

11281

25



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ANALISIS ANTIGENICO DE**

*Mycobacterium leprae*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**BIOMEDICAS. AREA INMUNOLOGIA**

**P R E S E N T A**

**ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ**

Facultad de Medicina



**DIRECTOR DE TESIS: DRA. CECILIA XIMENEZ GARCIA**

**MEXICO, D. F.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**2002**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**A**

**ALFONSO EUGENIO**

**Y**

**LOURDES**

**A**

**LOURDES**

**LOURDES MARIANA**

**PAULA EUGENIA**

**ALFONSO EDGARDO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Cecilia Ximénez García que con su valiosa ayuda, dedicación y paciencia llevó a cabo la dirección de esta tesis.**

**Al Dr. Raúl Mancilla Jiménez  
Al Dr. Rogelio Hernández Pando  
Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez  
A la Dra. Dolores Correa Beltrán  
A la Dra Iris Estrada García  
Al Dr. Celso Ramos García**

**Por su valiosa crítica**

**Al Dr. José Barba Rubio (post mortem)  
Al Instituto Dermatológico de Jalisco  
Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)  
A La Universidad de Guadalajara**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Me permito informarle que el Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas acordó designar el siguiente Jurado para examen de grado como Doctor en Ciencias Biomédicas, (plan 582) del M. en C. **ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ**, quien defenderá la tesis: **"ANALISIS ANTIGENICO DE MYCOBACTERIUM LEPRAE"**.

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>DR. RAUL MANCILLA JIMENEZ</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>DR. ROGELIO HERNANDEZ PANDO</b>
<b>PRIMER VOCAL:</b>	<b>DRA. CECILIA XIMENEZ GARCIA</b>
<b>SEGUNDO VOCAL:</b>	<b>DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIERREZ</b>
<b>TERCER VOCAL:</b>	<b>DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRAN</b>
<b>SUPLENTE:</b>	<b>DRA. IRIS ESTRADA GARCIA</b>
<b>SUPLENTE:</b>	<b>DR. CELSO RAMOS GARCIA</b>

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de Septiembre del 2001.

**Dr. Gabriel Roldán Roldán**  
Responsable  
Facultad de Medicina

**Dr. Abel Moreno Cárcamo**  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## INDICE

<b>I.- INTRODUCCION</b>	
Aspectos epidemiológicos de la Lepra	3
Características clínicas de la Lepra	4
Estructura de la pared celular de <u>M.leprae</u>	7
Antígenos proteicos de <u>M.leprae</u>	10
Biología Molecular de <u>M.leprae</u>	12
Respuesta Inmune a bacterias intracelulares	17
Evasión de las bacterias intracelulares a los Mecanismos Inmunológicos	21
Inmunología de la Lepra	22
Antecedentes Experimentales	24
<b>II.- PLANTEAMIENTO</b>	27
<b>III.- OBJETIVO</b>	28
<b>IV.- HIPOTESIS</b>	29
<b>V.- MATERIAL Y METODOS</b>	30
<b>VI.- RESULTADOS</b>	38
<b>VII.- DISCUSION</b>	53
<b>VIII.- RESUMEN EN INGLES</b>	58
<b>IX.- REFERENCIAS</b>	59
<b>X.- PRODUCCION CIENTIFICA</b>	73

## INTRODUCCION

**Aspectos epidemiológicos de la Lepra.** - La Lepra es una enfermedad granulomatosa crónica producida por *Mycobacterium leprae*, que es un bacilo no cultivable en medios sintéticos, con carácter intracelular y que afecta a más de 10 millones de personas alrededor del mundo. De ellos, cerca del 62 % están en Asia y 34 % están en África, donde la enfermedad es tres veces más severa. El resto de los pacientes con Lepra se encuentran en América, en particular en los países en vías de desarrollo. En todos ellos es necesario poder realizar un diagnóstico temprano y preciso con el objeto de prevenir la transmisión de la enfermedad.

La transmisión de la Lepra es de persona a persona. Existen suficientes argumentos para pensar que esta transmisión se realiza a través de la piel intacta o a través de la inhalación y depósito del bacilo en la mucosa nasal intacta o por lesiones en la piel como las provocadas por las picaduras de artrópodos. No existen conclusiones definitivas acerca de cual sea el mecanismo más frecuente, quizá la hipótesis más aceptada es la de los bacilos expelidos en las secreciones nasales de pacientes con enfermedad activa, dichas secreciones expelidas se impactan sobre la mucosa nasal de otro individuo no infectado.

