

105
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA TALIDOMIDA SOBRE LA
DERMATOSIS POLIMORFA LUMINICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

RUTH ANGELICA LEZAMA PALACIOS

MEXICO, D. F.

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	11
Material	25
Métodos	34
Resultados	43
Discusión	68
Conclusiones	73
Resumen	74
Bibliografía	76

INTRODUCCION

La inmunidad se encuentra involucrada en el desarrollo y preservación de la individualidad de los seres vivos. Para tal efecto se vale de mecanismos de defensa que permiten a un organismo protegerse de los agresores que se encuentran en su medio ambiente, evitar el desarrollo de células tumorales y eliminar moléculas nocivas elaboradas por sí mismo o como consecuencia del envejecimiento.

Así, la respuesta inmune tiene a su cargo funciones como: defensa, homeostasis y vigilancia. La defensa se refiere a la resistencia a la infección por microorganismos; la homeostasis se ocupa de las funciones normales degenerativas o catabólicas del cuerpo y de la eliminación de elementos celulares lesionados. La vigilancia tiene a su cargo reconocer los tipos celulares anormales que constantemente se producen en el cuerpo y favorece su eliminación (6).

Los mecanismos de la respuesta inmunológica pueden ser específicos o inespecíficos. Los mecanismos inespecíficos entran en acción al primer encuentro con la partícula extraña (o mejor llamada antígeno); en cambio los mecanismos específicos requieren de una exposición inicial al antígeno, después de elaborada una respuesta inmune viene el reconocimiento a este mismo, para finalmente reaccionar contra él.

El sistema inmune está formado por un acúmulo de elementos celulares que se encuentran estratégicamente distribuidos por todos los tejidos y revisten las vías vasculares y linfáticas. Así tenemos

sus células presentes en la sangre, timo, ganglios linfáticos, placas de peyer, amígdalas. Dichas células incluyen fagocitos mononucleares, granulocitos, plaquetas y linfocitos. Las antecesoras de estas células son células madres hematopoyéticas pluripotenciales que se localizan dentro de la médula ósea, hígado fetal y saco vitelino (6,52).

Los linfocitos normalmente presentan una morfología homogénea aunque pueden presentarse algunas diferencias en núcleo y tamaño de citoplasma. Sobre la membrana de los linfocitos se encuentra una gran cantidad de moléculas diferentes, algunas de las cuales funcionan como receptores específicos para determinantes de un antígeno; esta característica hace a los linfocitos células especializadas que responden a un grupo limitado de antígenos relacionados estructuralmente.

Tomando como base su actividad inmunológica predominante, es posible diferenciar dos clases principales de linfocitos. Linfocitos T (timo-dependientes) que son los principales responsables de las reacciones inmunitarias mediadas por células; y linfocitos B, que tienen la capacidad de sintetizar anticuerpos y son los responsables de la respuesta inmune humoral (45,51).

LINFOCITOS B

Los linfocitos B representan cerca del 5-15% de los linfocitos circulantes y su reconocimiento depende de la propiedad que tienen para sintetizar inmunoglobulinas. Estas se producen sólo en cantida

des pequeñas, incorporándose a la membrana celular en donde actúan como receptores de antígenos. Estas células derivan de precursores específicos; las células pre-B que se desarrollan en los tejidos hematopoyéticos. Las células pre-B morfológicamente parecen células linfoides grandes con pequeñas cantidades de inmunoglobulinas citoplasmáticas, conforme va madurando va tomando el aspecto de un linfocito pequeño, pierde las inmunoglobulinas citoplasmáticas y aparecen las inmunoglobulinas de superficie.

Los linfocitos B se activan cuando se unen a su antígeno específico en presencia de células accesorias, el resto de los linfocitos B "vírgenes" comienzan a multiplicarse y a madurar hacia células efectoras o productoras de anticuerpo específico para dicho antígeno.

Este proceso provoca una expansión de clonas específicas las cuales se diferencian a células efectoras, que mientras no entren en contacto con el antígeno específico, funcionan como células de memoria. Se ha observado una regulación compleja en el crecimiento y maduración de los linfocitos B por moléculas producidas por los linfocitos T, estas moléculas son conocidas como interleucinas - (IL). No obstante que la activación de linfocitos B puede llevarse a cabo en ausencia de linfocitos T gracias a un antígeno T independiente, el desarrollo posterior de los linfocitos B se lleva a cabo en presencia de linfocitos T e IL (8,45,51).

LINFOCITOS T

Los linfocitos T constituyen una población uniforme de células involucradas en el reconocimiento de antígeno para reacciones inmunes mediadas por células, incluyendo la hipersensibilidad tardía. Los precursores celulares de los linfocitos T provenientes del tejido hematopoyético entran al timo donde se lleva a cabo un proceso de maduración. El timo está formado por dos lóbulos rodeados por una delgada cápsula de tejido conectivo, en el cual podemos distinguir dos compartimientos: la corteza y la médula. Se ha aceptado que los timocitos inmaduros aparecen primero en la periferia de la corteza y avanzan centralmente a la médula para complementar su diferenciación y posteriormente migrar a los tejidos linfoides periféricos como linfocitos T maduros. Dentro del timo ocurren eventos importantes, determinando la especificidad de los linfocitos T periféricos del individuo.

Dos de las principales subclases de linfocitos T (linfocitos T cooperadores y linfocitos T "supresores" citotóxicos muestran un tipo complejo de especificidad antigénica y una proteína autóloga de membrana codificada por el complejo de histocompatibilidad (MHC). Parece que los linfocitos T con esta capacidad pueden ser seleccionados dentro del timo (26, 31, 45, 51, 60, 66)

LINFOCITOS T COOPERADORES

El linfocito T cooperador no reconoce directamente al antígeno libre; reconoce péptidos asociados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad

bilidad tipo II (MHC II) de las células presentadoras de antígeno (APC). Los fragmentos de péptidos son el resultado de la acción de las proteasas de las células APC sobre antígenos de tipo viral, bacteriano, parásito, etc. Estos fragmentos son enlazados por el MHC-II y presentado en la superficie celular de la célula APC. (9b, 29b).

La actividad de las células presentadoras de antígeno es expresada principalmente por macrófagos, células epiteliales de Langerhans, queratinocitos, células de Kuupfer, células dendríticas o interdigitales (29b, 51).

El receptor del linfocito T cooperador tiene especificidad para la molécula MHC II y al péptido antigénico presentado; así el linfocito T cooperador por medio de su receptor reconoce el complejo presentado, capta la señal, es estimulado para cooperar con un linfocito B que laborará una respuesta inmune humoral, mediante una expansión clonal que provocará la formación de células productoras de anticuerpo y células B de memoria, y también por otro lado coopera con un linfocito T que elaborará la respuesta inmune celular -- por medio de linfocitos T sensibilizados. (9b, 29b).

Los linfocitos T cooperadores humanos pueden ser identificados por métodos basados en el reconocimiento de antígenos marcadores de su superficie, receptores para la porción Fc del anticuerpo Ig M monomérico y por glicoproteínas estables de membrana conocidas como antígeno T₄, 62 KT₄, 62 KD, identificados por los anticuerpos monoclonales OKT₄, CD₄ y Leu 3 (64).

Mosman y Coffman (1987) describen en un modelo murino, la presencia de dos tipos de linfocitos T cooperadores, T_{H1} y T_{H2} . El primer tipo de linfocito T cooperador T_{H1} sintetiza IL-2 e interferón gamma (IF γ), mientras que el segundo tipo T_{H2} sintetiza IL-4 e IL-5. Ambos tipos de linfocitos producen IL-3, factor estimulante de granulocitos, macrófagos (GM-CSF) y ciertas proteínas en respuesta a la inducción. Los linfocitos T_{H1} al producir IF γ estimulan la expresión de antígenos Ia en macrófagos, mientras que la IL-4 producida por linfocitos T_{H2} estimula la expresión de Ia en células B y macrófagos, así ambos linfocitos tienen la capacidad de regular la expresión de Ia y pueden aumentar la sensibilidad de la respuesta inmune con bajas cantidades de antígeno. (33b).

LINFOCITOS T SUPRESORES

Los linfocitos T supresores fueron reconocidos como una estirpe celular aparte por mucho tiempo, atribuyéndole la capacidad de suprimir respuestas inmunes y cuya activación requería la presencia de otras células, inclusive, en ratones se habían descrito dos vías de supresión, en las cuales intervenían diferentes tipos de células supresoras así, como factores supresores específicos que interactuaban entre ellos para finalmente actuar sobre linfocitos T cooperadores o bien sobre linfocitos que participaban en respuestas inmunes celulares como la de hipersensibilidad tardía. (45, 61).

Möller en 1988 cuestiona la existencia de los linfocitos T supresores en base a los trabajos publicados por diversos investigadores y los propios; y comenta que hay por lo menos tres buenas razones

para preguntarse la existencia de los linfocitos T supresores. La primera consiste en que no hay un marcador que diferencie a los linfocitos T supresores de los linfocitos T citotóxicos, por lo tanto, nunca se ha visto una suspensión pura de linfocitos T supresores; la segunda es que el gene supresor I-J no se ha encontrado en el sitio donde este fue mapeado y la tercera, en las clonas o híbridonas de linfocitos T supresoras antigéno específicos no se ha encontrado genes funcionales para el receptor de linfocitos T, en contraste con las clonas cooperadoras y citotóxicas que tienen genes funcionales para el receptor de linfocitos T (31 b).

En contra parte otro grupo de investigadores siguen apoyando la existencia de linfocitos T supresores que actúan regulando la respuesta inmune. Así tenemos a Sercaz y Krzych (56b) quienes describen a linfocitos supresores como un tipo celular y con especificidad distinta a los linfocitos T cooperadores y sostienen la idea que los linfocitos T supresores $CD\ 8^+$ son linfocitos únicos y con una función definida.

LINFOCITOS T CITOTOXICOS

Las células T actúan como efectores importantes de respuestas inmunes y uno de los medios más importantes que permiten dicha activación es la lisis de células portadoras de antígenos para los cuales son específicos. De esta forma, reconocen células acarreadoras de antígenos extraños de superficie, aún para ellas mismas como antígenos de histocompatibilidad, antígenos tumorales y antígenos específicos de virus expresados sobre células infectadas.

Los linfocitos T citotóxicos provienen de células T precursoras y en su replicación y diferenciación intervienen unas células T cooperadoras o amplificadoras. La función de dichas células se produce con la presencia de factores solubles. El factor más estudiado de este tipo es la IL-2.

Los linfocitos T citotóxicos lisan las células mediante un proceso complejo. En un estado de unión inicial, probablemente representando reconocimiento de células T y moléculas clase I sobre la célula blanco, es seguido por una etapa de programación para la lisis, en la cual la célula T causa una lesión en la célula extraña y finalmente ocurre la lisis de la célula (45).

Los linfocitos T citotóxicos poseen receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina Ig G y la mayoría de ellos presentan marcador de superficie CD₈+ y reconocen al antígeno en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (51).

Por conservar la forma de distinguir las subpoblaciones de linfocitos T seguiremos llamando en este trabajo a los linfocitos T citotóxicos como linfocitos T supresores/citotóxicos.

OTRAS RESPUESTAS INMUNES DEPENDIENTES DE LINFOCITOS T

Los linfocitos T también se ven involucrados en mecanismos de hipersensibilidad de tipo tardío y sensibilidad por contacto, en rechazo de injertos, reacción de injerto contra huésped. Un mecanismo análogo al de hipersensibilidad es la activación de macrófagos,

la cual ocurre bajo la influencia de productos de linfocitos T (45).

HIPERSENSIBILIDAD

El término de hipersensibilidad se aplica cuando la respuesta inmune de un individuo actúa de una forma exagerada o inapropiada causando daño tisular. La hipersensibilidad es característica de cada individuo y se presenta cuando se tiene contacto por segunda vez con el antígeno provocador de la hipersensibilidad. (51).

Coombs y Gell han descrito cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad (tipo I, II, III y IV). En la práctica dichas reacciones no ocurren separadas una de otra. Los tres primeros tipos de reacciones son mediadas por anticuerpos y son llamadas comúnmente como "hipersensibilidad inmediata". La reacción de hipersensibilidad tipo IV esta mediada primariamente por linfocitos T y macrófagos y es llamada comúnmente como "hipersensibilidad tardía" (9c, 51).

TIPO I. Ocurre cuando el anticuerpo de tipo Ig E actúan contra un antígeno inocuo tal como el polen. Los anticuerpos IgE fijados a las membranas de las células cebadas o de basófilos, reaccionan contra el antígeno, desencadenando la liberación de mediadores como - histamina, sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A) ahora leucotrienos y el factor quimiotacticodeosinofílico de la anafilaxia (ECF-A). Este es el mecanismo responsable en la atopia y - anafilaxia.

TIPO II. Incluye dos tipos de reacciones, citotóxica y estimulato

ria, ambas dependientes de anticuerpos y ocurren cuando el anticuerpo unido al antígeno sobre las células blanco conduce a la fagocitosis o a la activación del complemento provocando la lisis de las células.

TIPO III. Esta reacción se desarrolla por la formación de complejos constituidos por antígeno unido al anticuerpo, los cuales pueden conducir a la activación del complemento, con lo cual los poli morfos son atraídos y ocurre la degranulación provocando daño tisular. La reacción de Arthus y la enfermedad del suero son ejemplos de este tipo de reacción.

TIPO IV. Los linfocitos T quedan sensibilizados con el primer encuentro con el antígeno. Durante el segundo encuentro con el antígeno los linfocitos T producen linfocinas, las cuales activan macrófagos e inducen reacciones inflamatorias. La dermatitis por -- contacto se incluye en este tipo de hipersensibilidad (51).

ANTECEDENTES

En la Dermatitis Polimorfa Lumínica se ven implicados mecanismos de hipersensibilidad Tipo IV o mediada por células, según la clasificación de Coombs y Gell (9c). Se acepta actualmente que los desórdenes de este padecimiento se encuentran mediados inmunológicamente y que pueden ser el resultado de un desbalance en la población de linfocitos T (13, 14, 16, 40, 46).

Dicho padecimiento también es conocido como Síndrome Cutáneo Guatemalteco (10), Dermatitis Solar, Dermatitis Actínica, Prurigo Actínico (28, 29, 32), Erupción Polimorfa Lumínica (1, 12, 18, 24, 44, 65) término descrito por el Reino Unido (29) y en nuestro país se ha descrito como Dermatitis Polimorfa Lumínica (DPL) (57). Todos estos términos describen una enfermedad cuyo signo clínico más importante es la presencia de lesiones exematosas, vesículas eritematosas, erupción prurítica en la piel, localizadas en áreas expuestas al sol. Estas lesiones son el resultado de una fotosensibilización de la piel a la luz solar, específicamente a los rayos de la región UVB (240-320 nm) y raramente a los rayos de la región UVA (320-400 nm) (15, 20, 23, 25, 62).

La DPL es incluida en el grupo de fotodermatitis idiopáticas (3,33) y se considera que en México ocupa el noveno lugar de frecuencia dentro de las dermatosis en personas de condición socioeconómica baja, con una incidencia de 1.5 a 1.8% del total de pacientes en diferentes instituciones (57). La duración media de la enfermedad puede ser de 10.5 años (22), o por un periodo de tiempo de 7-14 años o

más (57). La piel clara parece ser más susceptible a los rayos solares (4), aunque este padecimiento aparece en todas las razas, a cualquier edad, pero con predominancia en la primera y segunda década de la vida (14, 21, 63), y con mayor frecuencia en mujeres que en hombres con una variación 2:1 (55, 56, 63).

CUADRO CLINICO Y FISIOPATOLOGIA

Los pacientes con DPL pueden presentar como síntomas iniciales picazón, eritema, ardor, pápulas, ronchas e inflamación sobre las áreas de piel expuestas a los rayos UVB; el tiempo de exposición para la aparición de dichos síntomas es variable pueden ser de 30 min. a 8 hrs. (22), pero en general se presentan dos días después de la exposición a rayos UVB (41).

De acuerdo a la morfología de las lesiones se puede observar un cuadro clínico único o una combinación de diferentes lesiones y en las cuales predominan: (10, 17).

- I. Forma eritematosa con lesión macular rosada o rojo vivo.
- II. Forma papular consiste de numerosas pápulas pequeñas, planas de color rosado a rojo oscuro, con proceso infiltrativo en su base. Es la lesión más característica de la DPL.
- III. Forma en placas su morfología es muy semejante a la anterior, diferenciándose solamente en el tamaño de las lesiones y se encuentran frecuentemente asociadas entre sí, siendo esta la

segunda lesión característica de la DPL.

- IV. Forma eczematosa con lesiones eritemato-exudativas, edema local y reacción inflamatoria en su periferia, parcialmente recubiertas por descamación blancogrisáceas húmedas y costrosas.
- V. Forma vesiculosa con vesículas tensas asociadas o no con pequeñas ampollas.

Estas lesiones cutáneas aparecen con peculiar simetría y su distribución topográfica varía de acuerdo con las regiones expuestas del cuerpo, pero es común observarlas en la cara, nuca, ambos lados del cuello, pecho, regiones descubiertas de los miembros superiores e inferiores. Sin embargo los sitios más frecuentes de reactividad son la cara y el cuello (22), en los cuales además de la morfología ya descrita se suman otros signos característicos como: (10).

- I. Lesión máculo-eritematosa o pigmentada que recubre toda la cara y en la región frontal, sólo la mitad inferior.
- II. Edema simétrico y bilateral sobre ambos párpados inferiores, el cual es más prominente en las formas agudas.
- III. Ausencia de lesiones en ambos párpados superiores, signo apreciable cuando el paciente cierra los ojos.
- IV. Presencia de piel sana en la región submentoniana, la cual

se rodea de piel enferma hacia los lados y hacia abajo, hasta el nivel de la "V" del pecho.

- V. Eritema o pigmentación con edema y deformaciones de ambos lóbulos de los pabellones auriculares.
- VI. Ausencia parcial de la mitad externa de las cejas, con cabellos rotos en su base o ausentes, causada por depilación manual como reacción al prurito.

Por otra parte, en algunos pacientes se puede observar una variación de sensibilidad de la piel a la exposición de rayos UVB, una causa posible puede ser el engrosamiento del estrato córneo o hiperpigmentación, el cual funciona como protector o bloqueador de los rayos UVB (14); otra causa posible son factores hormonales que pueden influir en dicha variación (25). Como ya se ha mencionado las lesiones de este padecimiento tienen la peculiaridad de seguir los límites y contornos de las áreas protegidas por las prendas de vestir (10), no obstante en algunos casos las lesiones se extienden a áreas de la piel no expuestas a los rayos UVB: (22, 57, 63).

INMUNOLOGIA DE LA DPL

Influencia de los rayos UVB sobre el sistema inmunitario.

Los rayos UV alteran el sistema inmune y ocasionan una disminución de las reacciones inmunitarias (53, 59). Esta inmunosupresión se puede manifestar como fenómeno localizado, generalizado o sistémico.

Como fenómeno localizado juegan un papel esencial las células de Langerhans, las cuales portan antígenos de histocompatibilidad HLA y son presentadoras de antígeno a linfocitos T (51, 56, 57). Cuando dichas células son irradiadas con rayos UVB su número decrece en un 20-50% (59), pierden la capacidad de ser presentadoras de antígeno y con esto la capacidad de inducir una estimulación y una proliferación de linfocitos T.

La inmunosupresión generalizada o sistémica ha sido estudiada principalmente en ratones, en los cuales dicho fenómeno se debe a la liberación de mediadores solubles. Un candidato de mediador soluble es el ácido urocánico, que juega el papel de fotoreceptor en el tálapo córneo, el cual después de la irradiación con UVB puede inhibir la liberación de interleucinas y la expresión de Ag - Ia, en ratones. Otros candidatos de mediadores solubles son las prostaglandinas cuya liberación se ve aumentada con la irradiación de rayos UVB. Las prostaglandinas disminuyen la síntesis de interleucina 2 y la proliferación de linfocitos T. Sin embargo, se ignora hasta el momento si en el hombre la inmunosupresión generalizada se debe, como en los ratones, a la liberación de mediadores solubles (56).

Por otra parte exámenes inmunohistológicos de secciones de piel humana normal (no expuestas a rayos UV) han demostrado la presencia de linfocitos T, el 90% de ellos, localizados alrededor de vénulas postcapilares, vasos superficiales y junto a capas basales de la epidermis y de folículos pilosos. Estas células pertenecen a la subpoblación de linfocitos T cooperadoras/inductoras CD₄. El 10% restante de estos linfocitos T pertenecen a la subpoblación supresora

ra/citotóxica CD_8 localizados en las zonas intraepidérmica y subepidérmica. La presencia de linfocitos B no ha sido detectada (14,50).

También se ha descrito la presencia de citocinas como interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF) en membranas epidérmicas del estrato granuloso y espinoso de piel humana normales. Después de exponer la piel a una radiación UVB la intensidad de tinción para la IL-1 y TNF se incrementa moderadamente e incluye la capa de células basales; este hecho sugiere fuertemente que el TNF puede ser producido por los queratinocitos y también probablemente por células de Langerhans (43).

Otro fenómeno que ocurre poco después de ser irradiada la piel con rayos UVB es la inflamación cutánea. En el infiltrado inflamatorio (tomado de biopsias) se ha reportado la presencia de neutrófilos, monocitos, una mayoría de linfocitos T cooperadores/inductores CD_4 y pequeñas cantidades de linfocitos T supresoras/citotóxicas CD_8 (9, 19, 30, 50). Según Markey (30) un posible mecanismo que lleve a los linfocitos cooperadores a la piel, puede ser un antígeno soluble que activa a los linfocitos y lo lleva de la circulación sanguínea a la piel. La migración inicial de linfocitos T a los tejidos cutáneos incluye la adhesión de estos al endotelio y alternativamente se da una proliferación selectiva in situ de linfocitos T cooperadores en el sitio del estímulo antígeno.

En contra parte Taylor (62) señala que en humanos la exposición a la luz solar incrementa a las células OKT_8 ("supresoras") y decrece la población de células OKT_4 (cooperadoras) y que además se da una

depresión de células naturales asesinas (NK).

Por lo expuesto hasta el momento es claro que los rayos UVB son capaces de afectar la respuesta inmune en el hombre, en el caso de la DPL dicha respuesta es considerada como hipersensibilidad tipo IV, debido a los signos clínicos de enfermedad, el tiempo entre el estímulo y la respuesta, la estrecha relación con los padecimientos - alérgicos y autoinmunes y por su apariencia histológica dominada - por un denso y agregado infiltrado de linfocitos (24, 33, 34, 40, - 41, 57).

Las causas de la DPL son hasta el momento desconocidas, aunque algunos autores indican que el mecanismo que desata este padecimiento - es un disturbio en el metabolismo del triptofano que provoca una - acumulación de ácido quinurénico que actúa como fotosensibilizador en la piel (20, 38). En sus estudios Baranda y col. (5), sugieren que la luz UVB modifica antígenos cutáneos autólogos los cuales - provocan una respuesta inmune de tipo celular. Otros autores sugieren que los rayos UVB agregados a los factores genéticos y estado - nutricional deficiente en proteínas, probablemente promuevan cambios químicos en los componentes de la piel que se vuelven antígenos y provocan una sensibilización de los linfocitos T y una activación de la respuesta inmune hacia los sitios donde se producen las lesiones (42, 57).

Se han realizado caracterizaciones de tipo histológico-inmunológico (por medio de biopsias) de las lesiones producidas por la DPL, en la cual se ha encontrado un denso infiltrado de linfocitos T con -

una disposición perivascular en la dermis superior y con una predominancia de linfocitos T cooperadores CD₄ sobre linfocitos T citotóxicos CD₈ (33, 41).

Muhlbauer (34) examinó biopsias de pápulas de 8 pacientes con DPL, en las cuales encontró un infiltrado de linfocitos T y en la mayoría de los casos dicho infiltrado estuvo caracterizado por subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos/supresores. Estos datos hacen suponer al autor que el daño en la dermis superior de vénulas es mediado por linfocitos T y células de Langerhans, que además juegan el papel de presentadoras de antígeno a los linfocitos T; también supone que las células T están acumuladas en respuesta a un antígeno formado en la zona vascular o perivascular a causa de radiaciones de rayos UVB.

En otra publicación este mismo autor (35) informa de otro estudio de biopsias de pacientes con DPL, en el cual identificó depósitos de fibrina intravascular y perivascular y pequeñas cantidades de IgM y complemento. Argumenta que posiblemente el daño a la microvasculatura puede estar relacionado a la liberación de linfocitos a un efecto citotóxico de linfocitos T.

En estudios de valoración de linfocitos T en sangre periférica de pacientes con DPL se ha encontrado un ligero incremento de linfocitos T supresores y la relación cooperación/supresión se observan sin cambios con respecto a los controles (33).

Finalmente dentro de las últimas publicaciones tenemos un estudio -

de pacientes con DPL, también en sangre periférica, en el cual se encontró una disminución de los porcentajes de linfocitos T supresores OKT_8 , una ligera disminución de linfocitos T cooperadores OKT_4 y un aumento en la relación cooperación/supresión OKT_4/OKT_8 (57).

TRATAMIENTO DE LA DPL

La DPL en algunos casos puede ser tratada exitosamente reduciendo la exposición al sol combinada con la aplicación tópica de preparaciones fotoprotectoras adecuadas, (1). Actualmente estas preparaciones fotoprotectoras contienen dos o tres absorbentes de rayos UVB que bloquean un alto porcentaje de estas radiaciones. Dichos absorbentes incluyen: dióxido de titanio, talco, óxido de zinc, kaolin, cloruro férrico, ictiol, ácido para-aminobenzoico (PABA), benzofenonas tales como oxybenzonas y dioxybenzona, cinamatos como etilhexil-para-metoxicinamato (2-EHMC) usado comúnmente en Europa, y un nuevo compuesto butilmetoxidibenzoil metano, el cual absorbe la radiación ultravioleta a un máximo de 358 nm (55, 59, 62).

Existen otros tratamientos alternativos, a los cuales se acude cuando las preparaciones fotoprotectoras no dan los resultados esperados; ejemplo de ellos son: la fotoquimioterapia de psoralen oral (8 metoxipsoralen) más radiaciones UVA, mejor conocido como PUVA; radiaciones de UVB, los cuales suelen tener éxito cuando son aplicados en la etapa temprana de la primavera. Los pacientes de la DPL tratados con esta terapia presentan una tolerancia al sol. Este mecanismo de tolerancia no es muy conocido, pero se cree que la exposición con PUVA y UVB forman un engrosamiento y curtido del estrato

córneo junto con alteraciones en la inmunidad celular y disminución de las células de Langerhans (1, 3, 12, 44). Estos tratamientos de fototerapia y quimioterapia son comúnmente efectivos, pero ocasionalmente pueden disparar a la DPL (40).

La nicotinamida oral también es usada como tratamiento en la DPL, - cuya dosis consiste en 3g diarios durante dos semanas. Este tratamiento apoya la hipótesis de que la DPL puede ser causada por un error en el metabolismo del triptófano resultando en una acumulación de ácido quirureico, cuyos niveles son abatidos por la nicotinamida (20, 38).

Otros tratamientos no muy efectivos en la DPL consisten en la aplicación de B carotenos, dichos pigmentos provocan una fotoprotección sistémica. Los B carotenos combinados con un protector solar como la sulsibenzona han provocado mejoramiento en algunos pacientes con DPL (39, 65). Algunos otros tratamientos consisten en la aplicación tópica de indometacina (inhibidor de prostaglandinas) la cual reduce la respuesta inflamatoria a radiaciones de UVB.

Para exacerpciones agudas se usan generalmente azathioprina (40), corticoesteroides tópicos, antimalariales, aunque estos últimos no son muy usados debido a sus efectos tóxicos (14, 15, 40, 59), y recientemente se ha aplicado la talidomida con buenos resultados (29, 37).

La talidomida es un derivado del ácido glutámico, la N-ftalil-glutarida, medicamento sintetizado por Kuntz y col en 1953 en Alemania

y usada preferentemente por su notable acción hipnótica, sedante y antiemética. Desafortunadamente la droga, probó ser teratogénica y por esta razón fue desechado su uso general. Otros efectos colaterales mayores de la droga incluyen neuropatía periférica y mixoedema (29, 37, 47, 59, 67).

La talidomida ha probado su valor en diferentes padecimientos como artritis reumatoide y recientemente para evitar el rechazo injerto contra huésped (graft-versus host disease GVHD) que es la causa común de muerte después del trasplante de médula ósea. (47, 48). - Dermatológicamente se ha aplicado en la reacción leprosa en la cual es útil solamente en la sinología y sintomatología de la reacción leprosa, sin acción en la lepra misma. En Lupus Eritematosa Discoide se ha observado una rápida remisión del cuadro clínico, (37, 54, 59).

Varios investigadores han tratado a la DPL con talidomida; Londoño en 1973 trató 34 pacientes que padecían DPL con una dosis de talidomida de 300 mg para adultos y una dosis proporcional para los niños. En 32 de los 34 pacientes se obtuvieron buenos resultados, en los dos pacientes restantes, uno de ellos presentó un mejoramiento aceptable y en el otro no hubo mejoría. Se notó que el tiempo de mejoría fue más largo que en lepra, y que en todos los casos las lesiones reaparecieron cuando la droga fue descontinuada (28).

Saul, Flores y Novales (1976) trataron 25 pacientes con DPL con talidomida con una dosis de 100-200 mg/dfa. Se observó un mejoramiento del 88% de los pacientes después de un promedio de 15 días. La

droga fue descontinuada en 20 pacientes (80%) y 12 pacientes (50%) permanecieron asintomáticos un año después de que la terapia fue -- descontinuada. (55).

Lovell (1983) trató 14 pacientes con DPL, la dosis inicial diaria de talidomida fue de 50-100 mg para los niños y 100-200 mg para los adultos; 13 de 14 pacientes resultaron beneficiados con el trata- - miento, el paciente restante fue incapaz de tolerar una dosis sufi- - ciente debido a desvanecimientos. Tres pacientes quedaron libres - de síntomas después de descontinuar la droga, ocho pacientes requi- - rieron mantener la terapia entre 50-100 mg semanalmente y 100 mg - diarios. Dos pacientes recayeron en terapia; no se observaron efec- - tos colaterales mayores. El mismo autor recomienda evitar el embara- - zo en mujeres de edad fértil que se someten al tratamiento con tali- - domida. (29).

En otro tipo de investigaciones se ha tratado de observar el efecto que tiene la talidomida directamente sobre células del sistema inmu- - ne, por ejemplo, Roath en 1963 demostró que la incorporación de la talidomida comercial a cultivos de leucocitos humanos provocaba la inhibición en el desarrollo de éstos y que a una mayor concentra- - ción de talidomida se daba una mayor inhibición blástica (50). Más recientemente Shanon en 1989 investigó el efecto in vivo de la ta- - lidomida en linfocitos T humanos. Después de administrar la talido- - mida a una dosis de 100 mg diarios por 4 días, analizó con anticuer- - pos monoclonales anti leu 3a y encontró una reducción en la subpo- - blación de linfocitos T cooperadores/inductores, esta reducción fue en números absolutos y en porcentaje, en cambio al utilizar el anti

cuerpo monoclonal Leu 1 anti pan T no encontró ningún cambio en los linfocitos T. Estos hechos lo llevan a investigar si la talidomida tiene un efecto de impedimento estérico sobre el epitopo Leu 3a de la subpoblación de linfocitos T cooperadores/inductores. En estudios in vitro utilizando células mononucleares 1×10^6 células/500 μ l y adicionando talidomida a una concentración de 1μ g/10 μ l, no encontró diferencia entre el grupo de células con talidomida y el grupo de células testigo; además notó que la intensidad de la fluorescencia de las células T, de las subpoblaciones T supresoras y T cooperadoras parecía similar; por lo tanto concluye que la talidomida en condiciones in vitro no afecta la superficie antigénica de las células (58).

Actualmente se acepta que la talidomida es un potente agente inmuno supresor que carece de los efectos tóxicos de los esteroides, y de aquí, su uso en pacientes con desórdenes autoinmunes que no toleran la administración de estos últimos (28, 37, 47, 48, 49).

Como ya se ha mencionado, varios investigadores, han tratado anteriormente la DPL con talidomida, (28, 29, 55) reportando resultados alentadores en el mejoramiento clínico de los enfermos tratados. - Por este motivo, resulta interesante valorar inmunológicamente a los pacientes que se someten a dicho tratamiento, para observar el efecto de la droga, en los parámetros inmunológicos.

Por lo tanto y tomando en cuenta el papel inmunosupresor que se le atribuye a la talidomida (28, 37, 47, 48, 49), esperamos encontrar diferencias en las valoraciones de la inmunidad celular de pacien-

tes con DPL a nivel de sangre periférica por medio de las pruebas de factor de inhibición de la migración de linfocitos humanos (LIF), pruebas intradérmicas con antígenos involucrados en la respuesta celular (PPD, candidina y varidasa), valoración de linfocitos T y B - mediante la técnica de rosetas, valoración de subpoblaciones de linfocitos T por medio de anticuerpos monoclonales y cuenta diferencial de leucocitos totales, antes y después de iniciar el tratamiento con talidomida.

También se observará el efecto de la droga en cultivos in vitro de células linfoides, valorando las subpoblaciones de linfocitos T y la activación de los mismos por la adición de un mitógeno y la droga.

De esta forma con la presente investigación se pretende contribuir al esclarecimiento del mecanismo de acción de la talidomida en los parámetros inmunológicos en la DPL.

MATERIAL Y METODOS

EQUIPO

- Amplificadora fotográfica (Mod. 120 Solar, Chicago ILL.USA)
- Balanza analítica (Mettler H20. Greifense, Zurich, Suiza).
- Baño de 37°C (Thelco, Model 83. Precisión Científica, CO. Chicago USA).
- Centrifuga clínica (Solbat. Aparatos Científicos, México).
- Centrifuga clínica refrigerada (Model PR-2, International Equipment CO. USA).
- Congelador de -20°C (American, México).
- Contador de células (Clay Admas, Division of Becton, Dickinson and Company. N.J., USA).
- Contador de centelleo (Beckman, S 380, Beckman, Irvine, CA. USA).
- Cosechador de células (Watertown Mod 290. Cambridge Technology, - Inc. USA).
- Estufa 10-100°C (Thelco Mod. 4. GCA, Precision Scientific. USA).
- Hemocitómetro (Bright-Line, American Optical, Scientific Instrument Division, Buffalo, N.Y., USA).
- Incubadora de CO₂ (Napco Mod. 302. Scientific Company. Tualatin - Oregon USA).
- Micropipetas automáticas de 5-50 µl, 50-250 µl, 250-1000 µl y 1 µl (Labsystems Finnpipette, Finland,).
- Microscopio compuesto (Industrias Carl Zeiss de México, S.A. de C.V., México).
- Microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, West Germany, Industrias Carl Zeiss de México, S.A. de C.V., México).
- Olla de presión (Presto, Industrias Steele de México, S.A. México).

Potenciómetro (Conductronic.ph 20. México).
Refrigerador (American, México).
Termómetro de -20 a 110°C (Brannam. México).

MATERIAL

Bulbos de hule para pipetas
Cámaras de LIF
Cámara para guardar preparaciones
Cajas de Petri
Capilares
Cera
Cubreobjetos
Filtros milipore swinnex GS-25
Gradillas
Iman
Jeringas desechables de 1,5,10 y 20 ml. (estériles)
Ligaduras
Matraces Erlenmeyer de 250, 500 ml.
Matraces volumétricos de 500, 1000 y 2000 ml.
Membranas de fibra de vidrio
Membranas milipore tipo GS 0.22 μ m
Perlas de vidrio (estériles)
Pipetas mezcladoras para glóbulos blancos
Pipetas Pasteur de tallo largo (estériles)
Pipetas Pasteur
Pipetas graduadas de 1,2,5 y 10 ml.
Placas para cultivo con 96 pozos

Puntas para micropipetas

Probetas de 100, 250 y 500 ml.

Torundas de algodón con alcohol

Tubos de ensayo de vidrio de 12 x 75, 13 x 100 y 15 x 100

Tubos con tapón de baquelita de 16 x 150, 25 x 200 (estériles)

Vasos de precipitados de 150, 250, 500 y 1000 ml.

Viales de plástico para material radioactivo

Viales de 1 y 0.5 ml.

MATERIAL BIOLÓGICO, REACTIVOS Y SOLUCIONES

Azida de Sodio

CD₃ Anticuerpo monoclonal de ratón anticélulas T humanas, T₃ (Dako-T₃, Dakopatts, Denmark).

CD₄ Anticuerpo monoclonal de ratón anticélulas T cooperadoras/inductoras humanas, T₄ (Dako-T₄, Dako patts, Denmark).

CD₈ Anticuerpo monoclonal de ratón anticélulas T supresoras/citotóxicas humanas, T₈ (Dako-T₈, Dako patts, Denmark).

Anticuerpo de inmunoglobulina de ratón fluoroseinado (anti AB FIIC, Dako patts, Denmark).

Candidina dil 1:400, producto del sonicado de cultivo de Candida albicans.

Concanavalina A de Canavalia ensiformis tipo V (Sigma Chemical Company. ST. Louis Mo. 631, USA).

Eritrocitos de carnero (Granja del Departamento de Inmunología, - - ENCB, IPN, México, D. F.).

Hemolisina de conejo anti-glóbulos rojos de carnero (Granja del Departamento de Inmunología, ENCB, IPN, México, D. F.).

Heparina de 1000 UI/mil (Arbott Laboratories de México, S.A., México).

L-glutamina 200 mM (100x) (Invitro, S.A., México).

Limadura de Fierro.

Líquido de Centelleo.

Medio de Dulbecco, Iscove Modificado con L-glutamina, con buffer H₂O res 25 mM, sin bicarbonato de Sodio (Sigma Chemical Company. ST. - Louis Mo. 63178, USA).

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con sales de Earle con L-glutamina sin bicarbonato de Sodio (in vitro, S.A., México).

P.P.D. Tuberculina, purificado proteico dializado obtenido de M. tuberculosis 2 UT/0.1 ml. (S.S.A., México, D. F.).

Poly-L-Lysina. Hidrobromida ($C_6H_{12}N_2O-H-Br$) (Sigma Chemical Company ST. Louis. Mo. 63178 USA).

Solución de Alsever.

Solución de cristal violeta en ácido acético 2%.

Solución de cristal violeta al 1%.

Solución de FicoII-Hypaque densidad 1.077 ± 0.001 (20°C) (Lymphoprep. Nycomed Pharma As, Oslo, Noruega).

Solución de Formaldehido al 1% en S.S.A.

Solución de Montaje (glicerol 50% - S.S.A. 50%).

Solución Salina Amortiguada Ph 7.4 (S.S.A.).

Suero Fetal de Bovino para uso en cultivos de tejidos (In Vitro, - S.A., México).

Talidomida. Sintetizada por el Dr. Alfredo Everth Muñoz (Química - Orgánica ENCB, IPN, México, D. F.).

Timidina (Methyl- $3H$, radioactiva), (ICN Biomedicals, Inc. Irvine, - CA, 92715, USA).

Varidasa, enzimas de Streptococcus pyogenes, Estrepto cinasa 25U y

Strepto dornasa 62U.

Wright. Colorante. No. W.300 (Sigma Chemical Company ST. Louis. Mo. 67178, USA).

PREPARACION DE SOLUCIONES

1. Solución para reconstruir cada vial de anticuerpo monoclonal -

Agua destilada estéril	1.0 ml.
Glicerol	0.25 ml.
Azida de sodio	0.00125 g.

2. Medio de cultivo Iscove

Medio Iscove	0.425 g.
L-glutamina 200 mM	0.25 ml.
Penicilina-Estreptomicina	
10,000 UI/mcg/ml	0.25 ml.
Agua bidestilada	25 ml.

Bicarbonato de sodio al 7.5%

Medir aproximadamente 23 ml. de agua, agitar suavemente y agregar el medio Iscove hasta disolverlo, adicionar la L-glutamina y la penicilina-estreptomicina; adicionar el bicarbonato de sodio al 7.5% hasta alcanzar un pH de 7.2. Lavar al volumen final, esterilizar por filtración y almacenar a -20°C en oscuridad;

3. Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) (10x)

Con sales Earle con L-glutamina sin bicarbonato de sodio

Al medio se le agrega inmediatamente antes de su uso:

- a) Lo que se indique en las instrucciones del producto.
- b) Estreptomina, a una concentración final de 100 µg/ml.
- c) Penicilina, a una concentración final de 100 UI/ml.
- d) Bicarbonato de sodio al 7.5% hasta alcanzar un pH de 7.2.
- e) Suero generalmente fetal de ternera al 10%.

4. Líquido de Centelleo

2-5 Difeniloxazol (PPO)	4 g.
1,4-bis *2-(5 feniloxazol) benceno	2 g.
Etilenglicol	20 ml.
Tolueno	1000 ml.

Disolver el tolueno con sumo cuidado para evitar dermatitis de contacto.

5. Poly-L-Lysina

Pesar 50 mg. de Poly-L-Lysina y disolver en 1 ml. de agua destilada, distribuir en alicuotas de 20 µl y congelar a -20°C.

6. Solución de Alsever

Glucosa	20.50 g.
Citrato de Sodio Dihidratado	8.00 g.
Acido Cítrico monohidratado	0.55 g.
Cloruro de Sodio	4.20 g.

Aforar a 1000 ml. con agua destilada.

7. Solución Salina Amortiguada (SSA) pH 7.4

Solución A

Cloruro de Sodio	8.0 g.
------------------	--------

tar el pH a 7.4 y esterilizar a 121°C, durante 15 minutos.

8. Preparación de talidomida.

Pesar 2 mg. de talidomida, tratar de disolver lo mejor posible en 2 ml. de agua bidestilada, esterilizar por filtración y repartir en viales estériles, congelar a -20°C.

9. Colorante Wright.

Colorante Wright	2.0 g.
Glicerina neutra	40 ml.
Alcohol metílico	1000 ml.

Mezclar el colorante con la glicerina en un mortero. Adicionar poco a poco el metanol tratando de disolver el colorante, dejar sedimentar y separar por decantación el metanol.

dos individuos sanos, se adicionó la droga a una concentración de 1, 5, 10 μg , se activó con Concanavalina A, y se midió el grado de activación por la incorporación de Timidina tritiada.

El perfil inmunológico empleado en los pacientes y en los testigos sanos incluye:

OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES

1. Obtener de 10-14 ml. de sangre venosa heparinizada (150 UI).
2. Incubar a 37°C en posición vertical durante 30 min.
3. Obtener el plasma y adicionar 0.4 gr. de limadura de Fe.
4. Incubar a 37°C durante 30 min. agitando cada 10 min.
5. Recuperar la limadura de Fe con ayuda de un iman.
6. Estratificar en gradiente de densidad de ficoll-Hypaque 1.077 \pm 0.001g/ml (20°C).
7. Centrifugar durante 30 min. a 1500 rpm.
8. Separar la capa de células mononucleares de la interfase.
9. Lavar 3 veces con SSA.
10. Contar y ajustar según la concentración requerida.

DETERMINACION DE LINFOCITOS T (ROSETAS E)

1. Colocar en un tubo eritrocitos de carnero, lavar por centrifugación con SSA, a 2000 rpm/8min. 3 veces.
2. En otro tubo tomar 50 μl de los eritrocitos de carnero previamente lavados y 5 ml. de SSA, para tener una preparación al 1%.

Conteo de linfocitos T por el método de rosetas directas.

1. Agregar a 0.25 ml. de eritrocitos de carnero al 1%, 0.25 ml. de la suspensión de linfocitos (4×10^6), y se mezclan cuidadosamente.
2. Incubar a 37°C por 15 min.
3. Centrifugar a 500 rpm durante 2 min.
4. Guardar en refrigeración 18-24 hrs.
5. Aspirar parte del sobrenadante procurando no resuspender las células sedimentadas.
6. Resuspender el paquete celular con sumo cuidado, se toma una gota con pipeta pasteur y se coloca entre porta y cubreobjetos.
7. Leer el porcentaje de rosetas E con el objetivo de inmersión.
8. Para considerarse una roseta cada linfocito debe tener adheridos por lo menos tres eritrocitos.

DETERMINACION DE LINFOCITOS B (ROSETAS EAC)

Preparación de eritrocitos "sensibilizados" para la determinación de linfocitos B.

1. En un tubo colocar 50 μ l de eritrocitos de carnero (previamente lavados) y 1 ml. de SSA.
2. Agregar 1 ml. de hemolisina diluída con título subaglutinante.
3. Incubar a 37°C durante 30 min. con agitación frecuente.
4. Al término de la incubación los eritrocitos sensibilizados (EA) se lavan con SSA 3 veces, por centrifugación a 3000 rpm durante 8 min., al final se resuspenden en 1 ml. de SSA.
5. Se agrega 1 ml. de suero humano diluído como fuente de comple--

mento y se incuba a 37°C durante 30 min. con agitación frecuente.

6. Al término de la incubación los eritrocitos (EAC) se lavan 3 veces con SSA por centrifugación, a 3000 rpm durante 8 min.
7. El paquete se resuspende con 5 ml. de SSA.

Conteo de linfocitos B por el método de rosetas EAC o indirectas.

1. Agregar 0.25 ml. de eritrocitos de carnero al 1% "sensibilizados" y 0.25 ml. de linfocitos (4×10^6).
2. Centrifugar a 800 rpm durante 2 min.
3. Mantener a temperatura ambiente 15 min.
4. Aspirar parte del sobrenadante procurando no resuspender las células sedimentadas.
5. Se resuspende el paquete celular con sumo cuidado, se toma una gota con pipeta pasteur y se coloca entre porta y cubreobjetos.
6. Leer el porcentaje de rosetas EAC con el objetivo de inmersión.

DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T PERIFERICOS
LINFOCITOS T COOPERADORES/INDUCTORES Y LINFOCITOS SUPRESORES/CITOTOXICOS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

1. Colocar en un portaobjetos con pozos, una gota de Poly-L-lisina en cada uno, incubar 45 min.
2. Lavar 3 veces cada pozo con 30 μ l de SSA.
3. Agregar 20 μ l de la suspensión de linfocitos (1×10^6) a c/u de los pozos.
4. Dejar sedimentar durante 30-45 min. a temp. ambiente.
5. Lavar 3 veces cada pozo con 30 μ l de SSA.

6. Agregar 30 μ l de formaldehído al 1% en PBS en c/u de los pozos.
7. Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
8. Lavar cuidadosamente de 3-5 veces con 30 μ l de SSA.
9. Agregar 20 μ l del anticuerpo correspondiente en los pozos.
10. Incubar 20 min. a temperatura ambiente.
11. Lavar cuidadosamente de 2-3 veces en SSA.
12. Agregar 20 μ l de anti-anticuerpo pegado a fluoresceína.
13. Incubar a temperatura ambiente durante 20 min.
14. Lavar 2-3 veces en SSA.
15. Agregar una gota de glicerol 50% en SSA en c/u de los pozos.
16. Colocar cubreobjetos y observar al microscopio de fluorescencia.
17. En cada pozo contar un total de 100 células e incluir las que - fluorescen. Reportar en porcentaje.

FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACION DE LEUCOCITOS HUMANOS

Todo el proceso se debe hacer en condiciones de esterilidad.

1. Se obtienen 20 ml. de sangre por punción venosa, en una jeringa que contenga 250 UI de heparina, se mezcla bien y se deja sedimentar en la jeringa en posición ligeramente inclinada a 37°C.
2. La incubación se continua durante 45 min., hasta que haya una buena separación de los eritrocitos. Sin mover la jeringa se - dobla la aguja hacia abajo y presionando el émbolo se transfiere plasma rico en leucocitos a un tubo estéril de 13 x 100 mm. con tapa de rosca.
3. Los leucocitos se centrifugan a 2000 rpm, 10 min. y se lavan - dos veces con Alsever por centrifugación en las mismas condiciones.

4. El último sedimento se resuspende en 0.5 ml. de medio de cultivo y se hace una cuenta celular.
5. Las células se ajustan a una concentración de 5×10^6 /ml.
6. Con la suspensión anterior se llenan capilares, se sellan al calor y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min.
7. Cada capilar se corta en la interfase, células sobrenadante y - la porción que contiene el paquete celular se coloca en la cámara de MIF, se fija sobre la gota de silicón.
8. Se pueden colocar dos capilares por cámara, en posición tal - - (en V) que las áreas de migración no se mezclen.
9. Ya fijos los capilares, las cámaras se cubren con un cubreobjetos y estos se sellan con parafina.
10. Las cámaras se llenan por los orificios laterales, una con medio de cultivo y la otra con una décima de antígeno.
11. Deben llenarse completamente, sin dejar burbujas.
12. Se sellan los orificios con parafina, y las cámaras se incuban perfectamente horizontales a 37°C por 24 hrs.
13. A las 24 hrs se miden las áreas de migración, proyectar las cámaras directamente sobre papel por medio de una amplificadora - fotográfica. Se calcula el índice de migración al dividir el - peso de la migración obtenida con el Ag entre el peso de la migración obtenida en el testigo. Si los capilares incubados con antígeno se obtiene un índice de migración de 0.85 o menor, es que hubo producción de LIF y si es mayor de 0.85 nos indica una no producción de LIF y por lo tanto que el individuo no tiene - respuesta inmune celular, hacia el antígeno probado.

PRUEBAS DERMICAS

1. Limpiar con alcohol, la cara anterior del antebrazo del individuo al que se le va a practicar la prueba.
2. Inyectar 0.1 ml. de solución de antígeno por probar (PPD, variada, candidina) por vía intradérmica en la zona seleccionada.
3. Al cabo de 24 o 48 hrs. buscar la presencia de eritema e induración en el sitio donde se aplicó el antígeno.
4. En caso de que haya habido reacción, medir el diámetro en mm. - con ayuda de una regla transparente.
5. Una reacción negativa o menor de 5 mm. de diámetro, indica que el individuo no está "sensibilizado" (inmunidad de tipo celular) al antígeno empleado.

CUENTA DE LEUCOCITOS.

1. Hacer una dilución de la sangre heparinizada 1:20 con cristal - violeta en ácido acético.
2. Contar en la cámara de Neubauer.
3. Hacer los cálculos necesarios.

TINCION DE WRIGHT

1. Hacer frotis sanguíneo.
2. Cubrir el frotis con Wright, dejar 10 min.
3. Adicionar igual cantidad de agua de la llave y dejar 15 min. - más.
4. Lavar con agua de la llave, pero dejando llenar sin escurrir.

5. Colocar verticalmente, secar.
6. Observar.

EFECTO DE LA TALIDOMIDA EN LA ACTIVACION CELULAR

Todo el proceso se debe hacer en condiciones de esterilidad.

1. Obtener de 25-30 ml. de sangre venosa y defibrinarla.
2. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 min.
3. Marcar el volúmen total de la muestra y eliminar el suero; llevar con SSA al nivel marcado y homogenizar.
4. Estratificar en gradiente de densidad de ficoll-Hypaque 1,077+ 0.001 g/ml (20°C).
5. Centrifugar a 1500 rpm durante 30 min.
6. Obtener la capa de células de la interfase.
7. Lavar una vez con Alsever y dos veces con medio de cultivo Iscove.
8. Contar y ajustar las células a una concentración de 1×10^6 - - cel/ml.
9. Colocar en la caja de cultivo 200 μ l de la suspensión celular - por cada pozo y la concentración correspondiente de la droga - (1 μ g, 5 μ g, 10 μ g).
10. Agregar 5 μ l de concanavalina A a una concentración de 2.5 μ g a c/u de los pozos.
11. Incubar a 37°C en atmósfera de CO₂ durante 72 hrs.
12. Agregar un pulso de timidina tritiada 18 hrs. antes de concluir el tiempo de incubación.
13. Cosechar en el microcosechador y colocar la membrana de fibra - de vidrio en c/u de los viales. Agregar 3 ml. de líquido de -

centelleo y leer en el contador.

EFEECTO DE LA TALIDOMIDA SOBRE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

Todo el proceso se debe de hacer en condiciones de esterilidad.

1. Obtener de 25-30 ml. de sangre venosa y defibrinarla.
2. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 min.
3. Marcar el volumen total de la muestra y eliminar el suero, llevar con SSA al nivel marcado y homogenizar.
4. Estratificar en gradiente de densidad de ficoll-Hypaque 1.0077± 0.001 g/ml (20°C).
5. Centrifugar a 1500 rpm durante 30 min.
6. Obtener la capa de células de la interfase.
7. Lavar una vez con Alsever y dos veces con medio de cultivo Iscove.
8. Contar y ajustar las células a una concentración de 1×10^6 - - cel/ml.
9. Valorar subpoblaciones de linfocitos T con los correspondientes anticuerpos monoclonales.
10. Colocar en la caja de cultivo 200 μ l de la suspensión celular - por cada pozo la concentración correspondiente de la droga (1 μ g, 5 μ g, 10 μ g), se deja un testigo sin antígeno.
11. Incubar a 37°C en atmósfera de CO₂. Tomar una muestra de cultivo a las 24, 48 y 72 hrs., valorar subpoblaciones de linfocitos T.

RESULTADOS

Las muestras de los pacientes con DPL y de los individuos sanos fueron examinadas bajo las mismas condiciones en el laboratorio y los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por la prueba de U de Mann Whitney, para datos pareados no paramétricos. (11).

LINFOCITOS B (ROSETAS EAC)

Los resultados obtenidos de la valoración de linfocitos B (rosetas EAC) fueron los siguientes: Para individuos sanos se obtuvo un porcentaje de 37.2 ± 6.1 (Tabla I y IV), para pacientes con DPL antes de tratamiento con talidomida un porcentaje de 41.1 ± 9.22 (Tabla II y IV), y para los pacientes después del tratamiento (Tabla III y IV) un porcentaje de 38.1 ± 9.2 . Como puede observarse hubo poca variación entre los valores obtenidos y al realizar el análisis estadístico, este no revela ninguna diferencia significativa en los valores ni para antes ni para después del tratamiento.

En la Gráfica I se puede observar la distribución de los valores de los linfocitos B de los individuos sanos y de los pacientes con DPL, antes y después del tratamiento, en la cual podemos observar que 3 pacientes para antes del tratamiento (ERM, AAV, RG) presentaron porcentajes ligeramente elevados en comparación con individuos sanos.

Si comparamos la distribución de los valores de linfocitos B de los pacientes antes y después del tratamiento con talidomida (Gráfica I) observamos que de los 4 pacientes que antes del tratamiento presen-

taban una ligera elevación de linfocitos B, después del tratamiento con talidomida dicha elevación disminuyó a parámetros normales en 2 pacientes (RG, AAV), y en uno (ERM) disminuyó ligeramente.

LINFOCITOS T (ROSETAS E)

Los linfocitos T fueron determinados por el método de formación de rosetas E, y se obtuvo una reducción significativa con un promedio de 42.5 ± 11.8 , $P = 0.001$ (Tabla II y IV) para antes del tratamiento y de 39.0 ± 11.9 , $p = 0.0001$ para después del tratamiento (Tabla II y IV), con respecto a los resultados obtenidos para individuos sanos, 54.2 ± 4.12 (Tabla I y IV).

En la Gráfica II se observa la distribución de los valores obtenidos de linfocitos T de pacientes con DPL antes y después del tratamiento con talidomida, donde se notan valores variables, que van de 26-70%; para los individuos sanos se observa una distribución más homogénea con porcentajes más altos de 40-78%. En la misma Gráfica se puede apreciar, que los valores de linfocitos T para los pacientes después del tratamiento disminuyeron aún más (de 29 a 60%) en comparación con los valores obtenidos antes del tratamiento.

LINFOCITOS T TOTALES PERIFERICOS DETERMINADOS CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI CD₃

Para los pacientes con DPL antes del tratamiento se obtuvo un porcentaje de linfocitos T totales periféricos de 62.6 ± 6.73 (Tabla II y V), para después del tratamiento el porcentaje determinado fue

de 55.1 ± 7.8 (Tabla II y V), para los individuos sanos se obtuvo un porcentaje de 64.8 ± 7.6 (Tabla I y V).

Como puede observarse, los valores obtenidos en los individuos sanos y en los pacientes antes del tratamiento no varían mucho (Gráfica III). La valoración obtenida para después del tratamiento presenta una disminución, en comparación con individuos sanos (Gráfica IV), sin embargo, dicha disminución no resultó estadísticamente significativa.

LINFOCITOS T COOPERADORES/INDUCTORES DETERMINADOS CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD₄

En la valoración de esta subpoblación de linfocitos T, se obtuvieron valores que no variaron significativamente; para los pacientes con DPL antes del tratamiento con talidomida se obtuvo un porcentaje de 45.5 ± 10.6 (Tabla II y V), para después del tratamiento un porcentaje de 43.8 ± 9.3 (Tabla III y V), para los individuos sanos se encontró un porcentaje de 48.5 ± 5.4 (Tabla I y V). Los resultados se presentan en las Gráficas III y IV.

LINFOCITOS T SUPRESORES/CITOTOXICOS DETERMINADOS CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD₈

La subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos no varió significativamente en ninguno de nuestros grupos de estudio. Para los pacientes con DPL antes del tratamiento con talidomida se obtuvo un porcentaje de 29.5 ± 9.3 (Tabla II y V), para después del tratamiento

to se obtuvo un porcentaje de 31.07 ± 8.5 (Tabla III y V) y en el grupo de individuos sanos el valor encontrado fué de 29.7 ± 5.3 (Tabla I y V).

En las Gráficas III y IV se puede observar que al igual que en las otras dos subpoblaciones de linfocitos T, los valores para la subpoblación de supresora/citotóxica en pacientes con DPL antes y después del tratamiento muestran una dispersión en comparación con los valores de los individuos sanos.

RELACION LINFOCITOS T COOPERADORES-INDUCTORES/LINFOCITOS T SUPRESORES-CITOTOXICOS (CD_4/CD_8)

La relación cooperación/supresión (CD_4/CD_8), han sido utilizada como un indicador del balance entre los linfocitos T cooperadores/inductores y los linfocitos T supresores citotóxicos, dando información de hacia donde pudiera estar desplazado el equilibrio inmunorregulador de cooperación/supresión de una respuesta inmune.

En poblaciones mexicanas la relación CD_4/CD_8 en condiciones normales es aproximadamente de 1.42-1.54, en estados patológicos esta relación se desplaza cerca de 1.0 donde las cantidades o porcentajes de linfocitos T supresores son muy semejantes. Cuando se dan valores mayores de 3.0 se habla de un aumento de linfocitos T cooperadores o de cantidades muy bajas de linfocitos T citotóxicos. (63).

En nuestro caso la relación cooperación/supresión no presentó diferencias significativas entre los pacientes antes del tratamiento --

con talidomida, que fue de 1.6 ± 0.59 (Tabla II y V), para después del tratamiento 1.5 ± 0.62 (Tabla III y V) y los individuos sanos - de 1.6 ± 0.47 (Tabla I y V).

Como puede observarse la relación cooperación/supresión de nuestros tres grupos de estudio es muy semejante y se encuentran dentro de - los parámetros normales de poblaciones mexicanas-

RESPUESTA INMUNE CELULAR IN VIVO

La respuesta inmune celular in vivo se valoró por medio de pruebas intradérmicas para tres distintos antígenos. En pacientes con DPL antes del tratamiento con talidomida (Tabla VI) se obtuvo una - respuesta positiva de 78.9% para el PPD, para la varidasa una res-- puesta positiva de 15.7% y para la candidina una respuesta positiva de 84.2%. Para después del tratamiento con talidomida (Tabla VII) se obtuvo una respuesta positiva al PPD de 72.7%, para varidasa una respuesta positiva de 18.1% y finalmente para la candidina la res-- puesta positiva fue del 81.8%. Los valores normales en respuesta a estos antígenos son para PPD, candidina y varidasa de 60-65%.

Como puede observarse la respuesta positiva para el PPD y candidina antes y después del tratamiento se encontró por arriba de los valores normales. Se notó una ligera disminución de la respuesta de es-- tos dos antígenos después del tratamiento con talidomida. Para la varidasa se obtuvo una respuesta positiva baja antes y después del tratamiento comparada con el valor normal, y al contrario de los - otros dos antígenos esta presentó un ligero aumento de respuesta po

sitiva después del tratamiento con talidomida.

RESPUESTA INMUNE CELULAR IN VITRO

La respuesta inmune celular in vitro se valoró por medio del factor inhibidor de la migración de leucocitos humanos (LIF). Se obtuvo en pacientes con DPL antes del tratamiento con talidomida (Tabla VI) una respuesta positiva al PPD de 25%, a la varidasa una respuesta positiva de 20% y 30% para candidina. En la segunda valoración después del tratamiento con talidomida la respuesta positiva en pacientes con DPL (Tabla VII), aumentó obteniéndose para el PPD 30%, varidasa 38.4% y candidina 61%. Los valores normales para la respuesta inmune celular in vitro corresponden a los mismos valores normales de la respuesta inmune celular in vivo por tal motivo ambos valores debieron tener valores similares.

Como podemos notar la respuesta in vitro antes del tratamiento con talidomida para los tres antígenos valorados se encuentra por debajo de los valores normales; para después del tratamiento el PPD y la varidasa continúan por debajo de los valores normales, no así la candidina que se encontró dentro de los límites normales. Es de notar también que los valores obtenidos en la respuesta inmune celular in vitro antes y después del tratamiento no se acercan a los obtenidos en la respuesta inmune celular in vivo.

EFFECTO DE LA TALIDOMIDA EN LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T

Al valorar las subpoblaciones de linfocitos T (linfocitos T totales

CD₃, linfocitos cooperadores/inductores CD₄, linfocitos supresores/citotóxicos CD₈) de pacientes con DPL y de individuos sanos, a diferentes tiempos de cultivo (24, 48 y 72 hrs.), y a diferentes concentraciones de talidomida (1, 5 y 10 µg). (Tabla VIII y IX) no se encontraron variaciones significativas en los niveles de dichas subpoblaciones.

Este fenómeno se ve más claramente si en cada tiempo de cultivo y en cada una de las subpoblaciones valoradas, comparamos primero el testigo (que no contiene droga) con el valor correspondiente de subpoblación al tiempo cero y si comparamos también en cada tiempo de cultivo y en cada una de las subpoblaciones valoradas el testigo con los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de talidomida. De esta forma observamos que no existen diferencias significativas entre los valores encontrados.

EFEECTO DE LA TALIDOMIDA EN LA ACTIVACION CELULAR

Se valoró en tres pacientes con DPL el efecto de la talidomida en la activación celular por medio de la incorporación de timidina triada (H³) (Tabla XI). Para el testigo (estimulado sólo con el mitógeno) obtuvimos una lectura de 8,052.22 (cuentas/min.), para las concentraciones de talidomida se obtuvieron las siguientes lecturas en cuentas/min.) (Tabla VII): para 1µg 7,226, 5 µg 7,267.66 y para 10µg 6,582. Para los individuos sanos las lecturas encontradas fueron las siguientes: para el testigo 5,637.50 cuentas/min., para 1µg de talidomida 10,109; 5µg 15,2885 y para 10µg 19,262 cuentas/min. (Tabla X). En la Gráfica VI observamos que la activación celular -

en los individuos sanos es mayor en comparación con la activación de los pacientes con DPL, y que esta activación va aumentando conforme aumenta la concentración de talidomida; y la activación con el mitógeno (concanavalina A) solamente, es más alta para los pacientes que para los individuos sanos.

CUENTA DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFERICA

Como puede observarse en la Tabla XII la cuenta de leucocitos, linfocitos, y el porcentaje diferencial de leucocitos en sangre de los pacientes con DPL antes y después del tratamiento están dentro de los parámetros normales.

TABLA I

Determinación de Linfocitos B, Linfocitos T, subpoblaciones de linfocitos T y relación CD4/CD8 en individuos sanos

Número	Linfocitos B Rosetas EAC (%)	Linfocitos T Rosetas E (%)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8 (%)
1	33	51	71	51	23	2.22
2	38	54	57	49	33	1.48
3	42	52	68	41	34	1.21
4	43	62	52	38	26	1.46
5	40	57	69	59	31	1.90
6	44	51	67	48	34	1.41
7	42	59	67	56	23	2.43
8	41	60	63	44	33	1.33
9	39	58	63	54	31	1.74
10	43	52	55	48	31	1.55
11	40	50	66	41	43	0.95
12	41	58	55	61	21	2.43
13	38	54	66	52	17	3.06
14	38	51	64	52	29	1.79
15	41	56	75	47	28	1.68
16	28	54	71	41	30	1.37
17	41	52	71	47	35	1.34
18	38	48	76	50	31	1.61
19	29	49	63	42	29	1.45
20	25	49	62	46	24	1.92
21	28	51	58	40	35	1.14
22	36	58	63	57	37	1.54
23	38	61	62	46	29	1.59
24	41	56	59	52	30	1.73
25	39	54	51	43	37	1.16
26	26	53	77	54	26	2.08
27	50	60	60	53	33	1.61
28	38	78	51	51	32	1.59
29	28	46	68	49	25	1.96
30	30	40	72	54	22	2.45

Promedio \pm Desv. Estándar

CD3 Linfocitos T totales perifericos.
 CD4 Linfocitos T totales cooperadores/infectores.
 CD8 Linfocitos T totales supresores/citotóxicos perifericos.

TABLA II

Determinación de Linfocitos B, Linfocitos T, subpoblaciones de Linfocitos T, y relación CD4/CD8 en pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida

Nombre	Sexo	Linfocitos B Puntos EAC (%)	Linfocitos T Puntos E ² (%)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8 (%)
ENBA	F	54	27	64	50	20	2.50
ECS	F	42	31	75	51	29	1.76
DMR	F	81	60	70	62	31	2.00
GB	F	38	35	53	46	23	2.00
JEM	F	49	70	64	81	24	2.13
PLG	F	46	50	86	80	16	3.13
AR	M	35	50	54	47	30	1.57
AAV	F	54	55	56	49	28	1.76
PD	M	57	37	56	25	53	0.47
PH	F	ND	81	70	63	39	1.62
BD	F	26	39	ND	44	27	1.63
MACL	F	45	44	ND	32	32	1.63
JCRO	M	40	ND	ND	37	25	1.48
AO	F	36	42	60	43	30	1.43
GBG	M	31	26	71	55	36	1.53
JB	M	36	29	67	29	16	1.81
ACL	F	39	44	81	44	23	1.91
GGG	F	37	39	64	50	27	1.86
BAM	F	35	37	63	40	48	0.83
PHH	F	ND	ND	ND	23	33	0.70
Promedio ±		46.81 ±	46.84 ±	68.88 ±	48.98 ±	28.98 ±	1.69 ±
Dev. Estándar		6.92	11.82	6.78	16.89	6.92	0.88

CD3 Linfocitos T totales perifericos.
 CD4 Linfocitos T totales cooperadores/inductores.
 CD8 Linfocitos T totales supresores/celulas perifericas.
 ND No Determinado

Significancia Estadística con relación a población sana (N) $p < 0.001$

(N) Prueba estadística no paramétrica de U de Mann Whitney

TABLA III

Determinación de Linfocitos B, Linfocitos T, subpoblaciones de Linfocitos T y relación CD4/CD8 en pacientes con DPL después del tratamiento con Talidomida

Nombre	Sexo	Linfocitos B Rosetas EAC (%)	Linfocitos T Rosetas EI (%)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8 (%)
EDM	F	50	58	55	40	22	1.82
ECS	F	45	43	41	30	29	1.03
DMR	F	51	60	70	62	31	2.00
AR	M	47	26	66	51	32	1.59
RIG	M	25	18	ND	43	19	2.26
AAV	F	32	39	52	39	28	1.39
AO	F	ND	44	60	43	30	1.43
JEM	F	ND	45	46	45	34	1.32
GB	F	27	35	53	49	43	1.14
RLG	F	35	43	ND	47	37	1.27
MACL	F	27	38	60	29	50	0.58
JCRD	M	40	ND	47	44	27	1.63
ACL	F	ND	ND	55	34	38	0.89
JB	M	36	29	58	60	19	3.16
PHH	F	47	29	55	41	27	1.52

Promedio \pm **38.00 \pm** **46.00 \pm** **55.10 \pm** **43.66 \pm** **31.07 \pm** **1.84 \pm**
 Desv. Estandar **8.20** **11.87** **7.64** **8.38** **8.81** **0.82**

CD3 Linfocitos T totales periféricos.
 CD4 Linfocitos T totales cooperadores/inductores.
 CD8 Linfocitos T totales supresores/citotóxicos periféricos.
 ND No Determinado

Significancia Estadística con relación a población sana (*) $p < 0.0001$

(*) Prueba estadística no paramétrica de U de Mann Whitney

TABLA IV

Determinación de Linfocitos T (Rosetas E) y Linfocitos B (Rosetas EAC)
en individuos sanos y pacientes con DPL

(%)	Individuos Sanos	Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida	Pacientes con DPL despues del tratamiento con Talidomida
Linfocitos T	54.2 ± 4.1	42.5 ± 11.8 *	39.0 ± 11.9 **
Linfocitos B	37.2 ± 6.1	41.1 ± 9.22	38.1 ± 9.2

* Significancia Estadística con relación a población sana $p < 0.001$
** Significancia Estadística con relación a población sana $p < 0.0001$

TABLA V

Determinación de subpoblaciones de Linfocitos T en individuos sanos y en pacientes con DPL antes y después del tratamiento con Talidomida

(%)	Individuos Sanos	Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida	Pacientes con DPL después del tratamiento con Talidomida
CD3	64.8 ± 7.62	62.6 ± 6.73	55.1 ± 7.84
CD4	48.5 ± 5.40	45.5 ± 10.65	43.8 ± 9.39
CD8	29.7 ± 5.30	29.5 ± 9.30	31.07 ± 8.51
Relación Coop/Sup	1.6 ± 0.47	1.6 ± 0.59	1.5 ± 0.62

TABLA IV

Determinación de Linfocitos T (Rosetas E) y Linfocitos B (Rosetas EAC)
en individuos sanos y pacientes con DPL

(%)	Individuos Sanos	Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida	Pacientes con DPL despues del tratamiento con Talidomida
Linfocitos T	54.2 ± 4.1	42.5 ± 11.8 *	39.0 ± 11.9 **
Linfocitos B	37.2 ± 6.1	41.1 ± 9.22	38.1 ± 9.2

* Significancia Estadística con relación a población sana $p < 0.001$
** Significancia Estadística con relación a población sana $p < 0.0001$

TABLA V

Determinación de subpoblaciones de Linfocitos T en individuos sanos y en pacientes con DPL antes y después del tratamiento con Talidomida

(%)	Individuos Sanos	Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida	Pacientes con DPL después del tratamiento con Talidomida
CD3	64.8 ± 7.62	62.6 ± 6.73	55.1 ± 7.84
CD4	48.5 ± 5.40	45.5 ± 10.65	43.8 ± 9.39
CD8	29.7 ± 5.30	29.5 ± 9.30	31.07 ± 8.51
Relación Coop/Sup	1.6 ± 0.47	1.6 ± 0.59	1.5 ± 0.62

TABLA VI

Intradermoreacciones y LIF en pacientes con DPL
antes del tratamiento con Talidomida

Antígeno	Respuesta Intradermica * in vivo *		L I F * * in vitro *	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
PPD	78.9 %	21.1 %	25 %	75 %
Varidasa	15.7 %	84.3 %	20 %	80 %
Candidina	84.2 %	15.8 %	30 %	70 %

Valores normales positivos para PPD, Varidasa y Candidina: 60 - 65 %.

* Factor inhibidor de la migración de leucocitos.

TABLA VI

Intradermoreacciones y LIF en pacientes con DPL
antes del tratamiento con Talidomida

Antígeno	Respuesta Intradermica * in vivo *		L I F * * in vitro *	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
PPD	78.9 %	21.1 %	25 %	75 %
Varidasa	15.7 %	84.3 %	20 %	80 %
Candidina	84.2 %	15.8 %	30 %	70 %

Valores normales positivos para PPD, Varidasa y Candidina: 60 - 65 %.

* Factor inhibidor de la migración de leucocitos.

TABLA VII

Intradermoreacciones y LIF en pacientes con DPL
despues del tratamiento con Talidomida

Antigeno	Respuesta Intradermica * in vivo *		L I F* * in vitro *	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
PPD	72.7 %	27.3 %	30.0 %	70.0 %
Varidasa	18.1 %	81.9 %	38.4 %	61.6 %
Candidina	81.8 %	18.2 %	61.5 %	38.5 %

Valores normales positivos para PPD, Varidasa y Candidina : 60 - 65 %.

* Factor inhibidor de la migración de leucocitos.

TABLA IV

Determinación de Linfocitos T (Rosetas E) y Linfocitos B (Rosetas EAC)
en individuos sanos y pacientes con DPL

(%)	Individuos Sanos	Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida	Pacientes con DPL despues del tratamiento con Talidomida
Linfocitos T	54.2 ± 4.1	42.5 ± 11.8 *	39.0 ± 11.9 **
Linfocitos B	37.2 ± 6.1	41.1 ± 9.22	38.1 ± 9.2

* Significancia Estadística con relación a población sana $p < 0.001$
** Significancia Estadística con relación a población sana $p < 0.0001$

TABLA V

Determinación de subpoblaciones de Linfocitos T en individuos sanos y en pacientes con DPL antes y después del tratamiento con Talidomida

(%)	Individuos Sanos	Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida	Pacientes con DPL después del tratamiento con Talidomida
CD3	64.8 ± 7.62	62.6 ± 6.73	55.1 ± 7.84
CD4	48.5 ± 5.40	45.5 ± 10.65	43.8 ± 9.39
CD8	29.7 ± 5.30	29.5 ± 9.30	31.07 ± 8.51
Relación Coop/Sup	1.6 ± 0.47	1.6 ± 0.59	1.5 ± 0.62

TABLA VI

Intradermoreacciones y LIF en pacientes con DPL
antes del tratamiento con Talidomida

Antígeno	Respuesta Intradermica * in vivo *		L I F * * in vitro *	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
PPD	78.9 %	21.1 %	25 %	75 %
Varidasa	15.7 %	84.3 %	20 %	80 %
Candidina	84.2 %	15.8 %	30 %	70 %

Valores normales positivos para PPD, Varidasa y Candidina: 60 - 65 %.

* Factor inhibidor de la migración de leucocitos.

TABLA VII

Intradermoreacciones y LIF en pacientes con DPL
despues del tratamiento con Talidomida

Antigeno	Respuesta Intradermica * in vivo *		L I F* * in vitro *	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
PPD	72.7 %	27.3 %	30.0 %	70.0 %
Varidasa	18.1 %	81.9 %	38.4 %	61.6 %
Candidina	81.8 %	18.2 %	61.5 %	38.5 %

Valores normales positivos para PPD, Varidasa y Candidina : 60 - 65 %.

* Factor inhibidor de la migración de leucocitos.

TABLA VIII

Efecto de la Talidomida en las subpoblaciones de Linfocitos T de Individuos Sanos.

Muestra	CD3						CD4			CD8		
	f	Concentración de Tálidomida			f	Concentración de Tálidomida			f	Concentración de Tálidomida		
		1.4g	5.4g	10.4g		1.4g	5.4g	10.4g		1.4g	5.4g	10.4g
24 Horas:												
SP	66	72	54	54	49	46	40	44	34	34	38	34
CR	70	24	70	69	64	89	58	60	25	31	30	38
MS	72	68	64	68	38	38	42	38	28	36	29	24
BL	—	70	60	43	60	50	68	18	22	18	44	ND
FM	61	63	90	88	65	40	65	40	38	51	37	31
f	67.2	66.4	67.8	64.8	61.4	48.8	64.8	68.8	38.8	66.8	68.8	61.2
48 Horas:												
SP	68	88	59	60	48	48	48	40	30	38	38	38
CR	63	88	88	88	50	47	53	52	35	38	34	28
MS	68	84	48	50	39	40	38	42	37	31	29	29
BL	35	47	32	42	57	44	47	28	23	21	18	26
FM	66	68	50	57	64	53	38	51	26	37	37	37
f	68.8	68.8	68.8	68.8	61.8	48.8	48.8	48.8	68.8	61.8	68.8	61.8
72 Horas:												
SP	61	53	63	58	49	49	44	44	34	31	30	38
CR	72	65	60	58	55	58	53	60	20	24	29	28
MS	66	62	62	62	48	46	32	46	23	28	28	28
BL	54	47	54	51	42	42	44	43	26	27	29	29
FM	66	75	68	74	44	46	46	43	23	28	38	23
f	68.8	68.4	68.8	68.8	47.8	48.2	47.8	48.2	68.2	68.8	68.8	68.2

Tempo G:	CD3	CD4	CD8
SP	63	48	32
CR	65	49	27
MS	74	45	27
BL	54	50	21
FM	61	38	37
f	68.4	44.8	38.8

CD3 Linfocitos T totales periféricos.
 CD4 Linfocitos T totales supresores/inhbitores.
 CD8 Linfocitos T totales supresores/inhbitores periféricos.
 ND No Determinado

TABLA IX

Efecto de la Talidomida en las subpoblaciones de Linfocitos T de Pacientes con DPL.

Numero	CD3				CD4				CD8			
	S	Concentración de Talidomida			S	Concentración de Talidomida			S	Concentración de Talidomida		
		1.5g	3.5g	10.5g		1.5g	3.5g	10.5g		1.5g	3.5g	10.5g
24 Horas												
MP	37	38	32	38	39	48	46	50	37	29	26	46
SA	30	44	70	39	48	38	41	50	43	37	43	46
JE	30	37	38	54	38	44	54	42	37	38	31	31
PH	30	38	30	40	38	38	48	38	38	23	24	18
GA	35	32	50	38	44	48	35	38	38	48	30	34
Σ	225.0	225.0	227.0	225.0	227.0	244.0	225.0	225.0	227.0	225.0	225.0	225.0
48 Horas												
MP	35	35	39	40	42	48	32	30	31	34	35	39
SA	77	72	63	63	46	47	42	50	40	43	43	38
JE	65	37	34	30	44	37	42	42	21	22	23	29
PH	74	39	70	72	54	46	46	50	43	18	22	35
GA	30	44	39	54	39	39	45	39	48	48	32	37
Σ	225.0	227.0	219.0	222.0	225.0	229.0	225.0	225.0	225.0	225.0	225.0	225.0
72 Horas												
MP	48	30	32	35	45	35	39	34	24	32	34	34
SA	70	54	52	54	32	44	35	31	38	47	34	45
JE	38	47	35	35	45	39	45	63	35	20	14	22
PH	75	75	30	40	42	48	48	38	50	30	24	18
GA	35	34	39	35	42	44	32	31	44	42	45	48
Σ	225.0	225.0	228.0	227.0	225.0	225.0	225.0	225.0	225.0	225.0	225.0	225.0

Tempo D:	CD3	CD4	CD8
MP	37	44	31
SA	31	35	43
JE	38	39	35
PH	37	54	45
GA	37	35	39
Σ	225.0	225.0	225.0

CD3 Linfocitos T totales por/foros.
 CD4 Linfocitos T totales supresores/inhibidores.
 CD8 Linfocitos T totales asesinos/citotoxicos por/foros.
 ND No Determinado

TABLA X

Efecto de la Talidomida en la activación celular en Individuos Sanos

Individuos Sanos	Concanavalina (Testigo)	Concentración de Talidomida		
		1 μ g / pozo	5 μ g / pozo	10 μ g / pozo
RALP	7,445.33	9,350.00	9,227.00	11,733.00
HMSG	3,829.67	10,864.00	21,344.00	26,991.61
Σ	8,637.80	10,109.00	15,285.00	19,362.00

TABLA XI

Efecto de la Talidomida en la activación celular en pacientes con DPL

Pacientes con DPL	Concansvalina (Testigo)	Concentración de Talidomida		
		1 μ g / pozo	5 μ g / pozo	10 μ g / pozo
J E	10,022.00	6,411.67	7,622.00	6,207.00
G A	5,756.00	7,732.67	7,637.00	6,458.00
M	8,378.67	7,534.67	6,544.00	7,082.00
Σ	8,052.22	7,228.67	7,267.96	6,582.30

TABLA XII

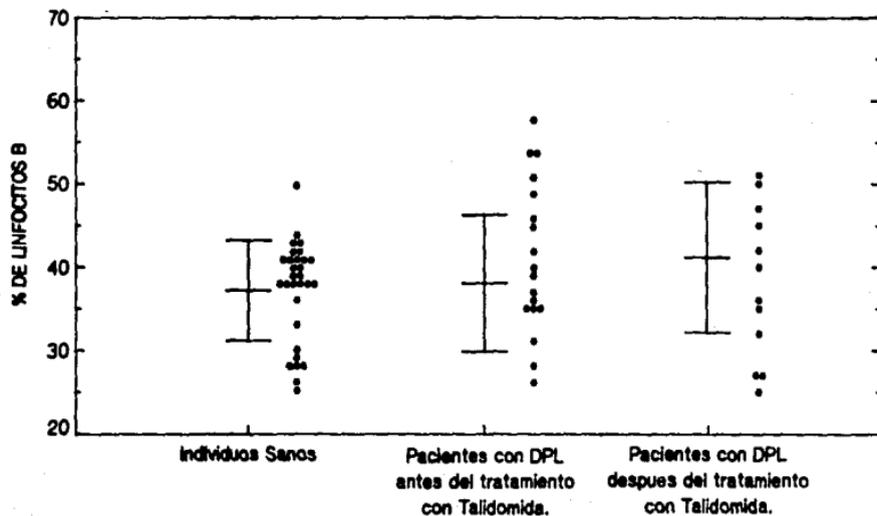
Leucocitos en Sangre de Pacientes con DPL.

Promedios	No. de Leucocitos mm ³	No. de Linfocitos mm ³	Linfocitos %	Neutrófilos %	Monocitos %	Eosinófilos %	Baófilos %
Pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida,	6,400	2,160	35	55	5.5	3.3	0.89
Pacientes con DPL despues del tratamiento con Talidomida,	5,430	2,393	35	57	4.4	3.5	0.38
Individuos Sano* ^a	5,000-10,000	1,500-3,000	23-33	54-62	3-7	1-3	0-0.75

* (26)

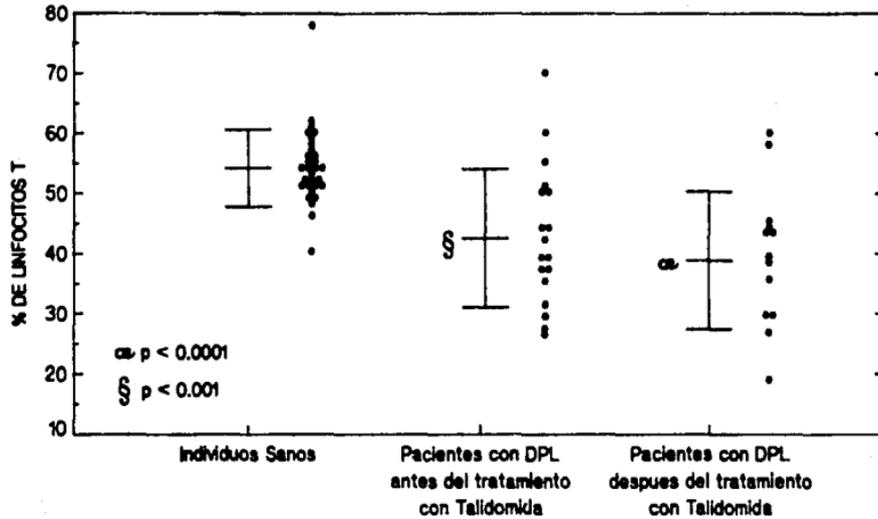
GRAFICA I

Porcentajes de linfocitos B (Rosetas EAC), en Individuos Sanos y en pacientes con DPL antes y despues del tratamiento con Talidomida.



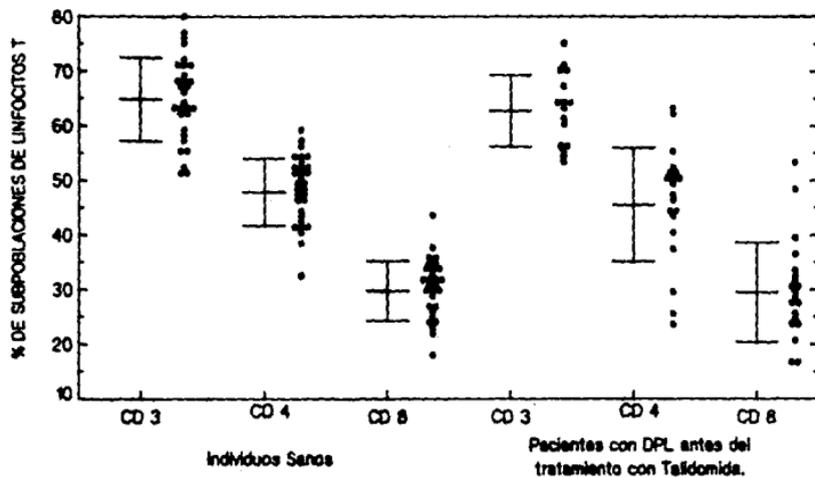
GRAFICA II

Porcentajes de linfocitos T (Rosetas E), en Individuos Sanos y en pacientes con DPL antes y despues del tratamiento con Talidomida.



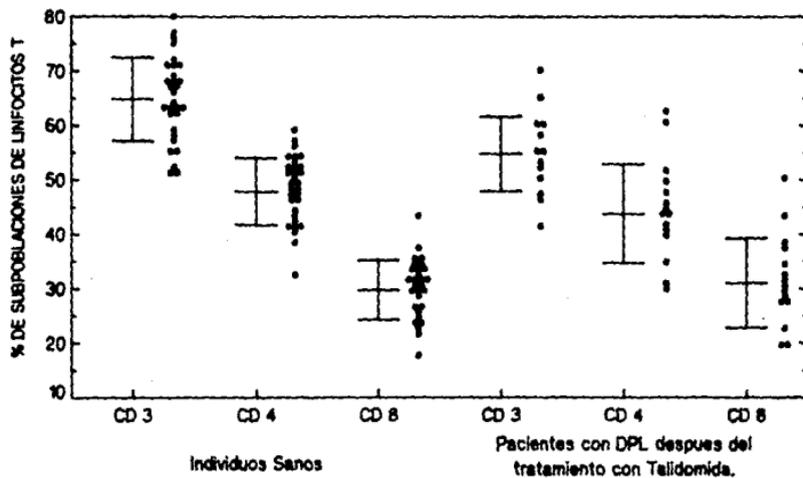
GRAFICA III

Determinación de subpoblaciones de linfocitos T en individuos sanos y en pacientes con DPL antes del tratamiento con Talidomida.



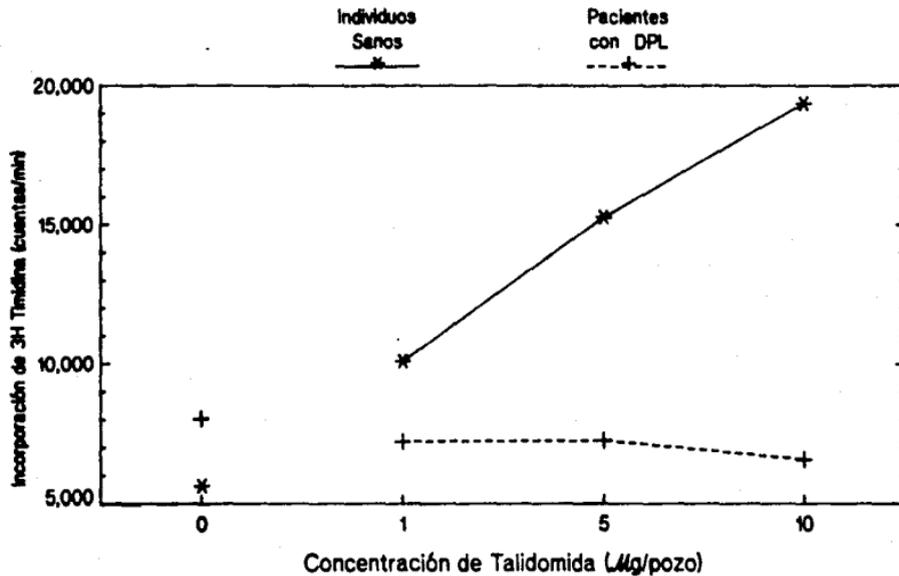
GRAFICA IV

Determinación de subpoblaciones de linfocitos T en Individuos Sanos y en pacientes con DPL despues del tratamiento con Talidomida.



GRAFICA V

Efecto de la Talidomida en la activación celular en Individuos Sanos
y en Pacientes con DPL



DISCUSION

No obstante que dentro de los objetivos de este estudio no figuró - el observar el efecto clínico de la talidomida en pacientes con DPL, es importante señalar que de los 15 pacientes (75%), que concluyeron el tratamiento, en todos desapareció el prurito, un paciente -- (5%) no mejoró totalmente, doce pacientes (60%) mejoraron totalmente pero recayeron en un periodo de 1-6 meses, dos pacientes sanaron totalmente (10%), sin recaída en un año de seguimiento. Estos dos últimos pacientes se encontraban en la etapa inicial del padecimiento y los trece pacientes restantes se encontraban en la etapa franca.

Los linfocitos B fueron valorados fenotípicamente por el método de formación de rosetas EAC, con porcentajes semejantes en los tres -- grupos de estudio (individuos sanos, pacientes con DPL antes del - tratamiento y pacientes con DPL después del tratamiento). Un resultado parecido fue reportado en otra investigación realizada en pacientes con DPL sin tratamiento alguno (57).

En este trabajo se encontró una disminución significativa en los - porcentajes de linfocitos T valorados por rosetas E en los porcentajes con DPL antes y después del tratamiento con talidomida, comparadas con los individuos sanos (Tabla IV). Lo que nos indica una disminución en las células involucradas en la respuesta inmune. Este resultado es similar al encontrado en el estudio antes citado (57), en el cual se reporta una disminución en los linfocitos T (determinados por medio de rosetas), en pacientes con DPL.

En los linfocitos T totales periféricos valorados con anticuerpo monoclonal anti CD₃, linfocitos T cooperadores/inductores valorados con anticuerpo monoclonal anti CD₄ y en los linfocitos T supresores/citotóxicos valorados con anticuerpo monoclonal anti CD₈, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes con DPL antes y después del tratamiento con talidomida. En la relación cooperación/supresión tampoco se encontró variación alguna entre los tres grupos de estudio.

Los resultados de esta investigación son semejantes a los reportados por Moncada en 1984 (33). Dicho investigador valoró linfocitos T de sangre periférica de pacientes con DPL con anticuerpos monoclonales, y reporta un ligero incremento de linfocitos T totales, mientras que los linfocitos T cooperadores, linfocitos T supresores y la relación cooperación/supresión se observa sin cambios con respecto a los controles.

De acuerdo a las características de la talidomida referidas en la bibliografía como por ejemplo, su acción preferente sobre la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos y como consecuencia de esto, la disminución de la tasa celular cooperador/supresor (37, 48), en este trabajo esperábamos encontrar un movimiento significativo de la subpoblación de linfocitos T supresora/citotóxica de los pacientes con DPL que concluyeron el tratamiento con talidomida; sin embargo este carácter inmunosupresor atribuido a la droga no fue observado en los pacientes al término de este.

Nuestros resultados en la respuesta intradérmica para el PPD y la -

candidina en pacientes con DPL antes y después del tratamiento con talidomida están por arriba de los valores normales, no así la varidasa que se conserva por debajo del valor normal para antes y después del tratamiento. Probablemente para los tres antígenos se dió una respuesta como la anteriormente descrita (25, 33, 51), pero en el caso de la varidasa la respuesta fue menor; probablemente el antígeno preparado sufrió algún cambio que impidió que se obtuviera una mejor respuesta, para el PPD y candidina se vió aumentada sin diferencia significativa para después del tratamiento con la talidomida.

Los resultados de la respuesta inmune celular in vitro en este estudio se encontraron en general bajos en los pacientes con DPL antes y después del tratamiento, la excepción es la candidina que después del tratamiento alcanzó valores dentro de los límites normales. Quizás este resultado se debió a que sólo estamos valorando un aspecto de la inmunidad celular de los pacientes con DPL; que probablemente es más compleja e involucra otros factores que no son posibles de evaluar con este tipo de estudio.

Al estudiar el efecto in vitro de la talidomida a diferentes concentraciones sobre células linfoides no se encontraron diferencias significativas entre las subpoblaciones de linfocitos T de pacientes con DPL e individuos sanos.

Shanon (58), reporta un resultado semejante en una parte de su investigación, la cual consistió en un cultivo in vitro de células mononucleares a las cuales se les adicionó talidomida, sin encontrar diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T tratadas con ta-

lidomida y entre las subpoblaciones de linfocitos T de su grupo control.

En este trabajo se encontró una disminución de la activación celular en pacientes con DPL con respecto a la activación en individuos sanos; se notó también que conforme aumenta la concentración de talidomida la diferencia entre los dos grupos fue mayor. Al comparar los pozos testigos (sin talidomida) de ambos grupos (al término de 72 hrs.), observamos una activación mayor de las células de los pacientes que en las células de los individuos sanos; estos resultados indican que la talidomida tiene un efecto no determinado aún, y diferente para células de individuos sanos y de los pacientes con DPL.

La cuenta diferencial de leucocitos de sangre periférica de pacientes con DPL antes y después del tratamiento se ubicó en los límites normales, lo cual indica que la droga no tuvo efecto alguno sobre los niveles de leucocitos.

El carácter inmunosupresor de la talidomida reportado por otros investigadores (37, 48), no se encontró en este estudio en ninguno de los parámetros inmunológicos evaluados. Tal vez esta droga esté actuando en forma inmunoreguladora a través de sustancias solubles (citocinas), que actúan sobre células blanco, haciéndose presente esta inmunoregulación en el mejoramiento clínico de los pacientes.

También es importante tener presente que no se conoce con seguridad la naturaleza del antígeno que provoca esta hipersensibilidad; algunos investigadores proponen que es una sustancia soluble (ácido qui

nurénico), que provoca sensibilidad en la piel (20), y otros que se trata de un antígeno cutáneo autólogo (5). Este hecho nos impide conocer con certeza la naturaleza de la respuesta autoinmune observada en los pacientes.

Por otra parte es conveniente tomar en cuenta el estado intrínseco de cada uno de los pacientes, el cual puede influir en la variación de los resultados. Tales variaciones pueden apreciarse con mayor claridad por la mayor dispersión de los datos en las gráficas de los pacientes con DPL, comparados con las de individuos sanos.

Por último, se debe recordar que la sangre no es el sitio de interacción de los linfocitos T, ni el medio en que se provoca el estímulo, ni el sitio donde se desarrolla la inflamación y el daño tisular, pues así erróneamente pueden reflejar eventos celulares que resultan de la sensibilización y manifestaciones químicas de las reacciones alérgicas (63); aunque sabemos que la sangre irriga todo el cuerpo, y algún cambio en la piel pudiese captarse en ella.

Por tal razón son recomendables como ya se han realizado (12, 20, 34, 35, 40, 43, 46) estudios inmunohistológicos de las lesiones características de la DPL con los cuales se establezca de una manera más amplia la inmunopatología de este padecimiento, pero ahora asociados a la acción de la talidomida.

CONCLUSIONES

No se observó el efecto inmunosupresor de la talidomida en ninguno de los parámetros inmunológicos valorados en pacientes con DPL. En estudios "in vitro" de células linfoides de pacientes con DPL, tampoco se logró observar tal efecto.

El 60% de los pacientes mejoró clínicamente, lo cual indica que en estos pacientes la droga está actuando de forma diferente, a la que se le ha atribuido recientemente.

Quizá dicho mejoramiento clínico se debió a una inmunoregulación de la talidomida a través de mediadores solubles, que actuaron sobre las células blanco, probablemente involucradas en la patología de la enfermedad.

Para conocer mejor el mecanismo de acción de la talidomida en pacientes con DPL es conveniente realizar valoraciones inmunológicas en sangre periférica y análisis inmunohistológicos de las lesiones características de esta enfermedad, antes, durante y al término del tratamiento con talidomida. Con este tipo de estudios aplicados a aislar el antígeno en la piel, también ayudaríamos a establecer más claramente la naturaleza del antígeno que causa este padecimiento y por tanto comprender más ampliamente su inmunopatología.

RESUMEN

La Dermatitis Polimorfa Lumínica (DPL) es una fotodermatitis que se caracteriza por el desarrollo de pápulas, vesículas, eritema y placas o escama, con daño en piel. Inicialmente por efecto del sol - (rayos ultravioleta B [240 a 320]), posteriormente se pierde la resistencia a la luz solar y se presenta la erupción en diferentes estaciones del año. En dicha dermatosis se ven implicados mecanismos de hipersensibilidad tipo IV o mediada por células, según la clasificación de Coombs y Gell. Se acepta actualmente que los desórdenes de este padecimiento se encuentran mediados inmunológicamente y que pueden ser el resultado de un desbalance en la población de linfocitos T. El objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto de la talidomida, en pacientes con DPL, sobre el sistema inmune; principalmente en la inmunidad celular. Se valoraron 20 pacientes diagnosticados clínicamente por el médico dermatólogo como enfermos con DPL, además 30 testigos sanos clínicamente. Se tomó una muestra de sangre periférica para realizar el perfil inmunológico; antes y después de efectuar la administración de talidomida vía oral, con dosis diarias de 100 mg. durante 60 días. Los resultados obtenidos para la inmunidad celular "in vivo" fueron los siguientes: antes del tratamiento para el PPD hubo una respuesta positiva del 78.9%, para la varidasa 15.7% y para la candidina 84.2%; después del tratamiento respondieron positivamente al PPD 72.7%, a varidasa 18.1% y a candidina 81.8%. Para la respuesta inmune celular "in vitro" por medio del factor inhibidor de leucocitos humanos (LIF) antes del tratamiento se obtuvo una respuesta positiva para el PPD de 25%, para varidasa 20% y para candidina 30%, después del tratamiento la respuesta al PPD fue del 30%, para varidasa 38.4% y para candidina 61.5%. Los valores normales para ambas pruebas varían del 60-65%. En la determinación de linfocitos B por medio de rosetas, los resultados obtenidos antes del tratamiento fueron de $41 \pm 9.2\%$ después del tratamiento de un $38.1 \pm 9.2\%$. En los testigos sanos se encontró un 37.2% con desviación estándar de 6.1%. Para los linfocitos T mediante la técnica de rosetas antes del tratamiento se obtuvo un $42.5 \pm 11.8\%$ (p 001) y para después del tratamiento de $39 \pm 11.9\%$ (p 0.0001). En los testigos sanos se encontró un 53.2% con una desviación estándar de 4.8. Ambos valores resultaron estadísticamente significativos aplicando la prueba estadística no paramétrica de U de Mann Whitney. Las valoraciones de las subpoblaciones de linfocitos T con anticuerpos monoclonales, antes del tratamiento fueron para CD 62.6% \pm 6.7, para CD 45% \pm 10.65 y para CD 29.5% \pm 9.3, la relación cooperador/supresor fue de 1.6 ± 0.59 , para después del tratamiento, para CD 55.1 \pm 7.8%, CD 43.8 \pm 9.39% y CD 31.07 \pm 8.5%, la relación cooperación/supresión fue de 1.5 ± 0.62 los valores para los testigos sanos, CD 64.8 \pm 7.2%, CD 48.5 \pm 5.4%, CD 29.7 \pm 5.3%; la relación cooperación/supresión fue de 1.5 ± 0.47 . No se encontró diferencia significativa ni antes ni después del tratamiento. Después de cultivar las células con talidomida a 0, 24, 48 y 72 hrs. se midieron las subpoblaciones de linfocitos T; los resultados se compararon con los de los testigos, no encontrándose diferencia significativa en los valores comparados. En la activación celular se observó una disminución de ésta en los pacien--

tes con DPL con respecto a la activación celular obtenida en los individuos sanos, se hizo mayor la diferencia de activación entre los 2 grupos conforme aumentó la concentración de talidomida. La cuenta diferencial de leucocitos de sangre periférica de pacientes con DPL antes y después del tratamiento se encontró dentro de los límites normales. Clínicamente el 60% de los pacientes sanaron (con recaída entre 1-6 meses) después de haber concluido el tratamiento con la talidomida; sin embargo, los datos obtenidos en el laboratorio antes y después de administrar la droga no indican un cambio sustantivo en los parámetros medidos. Con lo que respecta al factor inmunoregulador que se le ha atribuido a la talidomida probablemente este se lleve a cabo por medio de otros mecanismos que no involucren directamente estirpes celulares sino sustancias solubles (citocinas), que sean estos los que actúen sobre elementos celulares, y se lleve a cabo de este modo la inmunoregulación de la talidomida. Por lo que se requieren otros estudios que nos indiquen con mayor claridad el mecanismo de acción de la talidomida en pacientes con DPL.

LITERATURA CITADA

1. Addo, H. A., S. C. Sharma (1987), "UVB phototherapy and photochemotherapy (PUVA) in the treatment of polymorphic light eruption and solar urticaria", *Brit J. Dermatol* 116:539-647.
2. Allut, F., J. C. Cerottini, R. R. A. Coombs, et al. (1974), "Identification, - Enumeration and Isolation of band T lymphocytes from human peripheral - - - blood", *Scand. J. Immunol.* 3:521-532.
3. Azulay, R. D., L. A. Abulafia, D. R. Azulay (1989), "Una nova clasificadas - fotodermatoses", *Med. Cut. I. L. A.* 17:22-27.
4. Azizi, E., A. Lusky, A. P. Kusheleus, M. Schewach-Millet (1988), "Skin type, hair color, and freckles are predictors of decreased minimal erythema ultra-violet radiation dose", *J. Am. Acad. Dermatol.* 19:32-38.
5. Baranda, L., B. Moncada, S. F. González, A. C. Mendoza, A. R. González ---- (1989), "Sensibilización Inmunológica hacia antígenos autólogos en pacientes con erupción luminica polimórfica", VII Congreso Nacional de Inmunología, p. 33.
6. Bellanti, J. A. (1988), "Inmunología", Interamericana, 3a. ed, México, pp 7-57.
7. Bloom, B. R. y P. R. Glade (1971), "In vitro Method in Cell Mediated Immunity", Acad. Press, New York, 252 pp.
8. Boogs, R. D. y A. Wilkellstein (1985), "El Leucocito", Manual Moderno, México pp 90-92.
9. Bos, D., I. Zonneveld, K. P. Das, S. R. Krieg, M. C. Vandder-Loss y M. L. -- Kapsenberg (1987), "The Skin Immune System (SIS)", *J. Invest. Dermatol.* 88:569-573.
- 9b. Braciale, J. T., L. V. Braciale (1991), "Antigen presentation: structural themes and functional variations", *Immunol. Today* 12:124-129.
- 9c. Coombs, R. R. A. y P. G. H. Gell (1975), "Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease", in *Clinical Aspects of Immunology*, Gell-Coombs-Lachman editors, Blackwell, p 761.
10. Cordero, C. f. (1976), "Síndrome Cutáneo Guatemalteco en la Dermatitis Actínica", *Med. Cut. I. L. A.* 6:393-400.
11. Daniel, W. W. (1990), "Bioestadística", LIMUSA, 3a. ed., México, 485 pp.
12. Diffey, B. L. y P. M. Farr (1986), "The erythema response to ultraviolet radiation in subjects with polymorphic light eruption", *Brit. J. Dermatol.* 114: 103-108.
13. Elpern, J. D., W. L. Morrison y H. A. Hood (1985), "Papuvesicular Light Eruption", *Arch. Dermatol.* 121:1286-1288.
14. Epstein, H. J. (1986), "Polymorphic Light Eruption", *Dermatologic Clinics.* 4: 243-251.
15. Farr, M. P. y L. B. Diffey (1989), "Effect of indomatacin on UVB and UVA indu

- ced erythema in polymorphic light eruption", *J. Am. Acad. Dermatol.* 21:230-236.
16. Flores, G., L. Terán, M. A. Bernal y J. Cuevas (1982), "HLA y Dermatitis Solar", *Alergia* 29:13-18.
 17. Fraun-Bell, W. (1988), "The effect of light on the skin", *Brit. J. Dermatol.* 119:479-485.
 18. Fraun-Bell, W., L. A. Mackenzie y E. Withman (1969), "Chronic Polymorphic --- Light Eruption", *Br. J. Dermatol.* 81:885-896.
 19. Hawk, J. L., G. M. Murphy y C. A. Holden (1988), "The presence of neutrophils in human cutaneous ultraviolet-B inflammation", *Br. J. Dermatol.* 118:27-30.
 20. Holzie, E., G. Plewing, P. Kries y P. Lehmann (1987), "Polymorphus Light Eruption", *J. Invest. Dermatol.* 88:325-385.
 21. Jansen, T. C. (1978), "Hereditary of Chronic Polymorphus Light Eruption", *Arch Dermatol.* 114:188-190.
 22. Jansen, T. C. (1979), "The Natural History of Polymorphus Light Eruption", -- *Arch. Dermatol.* 115:165-169.
 23. Jansen, T. C. (1982), "The Polymorphic Phototest Reaction", *Arch. Dermatol.* -- 118:638-642.
 24. Jansen, T. C. e I. Helander (1976), "Cell-Mediated Immunity in Chronic Polymorphus Light Eruption", *Acta Dermatovener.* 56:121-125.
 25. Jansen, T. C. y J. Korvonen (1984), "Polymorphus Light Eruption", *Arch. Dermatol.* 120:862-865.
 26. Kaplan, S. J. (1969), "Cuadros de Laboratorio Clínico", *Intermédica*, Buenos Aires, p. 35.
 27. Lanzavecchia, A. (1985), "Antigen-specific interaction between T and B cells" *Nature* 314(11):537-539.
 28. Londoño, F. (1973), "Thalidomide in the treatment of Actinic Prurigo", *Int. J Dermatol.* 12:326-328.
 29. Lovell, C. R., J. L. Hawk, C. D. Calnan e I. A. Magnus (1983), "Thalidomide - in Actinic Prurigo", *Br. J. Dermatol.* 108:467-471.
 - 29b. Male, D., B. Champion, A. Cooke (1987), "Advanced Immunology", *Grower Medical Publishing*, London, pp 4.1-4.14, 6.1-6.12
 30. Markey, A. C., M. H. Allen, C. Ptzalis y D. M. Macdonald, (1990), "T-cell inducer populations in cutanes inflammation", *Br. J. Dermatol.* 122:325-332.
 31. Marrack, P. y J. Kappler (1986), "The T cell and its receptor", *Scientific American* 254:28-37.
 - 31b. Moller, G. (1988), "Do supressor T cells Exist?", *Scand. J. Immunol.* 27:247-250.
 32. Moncada, B. (1984), "Prurigo Actinico", *J. Am. Acad. Dermatol.* 10:145.

33. Moncada, B., R. González-Amaro et al. (1984), "Immunopathology of polymorphous light eruption", *J. Am. Acad. Dermatol.* 10:970-973.
- 33b. Mosmann, R. T., L. R. Coffman (1987), "Two types of mouse helper T cell clone", *Immunol. Today* 8:223-227.
34. Muhlbauer, J. E., A. K. Bahn, et al. (1983), "Papular polymorphic light eruption", *Arch. Dermatol.* 108:153-162.
35. Muhlbauer, J. E., C. M. Mhin, et al. (1984), "Papular polymorphic light eruption", *Arch. Dermatol.* 120:866-868.
36. Murphy, G. M., R. A. Logan et al. (1987), "Prophylactic PUVA and UVB therapy in polymorphic light eruption a controlled trial", *Br. J. Dermatol.* 116:631-638.
37. Naafs, B. y W. R. Faber (1985), "Thalidomide therapy", *Int. J. Dermatol.* 24: 131-134.
38. Newman, R., E. Rappold y H. Pohl-Markl (1986), "Treatment of polymorphous light eruption with nicotinamide", *Br. J. Dermatol.* 115:77-80.
39. Nordland, J. L., y N. H. Conn (1973), "New therapy for Polymorphous Light Eruption", *Arch. Dermatol.* 108:710-712.
40. Norris, P. G., J. Morris et al. (1989), "Successful treatment of severe Polymorphous Light Eruption", *Arch. Dermatol.* 125:1377-1379.
41. Norris, P. G., J. Morris et al. (1989), "Polymorphic Light Eruption", *Br. J. Dermatol.* 120:173-183.
42. O'dell, L. B., T. R. Jessen et al. (1980), "Diminished Immune response in Sun-Damaged Skin", *Arch. Dermatol.* 116:559-564.
43. Oxholm, A., B. Oxholm, et al. (1988), "Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumor necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo", *Br. J. Dermatol.* 118:369-376.
44. Parris, J. A., M. Levine, et al. (1979), "Comparison of PUVA and Beta carotene in the treatment of polymorphous light eruption", *Br. J. Dermatol.* 100:187-191.
45. Paul, W. E. (1989), "The immune system: an introduction. "Fundamental Immunology", Edited by W. E. Paul, Raven Press, New York, pp 3, 10-18.
46. Ralfkier, E., L. G. Wantzin, et al. (1986), "Photosensitive dermatitis with actinic reticuloid syndrome", *Br. J. Dermatol.* 114:47-54.
47. Randall, T. (1990), "Thalidomides Back in the news, but in more favorable circumstances", in *Medical News & Perspectives*, *JAMA* 263:1467-1468.
48. Randall, T. (1990), "Research Focuses Immunosuppressive Effect, Unknown Teratogenic Mechanism of Thalidomide", in *Medical News & Perspectives*, *JAMA* 263:1473.
49. Randall, T. (1990), "Thalidomide has 37 years history", in *Medical News & Perspectives*, *JAMA* 263:1474.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79.

50. Roath, S., W. M. Elvey y G. Israels (1963), "Effects of thalidomide and its derivatives on human leucocytes cultured in vitro", *Lancet* 1:249-450.
51. Roitt, I., J. Brostoff y D. Male (1989), "Immunology", *Grower Medical Publishing*, 2nd. Ed., New York, pp 1.1-3.10.
52. Rojas, M. W. (1986), "Inmunología", *Addison-Wesley, Iberoamericana*, 6a. Ed. - pp 3-51.
53. Rowden, G., D. Davis, D. Lockett y L. Poulter (1988), "Identification of CD4+ 2H4+ (T_H+) Suppressor-Inducer cells in normal human epidermis and superficial dermis", *Br. J. Dermatol.* 119:147-154.
54. Sadl, A. (1988), "Talidomida en Dermatología", *Dermatología* 32:39-41.
55. Sadl, A., Q. Flores, et al. (1976), "Polymorphus Light Eruption treatment - - with thalidomide", *Australasian J. Dermatol.* 17:17-21.
56. Schwars, T. (1990), "Influence de rayons ultraviolets sur le système immunitaire", *Ann. Dermatol. Venerol.* 117:471-475.
- 56b. Sercarz, E. y V. kryzch (1991), "The distinctive specificity of antigen-specific suppressor T cells", *Immunol. Today* 12:111-118.
57. Serrano, M. E., A. D. Aguilar, O. S. Tenorio y S. Estrada-P (1988), "Aspectos Inmunológicos en la Dermatitis Polimorfa Luminica", *Dermatología* 32:19-26.
58. Shanon, E. J. y R. C. Hosting (1989), "In vitro Effect of Thalidomide on T--- cells, T-suppressors and T-helpers cells", *Int. J. Leprosy* 57:382.
59. Shehade, S. A., P. J. Roberts, B. L. Diffey e I. S. Foulds (1987), "Photodermatitis due to stop welding", *Br. J. Dermatol.* 117:117-119.
60. Stities, P. D., D. J. Stobo y V. J. Wells (1988), "Inmunología Básica y Clínica", *Manual Moderno*, 6a. Ed., México pp 59-75.
61. Tada, T. (1984), "Help, suppression and specific factors", in *Fundamental Immunology*, Edited by W. E. Paul, *Reven Press*, New York, pp 481-500.
62. Taylor, T. C., S. R. Stern, et al. (1990), "Photoaging/photodamage and photo-protection", *J. Am. Acad. Dermatol.* 22:1-15.
63. Tenorio, O. S. (1986), "Estudios de subpoblaciones de linfocitos T con anticuerpos monoclonales en pacientes con asma bronquial extrínseca y en pacientes con actinodermatitis", *Tesis, ENCB, IPN*.
64. Thompson, F. L., H. M. Mellon, et al. (1983), "Characterization with monoclonal antibodies of T lymphocytes bearing Fc receptors Ige (T cells) and IgG - (T cells) in atopc patients", *J. Immunol.* 131:2772-2776.
65. Thune, P. (1976), "Chronic Polymorphic Light Eruption", *Acta Dermatovener* 56: 127-133.
66. Williams, F. A. (1984), "The T-lymphocyte antigen receptor-elusive no more", *Nature* 308:108-109.
67. *The Merck Index* (1983), *Merck & Co. Inc.*, 10th Ed., U. S. A., p 1324.