



18
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL
DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

“SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA LIGADA AL COMPLEJO
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN LA
LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN MÉXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A:
JUAN GUZMAN GARCIA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 GENERAL

- I. INTRODUCCION
 - 1 Generalidades
 - 2 Ciclo biológico
 - 3 Clasificación clínica de la leishmaniasis
 - 4 Características clínicas
 - 5 Agentes etiológicos de la leishmaniasis
 - 6 Distribución geográfica
 - 7 La leishmaniasis en México
 - 8 Relación huésped parásito
 - 9 La respuesta inmunológica en la leishmaniasis
 - 10 El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)
 - 11 Asociación HLA y enfermedad
 - 12 Antecedentes de susceptibilidad y resistencia a la leishmaniasis
- II. OBJETIVOS
- III. MATERIAL Y METODOS
 - a Material y equipo
 - b Reactivos
 - c Métodos
 - 1 Toma de muestras
 - 2 Procesamiento de muestras para la tipificación de antígenos HLA
 - 3 Análisis estadístico

- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSION
- VI CONCLUSIONES
- VII. RESUMEN
- VIII. BIBLIOGRAFIA

CUADROS Y FIGURAS

- Figura 1 Ciclo de vida de la leishmaniasis
- figura 2 Distribución geográfica de la leishmaniasis en el mundo
- Figura 3 Distribución geográfica de la leishmaniasis en México
- Figura 4 Mapa genético del sistema HLA en el humano
- Cuadro 1 Especies y subespecies de Leishmania
- Cuadro 2 Formas clínicas de la leishmaniasis en la Chontalpa
- Cuadro 3 Antígenos HLA en el humano
- Cuadro 4 Distribución de sexos y edades en las poblaciones estudiadas
- Cuadro 5 Intradermorreacción de Montenegro y tiempos de evolución de las lesiones
- Cuadro 6 Improntas de los pacientes con leishmaniasis
- Cuadro 7 Frecuencias de grupos sanguíneos ABO y Rh en las poblaciones estudiadas
- Cuadro 8 Frecuencias de antígenos del locus A en las poblaciones estudiadas
- Cuadro 9 Frecuencias de antígenos del locus B en las poblaciones estudiadas

Cuadro 10 Frecuencias de antígenos del locus C en las poblaciones estudiadas

Cuadro 11 Frecuencia de antígenos de los loci DR, DQ y DP en las poblaciones estudiadas

Cuadro 12 Significancia estadística de los antígenos DQw3 y DPw4 asociados a la leishmaniasis

I. INTRODUCCION

La leishmaniasis abarca a un grupo de entidades clínicas causadas por diferentes protozoarios del genero Leishmania. La infección se debe a una zoonosis que infesta al hombre mediante el piquete de un mosquito parasitado. Por lo general la enfermedad sigue un curso crónico y es producida por diversas especies y subespecies del género Leishmania, las cuales se describen más adelante.

El padecimiento afecta casi toda América Latina y parte de los Estados Unidos, Asia, Africa y la costa del sur del Mediterráneo. Anualmente aparecen 400, 000 casos nuevos por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado a la leishmaniasis como un problema de salud pública (1).

Aun cuando recientemente se han hecho esfuerzos para controlar a la leishmaniasis, éstos no han fructificado debido a la diversidad de manifestaciones clínicas que presenta, a sus características epidemiológicas, y a la ignorancia sobre la prevalencia real de la enfermedad en cada zona geográfica.

En una reunión convocada por la OMS en Ginebra en 1984, los expertos concluyeron que constituye un verdadero problema, no sólo por su creciente magnitud sino por sus consecuencias socioeconómicas y psicológicas, ya que la leishmaniasis es a menudo debilitante e incapacitante. Además representa un

peligro para los niños pues este grupo es el más vulnerable, y el riesgo de equivocarse el diagnóstico es mayor debido a que las características clínicas de la leishmaniasis se pueden confundir con otras infecciones que afectan a los niños, como puede ser el caso de enfermedades exantemáticas, u otras que se manifiestan con lesiones en la piel. Por el contrario puede pasar desapercibida por algún tiempo (1).

1. GENERALIDADES.

El género Leishmania comprende un grupo de protozoarios flagelados, que son parásitos intracelulares obligados, de una gran variedad de animales vertebrados y del hombre mismo.

La leishmaniasis en los mamíferos es ocasionada por parásitos digénicos que contienen dos fases distintas en su ciclo de vida. Cada fase se caracteriza por tener un hospedero específico en la que el parásito muestra diferencias morfológicas y una localización distinta. En los tejidos de los vertebrados se encuentra exclusivamente en la forma de amastigote, es intracelular (sistema retículo endotelial). Los amastigotes son redondos inmóviles, de 2 a 5 micras de diámetro, tienen un núcleo central y cerca de este se halla el cinetoplasto el cual se colorea intensamente. Además tiene un flagelo rudimentario que no se extiende fuera del parásito. Los amastigotes son completamente

dependientes de la célula huésped donde se multiplican repetidamente por división binaria causando la ruptura de la célula parasitada. Los parásitos así liberados son fagocitados por los macrófagos vecinos. La transferencia del parásito de célula a célula puede ocurrir durante la división celular o durante la formación del granuloma el cual incluye las células epiteloides y gigantes que circulan a la zona afectada, la cual se infiltra con las células mononucleares (1, 2, 3).

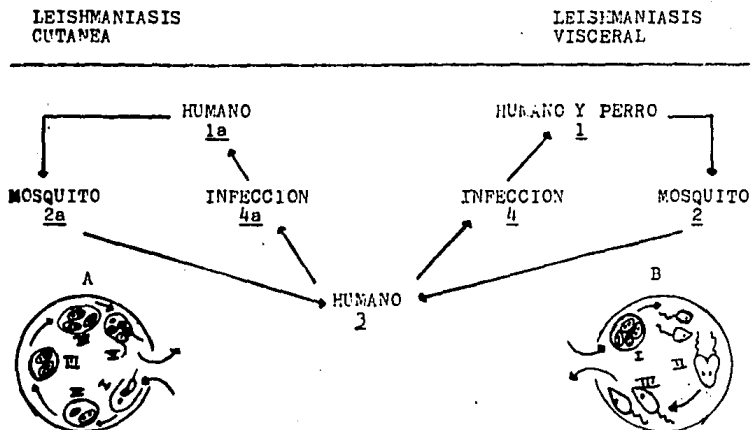
La forma de promastigote se encuentra dentro del huésped invertebrado (vector). Es extracelular de forma alargada y mide aproximadamente 20 micras de longitud, tiene un núcleo central y un cinetoplasto terminal en la parte anterior del cual se origina un flagelo (1, 2).

La infección es transmitida por vectores del género Phlebotomus en el Viejo Mundo y Lutzomyia en el Nuevo Mundo; en el humano solo los moscos hembra producen el piquete. Se considera una zoonosis característica de las zonas rurales y selváticas, donde se ha visto que los posibles reservorios son los roedores silvestres y los cánidos tanto silvestres como domésticos (1, 4).

2. CICLO BIOLÓGICO

Todas las leishmanias poseen un ciclo de vida similar. Los moscos vectores hembra toman al parásito de las células que se encuentran parasitadas en la piel del huésped vertebrado. En la luz del tubo digestivo del insecto, los parásitos se alargan, desarrollan rápidamente el flagelo y se convierten en formas móviles, que se conocen como promastigotes. Existe predilección de ciertas especies de leishmania para reproducirse en diferentes partes del tubo digestivo del mosquito. La reproducción se hace como ya se dijo, por división binaria. Los promastigotes infectantes migran a la parte anterior del tubo digestivo del insecto, hasta que son inoculados a un nuevo huésped a través del piquete. El tiempo que tarda el vector para ser infectante es aproximadamente de 10 días. En la naturaleza, la tasa de infección de los vectores es baja por lo que se requiere que pique repetidas veces, para lograr la transmisión. Al penetrar los promastigotes por la piel, invaden las células histiocitarias y en su interior se transforman en amastigotes. Dependiendo del tipo de cepa inoculada, el parásito se disemina en la piel, las mucosas o vísceras (1, 2). En la figura 1 se esquematiza el ciclo biológico del parásito.

FIGURA 1

CICLO DE VIDA DE LA LEISHMANIASIS

CICLO DE VIDA: 1 y 1a. El hombre y los animales vertebrados como el perro, padecen de la leishmaniasis visceral y tegumentaria. 2 y 2a. Son los vectores. 3. La exposición a la picadura de estos favorece la infección. 4. Compromiso visceral. 4a. La lesión cutánea. A. Desarrollo del parásito en el hombre: El promastigote que inyecta el vector penetra a la célula del sistema reticulo-endotelial (I), donde se convierte en amastigote (II), allí se divide (III, IV), finalmente se rompe la célula y da salida a numerosos amastigotes (V). B. Desarrollo del parásito en el vector: Los amastigotes son tomados por el vector (I), se multiplican en el intestino del insecto (II), y son inoculados como promastigotes al picar (III).

TOMADO DE: Restrepo, D., y Botero, D. 1984 (?)

3. CLASIFICACION CLINICA DE LA LEISHMANIASIS

No existe una clasificación universal de la enfermedad, pero para fines prácticos, se puede hablar de diferentes tipos de leishmaniasis de acuerdo a los órganos y tejidos afectados, y a la localización de la infección. Los diferentes tipos de entidades pueden ser causadas por distintas especies y subespecies. A continuación se señalan las diversas formas clínicas que se han descrito (1, 4).

Leishmaniasis Cutánea Localizada	(LCL)
Leishmaniasis Cutánea Diseminada	(LCD)
Leishmaniasis Mucocutánea o Espundia	(LMC)
Leishmaniasis Visceral o Kala-azar	(LV)
Leishmaniasis Dérmica o Postkala-azar	(LDPK)
Leishmaniasis Recidivans	(LR)

Es importante señalar que en cada región la enfermedad tiene una denominación autóctona propia del lugar. Por ejemplo en México la LCL se denomina úlcera de los chicleros y en Perú se llama Uta, en Brasil la LMC se llama Espundia y otros la denominan nariz de Tapir (2).

Los agentes etiológicos de esta forma clínica han sido bien identificados en cada zona endémica, y los cambios histopatológicos han sido muy bien caracterizados (3, 4).

4. CARACTERISTICAS CLINICAS

4.1 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

Después del piquete del mosquito, hay un periodo de incubación que va desde 2 semanas hasta 1 año. La primera manifestación de la enfermedad cutánea es la aparición de una pápula en el sitio de inoculación, la pápula crece lenta y progresivamente, hay formación de un absceso causado por bacterias piogénicas. Histológicamente, la pápula consiste de un histiosoma, acompañada de hipertrofia de la papila y el estrato corneo. La carga parasitaria es cada vez más evidente en la dermis., hay destrucción eventual aparentemente debida a la multiplicación del parásito y desintegración de la papila y de la epidermis. Se forma una costra en la piel, la cual se desprende dejando una úlcera o crater. La superficie de la herida se torna eritematosa, de apariencia espesa y deformación de tejido granulomatoso. En esta etapa hay cambios celulares importantes con infiltrado linfocitario, incremento de células plasmáticas y células gigantes multinucleadas. Se ven pocos macrófagos y unos cuantos parásitos. Pasando esta etapa hay recuperación de la lesión en la mayoría de los casos.

Las lesiones generalmente aparecen en extremidades y tronco, puede existir diseminación por vía linfática (2, 3).

4.2 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCD)

Fue descrita por primera vez por Convit (1958) como leishmaniasis tegumentaria difusa en Venezuela y Etiopía (5).

Esta forma clínica se manifiesta con múltiples lesiones diseminadas en las extremidades y en la cara, lo cual es consecuencia de la metástasis de una lesión única (LCL), aunque dicha metástasis nunca ocurre en los órganos internos. La lesión consiste de una pápula indolora no ulcerativa con macrófagos altamente parasitados. Los hallazgos histológicos demuestran escasos elementos linfocíticos; además de la cronicidad, llama la atención la ausencia de células gigantes y epiteloides y por lo tanto de la formación del granuloma (2, 3, 5).

4.3 Leishmaniasis Visceral (LV)

La LV o Kala-azar se conoce comunmente como una de las enfermedades que infectan órganos internos produciendo hiperplasia generalizada de las células del sistema retículo endotelial afectando particularmente al bazo, hígado y a los ganglios linfáticos. También puede existir anemia, leucopenia, hemorragias, úlcera intestinal y daño al miocardio. Además se manifiesta con hipoproteinemia e hipergammaglobulinemia. Macroscópicamente, se observan dos tipos de lesiones en el hígado. En la primera hay una reacción granulomatosa

que consiste de histiocitos y células linfocitocíticas y en la segunda se observan áreas más o menos extensas de necrosis hemorrágicas, cambios que provocan congestión, extravasación, colapso reticular y desaparición de los hepatocitos. Los cambios histológicos en el bazo consisten de una marcada atrofia de la pulpa blanca del bazo y de las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos. Dichas áreas en ambos órganos se acumulan de histiocitos parasitados y células plasmáticas (2, 3).

4.4 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)

La LMC o Espundia es característica del Brazil. La lesión primaria es similar a la producida por la LCL. Hay diseminación a la mucosa nasal y esto puede ocurrir durante la presencia de la primera lesión o hasta 30 años después de la infección.

Generalmente se manifiesta con ulceración y erosión progresiva en las lesiones, la cual destruye el tejido y el cartilago de las cavidades nasales; además hay fuerte reacción inflamatoria y sobreviene la mutilación de las cavidades nasales que pueden ser muy dolorosas e inclusive ocasionar la muerte. Histologicamente existe daño tisular y vascularización debido a la liberación del parásito. El infiltrado celular es muy importante y es una de las manifestaciones más comunes. Hay necrosis de la

colágena y cambios fibrinoides con vasculitis; aparecen unos cuantos macrófagos con pocos parásitos. Se cree que la destrucción del tejido en general se debe a liberación de los antígenos de la leishmania, siendo una de las formas más virulentas de la leishmaniasis. En contraste con la LCL, esta no cura espontáneamente (2, 3).

4.5 Leishmaniasis Recidivans (LR)

Es una forma crónica tuberculoide o lupoide de la leishmaniasis. Ha sido considerada como una enfermedad subclínica, la cual aparece años después de que ocurre la primera infección localizada de tipo urbano. La infección se localiza cerca de la cicatriz de la primera lesión manifestándose en forma lupoide. Histológicamente, la lesión se constituye como un granuloma y está formado por un intenso infiltrado linfocitario, con numerosas células gigantes, y algunas células epiteloideas y pocos histiocitos (1, 2, 3).

4.6 Leishmaniasis Dermica Postkala-zar (LDPK)

Es una lesión en la piel que se puede deber a un caso mal tratado de LV. Sus manifestaciones clínicas consisten de numerosas erupciones nodulares, particularmente en la cara, extremidades y tronco. Existen dos variedades de lesiones, una hipopigmentada usualmente no ulcerativa y una macular, las cuales se

asocian con una reacción granulomatosa y con la presencia de pocos parásitos. Las formas eritematosas y nodulares que son las más comunes presentan edema, infiltración histiocítica marcada, proliferación de los capilares con formación de granulomas y presencia de numerosos parásitos. A pesar de la carga parasitaria que se encuentra, no se llegan a localizar en la piel ni en órganos internos (2, 3).

5. AGENTES ETIOLOGICOS DE LA LEISHMANIASIS

Se conocen por lo menos doce especies del género Leishmania que causan la enfermedad en el mundo. No existe un acuerdo general en el empleo de la nomenclatura de estos parásitos. Sin embargo la mayoría de los autores coinciden con adoptar la nomenclatura trinomial de Hoare (6), que a pesar de sus inconveniencias, ofrece una buena comprensión de los agentes etiológicos de la leishmaniasis humana.

Algunos autores usan la nomenclatura trinomial y los datos clínicos epidemiológicos que permiten clasificar a las especies causantes de la enfermedad, basándose en las características antigénicas, biológicas, el lugar de aislamiento de la cepa, las características de la lesión y las especies predominantes en el área. Las más importantes son:

Leishmania mexicana

Leishmania tropica

L. braziliensis

L. donovani

L. major

L. aethiopica

L. peruviana

Más recientemente, se han distinguido las diferentes especies mediante la utilización de diferentes técnicas como son la densidad de flotación del DNA, la secuenciación del DNA del cinetoplasto y del DNA nuclear (7), y más comunmente el análisis electroforético de isoenzimas de las subespecies del parásito (8). La producción de anticuerpos monoclonales contra determinantes antigénicos específicos de especies y subespecies de leishmania, han sido de gran ayuda para el diagnóstico rápido y preciso, y para la tipificación de cepas en áreas donde coexisten varias subespecies (9).

En el cuadro 1 se muestran las especies y subespecies de leishmania que causan la enfermedad humana, sus formas clínicas y su distribución en el mundo (10).

6. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Es difícil mostrar una distribución geográfica exacta de la enfermedad ya que se desconoce su prevalencia con precisión en el mundo; sin embargo, existen algunos datos proporcionados por la OMS, donde

CUADRO 1. PRINCIPALES ESPECIES Y SUBESPECIES DE LEISHMANIA QUE CAUSAN ENFERMEDAD

ESPECIE	SUBESPECIE	DISTRIBUCION	FORMA CLINICA	TENDENCIA A LA AUTO-CURACION
<u>L. donovani</u>	<u>L. donovani donovani</u>	Viejo Mundo	LV	NO
	<u>L. donovani infantum</u>	Viejo Mundo	LDPK	NO
	<u>L. donovani chagasi</u>	Nuevo Mundo		
<u>L. major</u>		Viejo Mundo	LC	Rápida
<u>L. tronica</u>		Viejo Mundo	LC	Lenta
			LR.	NO
<u>L. aethiopica</u>		Viejo Mundo	LC	Lenta
			LCD	NO
<u>L. brasiliensis</u>	<u>L. brasiliensis brasiliensis</u>	Nuevo Mundo	LMC	NO
	<u>L. brasiliensis guyanensis</u>	Nuevo Mundo	LC	SI
	<u>L. brasiliensis panamiensis</u>	Nuevo Mundo	LC	SI
<u>L. mexicana</u>	<u>L. mexicana mexicana</u>	Nuevo Mundo	LC	Variable
	<u>L. mexicana amazonensis</u>	Nuevo Mundo	LCD	NO
	<u>L. mexicana bifanoi</u>	Nuevo Mundo		
<u>L. peruviana</u>		Nuevo Mundo	LC	Casi siempre

se señala una incidencia mundial de 400,000 casos por año. Es una enfermedad principalmente de zonas tropicales y subtropicales que se extienden en el Nuevo Mundo desde el sur de Texas hasta el norte de Argentina. Los países más afectados son México, todos los de Centro América, Colombia, Venezuela, Perú, Bolivia y Brasil, los cuales presentan focos endémicos importantes. En el Viejo Mundo comprende a los continentes de Asia, Africa y la costa sur del Mediterráneo en Europa (1, 10).

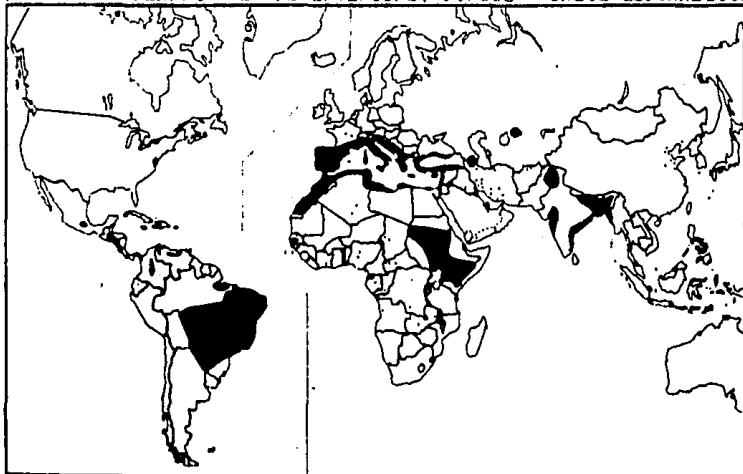
La distribución geográfica de la leishmaniasis visceral y cutánea se esquematiza en la figura 2; mapa I (LV) y mapa II (LC y LCM).

7. LA LEISHMANIASIS EN MEXICO

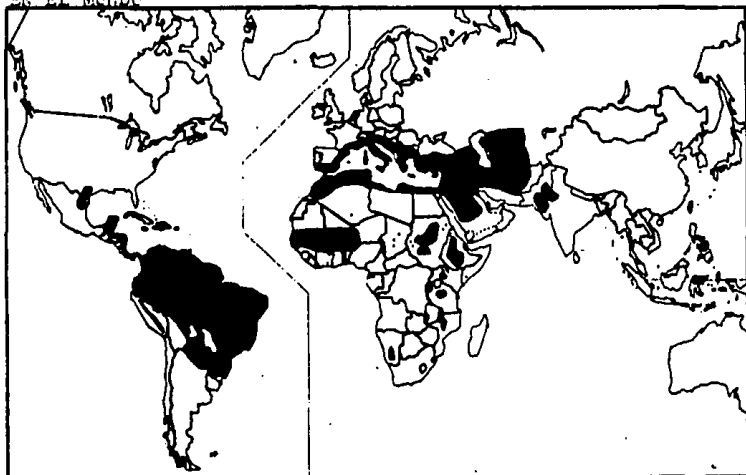
La leishmaniasis fue reconocida en América y desde luego en México desde la época precolombina. Entonces, los padres franciscanos describían a la enfermedad por la presencia de lesiones mutilantes en las orejas de los indígenas. En 1927 se publicaron datos sobre idolillos con mutilaciones en las orejas que ya reflejaban la existencia de la leishmaniasis en las comunidades, pues los indígenas expresaban mediante el arte los hechos de la vida cotidiana (11).

El primero en descubrir la leishmaniasis tegumentaria fue Seidelin en 1913 (12) y la bautizó como úlcera de los chicleros, debido a las lesiones en

MAPA I. DISTRIBUCION DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL EN EL MUNDO.
 (AREAS SOMBRADAS = ZONAS ENDEMICAS, PUNTOS = CASOS ESPORADICOS)



MAPA II. DISTRIBUCION DE LA LEISHMANIASIS CUTANEA Y MUCOCUTANEA EN EL MUNDO



las orejas de trabajadores dedicados a la extracción del chicle. En 1942 se publicó el primer estudio epidemiológico sobre esta zoonosis, realizada en la península de Yucatán (13). En 1952 (14) se informó del hallazgo del primer caso de LV en México en un niño nacido y residente del Municipio de Huitzuco, Gro. situado en la cuenca del río Balsas, posiblemente de una región endémica donde se han encontrado cinco casos más (14, 15).

Hoy la leishmaniasis también es un problema de salud en México. Se ha visto crecer su distribución geográfica, e incrementar en forma importante la prevalencia tanto de LCL como LCD, e incluso la primera esta en proceso de invadir algunas zonas urbanas del Estado de Tabasco. Afecta principalmente a las zonas tropicales y subtropicales; es una zoonosis de áreas rurales y selváticas y no respeta edad ni sexo (14, 15).

AGENTES ETIOLOGICOS

Hasta ahora la única especie de Leishmania encontrada en México, son L. mexicana mexicana y L. donovani chagasi. La LC fue adjudicada a L. m. mexicana por Neva en 1986 (16). Las cepas del presente trabajo que se lograron identificar fueron tipificadas por la Dra. Nancy Sarvia también como L. m. mexicana mediante

anticuerpos monoclonales y por identificación de isoenzimas en el CIDEIM de Cali, Colombia.

VECTORES.Y RESERVORIOS

En México el género Lutzomyia es el transmisor (en el lenguaje vernáculo papalotillas del nahuatl). En la actualidad el único transmisor comprobado es Lutzomyia olmeca, aunque se han sugerido otras especies. La transmisión se lleva a cabo a través de moscos de 3.5 mm de longitud, de cuerpos y alas pilosas. Las hembras son las únicas hematófagas. Los adultos se refugian en cuevas, en rincones oscuros y húmedos o matorrales. También se encuentran en los huecos de los árboles, madrigueras de roedores, y suelen penetrar en las casas cercanas a la selva atraídos por la luz artificial. En general se considera que los roedores silvestres son los reservorios de la LC y que los cánidos silvestres y domésticos de la LV (15, 16).

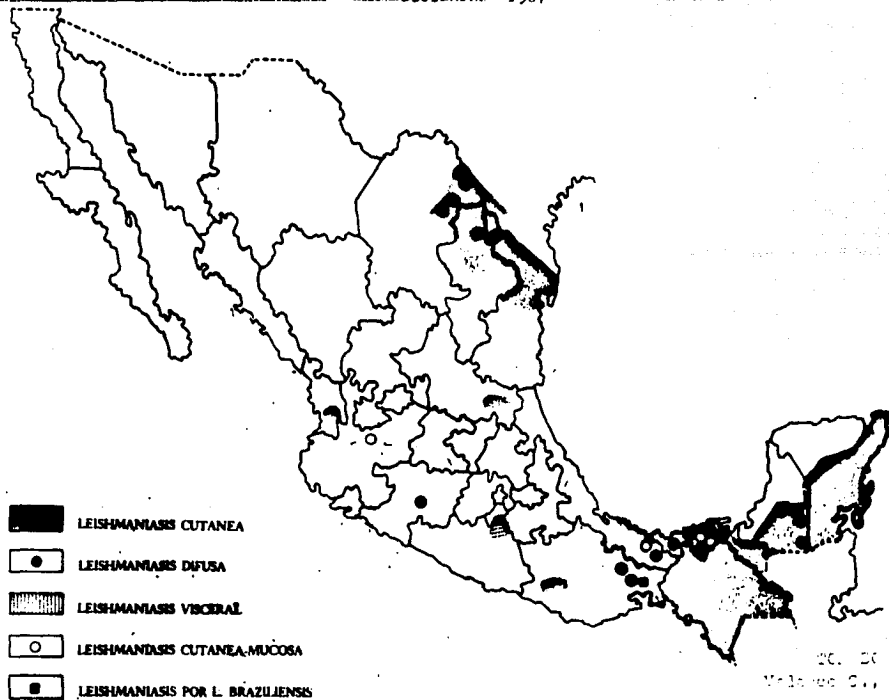
DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Algunos autores han sugerido que la leishmaniasis en México se extiende desde el río Bravo por el norte, hasta el río Suchiate por el sur particularmente por la costa del Golfo de México, aunque seguramente debe haber focos en la costa occidental del pacífico. Clásicamente se habla de tres zonas principales de

endemia; la del sureste que abarca desde el sur de Veracruz hasta Quintana Roo y Chiapas; la del norte que afecta los Estados de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila, así como la Huasteca Potosina y probablemente se adentre en el Estado de Durango y la zona de LV que se extiende desde la cuenca del río Valsas que comprende porciones del Estado de Puebla, Guerrero, Morelos, Oaxaca y Michoacán. Sin embargo, en lo que respecta a la LCL la zona endémica parece ser única, extendiéndose desde la península de Yucatán y Chiapas hasta la frontera con los Estados Unidos de Norte América (14, 17). En la figura 3 se observa la distribución geográfica en México.

Debido a la falta de información, es posible que existan otros focos de endemia, por lo que es necesario conocer más acerca de las características clínicas y epidemiológicas con el objeto de delimitar su distribución geográficas con precisión y afrontar el problema con conocimiento de causa. La prevalencia de la leishmaniasis en la República mexicana se desconoce, sólo hay estudios aislados en las áreas de endemia pero nunca se ha concretado un estudio epidemiológico completo en todo el país. A manera de ejemplo, en el cuadro 2 se indica un estudio hecho en la zona de la Chontalpa, Tabasco (18).

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA LEISHMANIASIS EN LOS ESTADOS MEXICANOS



CUADRO 2

FORMAS CLINICAS DE LA LEISHMANIASIS ESTUDIADA EN LA CHONTALPA,
TABASCO, MEXICO (1987):

FORMAS CLINICAS	Num.	%
LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA	148	94.2
LEISHMANIASIS CUTANEA DISEMINADA	7	4.5
LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA	2	1.3

PROCEDENCIA DE LOS ENFERMOS DE LEISHMANIASIS ESTUDIADOS EN LA
CHONTALPA, TABASCO, MEXICO (1987)

ENTIDAD Y MUNICIPIO	Num.
TABASCO:	
CARDENAS	25
CENTRO	3
COMALCALCO	68
CUNDUACAN	39
JALPA	3
MACUSPAN	2
PARAISO	6
TEAPA	1
TENCSIQUE	3
CAMPECHE : ESCARCEGA	7

TOMADO DE: Velasco C., 1989 (18)

FORMAS CLINICAS PREVALENTES EN MEXICO

La LCL o úlcera de los chicleros es la forma más frecuente en el país y consiste de una lesión ulcerosa de 1 0 2 cms de diámetro, localizada en las áreas descubiertas de la piel y con mayor frecuencia en las orejas. En esta zona se vuelve crónica y destructiva, y no es raro observar lesiones con más de 40 años de evolución, mientras que en la piel llegan a remitir espontáneamente en un periodo de 6 a 12 meses. Esta forma clínica se localiza en áreas urbanas de Comalcalco, Tabasco debido a la eliminación de las zonas selváticas y a su substitución por los plantíos de cacao, que producen condiciones ecológicas apropiadas para el establecimiento de la parasitosis.

La LCD se caracteriza por presencia de placas y lesiones nodulares que se extienden por la piel a lo largo de todo el cuerpo, sin invadir las palmas de las manos, los pies y el cuero cabelludo. En las etapas de mayor productividad de la vida del individuo se observa una destrucción notable de las mucosas orofaríngeas. La inmunosupresión específica es evidente, la respuesta a la intradermorreacción es negativa y los pacientes se tornan refractarios a la terapia con antimoniales.

Solo se conocen 6 casos de LV en el territorio nacional, y generalmente se manifiesta como atrofia del sistema retículo endotelial con daño hepático, bazo y en algunos casos en médula ósea y puede llegar a ser fatal (14).

8. RELACION HUESPED PARASITO

Existe una gran cantidad de estudios que se han llevado a cabo para explicar la relación huésped-parásito en las distintas formas clínicas de la leishmaniasis. Indudablemente existen factores que dependen del parásito como son: la especie y subespecie de leishmania, su estructura antigénica y su virulencia, la cantidad de inóculo inyectado inicialmente y quizá la asociación con un determinado tipo de reservorio o vector. También existen factores dependientes del hospedero como son: el estado general del individuo, el origen étnico, la constitución genética y la capacidad de montar una respuesta inmunológica. El parásito y el individuo interactúan entre sí, dando como resultado, un amplio espectro de manifestaciones clínicas y características inmunológicas análogas a las que se presentan en la lepra. El concepto espectral de la leishmaniasis fue originalmente descrito por Destombes (19), quien considera que las manifestaciones dérmicas en la leishmaniasis son una consecuencia de la respuesta celular que se induce en el huésped. De esta manera propuso las formas clínicas de la LC, basándose en los aspectos histológicos de las lesiones y la respuesta inmunológica celular (RIC), evaluada por la prueba cutánea que se lleva a cabo con la aplicación

intradérmica del antígeno específico (leishmanina). El espectro inmunológico de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis se describe más adelante.

El parásito es internalizado formando el fagosoma del macrófago y éste se fusiona con los lisosomas formando el fagolisosoma (20). Para el inicio y establecimiento de la infección es necesario la unión del parásito al macrófago, su internalización y supervivencia dentro de los fagolisosomas. La fagocitosis de la leishmania ocurre en dos etapas diferentes: primero, la adhesión del parásito a los receptores que existen sobre la superficie del macrófago y segundo, su subsecuente internalización. Griffin (21) propone que el proceso de entrada es a través de un mecanismo denominado "Zipper" (cremallera) que se lleva a cabo por el reclutamiento de receptores sobre los macrófagos asociados a moléculas de la superficie del parásito; esto permite la agregación sobre un polo de la célula para posteriormente activar la internalización del parásito. Es importante mencionar que no es un solo receptor el que esta involucrado en la adhesión. Existen varios receptores de los cuales los más estudiados son el CR3 (C3b) y el de manosa-fucosa (MFR) en los macrófagos humanos (22), pero pueden participar los que

reconocen el fragmento Fc de la IgG-1 e IgG-3 en el ratón (23).

En cuanto a las moléculas del parásito que participan en la interacción, se ha visto que la principal glicoproteína de superficie (PSP o Gp63) de la leishmania contiene manosa, la cual es receptora del fragmento C3bi (fragmento C3 del complemento inactivado) la cual se asocia al receptor CR3 y se une de manera directa al receptor manosa-fucosa del macrófago (22, 24). La PSP se encuentra en toda la superficie del promastigote aun en el flagelo y la bolsa flagelar. Se mueve sobre la membrana concentrándose primero al final de la célula y liberándose entonces al medio. Es un dímero de 152 KDa (Kilo Daltons); cada subunidad tiene 63 KDa y tiene una actividad proteolítica semejante a la tripsina. Los promastigotes incubados con suero normal o con componentes del complemento, acumulan hasta 10^6 moléculas de C3 distribuidas sobre la célula, que son en su mayoría C3b asociadas directa o indirectamente a la PSP. Se propone que la actividad proteolítica de la PSP es necesaria para la ruptura de C3b a C3bi, lo que inhibe la activación posterior de la cascada del complemento y además genera C3bi que se une al CR3 del macrófago (24).

La PSP es inmunogénica para el hombre y otros mamíferos. Los anticuerpos de conejo contra PSP

presentan reacción cruzada con diferentes especies de leishmania y los anticuerpos monoclonales pueden reconocer epítopes comunes aislados sobre la molécula. Los anticuerpos en contra de la PSP presentes en el suero de pacientes, no son protectores y no correlacionan con el pronóstico clínico de la infección, pero pueden ser útiles para el inmunodiagnóstico (23, 24).

Otra molécula que es importante en la adhesión del parásito al macrófago es la lipofosfoliglicana (LPG), la cual ha sido mejor estudiada en L. donovani. Es un glicoconjugado heterogeneo de 9 KDa en promedio que se encuentra en la superficie de la membrana del parásito ocupando el 25% del área total; también es aceptor de C3 del complemento y se une vía CR3 al macrófago.

La LPG (antes llamado factor excretor) es un marcador de metaciclo génesis ya que lleva una modificación regulada durante la transición de la fase de crecimiento logarítmica no infecciosa a la estacionaria metacíclica infecciosa. Esta modificación involucra la adquisición de un determinante de carbohidrato nuevo, que parece ser un marcador definitivo para la metaciclo génesis y un prerrequisito para la infectividad del parásito en ratones. Este cambio en el desarrollo promueve la resistencia al complemento y su unión a los receptores CR3 (a través de la unión de C3 a la LPG) (26).

El éxito de la infección depende de la capacidad del promastigote para reconocer y unirse a los macrófagos, ser ingeridos y sobrevivir dentro de los fagolisosomas de estas células.

Esto fue analizado por Sacks y col. (27) quien descubrió dos poblaciones de promastigotes provenientes de Phlebotomos y de cultivos: los promastigotes no infectivos en proliferación, en la fase logarítmica de crecimiento y los infectivos en la fase estacionaria (metacíclicos). En estudios sobre la infectividad de L. major en ratones Balb/c identificaron promastigotes metacíclicos en el intestino medio del vector en el día 3 post-infección cuya población se incrementa de los días 3 al 7. La proporción de promastigotes infectivos para ratones *in vivo* y para macrófagos *in vitro* va del 0 al 40% cuando los parásitos cambian de la fase de crecimiento logarítmica a la estacionaria en el cultivo.

Sacks y cols. (27) también estudiaron que la aglutinina de cacahuete (PNA) aglutina a todos los promastigotes de la fase logarítmica de crecimiento pero solo aglutina al 50% en la fase estacionaria. Los que no aglutinan son morfológica y patogenicamente distintos para los macrófagos murinos.

Un anticuerpo monoclonal contra promastigotes que no aglutinan con PNA reconocen a un antígeno de superficie que no está presente en los promastigotes de

la fase logarítmica. Se sugiere que este anticuerpo reconoce determinantes de carbohidrato que se hallan en una molécula de fosfatasa ácida soluble (22).

La perturbación de la membrana plasmática de los macrófagos peritoneales causada por promastigotes activa el estallido respiratorio. Los promastigotes de la fase estacionaria son capaces de reducir significativamente al citocromo C y por lo tanto la cantidad de iones superóxido. Los amastigotes no promueven el estallido respiratorio significativamente y sobreviven en los macrófagos in vitro. Hay algunas evidencias de que los amastigotes pueden interferir con la función del estallido respiratorio debido a la acción de una fosfatasa ácida unida a la membrana y una lipasa que actúa sobre el diacil-glicerol de la membrana del macrófago. Además, estas enzimas de membrana del promastigote pueden ser importantes para la sobrevivencia del parásito, jugando un papel importante en la generación de purinas de los nucleótidos del hospedero para su transporte a través de la membrana de la leishmania. También se ha demostrado una ATPasa en la bomba de protones de la membrana del parásito que transporta glucosa y aminoácidos hacia el interior, manteniendo un pH neutro dentro del parásito mientras se encuentra en el fagolisosoma acidificado (22, 24).

La LPG también juega un papel muy importante en la sobrevivencia del amastigote dentro del fagolisosoma,

ya que se ha demostrado que es inhibidora de la B-galactosidasa y de la protein-cinasa C; además es quelante del calcio intracelular, lo cual está relacionado con la inhibición del estallido respiratorio de los macrófagos y se ha demostrado que los macrófagos activados por linfoncinas o LPS que fagocitan glóbulos rojos recubiertos con LPG presentan una tasa de citolisis significativamente menor que con los glóbulos rojos no recubiertos. Por otro lado, se propone que la LPG puede actuar como una barrera de superficie previniendo la acción de la hidrolasa sobre el parásito ya que el lisosoma puede no poseer las glicocidasas o lipasas necesarias para degradar a la LPG. Además, la naturaleza altamente aniónica de la LPG puede proporcionar protección para el parásito contra el ataque enzimático de los lisosomas (26).

Inmunológicamente la LPG es altamente inmunogénica por su estructura, y parece ser útil en la inmunización ya que ha demostrado ser protectora en ratones. No obstante, se ha confirmado que las células T reconocen a la LPG, aunque se sabe que en la infección puede inhibir las respuestas proliferativas y también activar las células T supresoras (26, 28).

9. LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad que presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales regularmente inducen a la expresión de un tipo de inmunidad característica, que dependen de la capacidad de respuesta del huésped en contra del parásito. Las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis depende de una gran variedad de mecanismos inmunológicos que a su vez están condicionados por las características genéticas de cada individuo, y por las diferentes especies de leishmania que lo afecten.

En la LCL se ha demostrado que la respuesta celular específica tanto in vivo como in vitro se halla intacta y en experimentos de transformación blastoide, los linfocitos T responden adecuadamente tanto a mitógenos como a la fitohemaglutinina (PHA) como a los antígenos de leishmania (29). La respuesta celular específica in vivo se determina mediante el uso de la prueba cutánea de hipersensibilidad tardía y este tipo de pacientes desarrollan una buena respuesta celular, con una induración positiva. La respuesta que se obtiene varia dependiendo de la especie del parásito, entre 48 hrs y 2 semanas. La respuesta humoral no parece jugar un papel importante en la protección contra el parásito en estos casos y de

hecho, los anticuerpos se hallan en títulos muy bajos o están totalmente ausentes (30).

Huszar y col. (31) informaron que pacientes con LC, las células predominantes en el infiltrado mononuclear que rodea a las lesiones son del tipo CD8. No obstante, los pacientes tienen tanto subpoblaciones de linfocitos T circulantes como respuesta proliferativa a PMA y al antígeno específico normal. En cambio, en las biopsias en las que el granuloma estaba bien formado, observaron un incremento relativo de linfocitos T CD4 (cooperadores). Estos datos sugieren que las células supresoras pueden inhibir las señales de inducción de los linfocitos T cooperadores y por lo tanto ser responsables de la aparición de lesiones crónicas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las células CD8 pueden inducir protección contra L. major ya que los ratones CBA que son resistentes, se vuelven refractarios a la curación después del tratamiento repetido con anticuerpos monoclonales CD8 lo que sugiere la participación de las células CD8 en la citotoxicidad contra las células infectadas (32).

Por otro lado, en este mismo trabajo se demostró la existencia de dos subpoblaciones de linfocitos CD4 y se sugiere que dependiendo de la constitución genética del huésped los amastigotes se multiplican o no dentro del macrófago. Las células en las que la proliferación es limitada induce la activación de linfocitos CD4

protectores (Tp), mientras que los macrófagos en donde el parásito prolifera activa a los CD4 (Tcp) " contraprotectores ". Las Tp secretan $IFN-\gamma$ que activan a los macrófagos para matar al parásito intracelular. En cambio las Tcp elaboran IL-3 e IL-4 las cuales pueden inhibir la activación del macrófago que se logra con el $INF-\gamma$ desviando la respuesta hacia la producción de anticuerpos, los cuales no son protectores. Se ha propuesto que la inducción de estas poblaciones depende de la asociación de ciertos glicoconjugados de los promastigotes de L. major con las moléculas MHC de clase II sobre la superficie del macrófago infectado. También se sugiere que el L-GC (glicoconjugado deslipidizado) se une a los macrófagos sin asociarse a las moléculas clase II para activar a las células CD4 (Tcp). Otra alternativa es que estas subpoblaciones CD4 reconozcan epítopes distintos (péptidos) ya que en ratones Balb/c infectados con Leishmania mexicana y tratados con tumiocicina no se induce una respuesta protectora, pero se retiene la capacidad de estimular la supresión de la inmunidad protectora, cuando la administración es por vía subcutánea (32).

En la LMC parece haber ciertos trastornos en los mecanismos de protección en individuos aparentemente inmunocompetentes, pues los pacientes responden bien a la intradermorreacción, desarrollan una buena respuesta celular, pero también se encuentran anticuerpos

circulantes en la mayoría de los casos (3, 33) y se ha demostrado la presencia de complejos inmunes además de anticuerpos específicos anti-IgG, particularmente en casos que exhiben múltiples lesiones en las mucosas. Es posible que la presencia de estos complejos inmunes determinen la severidad de la infección, debido a que se encuentra activada la vía del complemento y esto producir necrosis del tejido donde se depositan los complejos inmunes.

La LCD se caracteriza inmunológicamente por la ausencia de respuesta tardía al antígeno de leishmania, y la presencia de títulos altos de anticuerpos específicos circulantes. La inmunosupresión es específica ya que se ha demostrado que los pacientes no están inmunocomprometidos y reaccionan normalmente a antígenos no relacionados como son la lepromina y tuberculina (3).

En un estudio hecho en la República Dominicana, se informó que los individuos con LCD no responden a la leishmanina, pero si al PPD y a la candidina. También se observó que la proliferación de células T se logra restaurar cuando las células linfocíticas se pasan a través de una columna de lana, con la cual se eliminan las células adherentes o cuando se agrega indometasina. Por estos hallazgos se propuso que existe una población de células supresoras adherentes que son responsables de la anergia específica en la LCD. (35).

La LV se caracteriza principalmente por una producción exagerada de inmunoglobulinas como son la IgG y la IgM y una supresión específica celular. También se encuentra una gran cantidad de anticuerpos circulantes contra antígenos específicos y se ha demostrado la presencia de complejos inmunes que contienen IgG, IgM y factores del complemento que se pueden disociar a un pH ácido (33, 36). La hiper-reactividad de la respuesta humoral en pacientes con LV va acompañada de una hiporeactividad de la inmunidad celular.

El defecto de la respuesta de la prueba cutánea va acompañada de una respuesta pobre de células T in vitro (37). También se ha informado de una disminución de las células T circulantes además de una respuesta baja a los mitógenos in vitro (38).

Es evidente que las subpoblaciones de células T están jugando un papel importante en el proceso inmunológico para inducir una buena respuesta, pues también se ha informado que la proporción de células T cooperadoras (Th) y T supresoras (Ts) están en desequilibrio comparativamente con lo que sucede en personas sanas. En este sentido se han encontrado incrementadas las células CD8 (Ts) y reducidas las células CD4 (Th), lo que sugiere que no hay una activación adecuada de las células Th y que por lo tanto la producción de linfocinas se encuentra

disminuída. Esto puede ocasionar que los macrófagos no se activen y por lo consiguiente no confieran proteccion al no poder llevar a cabo eficientemente el proceso de destruccion intracelular de los parásitos (39).

Debido a la importancia que juega la respuesta inmunológica en el desarrollo de la leishmaniasis en el humano, se ha utilizado el modelo murino para tratar de explicar lo que esta sucediendo en dicha infeccion.

En un trabajo realizado en ratones susceptibles Balb/c y resistentes CBA en la LC causada por L. major se investigó el papel inmunológico de las subpoblaciones de las células T L3T4+ (T cooperadoras) y LYT2+ (citotoxicas/ supresoras) (39). Los resultados de este y otros estudios han demostrado que se requiere tanto de células específicas L3T4+ como LYT2+ para el control inmunológico efectivo de la LC, aunque el mecanismo efector más importante de la destruccion de los parásitos intracelulares parece ser la activación del macrófago por las células L3T4+, las cuales proveen ayuda para la síntesis de anticuerpos tanto in vitro como in vivo, transfiriendo la capacidad de respuesta de hipersensibilidad tardía en ratones singénicos y produciendo factores activadores de macrófagos INF- γ e IL-3. Sin embargo los resultados obtenidos en los ratones susceptibles Balb/c sugieren que el papel protector de estas células depende del

número de células L3T4+ que se generan durante la infección, pues cuando hay un exceso, estas células favorecen el reclutamiento y proliferación de macrófagos al sitio de la lesión. Como resultado de este incremento, el número de macrófagos parasitados aumenta considerablemente y la infección ya no es controlada por los mecanismos inmunológicos. Por lo tanto el que la infección revierta en los animales susceptibles y resistentes se puede deber en parte a las diferencias cuantitativas de las células L3T4+ presentes. No obstante, debe tenerse en cuenta que recientemente se ha visto que estas células están formadas por dos subpoblaciones como ya se señaló (32), y es posible que en los ratones susceptibles este presente la subpoblación que causa daño mientras que en los ratones resistentes esté en exceso la responsable de la protección.

Por otro lado también se demostró en este estudio que la presencia de células LYT2+ puede conferir protección en la LC, pues cuando se reduce esta población con anticuerpos monoclonales anti-LYT2+, la carga parasitaria aumenta y la lesión se exagera, por lo que se puede concluir que ambas subpoblaciones celulares son necesarias para el control inmunológico efectivo de la LC causada por *L. major* (39).

Otros trabajos han demostrado que la resistencia adquirida depende de la respuesta de las células T. En

el ratón esta respuesta está mediada por células T circulantes que generalmente exhiben el fenotipo LYT1+2- (cooperadoras) y se demostró que éstas son capaces de transferir la respuesta de hipersensibilidad a cepas de ratones singénicos normales, inoculando clonas de células LYT1+2- específicas contra el antígeno de leishmania en ratones DBA/2 sanos. La transferencia de la hipersensibilidad se logra en ratones singénicos con la administración simultánea del antígeno de L. major. La respuesta es específica para L. major y requiere de la identidad H-2 entre las células transferidas y las células del huésped, por lo que se ha propuesto que existen genes dentro del sistema MHC en el ratón que están participando en la regulación de la respuesta inmunológica a la infección (40). En otro modelo se ha observado que la reacción de hipersensibilidad tardía se puede restaurar en ratones Balb/c altamente susceptibles a la LC causada por L. tropica; estos ratones montan una respuesta celular intensa in vivo y curan de sus lesiones cuando se les transfieren células T normales. Los ratones timectomizados e irradiados de la misma cepa, muestran un retardo en el crecimiento de las lesiones llegando a sanar paralelamente con la aparición de reactividad cutánea cuando se les reconstituye con médula ósea de ratones sanos. Estos autores han propuesto que existen poblaciones de T supresoras específicas en los ratones

susceptibles que son responsables de este rasgo pero que al ser irradiados y timectomizados pierden la capacidad de producir dichas poblaciones, y por lo tanto se recuperan de la infección (41).

Recientemente se demostró que una fracción de una glicoproteína purificada de L. m. amazonensis designada gp 10/20 induce la respuesta celular mediada por células L3T4+. Sorprendentemente se demostró que la inmunidad a esta fracción incrementa el tamaño de la lesión inducida por L. m. amazonensis en ratones susceptibles Balb/c, lo que indica una posible participación de la gp 10/20 en el proceso inmunopatológico en la LC. Se ha comprobado que esta fracción es el producto de degradación de un antígeno de 17 KDa que se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes especies de leishmania. Al inmunizar ratones con gp 10/20 previamente a la infección con L. m. amazonensis, se acelera la progresión de la enfermedad y por lo tanto se piensa que esta fracción induce supresión de la inmunidad celular. Se ha postulado que la supresión presente en pacientes con LCD causada por subespecies de L. mexicana, es consecuencia de la presencia de grandes cantidades de esta fracción. Contrariamente, en pacientes con LCL y LMC causada por subespecies de L. braziliensis hay una baja cantidad de la fracción del antígeno de 17 KDa y en estos pacientes parece haber supresión. También se

observó que los sueros de pacientes con LV reconocen a estas moléculas, lo que indica que esta molécula es antigénica en las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis (42).

Por último un acontecimiento relevante para la inducción apropiada de una respuesta inmunológica es la presentación del antígeno y en este sentido existen algunas observaciones que muestran que esta función esta alterada en la leishmaniasis.

La IL-1 es una citocina que constituye uno de los principales mediadores de las células presentadoras de antígenos para que la presentación a los linfocitos T sea óptima. Ya que los macrófagos se hallan crónicamente parasitados en la leishmaniasis, la caracterización de los fenómenos relacionados con estas células es sumamente importante. En este sentido, Reiner y col. (43) examinaron la cantidad de IL-1 en macrófagos infectados por L. donovani al poner en contacto dichas células de ratones Balb/c infectadas con amastigotes y evaluando la actividad de IL-1 por estimulación con timocitos. Demostraron que la producción de IL-1 está disminuída en comparación con células testigo estimuladas con L. monocytogenes. Además para saber si la activación del macrófago se ve afectada, se tomaron células del exudado peritoneal que se activaron con L. donovani pero no hubo incremento de la actividad intracelular, ni extramembranal, ni de

secreción de IL-1. Por otro lado, la penetración de promastigotes y su conversión a amastigotes dentro del macrófago, no induce la síntesis de IL-1. Estos hallazgos indican que L. donovani suprime la síntesis de IL-1 y la respuesta de células T a ella, y este defecto puede ser parcialmente responsable de la supresión de la inmunidad celular que se observa durante el curso de la infección (43).

Por último, también se ha señalado que L. donovani es capaz de suprimir la expresión de antígenos clase I y clase II del MHC, de lo cual se habla extensamente más adelante. Es un hecho bien conocido que se requiere de la expresión de estos productos sobre las células presentadoras de antígenos y sobre otros elementos de la respuesta inmunológica. El antígeno extraño se une a estas moléculas y mediante esta unión ocurre el reconocimiento del antígeno y la activación de los linfocitos T. En la leishmaniasis se demostró que la supresión de la expresión de los productos del MHC correlacionan con la duración y la intensidad de la infección, y aun cuando se agrega IFN- γ el cual incrementa normalmente la expresión de moléculas MHC, no se logra que estas moléculas se expresen sobre la superficie de las células (42). Esta alteración puede ocasionar una presentación del antígeno defectuosa a las células del aparato inmunocompetente y por lo tanto ser un mecanismo parcialmente responsable de la

respuesta celular defectuosa observada en la leishmaniasis.

10. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADES (MHC)

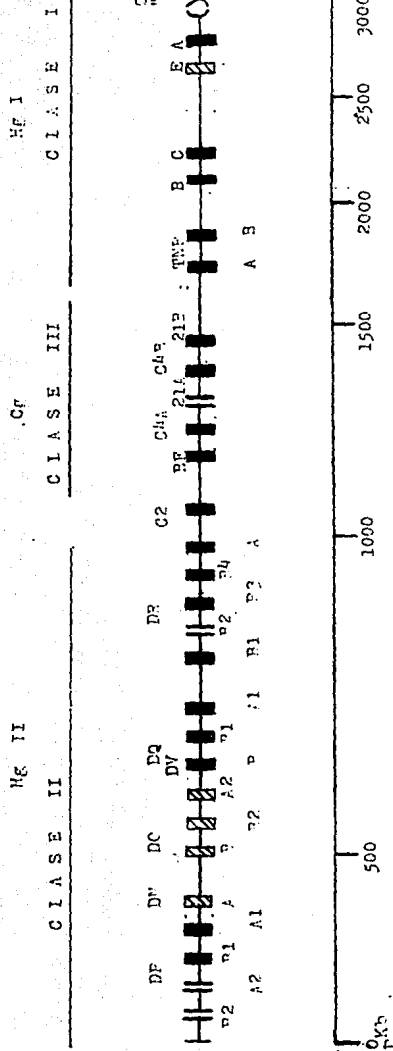
Los antígenos de histocompatibilidad se identificaron en 1963 cuando Gorer realizó estudios de transplante de tumores en ratones, los cuales mostraron que el rechazo se debía a las diferencias inmunogenéticas entre el donador y el receptor (44). El MHC en el ratón fue denominada por Gorer en 1938 complejo o sistema H-2. Esta región genética codifica para los productos responsables del rechazo de los injertos en el ratón y Snell (45) denominó a dichos productos, antígenos de histocompatibilidad.

Los primeros estudios en el humano se remontan a los años 50's cuando Dausset, observó que las transfusiones sanguíneas juegan un papel muy importante en la producción de isoanticuerpos. Así, identificó por primera vez a los antígenos del MHC sobre la superficie de los leucocitos. En 1954 Dausset encontró el primer antígeno de histocompatibilidad humano al cual llamó Mac, y posteriormente se denominó HLA-2 (45). Las reacciones de los sueros de pacientes politransfundidos y mujeres multiparas que contienen anticuerpos contra estos antígenos permitió la identificación de ellos sobre los leucocitos humanos.

El complejo HLA (Human Leukocytes Antigens) es el MHC en el humano, y consiste en un grupo de genes que se heredan en forma mendeliana codominante. Ocupa una región genética que codifica para la síntesis de moléculas llamadas antígenos de histocompatibilidad conocidos en el humano como antígenos HLA que están involucrados en diversas funciones inmunológicas fundamentales.

El mapa genético del sistema HLA, ocupa un segmento de 2 a 4 centimorgans aproximadamente en el brazo corto del cromosoma No. 6. En la figura 4 se esquematiza el mapa genético del sistema HLA. Abarca las siguientes regiones genéticas o loci. Los loci HLA-A, B, C y D contienen a los genes que codifican para la expresión de los antígenos HLA-A, B, C y D, también llamados clase I. El locus E fue descrito recientemente y tiene 3 genes potencialmente funcionales (el 6, 6.2 y 5.4) de los cuales solo uno parece estar expresado sobre la superficie de las células de linfocitos que están en reposo (47). La región llamada de clase II (también conocida como HLA-D) está dividida en subregiones que son la DR, DQ, DP y DN, solo se expresan los antígenos HLA DR, DQ y DP. Los genes clase III codifican para algunos factores del complemento; C2 y C4 de la vía clásica del complemento y el factor B (Bf) de la vía alterna. Los genes A y B de la enzima 21-Hidroxilasa (21-OH) también

FIGURA 4. ESQUEMA DEL MAFA GENETICO EN EL HUMANO: EL SISTEMA HLA



▨ - Pares de kilobases

▩ - Seudogen

▬ - Gen que se expresa

■ - Expresión

○ - 15 genes relacionados a clase I (QA-TIA "like")

Hf I -- Genes de histocompatibilidad I

Hf II - Genes de histocompatibilidad II

Cg - Genes del complemento

TONADC DE: Bodmer, 1989 (48)
Gorodezky, 1989(53)

se localiza en el MHC intercalados entre los genes del complemento, que aunque no son antígenos HLA, por el hecho de estar dentro del mapa genético del sistema HLA se consideran parte del MHC (48). Adicionalmente en un extremo del MHC se encuentra un locus que codifica para la producción de la enzima eritrocitaria glioxalasa-I (GLO-I) que se encuentra cerca del locus clase II, cerca del centromero. Los genes A y B que gobiernan la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF) están ubicados entre la región de clase I y la región de clase III. El TNF es una citocina involucrada en diversas funciones, entre ellas la de lisar a células tumorales y si se trata de explicar su presencia junto con la de los factores del complemento dentro del MHC, desde un punto de vista evolutivo, es posible que la interacción de sus funciones con la respuesta inmunológica haya proporcionado una ventaja selectiva al quedar insertados dentro del MHC (48).

Una de las características principales del sistema HLA es su gran polimorfismo, de hecho es el sistema más polimórfico que se ha descrito, por lo que la distribución de antígenos en las poblaciones humanas es muy variable y es difícil encontrar dos individuos idénticos que no tengan relación familiar. En el cuadro 3 se muestra la distribución de los antígenos clase I y clase II oficialmente reconocidos al momento actual (49). Los antígenos se dividen de acuerdo a sus

características estructurales, en privados, públicos y supertípicos; los privados son antígenos dados por moléculas determinadas por un solo alelo, por ejemplo A2, B7 y B39 etc. Los antígenos públicos se expresan como determinantes comunes a varias moléculas HLA, cada una de las cuales es portadora de un antígeno HLA privado distinto. Por ejemplo B15 se divide en Bw62, Bw63, Bw76 y Bw77, por lo tanto un individuo B15 también será alguno de los 4 antígenos privados. Los antígenos supertípicos son los determinantes que están formados por antígenos privados y públicos. Estos son el DRw52 y DRw53, Bw4 y Bw6 (49). Cada individuo tiene expresado 2 antígenos HLA: dos antígenos del locus A, dos antígenos del locus B, dos antígenos del locus C, dos del locus D, dos del locus DR, dos del locus DQ y dos del locus DP. Estos se heredan en forma codominante siguiendo la primera ley de Mendel, de modo que uno de los haplotipos proviene de la información de un cromosoma materno y el otro de un cromosoma paterno, por lo que cada sujeto tiene dos haplotipos HLA, conteniendo 7 antígenos cada uno (50).

Estas moléculas se encuentran sobre la superficie de todas las células nucleadas del organismo. Los antígenos clase I se distribuyen en forma universal en el organismo, mientras que los clase II están exclusivamente sobre células presentadoras de antígenos, linfocitos B y algunas subpoblaciones de

linfocitos T, como son: T cooperadores, T que ejercen supresión y T activados por antígenos o mitógenos (50, 51).

Los antígenos clase I se identifican por métodos serológicos y moleculares (48). Los antígenos clase II, DR, DQ y DP también se identifican por métodos serológicos y moleculares, y los productos de la región DP se identifican mediante el cultivo de mezcla de linfocitos secundario (PLT). Los antígenos D que incluyen a los tres DR, DQ y DP se tipifican mediante el cultivo de mezcla de linfocitos primario.

La estructura de los antígenos clase I consiste de una cadena pesada llamada alfa cuyo peso molecular es de 44 KDa y se encuentra flotando en la bicapa de lípidos de la membrana celular. Contiene tres dominios exteriores (alfa 1, alfa 2 y alfa 3) cada uno con 90 residuos de largo, una región transmembranal y un dominio intracitoplasmático. El tercer dominio (alfa 3) esta asociado en forma no covalente con una cadena ligera que es una B2-microglobulina (12 KDa) y es homóloga a un dominio de la región CH3 de la inmunoglobulina G. La cadena alfa esta codificada dentro del MHC y la B2 en el cromosoma 15 (15, 53).

El dominio alfa 3 y la B2-microglobulina son relativamente constantes, en cambio los otros dos dominios son muy polimórficos. El trabajo de cristalografía hecho en el antígeno HLA-2 demuestra

donde reside el polimorfismo y los residuos donde reconocen las células T a los antígenos clase I. Los dominios constantes tienen una estructura terciaria. Los dominios variables son casi idénticos entre ellos, y forman una plataforma compuesta por una configuración Beta-plegada, cubierta en los extremos por alfa-hélices que muestran una hendidura entre ellas. Dentro de las hélices se ve una zona densa que parece mostrar que el sitio está ocupado (54). Como ya se dijo, una de las principales características de estas moléculas es su amplio polimorfismo, y hay al menos 90 alelos de los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C en las poblaciones. Una de las principales regiones polimórficas reside en los residuos 62-80 en el dominio alfa 1, mientras que en el dominio alfa 2 el polimorfismo reside en los residuos 151, 152 y 156 en posición idéntica al dominio alfa 1. También es importante mencionar que estas diferencias en la secuencia de aminoácidos confiere diferencias funcionales entre las moléculas clase I. Existen 15 residuos en alfa 1 y alfa 2 que son los que interactúan con los péptidos antigénicos y los extremos de las hélices están localizados 6 residuos mirando hacia el sitio activo, en posición que indica ser ligandos para los antígenos extraños. Los residuos 62, 65 y 163 se hallan en la parte superior de las hélices, por lo que se consideran candidatos para la unión con los receptores de los linfocitos T. La localización de

tantos residuos polimórficos cerca o dentro del sitio activo, es consistente con el mapeo genético de los efectos de la respuesta inmunológica (53, 54, 55).

Respecto a las funciones, los productos clase I son los blancos de los linfocitos T citotóxicos (Tc), durante el fenómeno de rechazo de trasplantes alogénicos. También son reconocidos por estas células, en unión con antígenos virales que se exponen a la superficie de las células infectadas o asociados a antígenos tumorales expresados sobre la superficie de las células cancerosas. Este fenómeno se designa reconocimiento mediado por restricción MHC (56). Los linfocitos T solo pueden reconocer antígenos proteicos, en asociación con una molécula HLA en particular y para que los linfocitos Tc puedan lisar o matar una célula tumoral o infectada, el reconocimiento del antígeno extraño por el receptor de linfocitos T debiera ocurrir en forma asociada con la molécula clase I. Se ha demostrado que las células Tc específicas para un determinado virus, pueden lisar a las células blanco libres de infección, pero que tengan la especificidad clase I adecuada a la cual se le han agregado péptidos de las proteínas virales en cuestión (54, 55).

Las moléculas clase II están constituidas por dos cadenas; una pesada, llamada alfa (34 KDa) y una ligera denominada beta (29 KDa). Cada cadena contiene dos dominios externos, alfa 1 y alfa 2 para la cadena

alfa, y en la cadena beta, beta 1 y beta 2. Ambas cadenas están insertadas en la membrana celular y terminan en pequeñas regiones intracitoplasmáticas. El conocimiento de estas características bioquímicas de estas moléculas, no es tan preciso como el de las moléculas clase I, pero se sabe que los dominios alfa 2 y beta 2 están cerca de la membrana, son constantes y tienen homología con los dominios conservados de las inmunoglobulinas. Los dominios distales alfa 1 (en DQ) y beta (en todos los clase II) son polimórficos. Los residuos que llevan la variabilidad están agrupados en 4 partes de los dominios beta 1 de los productos DR y DQ. Las diferencias están en los aminoácidos 10-20, 30-37 y 66-78; en DQ hay un agrupamiento polimórfico en 45-56. La cadena DPB parece ser menos polimórfica (52, 53).

Los estudios sobre la presentación de antígeno, ofrece los primeros indicios de la participación de las moléculas clase II en las interacciones celulares. Al mismo tiempo al buscar la función biológica de estos antígenos se descubrieron los genes Ir (respuesta inmunológica), que en el ratón se encontraron en la región H2-I (57). Estudios posteriores aclararon que los productos clase II expresados en las células presentadoras de antígenos (CPA), son señales fundamentales para la inducción de la respuesta celular dirigida contra los antígenos, por lo que se indudable

que las células reconocen proteínas, sólo cuando estas son presentadas por CPA asociadas a moléculas clase II, como se hallan sólo en ciertas estirpes celulares, el reconocimiento proteico que incluye a antígenos extraños y propios (no-MHC) es en células que son portadoras de clase II, es decir una proporción menor de todas las células del organismo. Además el alelo clase II que interviene, determina que epítopes del antígeno extraño se ha de reconocer. Los sujetos totalmente respondedores o no respondedores a las proteínas naturales, las cuales tienen determinantes antigénicos muy diversos, casi no existen, ya que el gen Ir o Is (de supresión inmunológica) reconocen a un pequeño epítope del antígeno extraño (53). La activación de las células CD4 inicia las interacciones celulares que incluyen la activación de los linfocitos B, desencadenando la respuesta inflamatoria y la activación de las células CD8, que ejercen funciones de citotoxicidad. Estas últimas, reconocen al determinante antigénico sobre las células blanco, pero asociadas a moléculas clase I. Para que dicha interacción ocurra, la CPA debe poder captar al antígeno, internalizarlo y procesarlo; debe expresar moléculas clase II y secretar linfocinas que activen al linfocito T (53, 55).

Se ha observado que la expresión de los antígenos clase I y clase II se modula por los tres tipos de interferon existentes (alfa, beta y gamma), los cuales

TABLE 24. *Artibeus fuscus* (CAMPBELL, 1907)

LOCALITY	NO.	SEX	AGE	WEIGHT	WING	TAIL
1	76	♂	1	20.1	79.1	59.1
2	77	♂	2	20.2	79.2	59.2
3	78	♂	3	20.3	79.3	59.3
4	712	♂	4	20.4	79.4	59.4
5	713	♂	5	20.5	79.5	59.5
6	714	♂	6	20.6	79.6	59.6
7	715	♂	7	20.7	79.7	59.7
8	716	♂	8	20.8	79.8	59.8
9	717	♂	9	20.9	79.9	59.9
10	718	♂	10	20.10	79.10	59.10
11	721	♂	11	20.11	79.11	59.11
12	722	♂	12	20.12	79.12	59.12
13	727	♂	13	20.13	79.13	59.13
14	735	♂	14	20.14	79.14	59.14
15	737	♂	15	20.15	79.15	59.15
16	738(16)	♂	16	20.16	79.16	59.16
17	739(16)	♂	17	20.17	79.17	59.17
18	740	♂	18	20.18	79.18	59.18
19	741	♂	19	20.19	79.19	59.19
20	742	♂	20	20.20	79.20	59.20
21	744(12)	♂	21	20.21	79.21	59.21
22	745(12)	♂	22	20.22	79.22	59.22
23	746	♂	23	20.23	79.23	59.23
24	747	♂	24	20.24	79.24	59.24
25	748	♂	25	20.25	79.25	59.25
26	749(21)	♂	26	20.26	79.26	59.26
27	750(21)	♂	27	20.27	79.27	59.27
28	751(5)	♂	28	20.28	79.28	59.28
29	752(5)	♂	29	20.29	79.29	59.29
30	753	♂	30	20.30	79.30	59.30
31	754(w22)	♂	31	20.31	79.31	59.31
32	754	♂	32	20.32	79.32	59.32

* Artificially punctured

() Artificially dilated

incrementan de 3 a 5 veces el nivel de expresión de los antígenos en linfocitos T y B. El aumento de la expresión se correlaciona con el aumento de mRNA sugiriendo que la acción del interferón involucra la estimulación de la transcripción de los genes clase I y clase II para una mayor expresión de dichos antígenos (51).

11. ASOCIACION HLA Y ENFERMEDAD

La asociación de los antígenos HLA con diversas enfermedades ha sido explorada muy ampliamente (58). Esta relación se demuestra usualmente a través de la presencia incrementada de un alelo HLA de cualquier loci en cierta enfermedad comparativamente con la fracción del mismo alelo de un grupo de sujetos sanos pertenecientes al mismo grupo étnico de los enfermos.

En una enfermedad es preciso ver la diferencia entre asociación y ligamiento. La asociación es el resultado de una relación existente entre un marcador ya sea HLA o algún otro perteneciente al mapa genético del MHC con la enfermedad en cuestión. Para esto se selecciona un grupo de pacientes cuyo diagnóstico sea preciso y homogéneo y un grupo de sujetos sanos. El número de pacientes y testigos debe ser bastante grande y ambos deben pertenecer al mismo grupo racial. Si se encuentra un antígeno HLA significativamente aumentado o disminuido, se habla de una asociación que sugiere un

gen de susceptibilidad ligado a HLA en el primer caso y gen de resistencia en el caso que el antígeno esté significativamente disminuído en comparación con los sanos. El ligamiento indica que uno o ambos haplotipos segregan en los sujetos afectados en una misma familia, y es posible determinar el modo de herencia y la penetrancia del gen de la susceptibilidad. Para ésto es necesario hacer el estudio de familias completas donde se encuentren uno o más hermanos afectados y uno o más sujetos sanos para investigar como segrega el gen HLA, si se trata de una enfermedad dominante o recesiva o si es multifactorial o no (58, 59).

La primera observación de una asociación entre el MHC y la susceptibilidad a enfermedad fue descubierta por Lilly, quien demostró que algunas especies de ratones son particularmente susceptibles al virus de la leucemia murina (60). Con el cruzamiento de cepas de ratones susceptibles y resistentes, demostró que no sólo la enfermedad está bajo control genético, sino que uno de los genes de susceptibilidad a la enfermedad está ligado al MHC en el ratón (60).

Los primeros estudios de susceptibilidad de una enfermedad asociada al sistema HLA, fueron hechos en la enfermedad de Hogdkin's, en la que se encontró un gen dentro de la región HLA que influye en determinar un mayor riesgo de contraer la enfermedad (61).

Entre las asociaciones indudablemente confirmadas están la espondilitis anquilosante asociada con el antígeno B27, la artritis reumatoide del adulto asociada con el antígeno DR4 y la diabetes tipo 1 con el antígeno DR3 y DR4 por lo que las personas portadoras de éstos antígenos tienen un riesgo importante de manifestar la enfermedad (62).

La investigación de asociación HLA en una enfermedad claramente infecciosa como la lepra han sido muy fructíferas. Los primeros estudios se enfocaron al análisis con antígenos clase I, pero la mayor parte de las asociaciones eran débiles e inconsistentes y en general no se tomaron en cuenta las diversas formas clínicas de la enfermedad (53, 63, 64, 65). Gorodezky y su grupo publicaron una disminución de HLA-A2 y A3 en lepra lepromatosa en mexicanos (66), pero un segundo estudio confirmó que no había asociación con clase I. Sin embargo cuando se estudiaron los antígenos clase II, se encontró consistentemente en diferentes poblaciones que en la lepra tuberculoide segregan los antígenos DR2 y DR3 (revisado en 53, 63, 64 y 65). Gorodezky y col. también demostraron una asociación clara en pacientes tuberculoides con el DR3 (63).

En la lepra lepromatosa se ha visto que el DQw1 parece jugar un papel importante en la susceptibilidad en mexicanos y que este alelo es o está ligado a un gen Is que probablemente es responsable de la falla en la

capacidad de los macrófagos infectados para eliminar al basilo de la lepra. Estos hallazgos son importantes para este trabajo, por la analogía que existe en cuanto al espectro clínico entre la lepra y la leishmaniasis.

Mecanismos de asociación HLA

Las enfermedades asociadas al sistema HLA pueden dividirse en tres grupos: 1; un pequeño grupo donde los mecanismos inmunológicos parecen no ser un factor significativo en la patogénesis, 2; otro grupo amplio donde los mecanismos inmunopatológicos juegan un papel importante en la patogénesis, y 3; un grupo donde la patogénesis es incierta.

Se han postulado varios mecanismos para explicar la asociación con enfermedad, los cuales deben tomarse con cautela, ya que es importante considerar las características y la naturaleza de cada una de las enfermedades asociadas, pues muchas de ellas son muy heterogéneas y realmente constituyen síndromes que abarcan una gran variedad de entidades clínicas diferentes. Los mecanismos postulados son:

1.- Hipótesis de receptores. Los antígenos HLA pueden funcionar como receptores de la superficie celular de agentes patógenos específicos, por ejemplo virus. Las proteínas son endocitadas o recicladas después que se han unido a los virus. Por ejemplo el virus de Epstein-Barr se une al receptor C3b y el VIH al CD4. Se

ha demostrado la unión de tres virus a moléculas del MHC tanto humanas como murinas. El virus Semliki y el adenovirus tipo 2 se unen a moléculas clase I y el lactato deshidrogenasa se une a clase II. Así, algunos virus pueden penetrar a las células después de adherirse a una molécula HLA específica y por lo tanto algunos antígenos HLA pueden conferir resistencia y otros susceptibilidad a las partículas virales (67, 68, 69).

2.- Mimetismo molecular. Es posible que haya similitud entre las estructuras propias de algunos agentes patógenos con ciertas porciones de la estructura molecular de alguno de los antígenos HLA; a esto se le denomina mimetismo molecular, lo que provocaría que el sistema inmunitario se vea imposibilitado a desarrollar una respuesta inmunológica en contra del agente invasor, debido a la semejanza con el antígeno. Esto permitiría que el agente etiológico se pueda establecer en el organismo, promoviendo un estado de tolerancia hacia él. En este sentido se han presentado evidencias de que Klebsiella pneumoniae comparte ciertas secuencias de aminoácidos con el antígeno B27 y esto puede ocasionar que los sujetos B27 que se infecten con el patógeno pueden desarrollar espondilitis anquilosante. Una hipótesis es que al establecerse la bacteria y proliferar pueda liberar toxinas que afecten a las articulaciones (59, 67).

3.- Modificación de antígenos propios. Los productos de los genes de la región clase I, permiten el reconocimiento de células propias infectadas por virus o células tumorales a través de los linfocitos Tc. Dichos antígenos pueden ser modificados por el virus en su estructura tridimensional, y así las células efectoras las reconocen como extrañas y las eliminan. Michael y col. han informado en el humano que este tipo de restricción HLA existe y permite la destrucción de las células infectadas por el virus de la influenza tipo II (69).

4.- Expresión aberrante de antígenos clase II. Ya se dijo que las moléculas clase II tienen una distribución restringida, pero se ha visto con el empleo de anticuerpos monoclonales que en ciertas enfermedades autoinmunes hay expresión de antígenos clase II en tejidos que normalmente no los expresan. Tal es el caso del epitelio tiroideo en la tiroiditis autoinmune, o el de las células Beta del páncreas en la diabetes tipo I. Estos tejidos expresan en forma aberrante clase II tal vez inducidos por interferón gamma que a su vez puede ser sintetizado en grandes cantidades por un virus que sea reconocido por los linfocitos T. La destrucción autoinmune puede deberse a que los linfocitos Tc ahora reconozcan como extraños a estos tejidos y traten de eliminar a las células propias (59, 67).

5.- Epítopes de susceptibilidad en las moléculas HLA.

Recientemente se ha descrito que no es el antígeno HLA completo el que confiere la susceptibilidad, sino ciertas secuencias dentro del antígeno. Así, Nepon y Hansen observaron en relación a la asociación de la artritis reumatoide con el antígeno DR4, que no todos los DR4 son marcadores de susceptibilidad, pues identificaron por lo menos 6 subtipo del DR4 y de éstos, sólo el DR4-Dw10-DQw3.2 carece de la capacidad de conferir susceptibilidad. Las diferencias entre estos DR4 radican en cambios de entre 2 y 4 aminoácidos en el dominio beta 1 de la cadena DR (70).

6.- Enfermedades asociadas a HLA en los cuales otros son genes responsables.

Un ejemplo claro de esta situación es la deficiencia de 21-OH o hiperplasia suprarrenal congénita, que se debe a la deficiencia del gen B de la 21-OH. Es una enfermedad autosómica recesiva y monogénica. Sin embargo, dado que estos genes están intercalados en la región de clase III, siempre segregan los mismos haplotipos HLA en los enfermos dentro de una misma familia (58).

7.- Genes Ir o Is ligados a HLA.

Se ha postulado que la asociación del sistema HLA con algunas enfermedades es debida a la existencia de genes Ir o Is dentro del sistema HLA que se encuentran en desequilibrio de enlace con ciertos alelos de los loci clase II. En el ratón los genes Ir se encuentran en la región I-A del

cromosoma 17 (71). En el humano la región DR es análoga a la región I-A del ratón, y la región I-E es equivalente a la región DQ. A este respecto se han descrito genes Is ligados al DQw1 que puede conducir la expresión de la lepra lepromatosa (53). Otro ejemplo sería la presencia de genes Ir ligados a DR3 y DR5 que parecen condicionar la hiperrespuesta de síntesis de IgE específica a ciertos alérgenos, los cuales finalmente causan la instalación de un fenómeno atópico en individuos alérgicos (72).

12. ANTECEDENTES DE SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA A LA LEISHMANIASIS.

Los primeros estudios de susceptibilidad genética a la leishmaniasis cutánea se hicieron en el ratón, donde se observó que las cepas como Blab/c y la SWR/J no son capaces de sanar y mueren 7 1/2 semanas después de la infección, mientras que las cepas C57Bl/J6, B10.D2, B10.129 y B10.CE son resistentes a la infección, por lo cual se propuso que en el ratón existe un fondo genético que determina la susceptibilidad o resistencia a la leishmaniasis (73, 74, 75). Los animales susceptibles desarrollan grandes lesiones cutáneas y los ratones Balb/c forman lesiones metastásicas en las extremidades que progresan en tamaño y severidad.

Los híbridos F1 de Halb/c y C57Bl/6 se comportan en una forma intermedia mostrando una expansión de las úlceras cutáneas y un retardo en la aparición de los focos metastásicos. Sin embargo, la infección los mata. Entre los híbridos F2 en cambio se obtienen cepas resistentes, intermedias y susceptibles. Algunos autores han intentado localizar éstos genes en el ratón (75).

Se han infectado con varias especies de leishmania como modelo para estudiar a la leishmaniasis humana y son de gran valor en el estudio de los parámetros inmunológicos y genéticos asociados a la enfermedad. Los aspectos genéticos que controlan la resistencia natural y la resistencia adquirida en ratones con LV, se han estudiado usando cepas singénicas, inoculadas intravenosamente con L. donovani. La resistencia natural o innata, esta controlada por un sólo gen o un grupo de genes que están en el cromosoma No. 1 cuya región se ha denominado Lsh. Esta región se ubicó recombinando cepas congénicas resistentes con susceptibles y confirmando el establecimiento de los recombinantes, mediante el uso de isoenzimas y marcadores citogenéticos. Los trabajos realizados por Crocker y col. (76). demuestran que la expresión de la resistencia natural está controlada por el Lsh que se expresa en los macrófagos. También se observó que la resistencia natural aparece después de 2 días de

infección en los ratones inoculados con L. donovani. Se emplearon cepas de ratones CBA/c resistentes (Lsh/r) y C57Bl/6 susceptibles (Lsh/s). Los ratones se inyectaron intravenosamente con L. donovani y fueron sacrificados después de 1, 2, 3 y 4 días de infección. Los macrófagos extraídos del hígado se cultivaron in vitro y se observó el crecimiento de los parásitos. En los macrófagos de los ratones que tenían 72 hrs de infección el crecimiento parasitario fue mucho mayor en las cepas susceptibles que en las resistentes. Este mismo patrón se observó en experimento realizados in vivo, pues los ratones que tenían 72 hrs de infección y poseían el gen Lsh/r mostraron una carga de parásitos pequeña comparativamente con los macrófagos de los ratones portadores del gen Lsh/s. Estos datos sugieren que la resistencia natural reside principalmente en los macrófagos del hígado y que la expresión de la resistencia se manifiesta en corto tiempo después de la infección.

El control genético de la resistencia adquirida a L. donovani en cambio, parece operar a través de otros mecanismos. De Tolla y col (77) y Blackwell y col (78) emplearon una serie de cepas congénicas resistentes B10 (C57Bl/10Sn, la cual tiene como diferencia de otras cepas B10 la introducción de un sólo gen no H-2 donado de otras cepas). También investigaron cepas con diferentes haplotipos del complejo H-2 para demostrar

la posible influencia de los genes del MHC. Al infectar a los ratones con 10X7 amastigotes de L. donovani las cepas congénicas B10 no H-2 así como los híbridos mostraron un decremento rápido y significativo en la carga de parásitos en el hígado al día 35. Esta disminución se acompañaba de infiltración linfocitaria y reacciones intensas de hipersensibilidad tardía en aquellas cepas congénicas para una porción del cromosoma 2, indicando que la inmunidad adquirida a L. donovani esta bajo el control de un gen dominante cerca del locus Ir-2 (77, 78). Adicionalmente los ratones B10.129 (10H) que difieren de los B10 en el locus H-11 mostraron un incremento importante de parásitos en ausencia de infiltrado celular y respuesta de hipersensibilidad tardía. Por otro lado, los ratones con los haplotipos H-2a, H-2b y H-2k también tenían una reducción importante de parásitos. Estos hallazgos indican que la capacidad de respuesta inmunológica adquirida en la LV es poligénica y esta gobernada por genes H-2 con la influencia de otros 2 loci no ligados al MHC: el Ir-2 y el H-11. Un efecto similar ha sido observado para la LV causada por L. major (79). Rezaí y col. (80) determinaron la carga parasitaria de L. donovani en ratones después de períodos mayores de 120 días de infección y encontraron una correlación entre la carga de parásitos y el establecimiento de la inmunidad a la reinfección. La respuesta cutánea

específica es positiva cuando la carga parasitaria disminuye en las cepas CFA1, C57Bl/6 y Balb/c mientras que en la DBA que es la más susceptible nunca hay respuesta. La resistencia a la infección sólo se observa en los ratones C57Bl/6 y la inmunidad está mediada por linfocitos T cuando se transfieren células de animales inmunes. También se confirmó que la transferencia de suero no confiere protección.

Las infecciones con L. tropica en cepas de ratones singénicos que causan una enfermedad similar a la LCD, han demostrado que también hay ratones resistentes y susceptibles, de acuerdo al grado de infección. Las cepas de ratones Balb/c infectados con L. tropica desarrollan lesiones múltiples con metástasis y mueren después de algún tiempo. En contraste los ratones C57Bl/6 que son inoculados intradermicamente, desarrollan lesiones cutáneas que sanan después de algún tiempo. Sin embargo, cuando a éstos mismos ratones (normales) se les inyecta por vía intravenosa, desarrollan lesiones múltiples parecidas a las de los ratones Balb/c. Aun cuando el resultado de las lesiones es similar tanto en ratones Balb/c como en ratones C57Bl/6 inoculados intravenosamente, la respuesta inmunológica es significativamente diferente. La infección con Balb/c se asocia con una inmunosupresión generalizada no específica, en cambio, en C57Bl/6 no hay evidencia de este efecto. Balb/c responde

transitoriamente a la prueba cutánea, mientras que las cepas C57Bl/6 es anérgica. Se ha propuesto que además de la susceptibilidad genética en diferentes cepas de ratones como en este caso (Balb/c susceptibles) y (C57Bl/6 resistentes), también existe la posibilidad de que operan otros mecanismos inmunológicos que regulan la expresión de la infección (81). Por otro lado, la infección con L. tropica no está bajo el control del mismo gen que gobierna la susceptibilidad a L. donovani. Los análisis genéticos de esta forma de infección sugieren que la susceptibilidad está gobernada por un sólo gen cuya función y localización se desconoce aunque se ha sugerido que el defecto pueda estar asociado con la inducción de células que ejercen supresión.

Blackwell y col. (82), y Alexander y Kate (83) mostraron que la leishmaniasis murina causada por L. major y L. m. mexicana esta regulada por diferentes mecanismos inmunológicos y diferentes genes en ratones Balb/c y CBA y lo más interesante es que una cepa es susceptible a una determinada especie de leishmania y resistente a otra. Se usaron ratones de la cepa Balb/c altamente susceptibles a L. major y L. m. mexicana, en los que se producen lesiones en el sitio de la infección que posteriormente se expanden llegando a producir la muerte, mientras que la infección producida por L. major en ratones CBA provoca lesiones leves que

sanan espontáneamente, contrariamente a lo que ocurre con L. m. mexicana en la misma cepa. Cuando los ratones se irradian antes de la infección, presentan un patrón diferente al de los ratones normales. Los ratones CBA previamente irradiados son resistentes a la infección con L. m. mexicana y no desarrollan lesiones en el sitio de la infección, lo que no ocurre en los ratones normales CBA sin irradiar. Los ratones irradiados Balb/c no son capaces de contrarrestar la infección con L. m. mexicana, sin embargo, ante la infección con L. major, éstos presentan lesiones ligeras que curan un tiempo después y los ratones se vuelven refractarios a la infección. El efecto protector de las radiaciones coincide con el desarrollo de una reacción positiva de hipersensibilidad cutánea. También se restaura la susceptibilidad de los ratones Balb/c infectados con L. major, transfiriendo células T singénicas por vía intravenosa, no así en la infección con L. m. mexicana en ratones CBA irradiados. Sin embargo es posible reconstituir la susceptibilidad transfiriendo células de ratones infectados con L. major. Los ratones normales CBA inmunizados 4 días antes con L. major son resistentes a la infección con L. m. mexicana, mientras que los ratones Balb/c inmunizados con L. major no muestran protección alguna en contra de L. m. mexicana.

Por los fenómenos encontrados en este trabajo se ha sugerido que la susceptibilidad a L. m. mexicana en ratones CBA esta bajo el control de un gen que aun no se ha localizado en el genoma murino, y probablemente es responsable de la generación de células T supresoras, mientras que la susceptibilidad a L. major en ratones Balb/c está gobernada por un gen llamado Sci-1 localizado en el cromosoma No.8 en los ratones susceptibles (82, 83).

Se ha demostrado que la capacidad de la respuesta inmunologica a la leishmaniasis en cada cepa de ratón es diferente, además de que esta capacidad está bajo un control poligénico. De aquí que mientras unas cepas de ratones son susceptibles a una especie de leishmania otras son resistentes a la LV producida por L. donovani inocula por vía intravenosa, mientras que la inoculación de L. major por vía subcutánea produce lesiones que curran espontaneamente. La infección con L. m. mexicana por vía subcutánea produce lesiones que se expanden y conducen a la muerte. Los ratones C57Bl/ScSn (B10) infectados con L. donovani y L. major muestran una susceptibilidad temprana pero posteriormente se curan mientras que L. m. mexicana causa lesiones incurables. Los ratones DBA infectados con L. donovani muestran una resistencia temprana, son susceptibles a L. major y completamente refractarios a la infección con L. m. mexicana aun con dosis altas de

inoculación. Entre todas las cepas singénicas, los ratones Balb/c presentan un patrón muy variable de susceptibilidad a todas las especies de leishmania (82, 83).

Una posible explicación es que estos ratones tienen un defecto único determinado genéticamente y muy probablemente afecte algunos mecanismos críticos involucrados en el control de la infección de todas las especies. Alternativamente, estos ratones son portadores de un alelo de susceptibilidad ligados a diversos loci que regulan la infección.

Algunos de los genes que se han mapeado e identificado juegan un papel importante en el curso de la infección producida por una especie en particular. El gen Lsh localizado en el cromosoma No. 1 es importante en el desarrollo de la LV producida por L. donovani, pero no tiene efecto alguno sobre la infección producida por L. major o L. m. mexicana. El gen Scl-1, localizado en el cromosoma No. 8, tiene un profundo efecto en el desarrollo de la LCD producida por L. major y muy posiblemente por L. m. mexicana, pero probablemente juega un papel muy pobre en el desarrollo de la LV producida por L. donovani. Estos resultados son interesantes, en vista de que ambos genes Lsh y Scl-1 parecen operar regulando la actividad de los macrófagos (76, 84). En cuanto al complejo H-2 parece ser que los genes H-2 e Ir-2 están ligados a la

resistencia a la LC y la susceptibilidad está determinada por el locus H-11 y el H-2 del MHC (77, 84).

La comprensión de los mecanismos de control inmunológico en este padecimiento se ha ampliado enormemente gracias al análisis del modelo experimental del ratón y esto ha planteado la posibilidad de que fenómenos similares estén ocurriendo en el humano. Por estos motivos la investigación de la participación del MHC en el humano es una herramienta muy importante.

En un estudio hecho en una zona endémica de la cominidad de Hamong en la República de Guinea en pacientes con LC se encontró un decremento significativo HLA-Cw7 en los pacintes en comparación con los sujetos sanos, no obstante estos resultados deben tomarse con cautela, ya que al corregir el valor de la probabilidad por el número de comparaciones hechas, el valor obtenido perdió su significado estadístico (85). Desafortunadamente sólo se analizaron antígenos HLA clase I, por lo se desconoce si hay algún gen de clase II que pueda estar participando. Tampoco se encontró asociación alguna entre la LC y los alotipos de inmunoglobulinas Gm y Km.

Aunque las enfermedades parasitarias están poco exploradas existen evidencias de la participación del sistema HLA como marcador de susceptibilidad en padecimientos como el paludismo (86), giardiasis

(87) y esquistosomiasis (88), por lo que es muy importante explorar los factores genéticos en la leishmaniasis humana.

II. OBJETIVOS

- 1.- Investigar la presencia de posibles factores genéticos involucrados en la susceptibilidad a desarrollar la leishmaniasis cutánea ya sea localizada o diseminada en humanos, ya que hay muy pocos antecedentes en la literatura al respecto.
- 2.- Para este propósito se seleccionaron un grupo de pacientes con leishmaniasis cutánea cuyo diagnóstico se hizo mediante criterios clínicos e inmunológicos. También se incluye un grupo de sujetos sanos para comparación. Todos los individuos que se integran al estudio son mestizos mexicanos de la región de Comalcalco, la zona endémica del Estado de Tabasco.
- 3.- En todos los pacientes se realizan pruebas cutáneas y se analizan las improntas para confirmar el diagnóstico.
- 4.- Estudiar la distribución de antígenos de la región HLA, clase I (A, B y C), clase II (DR, DQ y DP), en ambos grupos y comparar las frecuencias para saber si hay algún marcador que se desvie significativamente, indicando la asociación con la enfermedad.
- 5.- Tipificar grupos sanguíneos de los sistemas Rh y ABO.
- 6.- Calcular las frecuencias antigénicas y génicas para todos los antígenos HLA tanto en pacientes como en sujetos sanos. En caso de encontrar algún antígeno desviado, obtener la significancia estadística de la

asociación aplicando la X^2 corregida por Yates y determinar el valor de la probabilidad.

7.- Calcular el riesgo relativo y fracción etiológica, o la fracción preventiva en el caso de resistencia, para los alelos que se hallen involucrados.

III. MATERIAL Y METODO

a. MATERIAL Y EQUIPO

- Tubos de vidrio de 13 x 150
- Tubos Fisher (Robbins Sci. Co)
- Pipetas graduadas (1, 5, 10 ml)
- Pipetas pasteur ..
- Jeringas esteriles
- Portaobjetos (Clay Adams)
- Popotes de plástico
- Fibra de nylon (Fenwall Laboratories)
- Cajas petri
- MicroJeringas Robbins de 50 Ul y 250 UL
- Pipeteador automático (Jet Pipette, Robbins Sci. Co.)
- Mecheros
- Frasco de vidrio
- Viales de congelación
- Tanque de nitrógeno líquido
- Balanza granataria y analítica
- Estufa a 37 °C
- Camara Newbauer
- Vortex Mixer 60085
- Microscopio invertido, American Optical BioStar
- Microscopio óptico E. Letz W. Nr 53214
- Centrífuga refrigerada, modelo PR-2
- Centrífuga Fisher, modelo 59

Microplacas Terasaki para citotoxicidad (Robbins Sci. Co.).

b. REACTIVOS

Aceite mineral

Complemento de conejo para linfocitos B (Pel-Freez)

Complemento de conejo para linfocitos T

Sueros anti-HLA

Suero anti AB

Eosina amarilla

Formol solución estandar al 34 %

Solución balanceada de Hanks normal

Medio RPMI o TC 199

Hepes

Solución de Ficoll-Hypaque

Penicilina G sódica

Estreptomicina

Heparina

Glutamina

Bicarbonato de sodio 2 %

Azul de tripano

Sueros comerciales anti-A, anti-B y anti-Rh

Solución salina balanceada

Ficoll-Hypaque

El ficoll se prepara al 9 % con agua destilada. El Hypaque es una solución de Diatriziato de sodio que se

diluye al 34%. Existe en dos presentaciones al 50 y 75 %. En el primer caso se diluye 1:1.076 y el segundo se diluye 1:2.1. La densidad de la mezcla debe ser 1.076-1.077.

SOLUCION DE HANKS 10X

Unidad I NaHCO_3 . Disolver 3.5 g en 250 ml de agua destilada. Distribuir en en frascos de 50 ml. Esterilizar 15 lb/pulg.

Unidad II	NaCl	80.0 g
	$\text{Na}(\text{HPO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6
	KCl	4.0
	Glucosa	10.0
	KH_2PO_4	0.6

Disolver en 800 ml de agua destilada.

Unidad III	Rojo de fenol	0.4
------------	---------------	-----

Mezclar el rojo de fenol en una pequeña cantidad de agua destilada, titular con NaOH 0.2N y llevar a un volumen de 1000 ml. Esterilizar la solución por medio de filtros milipore 0.22 U y distribuir en los frascos de 100 ml estériles sellados con tapas de hule y retapas de aluminio. Para usar el Hanks se prepara una solución 1X, se diluye la solución madre 1:10 con agua destilada y se añaden 2.2^l ml de la unidad I a la solución 1X para ajustar el pH (7.2 - 7.4).

MEDIO TC 199

Pasar 10 ml de medio concentrado en un frasco estéril de 100 ml agregar 4 ml de solución de Hepes, 0.4 de mezcla de antibióticos y completar a 100 ml con agua destilada estéril. La solución concentrada se encuentra a 10X y esta se diluye a una concentración 1X, con agua destilada y se ajusta a un pH de 7.2 - 7.4.

ANTIBIOTICOS

Penicilina G sódica (ampolleta de 1 X 10 UL)

Sulfato de estreptomina (ampolleta de 1 g)

Resuspender el contenido de ambas ampollas en 5 ml de agua destilada. Mezclar ambos antibióticos y distribuir en alícuotas de 2 ml en frascos estériles. Almacenar en congelación hasta su uso.

HEPES pH 7.2

Disolver 23 g de hepes en 10 ml de agua destilada, ajustar a un pH 7.2 con NaOH 5N, completar a 100 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

REACTIVOS ANTI-HLA

Se utilizan antisueros y anticuerpos monoclonales del V Taller Latinoamericano de Histocompatibilidad, provenientes de diferentes laboratorios de Latinoamérica incluyendo los del Departamento de Inmunogenética, Europa, Israel, Estados Unidos y

Canada. Se incluyeron 188 reactivos anti-HLA clase I y 97 anti-HLA clase II que abarcan antisueros y anticuerpos monoclonales tanto monoespecíficos como bi y tri específicos para definir 20 especificidades del locus A, 40 del locus B y 8 del C. Los anti-HLA clase II abarcan 97 reactivos para definir a 20 antígenos DR y DRw, a 8 productos DQw y 3 antígenos DP.

ANTISUEROS PARA GRUPOS SANGÜNEOS

Se usan antisueros comerciales para la determinación de los grupos ABO y Rh.

COMPLEMENTO

Se usa suero de conejo como fuente de complemento. Se sangra a los conejos y la sangre se deja coagular a 10 °C. Se separa el suero y se mezcla con un volumen igual de glóbulos rojos humanos grupo A que se obtienen de por lo menos 10 donadores. Se incuba durante una hora y se centrifuga a 1500 rpm durante 15 min a 10 °C. Se distribuye en alícuotas y se conserva a -70 °C hasta su uso. Se verifica que el reactivo sea adecuado mediante una determinación de microcitotoxicidad usando controles positivos y negativos para asegurarse de su alta potencia y ausencia de citotoxicidad inespecífica. El complemento así obtenido se utiliza para la tipificación de los loci A, B y C. También se puede usar complemento comercial para los antígenos clase I.

Los antígenos clase II se tipifican con complemento comercial especial para linfocitos B.

GLUTAMINA

Pesar 2.927 g de glutamina y disolver en 100 ml de agua destilada. Esterilizar por filtro milipore y distribuir en alícuotas de 1.5 ml en tubos de plástico estériles.

MEDIO RPMI-1640

Medir 950 ml de agua destilada y desionizada en un matraz Erlen-Meyer. Añadir el contenido de un sobre de medio al agua a una temperatura de entre 20 y 24 °C. Agitar suavemente hasta que se disuelva el polvo por completo. Añadir 2 g de bicarbonato de sodio. Aforar a 1000 ml.

Ajustar el pH 0.2 - 0.3 unidades por debajo de 7.2 (el pH aumenta de 0.1 a 0.3 unidades después de filtrar) se usan soluciones 1N de NaOH y HCl para ajustar. Esterilizar por filtro milipore de 0.22 U y distribuir en frascos estériles de 100 ml. Sellar con tapon de hule y retapa metálica y conservar a 4 °C hasta su uso.

RPMI COMPLETO

0.4 ml de antibiotico

4 ml de solución de glutamina

15 % de suero AB

Aforar con medio RPMI, guardar a 4 °C hasta su uso.

SUERO AB

Tomar varias unidades de suero sanguíneo humano grupo AB de donadores del sexo masculino sanos, que no hayan recibido transfusiones anteriores, y no tengan antecedentes de enfermedades autoinmunes o trasplantes. Descomplementar a 56 °C durante 45 min. Distribuir en alícuotas y conservar en congelación a -70 °C.

c. MÉTODOS

1.- TOMA DE MUESTRAS

A.- Pacientes. Se seleccionaron 64 pacientes con leishmaniasis de la zona endémica de Comalcalco, Tabasco. Los pacientes acuden a la consulta externa del Hospital Regional de Comalcalco. La selección de los pacientes y el diagnóstico clínico fue realizado por el Dr. Oscar Hobart quien esta a cargo de estos pacientes y tiene una amplia experiencia en esta enfermedad. El Dr. Hector Perez Perez Director del Hospital dio su

autorización para la realización del estudio. El diagnóstico se hizo tomando en consideración los siguientes parámetros: Las características clínicas de las lesiones, localización y el número de lesiones presentes. Se tomaron improntas de las lesiones de todos los casos para confirmar la presencia de parásitos. Se les aplicó la prueba cutánea con la leishmanina (reacción de Montenegro). La leishmanina consiste de parásitos en una solución de fenol con 5 X 10 promastigotes de L. m. mexicana/ml que se preparó en el departamento de Inmunogenética. Se aplicó 0.1 ml del extracto crudo por vía intradérmica en el brazo del paciente. La lectura de la reacción se efectuó a las 48 hrs. La reacción se considera positiva, cuando hay eritema con induración mayor de 5 mm de diámetro. Una reacción es negativa, cuando no hay evidencia de induración o eritema, o esta es menor de 5 mm.

B.- Testigos. Se seleccionaron un grupo de 100 sujetos aparentemente sanos de la zona endémica del Estado de Tabasco el cual se utilizó como grupo comparativo, para analizar los posibles factores genéticos ligados al sistema HLA, que pueden determinar la susceptibilidad o la resistencia a la leishmaniasis.

C.- Para la toma de muestra se envió a Comalcalco todo el material necesario.

a). Frascos con 20 ml de medio RPMI completo con heparina (1000 U/ml) y 15 % de suero AB (estéril)

b). Jeringas de 20 y 1 ml, agujas.

c). Leishmanina para la aplicación de la prueba cutánea.

D.- A cada uno de los testigos y enfermos se les tomo una muestra de 30 ml de sangre venosa que se colocó en el fresco con RPMI completo todo en condiciones esteriles. Las muestras fueron enviadas por avión en el transcurso de 24 hrs después de tomada la muestra.

E.- A la llegada de las muestras al Departamento de Inmunogénética, se procedió de inmediato a la separación de células mononucleares y a la congelación de las mismas, las cuales se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C . Los métodos de separación y congelación se describen a continuación.

2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA

A. OBTENCION DE LINFOCITOS TOTALES A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA POR FLOTACION SOBRE FICOLL-HYPAQUE (89).

a. - Los 30 ml de sangre heparinizada se diluyen con un volumen igual de solución de Hanks. En este caso ya vienen diluidas con el volumen igual de RPMI.

b. - Se coloca 2.5 ml de solución de Ficoll- Hypaque en 4 tubos de ensaye de 13 X 100.

c. - Se estratifica la sangre diluída cuidadosamente sobre la solución de Ficoll-Hypaque, distribuyendola en los 4 tubos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

d.- Centrifugar a 1500 rpm durante 30 min a temperatura ambiente.

e.- Inmediatamente después de la centrifugación se aspiran los linfocitos que forman un anillo blanco sobre la interfase, con una pipeta pasteur y se transfieren a otro tubo que contenga aproximadamente 2 ml de solución de Hanks. Se centrifuga a 1200 rpm durante 10 min.

f.- Se desecha el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 1 ml de medio RPMI.

g.- Se eliminan plaquetas de la siguiente manera: La suspensión de linfocitos totales se trasladan a tubos Fisher, se centrifuga a 4000 G durante un minuto, se elimina el sobrenadante y el paquete se resuspende en solución de Hanks normal. Se hacen 4 lavados más a 1000 G durante un minuto. Se verifica que no haya plaquetas.

B. MÉTODOS DE CONGELACION (89)

a.- La mezcla de congelación consta de:

Por cada ml de suspensión celular se prepara 1 ml de mezcla que contiene:

0.6 ml de medio RPMI completo o TC 199

0.2 ml de suero AB

0.2 ml de dimetilsulfoxido

La mezcla debera estar a temperatura de 4 °C para disminuir su toxicidad.

- b.- Se coloca hielo picado en un vaso de precipitado y se enfria el tubo de ensaye en el que se coloca la muestra.
- c.- Se coloca en el tubo 1 ml de la suspensión de linfocitos libres de plaquetas, que contienen el total de células para tipificar.
- d.- Se agrega un ml de la mezcla de congelación a cada vial y se mantiene en baño de hielo.
- e.- Se adiciona cuidadosamente el ml de suspensión de células sobre la mezcla, formando una interfase entre la mezcla y la suspensión.
- f.- Los viales así preparados se invierten lentamente para que ambas capas se mezclen. Se tapan los viales inmediatamente.
- g.- Se introducen en alcohol frío (4 °C) y se deja en este sistema durante dos horas a -70 C.
- h.- Las células congeladas a -70 C se trasladan a un tanque de nitrógeno a -196 °C, donde se almacenan hasta su uso. También se procesan muestras frescas y en éstas se continua el procedimiento como se describe en los métodos de separación de subpoblaciones y tipificación de antígenos HLA.

C. METODO DE DESCONGELACION DE LINFOCITOS (89)

Quando se va hacer la tipificación de antígenos HLA se procede de la siguiente manera.

- a.- Se prepara un baño maría a 37 °C.

- b.- Se saca el vial con las células congeladas del tanque de nitrógeno líquido, se sumerge de inmediatamente en el baño maría y se agita.
- c.- Cuando desaparecen totalmente los cristales de hielo se vacía el contenido a un tubo de ensayo y se agrega de inmediatamente 10 ml de medio RPMI o TC con 10 % de suero AB o suero de ternera fetal gota a gota con agitación continua. Se mezcla suavemente.
- d.- Se centrifuga a 1500 rpm por 5 min.
- e.- Se decanta el sobrenadante y se resuspende en 10 ml de medio que contiene 10 % de suero AB.
- f.- Se centrifuga a 1500 rpm 5 min.
- g.- Se decanta y se resuspende el paquete celular en un ml de medio RPMI. Se cuenta la viabilidad utilizando azul de tripano. La viabilidad se cuenta colocando en un tubo de 13 X 12 una gota de solución de azul de tripano, más una gota de suspensión celular. Se homogeneiza y se coloca una gota en la cámara cuantaglobulos. Se cuenta el total de las células en 5 campos de la zona de glóbulos blancos, anotando el número de las células muertas que se tiñen de azul y el de vivas que permanecen refringentes e incoloras, y se determina el % de viabilidad.

D. SEPARACION DE LINFICITOS T Y B POR COLUMNA DE NYLON
(89, 90)

Preparación de columna.

- a.- Se pesan de 70 a 90 mg de nylon Fenwall bien peinado y se sumerge en 5 ml de solución de Hanks normal.
- b.- Se corta un popote convencional a una altura de 10 cm aproximadamente y se cierra a la flama por uno de sus lados en un ángulo de 45 grados.
- c.- La lana bien peinada se empaqueta en el popote uniformemente ocupando una altura aproximada de 5 cm. Cuidar que no llegue al extremo cerrado del popote para permitir la salida del líquido. Se lava con solución de medio RPMI precalentado a 37 °C (con suero AB al 15 %) y se incuba durante 30 min en forma horizontal.
- d.- Se saca la columna y se elimina todo el medio, quedando lista para agregar las células dentro de la columna.
- e.- Las células mononucleares purificadas mediante la técnica de Ficoll-Hypaque se pasan por la columna de nylon hasta que todo el líquido penetra la lana.
- f.- Inmediatamente después se coloca la columna en forma horizontal y se agrega medio RPMI en el extremo abierto para evitar la evaporación.
- g.- Se incuba horizontalmente en baño maria a 37 °C.
- h.- Se coloca la columna sobre un tubo marcado como linfocitos T y se deja escurrir el contenido.

i.- Se lava el contenido de 3 a 5 veces con alícuotas de 5 ml de medio RPMI con suero AB al 15 % previamente calentado durante 30 minutos a 37 °C.

j.- Los linfocitos B que se han adherido al nylon, se recuperan en otro tubo marcado como linfocitos B, presionando y exprimiendo el nylon fuertemente con los dedos.

k.- Se repite el procedimiento 2 o 3 veces con alícuotas de 5 ml de medio RPMI adicionado con suero AB al 0.5 % frío hasta que el medio salga totalmente transparente.

l.- Se centrifuga las células T y B a 1500 rpm durante 5 min.

m.- Se desecha el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de medio RPMI, ajustando los linfocitos T a 2×10^6 células/ml.

n.- De igual forma se lavan los linfocitos B con medio RPMI y se ajusta a 2×10^6 células/ml.

E. PREPARACION DE LAS MICROPLACAS PARA LA TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA (89)

a.- Se marcan las microplacas que se utilizan de la siguiente manera: 5 WLAT 101, 102, 103, y 104 para los loci A, B y C. 201 y 202 para los loci DR, DQ y DP.

b.- Se agrega 2 a 3 U1 de aceite mineral en cada pocito para evitar la evaporación.

c.- Se agrega 5 U1 de antisuero o anticuerpo monoclonal de cada especificidad para los loci A, B, C, DR, DQ y

DP, en cada uno de los pozos de las placas correspondientes. Además se incluyen controles negativos y controles positivos en cada microplaca.

d.- Se guardan las placas en congelación a -70°C hasta su uso.

e.- Se registran los antisueros en formatos oficiales del V Taller Latinoamericano de Histocompatibilidad, en los que se señalan los antisueros y anticuerpos monoclonales usados para la tipificación, con sus especificidades correspondientes. Para cada antígeno se cuenta por lo menos dos reactivos que lo definen. Se utiliza un total de 286 reactivos anti-HLA, 189 para clase I y 97 para productos clase II.

F. TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA MEDIANTE LA TECNICA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD (89, 91)

a.- Se coloca 1 Ul de la suspensión ajustada de linfocitos T en cada uno de los pozos de las microplacas correspondientes a los loci A, B, C y 1 Ul de los linfocitos B a las microplacas para los loci D/DR.

b.- Las microplacas con los antisueros para los loci A, B y C se agitan con cuidado sobre un Vortex para que se mezclen bien.

c.- Se incuban durante 30 min a 37°C .

d.- Las microplacas que contienen los antisueros para los loci clase II también se mezclan y se incuban a 37 °C durante 60 min.

e.- Pasado el período de incubación, se agrega 5 Ul de complemento especial para clase I y para clase II respectivamente en cada excavación.

f.- Las placas para los antígenos clase I se dejan reposar a 24 °C durante 60 min y las placas para los antígenos clase II se incuban a la misma temperatura durante 2 horas. Este tiempo de incubación es para células frescas. Para células congeladas los tiempos de incubación con el complemento se disminuyen 30 min para los clase I y 90 min para los clase II.

g.- Se agrega 5 Ul de solución de eosina al 5 % a cada excavación (5 g en 100 ml de agua), y se deja reposar aproximadamente durante 5 min.

h.- Se agrega 5 Ul de formol pH 7.2 a cada pozo para parar la reacción.

i.- Se deja transcurrir por lo menos 15 min, se destapan las microplacas y se cubren con un portaobjetos del tamaño de la placa.

j.- Se lee en un microscopio invertido a 250 aumentos y bajo la luz de contraste de fases. Se calcula el número de células vivas y muertas. Estas últimas se ven opacas, grandes por el daño provocado por la acción del complemento y porque el colorante penetra en las

células, mientras que las células vivas se observan pequeñas, refringentes y convexas.

k.- Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

0	-	20	% de mortalidad	(-)	(1)
21	-	30	% de mortalidad	(±)	(2)
31	-	40	% de mortalidad	±	(4)
41	-	74	% de mortalidad	+++	(8)
75	-	100	% de mortalidad	++++	(8)

C. DETERMINACION DE GRUPO ERITROCITARIO POR AGLUTINACION EN TUBO SISTEMA ABO Y Rh

a.- En una serie de tubos de ensayo se coloca sucesivamente unas gotas del suero anti-A, anti-B, anti-C y anti-D y el del individuo control Rh.

b.- Se agrega una gota de suspensión de eritrocitos al 5 % en solución salina.

c.- Se mezclan y centrifugan a 1000 rpm durante 30 seg.

d.- Se lee cuidadosamente el fondo de los tubos, observando si hay o no aglutinación macroscópica.

3. ANALISIS ESTADISTICO (92, 93, 94, 95)

El análisis estadístico de cada antígeno en una población abierta permite evaluar las diferencias significativas que pudieran existir en dos poblaciones diferentes. Las comparaciones se hacen para cada

antígeno HLA entre la población sana y la población enferma. Es importante determinar los siguientes parámetros:

A.- Cálculo de las frecuencias antigénicas (FA) y frecuencias génicas (FG) según la ecuación de Haldane (93).

I. Frecuencia antigénica (FA)

$$FA = \frac{S+}{N} \times 100$$

S+ = Sujetos positivos al
antígeno

N = No total de sujetos
estudiados

II. Frecuencia génica (FG)

$$FG = 1 - \sqrt{1-A}$$

A = Frecuencia de antígenos en
números absolutos

B.- Cálculo de la significancia estadística de las comparaciones para cada antígeno entre la población sana y la población enferma. Se determina calculando la X^2 corregida por Yates para cada uno de los antígenos en cuestión (92).

$$X^2 = \frac{\left\{ \frac{(ad-bc) - n/2}{(a+b)(b+d)(a+c)(c+d)} \right\}^2 (n)}{1}$$

Donde:

a: número de individuos positivos para el antígeno en los pacientes

b: número de individuos negativos para el antígeno en los pacientes

c: número de individuos positivos para el antígeno en los testigos

d: número de individuos negativos para el antígeno en los testigos

N: número total de casos estudiados (población 1 y 2)

Con el valor de la X^2 se obtiene el valor de la probabilidad (P) en las tablas correspondientes, tomando en cuenta que los grados de libertad es 1 ya que estos se calculan tomando como base N-1 y aquí se comparan las dos poblaciones (N).

Con el valor de P, se calcula la cifra de la Pc (P corregida) multiplicando el valor P por el número de comparaciones hechas, es decir el número de antígenos estudiados.

Cuando se calcula el valor de P y de Pc si el valor es menor de 0.05 el resultado es significativo, lo que demuestra que la diferencia encontrada en dos poblaciones no se debe al azar, si no a la existencia de una diferencia real entre los dos grupos estudiados.

C. RIESGO RELATIVO (RR). Es una medida que permite valorar el riesgo que tiene un individuo sano portador

del antígeno en cuestión, de desarrollar el padecimiento.

Se calcula mediante la fórmula de Wolf (94).

Mientras mayor sea el valor de RR, quiere decir que el sujeto portador del antígeno tiene mayor probabilidad de expresar el padecimiento.

$$RR = \frac{(c+)}{(d-)} \cdot \frac{(t-)}{(t+)}$$

Donde:

p+: pacientes positivos para el marcador

p-: pacientes negativos para el marcador

t+: testigos positivos para el marcador

t-: testigos negativos para el marcador

D. FRACCION ETIOLOGICA (FE). Es una medida que permite saber cuanto del marcador genético esta participando en la susceptibilidad a la enfermedad. Mientras más acerca el valor de la FE a 1 más se debe la enfermedad al marcador genético. El FE se calcula por el método de Bergtsson y Thomson (95).

$$FE = \frac{(RR - 1)}{RR} \cdot \frac{p+}{(p+) + (p-)}$$

Donde:

RR: Riesgo relativo

p+: Pacientes positivos para el marcador

p-: Pacientes negativos para el marcador

E. FRACCION PRVENTIVA (FP). La fórmula muestra en el caso de la presencia de un antígeno disminuído, cuanto de la protección se debe al marcador genético involucrado. Mientras más se acerque a 0 el resultado, más estara relacionado el gen en cuestión con la protección. La FP se calcula de acuerdo a Bengtsson y Thomson (95).

$$FP = \frac{(1 - RR) \frac{I^+}{(P^+)} + \frac{I^-}{(P^-)}}{RR \left(1 - \frac{I^+}{(P^+)} + \frac{I^-}{(P^-)} \right)}$$

IV. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo corresponden a un estudio hecho en población abierta la cual esta integrada por 164 sujetos; 100 individuos aparentemente sanos, la mayoría de ellos pertenecientes a la misma área endémica de leishmaniasis de la cual se seleccionaron a los 64 pacientes casi todos ellos con LCL, excepto 4 pacientes que fueron diagnosticados como LCD.

En el cuadro 4 se muestra las distribuciones por sexo y edades de los grupos, pacientes y sujetos sanos. No se observa predominancia de sexo en ningun caso, pues la cifras tanto en pacientes como en testigos son muy similares entre si, (masculino 62.5 % en pacientes vs 73.0 % en sanos). Sin embargo, hay un mayor número de hombres afectados, (masculino 62.5 % vs femenino

37.4 %). La edad promedio en los pacientes es de 35.04 años, pero hay afectados desde 13 hasta 78 años de edad. Tampoco existe diferencias en cuanto a la edad entre pacientes y sujetos sanos.

En el cuadro 5 se señala los resultados de la intradermorreacción de Montenegro en los pacientes, así como los datos de tiempo de evolución de las lesiones. La prueba cutánea se realiza en 62 de los 64 pacientes de los cuales, la mayoría tenían diagnóstico de LCL (58 individuos), y solo 4 se diagnosticaron como LCD. Dicha prueba fue positiva en el 93.1 de los pacientes con LCL mientras que en los pacientes con LCD, que es un grupo muy reducido (solo 4 individuos), la prueba fue positiva solo en el 50 % de los casos.

En el mismo cuadro 5 se denota el tiempo de evolución de las lesiones, tanto para LCL y LCD. El promedio de tiempo de evolución en la LCL es mucho menor ($X = 8.5$ meses) que en la forma LCD ($X = 20.3$ meses). Un solo individuo con LCL tiene una evolución de 20 años.

En el cuadro 6 se observa la proporción de pacientes en los que se encontraron parásitos en las improntas tomadas de las lesiones. Los resultados muestran al patógeno en la mitad de los casos. Así mismo, al hacer un recuento del tipo de células sanguíneas que infiltran las lesiones, es claro que las poblaciones más abundantes son los neutrofilos

(51.1 %) y los linfocitos (40.5 %). Con respecto a los grupos sanguíneos, en el cuadro 7 se observa una disminución del grupo A en los pacientes con leishmaniasis (pacientes 7.0 % vs testigos 24.0 %) y un ligero incremento del grupo O (pacientes 83.8 % vs testigos 66.0 %). Al calcular la χ^2 , la diferencia para el grupo A resulta significativa como se señala en el cuadro 4 ($\chi = 7.55$; $P = 0.005$).

Los resultados de las frecuencias antigénicas (FA) y frecuencias génicas (FG) para los antígenos clase I de los loci A, B y C, se muestran en los cuadros 8, 9 y 10 respectivamente. No se encontró ninguna desviación significativa para ningún antígeno al comparar a los testigos contra los pacientes.

La FA y FG para los pacientes con LCL y los testigos para los antígenos de clase II que corresponden a los loci DR, DQ y DP se indican en el cuadro 11. Del total de antígenos que integran a los loci clase II, el subtipo DRw11 del antígeno DR5 mostro un incremento que está en el límite de la significancia ($P = 0.05$) pues la frecuencia antigénica del alelo es de 10 % en los testigos contra 21.9 en los pacientes. por otro lado el antígeno DQw3 se halla significativamente desviado ($\chi = 5.41$; $P = 0.01$) aunque al corregir el valor de P por el número de comparaciones hechas, el significado estadístico se pierde. Por último en el locus DP se observó una

CUADRO 4

DISTRIBUCION DE SEXOS Y EDADES EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

	MASCULINO	%	FEMENINO	%	\bar{X} (EDADES EN MESES)	DS	TOTALES
PACIENTES	40	62.5	24	37.5	35.04(13-78)	16.6	64
TESTIGOS	73	73.0	27	27.0	29.02(13-53)	7.5	100

DS = Desviación estándar

CUADRO 5

INTRADERMORREACCION DE MONTENEGRO Y TIEMPO DE EVOLUCION DE LAS LESIONES EN LCL Y LCD

	PRUEBA CUTANEA POSITIVA	%	TOTALES	TIEMPO DE EVOLUCION \bar{X} (MESES)	DS
LCL	54	93.1	58	8.5(1-36)	14.0
LCD	2	50.0	4	28.3(13-42)	6.3

DS = Desviación estándar

CUADRO 6

RESULTADOS DE LAS IMPRONTAS DE LOS PACIENTES CON LEISHMANIASIS

	PACIENTES	%
C/PARASITOS	30	50.0
S/PARASITOS	30	50.0
TOTALES	60	100.0
.. INFILTRADO CELULAR EN %		
BASOFILOS	0.1	
EOSINOFILOS	4.3	
NEUTROFILOS	51.1	
LINFOCITOS	40.5	
MACROFAGOS	4.0	
TOTALES	100.0	

CUADRO 7

FRECUENCIAS DE GRUPOS SANGUINEOS ABO Y RH EN LAS POBLACIONES

GRUPO SANGUINEO	TESTIGOS	%	PACIENTES	%
A ^o	24	24.0	6	7.0
B	10	10.0	4	6.5
AB	1	1.0	0	0.0
O	66	66.0	52	83.8
RH	100	100.0	62	100.0

^o Estadísticamente significativo con un valor de $\bar{X} = 7.55$ y una $P = 0.005$

disminución significativa del alelo DPw4 en los pacientes (FG en pacientes 25.0 % vs en testigos 44.3 %). Al analizar los datos la $X^2 = 11.38$ muestra un valor de $P = 0.0008$ y una $P_c = 0.02$. La probabilidad se sostiene a pesar de la corrección. Esta se llevó a cabo, multiplicando por 32 que es el número de antígenos estudiados para clase II. El RR es obviamente menor de 1, $RR = 0.34$ y la $FE = 0.46$ (cuadro 12).

En el mismo cuadro 12 se enlistan los valores de la X^2 , la P y la P_c para los antígenos DRw11 y DQw3. También se incluyen los resultados del RR y FE para los pacientes con LCL portadores de dichos antígenos. Para DRw11 se obtuvo una $X^2 = 3.51$; una $P = 0.05$ y una $P_c = 0.08$ indicando una asociación débil del DRw11 con la LCL que muestra un $RR = 2.52$ y una $FE = 0.13$, mientras que el antígeno DQw3 del locus DQ resulta con una $X^2 = 5.44$; una $P = 0.01$, que al corregirse pierde su significancia estadística, lo que sugiere una asociación más evidente que con la región DR. Para el DQw3, el $RR = 3.10$ y la $FE = 0.18$.

97
 CUADRO 8

FRECUENCIA DE ANTIGENOS DEL LOCUS HLA-A EN LA POBLACION DE TESTIGOS Y PACIENTES CON LEISHMANIASIS

ESPECIFICIDAD HLA	TESTIGOS			PACIENTES		
	CASOS (100)	FRECUENCIA ANTIGENICA (%)	FRECUENCIA GENICA (%)	CASOS (64)	FRECUENCIA ANTIGENICA (%)	FRECUENCIA GENICA (%)
A1	6	6.0	3.1	4	6.3	3.2
A2	60	60.0	36.8	37	58.0	35.7
A3	9	9.0	4.6	8	12.1	6.2
A9	0	0	0	0	0	0
A10	0	0	0	0	0	0
A11	4	4.0	2.0	2	3.1	1.6
Aw19	0	0	0	0	0	0
A23	2	2.0	1.0	0	0	0
A24	41	41.0	23.2	25	39.7	22.3
A25	3	3.0	1.5	1	1.6	0.8
A26	6	6.0	3.1	4	6.3	3.2
A28	4	4.0	2.0	3	4.7	2.4
A29	4	4.0	2.0	1	1.6	0.8
A30	7	7.0	3.6	8	12.1	6.2
A31	11	11.0	5.7	14	21.9	11.6

CUADRO 8 (CONTINUACION)

Aw32	3	3.0	1.5	1	1.6	0.8
Aw33	1	1.0	0.5	2	3.1	1.6
Aw34	2	2.0	1.0	1	1.6	0.8
Aw36	0	0	0	0	0	0
Aw43	0	0	0	0	0	0
Aw66	0	0	0	0	0	0
Aw68	16	16.0	8.4	9	14.0	7.3
Aw69	5	5.0	2.5	5	7.8	4.0
TX	16		-2.5	3		-8.5

CUADRO 9

FRECUENCIA DE ANTIGENOS DEL ICCUS HLA-B EN LA PCRACION DE TESTIGOS Y PACIENTES CON LEISHMANIASIS

ESPECIFICIDAD HLA	TESTIGOS			PACIENTES		
	CASOS (100)	FRECUENCIA ANTIGENICA (%)	FRECUENCIA GENICA (%)	CASOS (64)	FRECUENCIA ANTIGENICA (%)	FRECUENCIA GENICA (%)
B5	0	0	0	0	0	0
B7	9	9.0	4.6	9	14.0	7.3
B8	5	5.0	2.5	7	10.9	5.6
B12	0	0	0	0	0	0
B13	6	6.0	3.1	2	3.1	1.6
B14	6	6.0	3.1	2	3.1	1.6
B15	0	0	0	0	0	0
B16	0	0	0	0	0	0
B17	0	0	0	0	0	0
B18	5	5.0	2.5	4	6.3	3.2
B21	0	0	0	0	0	0
Bw22	1	1.0	0.5	0	0	0
B27	4	4.0	2.0	2	3.1	1.6
B35	32	32.0	17.5	27	42.2	24.0
B37	1	1.0	0.5	1	1.7	0.8
B38	0	0	0	0	0	0

CUADRO D (CONTINUACION)

P39	31	31.0	16.9	20	31.0	17.0
P40	0	0	0	0	0	0
Pw41	0	0	0	0	0	0
Pw42	4	4.0	2.0	4	6.3	3.2
P43	12	12.0	6.2	6	9.4	4.9
P45	2	2.0	1.0	0	0	0
Pw46	0	0	0	0	0	0
Pw47	1	1.0	0.5	1	1.6	0.8
Pw48	4	4.0	2.0	1	1.6	0.8
49	7	7.0	3.6	3	4.7	2.4
Pw50	1	1.0	0.5	2	3.1	1.6
P51	7	7.0	3.6	3	4.7	2.4
Pw52	3	3.0	1.5	2	3.1	1.6
Pw53	4	4.0	2.0	1	1.6	0.8
Pw54	0	0	0	0	0	0
Pw55	1	1.0	0.5	0	0	0
Pw56	2	2.0	1.0	2	3.1	1.6
Pw57	3	3.0	1.5	6	9.4	4.9
Pw58	6	6.0	3.0	2	3.1	1.6

CUADRO 9 (CONTINUACION)

Bw59	2	2.0	1.0	2	2.1	1.6
Bw60	13	13.0	6.7	"	10.9	5.6
Bw61	7	7.0	3.6	8	12.1	6.2
Bw62	9	9.0	4.6	2	3.1	1.6
Bw63	0	0	0	0	3.1	1.6
Bw64	0	0	0	0	0	0
Bw65	0	0	0	0	0	0
Bw67	1	1.0	0.5	0	0	0
Bw75	2	2.0	1.0	0	0	0
BX	9		1.0	0		0.0
Bw4 ^o	48	48.0		31	40.4	
Bw6 ^o	92	92.0		62	96.0	

• Los antígenos supertípicos Bw4 y Bw6 se informan en frecuencia: antígenicas únicamente

CUADRO 10

FRECUENCIA DE ANTICUEROS DEL TIPO MIV-C EN LA POBLACION DE TESTIGOS Y PASAJEROS CON LESIONES OIS

ESPECIFICIDAD	TESTIGOS		PASAJEROS	
	CASOS	FRECUENCIA	FRECUENCIA	CASOS
Qw1	10	19.0	10.0	14
Qw2	21	21.0	11.1	11
Qw3	11	11.0	25.2	21
Qw4	33	33.0	18.1	25
Qw5	12	13.0	6.7	3
Qw6	1	1.0	0.5	2
Qw7	12	13.0	10.0	10
Qw8	1	1.0	0.5	1
Qx	40		17.9	37

CUADRO 11

FRECUENCIA DE ANTIGENOS DE LOS LOCI HLA-DR, DQ Y DP DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

ESPECIFICIDAD	TESTIGOS			PACIENTES		
	CASOS (100)	FRECUENCIA ANTIGENICA (%)	FRECUENCIA GENICA (%)	CASOS (64)	FRECUENCIA ANTIGENICA (%)	FRECUENCIA GENICA (%)
<u>HLA-DR</u>						
DR1	16	16.0	8.4	9	14.6	7.4
DR2	0	0.0	4.6	2	4.7	7.4
DR3	3	3.0	1.5	0	0	0
DR4	41	41.0	23.2	22	34.5	19.1
DR5	0	0	0	0	0	0
DRw6	0	0	0	0	0	0
DR7	18	18.0	9.5	13	20.3	10.7
DRw8	24	24.0	12.8	19	29.6	16.1
DRw9	6	5.6	3.0	2	3.1	1.6
DRw10	3	3.0	1.5	3	4.7	2.4
DRw11(5)	10	10.0	5.1	14	21.9	11.6
DRw12(5)	5	5.0	2.5	1	1.6	0.8
DRw13(6)	4	4.0	2.0	3	4.7	2.4
DRw14(6)	3	3.0	1.5	1	1.6	0.8

CUADRO 11 (CONTINUACION)

DRw15(2)	20	20.0	10.6	13	20.3	10.7
DRw16(2)	12	12.0	6.2	8	12.5	6.5
DRw17(3)	1	1.0	0.5	0	0	0
DRw18	8	8.0	4.1	9	14.6	7.4
DPX	10		3.0	9		0.1
DRw52	52	52.0		41	64.0	
DRw53	60	60.0		33	31.5	
DRwX	88		32.5	54		29.5
<u>HLA-DQ</u>						
DQw1	36	36.0	20.0	32	50.0	29.3
DQw2	27	27.0	14.6	15	23.4	12.5
DQw3	9	9.0	4.6	15	23.4	12.5
DQw4	12	12.0	6.2	7	10.9	5.6
DQw5(1)	13	13.0	6.7	4	6.3	3.2
DQw6(1)	4	4.0	2.0	4	6.3	3.2
DQw7(3)	32	32.0	15.5	15	23.4	12.5
DQw8(3)	9	9.0	4.6	5	7.8	4.0
DQw9(3)	-	-	-	-	-	-
DQwX	58		25.8	29		17.2

CUADRO 11 (CONTINUACION)

HLA-DP

DFw3	7	7.0	3.6	2	3.1	1.6
DFw4 °	69	69.0	44.3	28	43.8	25.0
DFw5	6	6.0	3.1	7	10.9	5.6
DPwX	118		49.0	91		67.8

° DRw11 y DQw3 son antígenos significativamente incrementados

° DPw4 es el antígeno disminuido significativamente

CUADRO 12

COMUNICACIÓN ATRIBUIDA DE LOS SINDROMES EQw11, EQw3 y DFw4
 RESPECTO A LA TRICHELINIASIS

ESPECIFICIDAD	χ^2	P	Pc	RR	FE	PF
EQw11	3.51	0.05	NS	2.52	0.13	
EQw3	5.43	0.01	NS	3.10	0.16	
DFw4	11.36	0.0003	0.02	0.34		0.46

χ^2 : Prueba estadística de χ^2 corregida por Yates; P: Probabilidad; Pc: Probabilidad corregida; RR: Riesgo relativo; FE: Fracción etiológica; PF: Fracción preventiva; NS: No significativo.

V. DISCUSION.

El análisis de cualquier enfermedad infecciosa exige estudiar lo más profundo posible las relaciones entre el parásito y el huésped. En el caso de la leishmaniasis mucho se ha hecho en terminos de identificar las diferentes especies y subespecies del parásito y también se ha analizado el terreno de las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad como ya se menciona en la introducción de este trabajo (2, 7, 8, 9, 10).

En América, el repertorio tan variado de las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea es ocasionada por diversas especies. En este trabajo todas las cepas de los pacientes que se lograron aislar fueron cultivadas en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Inmunogenética, y fueron gentilmente tipificadas con anticuerpos monoclonales e isoenzimas por la Dra. Nancy Saravia en el Centro Internacional de Investigaciones Medicas. CIDEIM, en Cali Colombia, todas ellas corresponden al agente L. mexicana mexicana. Por lo tanto se confirma que los pacientes incluidos aquí, están afectados por el mismo parásito, lo cual facilita la interpretación del análisis genético llevado a cabo. Más aún, valga señalar que las cepas aisladas - fueron de pacientes tanto de la forma LCL como LCD, lo cual sugiere que la severidad de la infección no se debe a características

de patogenicidad del parásito, sino más bien a la capacidad individual del sujeto infectado para montar una respuesta inmunológica apropiada en contra del agente causal. Por otro lado, aunque la leishmaniasis cutánea fue descrita en México desde 1913 en el Estado de Yucatán (12), de este trabajo se desprende que la manifestación clínica prevalente en la zona de Tabasco de donde provienen los pacientes, es la LCL pues como se observa en el cuadro 5, el 93.8 % de los afectados es decir 58 de 62 padecen esta forma clínica. El número de casos de cuadros difusos, solo 4, parecería depender de rasgos intrínsecos del sujeto enfermo. De ahí la importancia de investigar cuales son los factores individuales que contribuyen a la expresión de la enfermedad. Estos hallazgos coinciden con estudios epidemiológicos previos (15, 18) en los que se ha demostrado que la LCL o "úlceras de los chicleros" se extiende desde el sur de Veracruz, parte de Campeche, Quintana Roo y sur del Estado de Yucatán, con ramificaciones hacia Tabasco, Oaxaca y Chiapas. En este extenso foco, la infección es una zoonosis en la que el hombre parece ser un huésped accidental expuesto únicamente por razones ocupacionales (15, 18, 96).

En este sentido, los resultados de este estudio en los que se observa que la enfermedad afecta con mayor frecuencia a adultos y a jóvenes son razonables, pues el promedio de edad entre los afectados es de $X = 35.04$

años con enfermos que van desde los 13 hasta los 78 años (cuadro 4). Durante estas etapas de la vida es cuando los individuos están expuestos a la infección selvática, en particular durante la noche, aunque existen evidencias de que esta puede darse también en forma intradomiciliaria (1, 15, 96). Los mayormente afectados en esta zona son hombres (62.5 %), como se señala en el cuadro 4, lo cual probablemente se debe a cuestiones ocupacionales, pues como se sabe, en comunidades dedicadas a la cafecultura, la proporción de mujeres que se infectan es más alta que en áreas selváticas (15, 96). Además, como el oficio de chiclero ha declinado, la ocupación a la cual se la atribuye el mayor número de casos actualmente es a la de campesino (96), labor predominante entre los sujetos de esta investigación. De modo que la diferencia de sexos que se observa en este trabajo no puede atribuirse a factores de ligamiento al aseo. Estos datos también coinciden con lo informado en la literatura con respecto a que no hay diferencias en el tipo de enfermedad que se desarrolla, cuando se infectan ratones hembra y machos en forma experimental (77).

Paralelamente al hecho de que la LCL es la forma prevalente en la zona endémica de Tabasco también es notorio del cuadro 5 que la mayoría de los pacientes tienen su capacidad de respuesta inmunológica específica intacta, pues el 93.1 % de los enfermos con

LCL son capaces de desarrollar una respuesta de hipersensibilidad tardía adecuada, después de la aplicación de la leishmanina. Todos estos pacientes presentan una reacción de induración mayor de 5 mm entre las 48 y las 72 horas posteriores a la aplicación del antígeno. Estos resultados también son acordes con lo informado en la literatura, con respecto a que dicha manifestación clínica corresponde al polo benigno de la enfermedad (19) pues al ser los enfermos inmunocompetentes tienen mayor oportunidad de responder en forma efectiva al tratamiento médico que se les administre. No obstante, el tiempo de evolución es bastante amplio pues aunque el promedio es mucho menor para los casos con LCL ($X = 8.5$ meses), se extiende desde 1 hasta 36 meses, lo cual puede deberse no tanto a la falta de atención médica sino a la escasez del medicamento que les impide a los pacientes muchas veces poder concluir el tratamiento. Esto es de llamar la atención, se encontró un paciente con LCL y 20 años de evolución, cuya lesión ha prevalecido durante todo el tiempo. Al observar sus características genéticas, el es portador de los antígenos DR4 y DQw3, que recientemente han sido identificados como posibles marcadores de la LCL en la población Venezolana (97), con motivo de la investigación de factores genéticos en la leishmaniasis para el V Taller Latinoamericano de Histocompatibilidad, del cual este

trabajo forma parte, como ya se señaló. De los 4 pacientes con LCD solo 2 respondieron a la prueba cutánea y su tiempo de evolución es más prolongada con un promedio de 20.3 meses (cuadro 5) y aunque son muy pocos los casos para alcanzar conclusiones, parece que en este polo del padecimiento, la inmunosupresión es evidente y por lo tanto, la capacidad del huésped para eliminar al parásito es deficiente. No obstante, es importante mencionar que si estos pacientes son sometidos a quimioterapia oportunamente su respuesta se puede regenerar, de modo que llegue al estado de inmunocompetencia lo cual a su vez facilita su curación, ya que la inmunosupresión específica, pues aunque no maneja inmunológicamente a la leishmania, si montan respuestas efectivas a otros antígenos como el PPD, la candidina o la coccidiodina (3, 40).

En el cuadro 6 se señala la confirmación de la presencia de parásitos en las improntas que se lograron analizar. Aun cuando se tomaron estas muestras de casi todos (60 enfermos) sólo en el 50 % de los casos se confirmó la presencia de parásitos. Estos resultados no son extraños pues se conoce que no en todos los casos están los parásitos accesibles, motivo por el cual es importante hacer el análisis de las improntas al mismo tiempo que se lleva a cabo la prueba cutánea. El diagnóstico de leishmaniasis es correcto si hay ausencia de parásitos pero la prueba cutánea es

positiva en un sujeto confirmado clínicamente. El infiltrado celular en las lesiones está dado fundamentalmente por invasión de neutrofilos (51.0 %) y linfocitos (40.5 %) como se observa en el cuadro 6, lo que indica que la respuesta inflamatoria en la mayoría de los casos es más bien de tipo agudo. Estos datos llaman la atención, pues el parásito afecta a los macrófagos (3, 20, 21, 22, 23) y sin embargo localmente predominan los polimorfonucleares. Es muy probable que sólo se observan los linfocitos entre los mononucleares y no macrófagos, porque estas células aparecen en la dermis cargadas de parásitos y empiezan a ser destruidas por él, a medida que el parásito se multiplica. Además, como regla, empiezan a verse menos macrófagos a medida que avanza el tiempo de evolución y los parásitos remanente se ven degenerados (3).

En el cuadro 7, se demuestra la distribución de grupos sanguíneos de los sistemas ABO y Rh. Hasta el momento no existe ningún trabajo en el que se informe sobre estos marcadores en la leishmaniasis y aquí se encontró una disminución significativa del grupo A en los pacientes en comparación con los testigos (7 % en pacientes vs 24 % testigos) con una $\chi^2 = 7.55$ y una $P = 0.005$. Estos resultados son interesantes ya que una disminución de un marcador genético, si la relación es real, sugiere protección. Sin embargo, es mucho más difícil demostrar la resistencia que la

susceptibilidad. Por otro lado, es muy probable que esta asociación sólo hable de un efecto de la estratificación poblacional, pues los enfermos pertenecen todos a la zona rural donde el componente indígena es muy grande y probablemente algunos de los testigos que no son campesinos, tienen una estructura genética más mestiza, en la que se refleja la presencia del grupo A.

Por lo que toca al análisis realizado con respecto a los antígenos de histocompatibilidad, no se encontró ninguna desviación significativa en los alelos clase I, en ninguna de las regiones genéticas, HLA-A, B o C. Estos resultados coinciden con los datos informados por Barbier y col. (85) quienes exploraron una población de pacientes con LC de la Guyana Francesa. Sin embargo, ellos mostraron una disminución significativa del antígeno Cw7, que se pierde al corregir el valor de la probabilidad. Estos resultados sugieren fuertemente que si hay algún gen involucrado en la susceptibilidad a la LC, no se haya localizado en la región de clase I. En este mismo trabajo también se analizaron 204 individuos de 18 familias en busca de segregación de haplotipos y tampoco encontraron ningún ligamiento genético a los marcadores HLA estudiados, ni a los alotipos Gm y Km de inmunoglobulinas. No obstante es muy importante enfatizar que sólo se investigaron antígenos HLA clase I y si el ligamiento está en clase II, no les fue

posible poner de manifiesto el efecto de estos genes, ya que no tipificaron dichos antígenos.

En el presente trabajo sí se estudiaron los antígenos clase II, HLA DR, DQ y DP, ya que es la primera vez que se informan datos al respecto en la leishmaniasis. Se encontró una disminución que se halla en el límite de la significancia estadística, del subtipo DRw11 del antígeno DR5 dado que la frecuencia génica en los sanos es de 5.13 % mientras que en los pacientes con LCL es de 11.9 % con una $X^2 = 3.51$ y una $P = 0.05$. Es importante aclarar que al corregir el valor de P, la significancia estadística se pierde lo cual sugiere que la asociación del DRw11 con LCL requiere estudios con mayor número de pacientes para confirmar o rechazar la asociación. Por otro lado, es interesante señalar que el DQw3 también se encontró significativamente aumentado, revelado por la frecuencia génica en los testigos de 4.6 % y en los pacientes de 12.5 % con un valor de $X^2 = 5.41$ y una $P = 0.01$. En este caso también se pierde la significancia al corregir el valor de la probabilidad, aunque la asociación es más intensa que en la región DR, por lo que también es relevante confirmar con un número mayor de casos y con estudios familiares la predominancia de dicho alelo. Valga mencionar que la combinación DRw11 - DQw3 se encuentra en desequilibrio de enlace en todas las poblaciones humanas y también en mestizos mexicanos

(98). El hecho de haber encontrado este desequilibrio en los pacientes no es sorprendente, pero si es de llamar la atención que hay tres subtipos del DQw3 que son el DQw7, DQw8 y DQw9 y que en algunas enfermedades como la diabetes dependiente de insulina, el gen DQ ligado es el DQw8 en el haplotipo DR4 - DQw8 (59). Al buscar en la LCL que subtipo del DQw3 es el involucrado, no hay ninguna desviación entre sanos y pacientes ni para el DQw7 y ni para el DQw8 (cuadro 8). Esto es un hallazgo interesante pues significa que probablemente el verdadero haplotipo involucrado en la LCL es el DRw11 - DQw9 o el DRw11 con un nuevo subtipo del DQw3. Para confirmar estos resultados se está explorando actualmente en el Departamento de Inmunoigénetica de la Dra. Gorodezky el DNA de estos pacientes mediante la técnica de amplificación del DNA con sondas de oligonucleótidos para la identificación de los genes DQ. El riesgo relativo de 2.52 para DR5 y 3.10 para DQw3 indican que un sujeto portador de dicho alelo tiene 2.5 y 3 veces más probabilidad de desarrollar LCL cuando se infectan con el parásito, que un sujeto sano que no lleva en su cromosoma estos genes.

El antígeno DRw9 del locus DR y el DPw4 de la región DP se hallan disminuídos pero para el DRw9, posiblemente se debe a un mecanismo de compensación dado por el incremento del alelo DRw11 y no a ninguna

disminución que implique asociación genética. Sin embargo, en el caso DPw4 sí parece estar relacionado con un gen de resistencia lo cual habra que confirmar, pues además la región DP es difícil definir serológicamente. Pero dado que el valor de P se sostiene a pesar de la corrección ($P_c = 0.02$), se postula un gen de protección ligado a la región DP. La FE de 0.48 demuestra que el 48 % o sea una proporción grande de esta resistencia se debe a un gen DP y que por lo tanto los sujetos que carecen del DPw4 son más susceptibles de desarrollar la LCL cuando se infectan con la leishmania.

Los hallazgos de este trabajo arrojan nuevos datos sobre la enfermedad y muestran que el MHC participa por lo menos parcialmente como fondo genético en la expresión de esta forma clínica de la leishmaniasis, lo cual concuerda con algunos resultados informados en el modelo del ratón ya que se ha visto que el parásito se establece en forma exitosa en las cepas Balb/c que se infectan con L. major, debido a un reconocimiento defectuoso de la leishmania que está restringiendo a H-2, pues las células de una población de Th no son capaces de reconocer al antígeno y destruir al parásito intracelular en los macrófagos (32, 73, 76, 78).

No hay que olvidar que también se ha demostrado que la infección en el ratón esta bajo el control de otros genes fuera del MHC, como son el Scl-1 y Scl-2

(82, 83) y el H-11 (72, 73, 76). Esto quiere decir que el control genético de la enfermedad es complejo y posiblemente poligénico y tal vez existe un efecto sinérgico entre los genes del MHC y los de los otros cromosomas. También sera relevante hacer estudios familiares para confirmar el ligamiento con el MHC, como el efectuado en la poblacion Venezolana (97) en el que se demostró el ligamiento a genes clase II del MHC en la LCL en mestizos de ese país. En este estudio segrega el haplotipo B22-DRw11-DQw8 y B22-DR4-DQw8 en los afectados y la asociación con el DQw3 se confirmó comparativamente con los controles, que en este caso eran los hermanos sanos. El RR para el DQw3 es de 4.25 con una *FE* de 0.63, demostrando que este alelo contribuye en forma importante como factor genético de riesgo para la expresión de la LCL en Venezuela.

Es conveniente hacer énfasis en que las diferentes cepas existentes de leishmania podrían ser responsables de las distintas manifestaciones clínicas de LC y por eso es de gran importancia tipificar al parásito en todo estudio genético que se haga, con el objeto de saber si lo observado se pudiera deber a una especie o subespecie en particular. Como ya se menciono las cepas obtenidas de los pacientes del presente trabajo corresponden a *L. m. mexicana*, lo cual confirma que la susceptibilidad genética en Mexicanos existe y está

condicionada por lo menos parcialmente la infección a esta subespecie del parásito.

Por último, valga señalar que estos resultados, muestran por primera vez la participación de los genes clase II del MHC en la LC en el humano y considerando las características clínicas y el espectro inmunológico de la enfermedad, los resultados son llamativos pues en otra enfermedad, con características similares, la lepra, hoy es evidente que los genes MHC juegan un papel determinante tanto en la expresión de la forma tuberculoide (83, 84, 85) como en la manifestación del polo lepromatoso (53). Esto ha sido confirmado también para mestizos Mexicanos por Gorodezky y su grupo, quienes demostraron que la lepra tuberculoide está asociada al DR3 (53, 63) y que la lepromatosa está ligada al DQw1 (53), el cual parece funcionar como un gen de supresión inmunológica Is, que probablemente facilite el establecimiento de la forma maligna de la lepra en los individuos afectados por la micobacteria.

Este estudio abre las puertas para futuras investigaciones en el terreno de la genética de la leishmaniasis, que ayudaran a comprender la patogenia de la enfermedad y a identificar a sujetos en riesgo de manifestar las diversas formas del padecimiento.

VI. CONCLUSIONES

1. La LCL es una enfermedad que se puede presentar a cualquier edad sin predilección, ya que en este estudio se encuentran afectados desde los 13 hasta 78 años de edad. Tampoco parece haber ligamiento al sexo y el hecho de que se afecte el 62.5% de hombres es más bien por motivos ocupacionales.
2. En lo que respecta a la forma clínica, la entidad prevalente en el Estado de Tabasco es la LCL, pero no se puede descartar la posibilidad de que haya otras manifestaciones, ya que hacen falta estudios epidemiológicos en lo que respecta a la leishmaniasis.
3. Los pacientes con LCL desarrollan una buena respuesta celular específica *in vivo*, mientras que los con LCD (sólo 4) la muestran deficiente (LCL 93.1% vs LCD 50%). El tiempo de evolución para la LCL fue de 8.5 meses y para la LCD fue de 20.3 meses, lo que indica que cada uno de los polos se manifiesta de acuerdo a las condiciones inmunológicas del paciente.
4. El agente causal que se encontro uniformemente en la población estudiada fue *L. m. mexicana*, lo que facilito la investigación genética por ser una sola especie.
5. Los resultados de distribución de grupos eritrocitarios muestra una disminución significativa del grupo A que se ve compensado por el aumento del grupo O. Probablemente esto se deba a estratificación

poblacional y no a una asociación genética con la infección.

6. La distribución de antígenos clase I, no mostró desviación significativa, mientras que los antígenos de la región de clase II mostraron un aumento del DRw11 y el DQw3. El primero se encuentra en el límite de la significancia ($P=0.05$) y el segundo indica una asociación más fuerte. El DPw4 se encuentra significativamente disminuido ($P=0.0008$) con una RR = 0.34 y una FP = 0.46 lo que sugiere que las personas portadoras de este antígeno tienen una protección del 46%, mientras que las que no lo portan son más vulnerables a la infección.

7. Importante es señalar que el gen de susceptibilidad a la LCL parece estar localizado en la región HLA-DQ y posiblemente este en desequilibrio de enlace con un subtipo del DQw3 diferente del DQw7 y del DQw8. Este podría ser el DRw11 - DQw9 o algún nuevo subtipo del DQw3. Esto se está investigando actualmente por amplificación del DNA con oligonucleótidos específicos para DQ.

VII. RESUMEN

Se ha demostrado que la susceptibilidad genética a la leishmaniasis en el ratón esta parcialmente ligada a genes del MHC. Este trabajo realizado en humanos, es parte integral del V taller Latinoamericano de Histocompatibilidad, y ha permitido conocer más acerca de las características genéticas ligadas al MHC que condicionan la expresión de la LCL en el hombre. En México existen diversas formas clínicas de la leishmaniasis, pero aquí se incluyeron pacientes con leishmaniasis cutánea. Se selecciono un grupo de 64 pacientes (58 con LCL y 4 con LCD) de la zona endémica de Comalcalco Tabasco, a los cuales se les diagnóstico de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS. Las cepas que se lograron aislar y cultivar, corresponden a la L. mexicana mexicana, de modo que una sola subespecie es la infectante en estos casos. En cada uno de los enfermos se aplicó la intradermorreacción de Montenegro, cuya prueba fue positiva en 93.1% de los pacientes. El tiempo promedio de evolución de la LCL es de 8.5 meses. Los resultados se compararon con los de un grupo de 100 sujetos aparentemente sanos que se incluyeron como testigos, casi todos ellos pertenecientes a la misma zona endémica. Todos los individuos son mestizos mexicanos. No se observó ninguna predominancia de sexo o edad y la distribución

de grupos sanguíneos del sistema ABO, muestra una disminución significativa del grupo A, en los pacientes, ($X = 7.55$; $P = 0.005$), que podría deberse a estratificación poblacional más que a susceptibilidad asociada al marcador.

En ambos grupos se analizó la distribución de antígenos HLA A, B, C, DR, DQ y DP y se calcularon las frecuencias antigénicas y génicas de cada alelo en las dos poblaciones. La tipificación de los antígenos HLA se realizó mediante la técnica de microlinfocitotoxicidad sobre poblaciones purificadas de linfocitos T y B. Se encontró un incremento del alelo DRw11 subtipo del DR5 ($P=0.05$) que pierde su significancia estadística al corregir la P por el número de antígenos analizados. El riesgo relativo (RR) de desarrollar la infección es de 2.52 y la fracción etiológica (FE) de 0.13, lo que indica que los genes responsables no pertenecen a la región DR. El antígeno DQw3 se encontró incrementado con una P de 0.01 y una FE de 0.16. Por otro lado el antígeno DPw4 se encuentra francamente disminuido, ($X = 11.36$; $P_0 = 0.02$; $RR = 0.34$; $FP = 0.46$), lo que sugiere la presencia de un gen de resistencia ligado a la región DQ en la LCL.

En conclusión, un gen en la región DQ, parece determinar por lo menos, parcialmente la susceptibilidad a la LCL y un gen ligado al locus HLA-DP, parece estar condicionando la resistencia al

padecimiento, de modo que cuando el DPw4 está ausente, el individuo está en un riesgo mayor cuando se infecta de manifestar la LCL. Estos hallazgos deberán confirmarse con estudios familiares y la investigación de un grupo mayor de pacientes.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. The leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. 1984 WHO Technical Report Series 701, Ginebra, Suiza.
2. Botero, D., y Restrepo, M., 1984. Leishmaniasis. En: Parasitosis humanas. Eds. Botero, D., y Restrepo, M., Ediciones CIP. Medellin, Colombia, 261-278.
3. Behin, R., y Jaques, L., 1984. Immune response to leishmania antigens. En: The clinical form. Eds. Chandra R., Plenum Publishing Corp., Berna Suiza, 145-150.
4. Laison, R., Shaw, J., 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-American. Nature, 273: 595-599.
5. Convit, J., 1965. Disseminated cutaneous leishmaniasis, Arch. Derm., 19: 439-447.
6. Hoare, C., 1964. Intraspecific biological groups in pathogenic protozoa. Refuah Veterinaria, 12: 258-263.
7. Giannini, H. S., y Schitting, N., 1986. Kariotype analysis of Leishmania, Nature, 232: 762-765.
8. Saravia, G. N., y Holguin, F., 1985. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: Leishmania brasiliensis subspecies diversity. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34: 714-720.
9. Anthony, L. R., y Grogl, M., 1987. Rapid detection of leishmania amastigote in fluid aspirates and

biopsies of human tissues, Am. J. Trop. Med., 73: 271-276.

10. Alexander, J., y Russell, D., 1985. Parasite antigens, The role in protection, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 120: 43-67.

11. López, G, D., 1888. Historia de Yucatán. Merida, Yuc.

12. Seidelin, H., 1913. Leishmania and leishmaniasis en Yucatan. Anna Trop. Med. Parasit., 6: 295-298.

13. Beltran, E., y Bustamante, 1942. Datos epidemiológicos acerca de la úlcera de los chicleros (Leishmaniasis Americana) en México. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop., 3: 1-28.

14. Velasco, C. G., 1987. La leishmaniasis en México. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 29: 119-126.

15. Velasco, C. G., 1984. La leishmaniasis en México en: Epidemiología y control de la leishmaniasis en Centro América. Panama, Belice y México. Editado en México OPS, Minatitlan Ver.

16. Neva, F. A., 1986. Información del Depto. de parasitología del NIH al Depto. de parasitología sel ISET.

17. Biagy, F. F., 1957. Distribución geográfica de la leishmaniasis en México. Med. Rev., 33: 444-446.

18. Velasco, C. G., 1988. La leishmaniasis en la Chontalpa, Tab. Rev. Lat. Microbiol., (en prensa).

19. Destombes, P., 1960 Application du concepts "de Systemiasation polare" aux leishmanioses cutanee, Bull. Soc. Path. Exot., 53: 229-300.
20. Alexander, J., Vickerman, K., 1975. Fusion of host cell secondary lysosomes whit the parasitophorus vacuoles of L. mexicana infected macrophages, J. Protozool., 22: 502-508.
21. Griffin, F. M., y Griffin, J. A., 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis, J. Exp. Med., 142: 1263-1268.
22. Channon, J., y Blackwell. J., 1986. Molecular biology of Leishmania, Parasitol. Today, 2: 45-53.
23. Bray, R. S., 1983b. L. m. mexicana attachment and uptake of promastigote to and by macrophages in vitro, J. Protozol, 30: 314-322.
24. Bordier, C., 1987. The promastigote surface protease of Leishmania. Parasitol. Today, 3: 151-152.
25. Gardiner, P. R., y Jaffe, L. C., 1984. Identification of crossreactive promastigote cell surface antigens some Leishmania stocks, Infec. Immun., 43: 637-643.
26. Turco. S. J., 1988. The lipophosphoglycan of Leishmania, Parasitol. Today, 9: 255-257.
27. Sacks, D. L., y Perkins, P. V., 1984. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes, Science, 223: 1417-1419.

28. Michell, F. G., y Handman, E., 1985. T-lymphocytes recognise Leishmania glycoconjugated, Parasitol. Today., 27: 61-63.
29. Sells, P. G., y Perkyms, L. O., 1987. Lymphocyte transformation in cutaneous leishmaniasis patients, Annals of Trop. Med and Parasitol., 81: 105-116.
30. Anthony, R. L., 1980. Microenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis, Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 190-194.
31. Huszar, H., y Shor, R., 1987. The cell T phenotypes in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol., 12: 103-107.
32. Liew, F., Y., 1989. Functional heterogeneity of CD4+ cells in leishmaniasis. Immunol. Today, 10: 4-45.
33. Ridley, D. S., Marsden, P. D., 1980. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 29: 163-169.
34. Dexjeux, P., y Santoro, F., 1980. Circulating immune complex and anti-IgG antibodies in mucocutaneous leishmaniasis, Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 195-198.
35. Peterson, E. A., y Neva, F. A., 1982. Specific inhibition of lymphocyte proliferation response by adherent suppressor cell in diffuse cutaneous leishmaniasis, N. Engl. J. Med., 306: 287-292.

36. Casoli, P., y Lambert, P. H., 1979. Purification of soluble immune complex from serum, Clin. Exp. Immunol., 37: 295-309.
37. Wyler, D. J., y Weibbaum, F. I., 1979. Characterisation to Leishmania antigens, J. Infect. Dis., 140: 215-221.
38. Ghose, A. C., y Halder, J. P., 1979. Phytohemaglutnin-induced lymphocyte transformation test in Indian Kala-azar. Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 73: 725-726.
39. Lucis, A. J., y Titus, R. G., 1986. Attempts to assess the contribution of T lymphocytes from the L3T4+ and LYT2- subsets in immunological control of cutaneous leishmaniasis, Lepra., Rev., 57: 255-261.
40. Lima, C. G., y Enger, H. D., 1984. Adoptative transfer of delayed type hypersensitive reaction for L. major antigens to normal mice using T cell population and clones generated in vitro. Clin. Exp. Immunol., 57: 130-138.
41. Howard, G. J., y Hale, C., 1981. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. J. Exp. Med., 53: 557-566.
42. Rodriguez, M. M., y Xavier, T. M., 198. Novel 17-Kilodalton Leishmania antigens reveled by murine T lymphocytes. Infect. Immun., 57: 1766-1770.

43. Reiner, E. N., Winnie, N. G., y McMaster, R. W., 1987. Parasite accessory cell interaction in murine leishmaniasis, *J. Immunol.*, 138: 1926-1932.
44. Gorer, P. A., 1936. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br. J. Exp. Pathol.*, 17: 42-50.
45. Snell, G., Dausset, J., Matleson, S., 1976. The HLA complex: serology and genetics. En: *Histocompatibility*, Academic Press. Nueva York, 182-237.
46. Dausset, J., 1954. Leucoagglutinins and blood transfusion, *Vox Sang.*, 4: 190-198.
47. Holmes, N., 1989. New HLA class I molecules, *Immunol. Today*, 10: 52-53.
48. Bodmer, F. W., 1989. HLA 1987. En: *Immunobiology of HLA*. Ed. B. DuPont, Springer Verlag, Nueva York, Vol. II, 1-9.
49. Bodmer, F. W., Albert, E., Bodmer, G. J., y DuPont, B., 1989. Nomenclature for factors of HLA system 1987. En: *Immunobiology of HLA*. Ed. DuPont, Springer Verlag, Nueva York. Vol. I, 72-79.
50. Terasaki, P. I., y Tiwari, J. L., 1985. The HLA complex. En: *HLA and Disease Association*. Eds. J. Tiwari y P. I. Terasaki, Springer Verlag, Nueva York, 4-14.
51. Cresswell, P., 1987. Regulation of HLA class I and class II antigens expression, *Br. Med.*, 43: 66-80.

52. Strominger, L. J., 1987. Structure of class I and class II HLA antigens. Br. Med. Bull., 43: 81-93.
53. Gorodezky, L. C., 1989. Tesis Doctoral. Genes de susceptibilidad y supresión inmunológica ligado al MHC en la lepra. México, D.F., 34-39.
54. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraovi, B., Bennet, W. S., Strominger, J. L., y Wiley, D. C., 1987. Structure of human class I histocompatibility antigen, HLA-2, Nature, 239: 506-512.
55. Owen J. M., 1987. The role of class I and class II antigens in T cell recognition. Br. Med. Bull., 43: 228-240.
56. Zinkernagel, R. M., y Doherty, P. C., 1974. Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocyte choriomeningitis within a syngenic or semi-allogenic system. Nature, 248: 248-701.
57. Benacerraf, B., McDevitt, H. O., 1972. Histocompatibility linked immune response genes, Science, 175: 273-279.
58. Terasaki, P. I., y Tiwari, J. L., 1985. HLA disease Association, Eds. Terasaki y Tiwari, Springer Verlag, Nueva York.
59. Batchelor, J. L., y Michael, A. J., 1987. Progress in understanding HLA and disease association. Br. Med. Bull. 43: 156-183.

60. Lilly, F., 1971. The influence of H-2 type on gross virus leukomogenesis in mice, *Transplant. Proc.*, 3: 1239-1241.
61. Amiel, J. L., 1967. Study of leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease. En: *Histocompatibility testing*. Eds. Curtoni, E. S. y Mattiuz, P. L., Munksgaard, Copenhagen, 79-81.
62. Terasaki, P. I., Tiwari, J. L., 1985. Juvenile mellitus diabetes, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. En: *HLA and Disease Association*, Eds. Tiwari y Terasaki, Springer Verlag, Nueva York, 185-201, 55-64 y 85-100.
63. Gorodesky, C., Flores, J., Arevalo, N., y Castro, L., 1987. Tuberculoid leprosy in Mexicans is associated with HLA-DR3, *Lepr. Rev.*, 58: 401-408.
64. Serjeantson, S. W., 1983. HLA and susceptibility to leprosy. *Immunol. Rev.*, 70: 89-112.
65. Van Eden, W., y de Vries, R. R. P., 1984. Occasional review HLA and leprosy: re-evaluation. *Lepr. Rev.*, 55: 89-104.
66. Escobar-Gutierrez, Gorodesky, C., Salazar-Mallen, M., 1973. Distribution of some of the LHA system lymphocyte antigens in mexicans. II. Studies in atopics and in lepers, *Vox Sang*, 25: 151-157.
67. Terasaki, P. L., y Tiwari, J. L., 1985. Mechanisms of HLA and Disease Association. The data and statistical analysis. En: *HLA and Disease Association*.

Eds. Tiwari y. Terasaki, Springer Verlag, Nueva York, 18-27, 28-31.

68. Helenius, A., y Morein, B., 1978. Human HLA (HLA-A and B) and murine (H-2K and D) histocompatibility antigens are cell surface receptor for Semliki Forest Virus. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 3848-3850.

69. Tejani, A., y Mahadevan, R., 1981. Occurrence of HLA type in H influenza type B disease. Tissue Antigens, 17: 205-211.

70. Nepon, G. T., Hansen, A. J., 1987. The molecular basis for HLA class II associated with rheumatoid arthritis, J. of Clin. Immunol., 7: 1-7.

71. Shreffler, D. C., y David, J., 1984. H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: Genetic Variation, function and organization. Adv. Immunol., 20: 125-195.

72. Ansari, A. A., Freidhoff, L. R., y Meyer, D. A., 1989. Human immune responsiveness to Lolium perenne Pollen allergen Lol PIII (Rye III) 15 associated with HLA-DR3 and DR5. Human Immunol 25: 59-71.

73. DeTolla, J. L., Semprevivo, H. L., Palczuk, C. N. 1980. Genetic control of acquired resistance to visceral leishmaniasis in mice. Immunogenet., 10: 353-361.

74. Brandley, J. D., 1977. Regulation of Leishmania population within the host, Clin. Exp. Immunol., 30: 130-140.

75. Brandley, J. D., Taylor, A. B., Blacwell, J., 1979. Regulation of Leishmania population within the host. Clin. Exp. Immunol., 37: 7-14.
76. Crocker, P. R., Blacwell, J. M., Bradley, D. J., 1980. Expression of the natural resistance gene LSH in resident liver, Infection and Immunity, 43: 1033-1040.
77. DeTolla, J. L., Scott, A. P., y Farrell, P. J., 1981. Single gene control of resistance to cutaneous leishmaniasis in mice. Immunogenet., 14: 29-39.
78. Blacwell, J., Freeman, J., y Brandley, D., 1980. Influence of H-2 complex and acquired resistance to L. donovani infection in mice. Nature, 283: 72-72.
79. Blackwell, M. J., Hale, C., y Roberts, B. M. 1985. An H-11 linked gene has parallel affect on L. major and L. donovani infection in mice. Immunogenet., 21: 385-395.
80. Rezaei, R. H., Farrel, J., y Soulsby, L. E., 1980. Immunological response of L. donovani infection in mice and significance of T cell in resistance to experimental leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol., 40: 508-514.
81. Scott, P. A., Farrell, J. P., 1982. Experimental cutaneous leishmaniasis: Disseminated leishmaniasis in genetically susceptible mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31: 230-238.

82. Blackwell, J. M., Robert, B., y Alexander, J., 1985. Response of Balb/c mice to leishmanial infection, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 122: 97-106.
83. Alexander, J., Kaye, P. M., 1985. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis, *Clin. Exp. Immunol.*, 61: 674-682.
84. Blackwell, J. M., Hale, C., Robert, M. B., 1985. An H-11 linked gene has a parallel effect on *L. major* and *L. donovani* infections in mice, *Immunogenet.*, 21: 385-395.
85. Barbier, D., 1987. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. *Tissue Antigens*, 30: 63-67.
86. Abdel y Salam, E., 1986. Associations of HLA class I antigens (A1, B5 and Cw2) with disease manifestations and infection in human Schistosomiasis in Egypt. *Tissue Antigens*, 27 : 142-146.
87. Vadas, M. A., 1980. Parasite immunity and the MHC. *Immunogenet.*, 11: 215-223.
88. Sasasuki, T., 1983. HLA-linked genes controlling immune response and disease susceptibility, *Immunol., Rev.* 70: 51-75.
89. Gorodezky, C., y col., 1989. Manual de practicas del Departamento de Inmunogenética, INDRE-SSA antes ISET, Mexico D.F.
90. Danilovs, J., Terasaki, P. I., y Park, M. S., 1980. B lymphocyte isolation by throbin-nylon wool. *En:*

- Histocompatibility testing 1980. Ed. P. I. Terasaki, UCLA Tissue typing laboratory, Los Angeles Ca., 187-258.
91. Longo, A., y Ferrara, G. B., 1980. Human B cell. Separation and typing. En: Histocompatibility testing 1980. Ed. P. I. Terasaki UCLA Tissue laboratory. Los Angeles Ca. 283-285.
92. Suejgaard, A., y Ryder, L. P., 1979. Disease association. En: Histocompatibility techniques. Eds. Heather, M. D., y Kissmeyer Nielsen, F., Elsevier-North Holland, Nueva York, 185-205.
93. Haldane, J. B., 1955. The estimation and significance of the logarithm of a ration of frequencies. Ann. Hum. Genet., 20: 309-311.
94. Wolf, B., 1955. On estimating the relation between blood group and disease, Ann. Genet., 19: 251-253.
95. Bengtsoon, B. O., y Thomson, G., 1981. Measuring the strength of associations between HLA antigens and disease, Tissue Antigens, 17: 356-363.
96. Fernández, De C. J., 1987: Leishmaniasis: Aspectos epidemiológicos, Congreso de Parasitología 1987.
97. Lara, M., Layrisse, Z., y Scorza, J., 1989. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis: Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. V Taller Latinoamericano de Histocompatibilidad. Dic 3-8, 1989, Mexico D.F. P 40.

98. Park, M. S., Gorodezky, C., Terasaki. P., 1986. HLA in a Population of mexicans. En: HLA in Asia-Oceania 1986. Eds M. Aizawa. Hokkaido University Press. Sapporo, Japon. 291-294.