No obstante que la enfermedad se presenta predominantemente en humanos, en 1975 se demostró que también se presenta de manera natural en armadillos (*Dasyus novemcinctus*). También se han encontrado casos espontáneos de lepra en monos mangabey (5,55,117).

**Características clínicas de la Lepra .-** Las características clínicas de la lepra pueden ser agrupadas en tres:

- a) características debidas a la proliferación del bacilo.
- b) características debidas a la respuesta inmune del huésped contra el bacilo.
- c) características relacionadas con la neuritis periférica causada por los dos primeros procesos mencionados.

La lepra siempre afecta a los nervios periféricos, casi siempre a la piel y frecuentemente a las mucosas, los tres signos cardinales de la lepra son: lesiones en la piel, anestesia de la piel y nervios periféricos alargados. La mayoría de los sujetos aún en zonas endémicas resisten a la infección por M. leprae , aunque hay que tomar en cuenta la resistencia que el propio bacilo desarrolla a los tratamientos quimioterapéuticos (10,42). Se afirma, que de 200 individuos que se infectan con el bacilo sólo uno desarrolla la enfermedad (55,117). Los pacientes con lepra presentan un amplio y bien conocido espectro de manifestaciones clínicas que incluyen a la forma indeterminada de la lepra y a los polos de la enfermedad: la lepra tuberculoide (LT), con un buen pronóstico, así como la lepra lepromatosa (LL), con un mal pronóstico. Por último, cuando las características de la lepra LL o LT no se encuentran bien definidas se ha establecido que ese grupo de pacientes cursa con formas de lepra limitrofe (55,109,117). Los individuos que son incapaces de resistir la infección por M. leprae cursan por un período de preincubación muy variable en tiempo, que frecuentemente oscila entre dos y cuatro años. Esos pacientes cursan entonces por formas de Lepra indeterminada. El signo más temprano de la lepra indeterminada consiste en la aparición de algunas zonas de la piel hipopigmentadas con una pérdida discreta de la sensibilidad confinada a la lesión, la histopatología de la lesión muestra dermatitis crónica no específica con infiltrados de células



esparcidas alrededor de la dermis. La presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en forma de un infiltrado selectivo en las intersecciones nerviosas es un signo diagnóstico. La lepra indeterminada tiene un curso variable, pero se observa que tres cuartas partes de los pacientes curan espontáneamente; algunos casos continúan presentando la forma indeterminada de la lepra por largos períodos de tiempo y algunos progresan a algunas de las formas establecidas de la enfermedad, mencionadas anteriormente (55). La LT, es la forma localizada de la enfermedad. Los pacientes con LT presentan muy pocos (a diferencia de los LL) o ningún bacilo en las lesiones, su imagen clínica está integrada por una combinación entre la baja proliferación de los bacilos y la "buena" respuesta inmune del paciente contra el bacilo. De una manera característica, los pacientes con LT presentan unas cuantas lesiones bien circunscritas en la piel con anestesia profunda de la zona afectada, puede existir también un engrosamiento de los nervios periféricos en la vecindad de la o las lesiones. Histopatológicamente como se mencionó, hay escasos bacilos en las lesiones o ninguno, existe un granuloma bien organizado constituido por células epitelioides, rodeados de linfocitos así como de células gigantes multinucleadas de Langhans, este granuloma envuelve la capa basal de la epidermis.

La LL es la forma anérgica de la enfermedad, M. Leprae prolifera abundantemente en los diferentes tipos de lesiones de la piel, estas lesiones pueden ser difusas, generalizadas o nodulares (lepromas) y se distribuyen de una manera simétrica. Los lepromas de la piel pueden llegar a contener  $10 \times 10^{10}$  bacilos por gramo de tejido.

Característicamente, las lesiones lepromatosas se desarrollan en las zonas más frescas de la piel debido a que al parecer, M. Leprae crece mejor a bajas temperaturas, de tal forma que: el tercio anterior del ojo (y no los dos tercios tibios), la mucosa nasal (pero no la mucosa oral que no es enfriada por el aire inspirado) y los nervios periféricos, que inervan las áreas más superficiales

(las zonas del antebrazo y las piernas), son los más afectados por la infección progresiva. Incluso existe un patrón característico de pérdida de la sensibilidad debido a la afectación de las fibras nerviosas de la piel en la lepra lepromatosa avanzada (114). En la LL existe una carga bacilar característica lo cual causa una gran acumulación de macrófagos necesarios para intentar contenerlos. Este fenómeno es una característica histopatológica de las lesiones lepromatosas que se caracterizan por la presencia masiva de macrófagos con gran número de bacilos y de lípidos en su interior, los cuales cuando se tiñen con hematoxilina-eosina tienen apariencia espumosa. Estos macrófagos espumosos pueden llegar a ocupar hasta el 90 % de la piel, la acumulación de células espumosas están separadas de la epidermis por una zona clara. Por último, la lepra limítrofe comprende a aquellos tipos de la enfermedad entre la LL y la LT. La lepra limítrofe media es muy rara e inestable. Un paciente que sufra de este tipo de lepra, puede desarrollar características clínicas, bacteriológicas e histopatológicas que se asemejen a la forma de LT de la enfermedad, en este caso se afirma que se trata de un paciente con lepra limítrofe en mejoría. De manera opuesta, si las manifestaciones antes descritas se acercan más a la LL, se afirma que el paciente es un caso de lepra limítrofe que empeora, (55,109,117). Estas manifestaciones de la lepra aparecen en cerca del 50% de los pacientes, se deben a la respuesta inmunológica del huésped al bacilo (49,125) y son básicamente de dos tipos: La tipo 1 o reacción reversa, es el resultado de una reacción de hipersensibilidad retardada y afecta desde pacientes con lepra limítrofe hasta pacientes con LT. Se caracterizan por edema y eritema de las lesiones preexistentes y por la tendencia general del paciente a mejorar. Las reacciones tipo 2 o eritema nodoso leproso, se caracterizan por tener manifestaciones de hipersensibilidad tipo Arthus y se observan frecuentemente en pacientes limítrofes y con LL, quienes desarrollan una importante sensibilidad en la piel, nódulos eritematosos de la

piel y fiebre. Ambos tipos de reacción pueden involucrar a nervios periféricos, sin embargo, esto parece ser más frecuente en pacientes que sufren la reacción tipo 1. Las reacciones tipo 2 pueden desarrollarse en cualquier tejido que contenga antígeno del bacilo de la lepra; de tal forma que las lesiones del eritema nodoso leproso no están confinadas a la piel y pueden afectar a: ojo, articulaciones y a la mucosa nasal. Histológicamente las reacciones tipo 1 consisten de un edema con datos de lepra limitrofe o LT. Si el resultado de la reacción tipo 1 es la mejoría, es posible encontrar un incremento temprano del número de linfocitos en el sitio de la lesión. En las lesiones tipo 1 severas, puede llegar a ocurrir necrosis del tejido. Las reacciones tipo 2 se caracterizan por la presencia de neutrófilos y datos histopatológicos de lepra limitrofe. Por otro lado, es posible observar vasculitis de arteriolas y vénulas en cerca de la mitad de los casos, (27,55,99,117).

**Estructura de la pared celular de M. leprae.** - Los microorganismos patógenos han desarrollado características que les han otorgado ventajas para sobrevivir aún en presencia de la respuesta inmune del hospedero (36,38). Ejemplos de lo anterior pueden ser la liberación de exotoxinas o sustancias capaces de modular la respuesta inmune inducida específicamente en el huésped. Las bacterias intracelulares como M. leprae caen en la segunda categoría, pues su sobrevivencia depende del mantenimiento de un ambiente estable dentro del macrófago capaz de responder a las señales del linfocito T. Los mecanismos de cómo la micobacteria produce tal modulación de la respuesta inmune del huésped, sólo pueden conocerse si se analiza la estructura y el metabolismo del agente patógeno.

Mientras que muchos componentes celulares parecen ser únicos de M. leprae, el análisis químico de su pared celular ha demostrado que es muy compleja, debido en parte a su contenido de macromoléculas ricas en lípidos,

común a todas las micobacterias (9,14,132), así como la presencia de peptidoglicanos, sin embargo, existen algunas diferencias importantes entre ellas, especialmente el ácido mesodiaminopimélico que se encuentra unido a un tetrapéptido que permite el entrecruzamiento del peptidoglicano, a través de los residuos adyacentes del ácido o a través de los residuos del ácido y la d-alanina (8,74,103).

En el caso de M. leprae a diferencia de otras micobacterias, el tetrapéptido del peptidoglicano contiene glicina en lugar de alanina. Se piensa que dicha sustitución, pueda proveer alguna ventaja en la patogenicidad de M. leprae, por ejemplo, incrementando su resistencia a la degradación, sin embargo, es muy poco probable que la mencionada sustitución afecte las propiedades de adyuvante de la región del muramil dipéptido encontradas en todos los peptidoglicanos bacterianos, incluidos los de M. leprae (128).

Covalentemente unido al peptidoglicano se encuentra el complejo del ácido arabinogalactano-micólico, el cual constituye aproximadamente el 70 % de la masa de la pared celular y forma una región externa anfipática al peptidoglicano. