both production and secretion of interleukin-2. *J.Biol. Chem.* 266 (1991) 10552-10561.
15. Mills, G.B., Chung, R.K., Grintein, S. and Gelfand, E.W.

- Increase in cytosolic free calcium concentration is an intracellular messenger for the production of interleukin-2 but not for the expression of the interleukin-2 receptor. *J. Immunol.* 134 (1985) 1640-1643.
16. Imboden, J.B. and Stobo, J.D. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 161 (1985) 446-456.
  17. Farrar, W.L. and Ruscetti, F.W. Association of protein kinase C activation with IL-2 receptor expression. *J. Immunol.* 136 (1986) 1266-1273.
  18. Mills, G.B., May, C., Hill, M. and Gelfand, E.W. Role of protein kinase C in interleukin-1, anti-T3, mitogenic lectin-induced interleukin-2 secretion. *J. Cell. Fisiol.* 141(1989) 310-317.
  19. Neckers, L.M. and Cossman, J. Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3494-3498.
  20. Brock, J.H. Iron-binding proteins. *Acta. Padiatr. Scand. Suppl.* 361 (1989) 31-43.
  21. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A and Lodish, H.F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2258-2262.
  22. Alcantara, O., Javors, M and Boldt, D.H. Induction of protein kinase C mRNA in cultured lymphoblastoid T cells by Iron-Transferrin but not by soluble iron. *Blood.* vol.77(1991) (6) 1290-1297.

23. Trowbridge, I.S. Immunoassay of serum transferrin receptors: clinical implications. *J. Lab. Clin. Med.* vol. 114 (1989) (4) 336-337.
24. Pelosi, E., Testa, U., Louache, F., Thomopoulos, P., Salvo, G., Samoggia, P. and Peschle, C. Expression of transferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 261(1986) [7] 3036-3042.
25. Mills, G.B., Lee, J.E.E., Cheung, R.K. and Gelfand, E. W. Characterization of the requirements for human T cell mitogenesis by using suboptimal concentrations of phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 135 (1985) [5] 3087-3093.
26. Kumagai, N., Banedict, S.H., Mills, G.B. and Gelfand, E.W. Comparison of phorbol ester/calcium ionophore and phytohemagglutinin-induced signaling in human T lymphocytes. *J. Immunol.* vol. 140 (1988) (1) 37-43.
27. Cano, E., Pizarro, A., Redondo, J.M., Sánchez-Madrid, F., Bernabeu, C. and Fresno M. Induction of T cell activation by monoclonal antibodies specific for the transferrin receptor. *Eur. J. Immunol.* 20 (1990) 765-770.
28. Kim, H.Y., Buchholz, A.M., Chrest, J.F. and Nordin, A.A. Up-regulation of c-myc induces the gene expression of the murine homologues of p34 cdc2 and cyclin-dependent kinase-2 in T lymphocytes. *J. Immunol.* 152 (1994) 4328-4335.
29. Aisenberg, J., Ehert, E.C. and Mayer, L. T cell activation in human intestinal mucosa; the role of superantigens. *Gastroenterology* 105 (1993) (5) 1421-1430.
30. Rudick, R.A., Carpenter, C.S., Cookfair, D.L., Tuohy, U.K.

- and Ransohoff, R.M. In vitro and in vivo inhibition of mitogen-driven T cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology*. 43 (1993) (10) 2080-2087.
31. Ahuja, S.S., Paliogianni, F., Yamada, H., Balow, E.J. and Boumpas, T.D. Effect of transforming growth factor-B on early and late activation events in human T cells. *J. Immunol*. 150 (1993) 3109-3118.
32. Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R. and Lechler, R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 264 (1994) 1587-1589.
33. Ottenhoff, H. T. Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. *Int. J. Lepr.* 62 (1994) (1) 108-121.
34. Boyüm, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation, and sedimentation at 1g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 suppl. 97 (1968) 77-89.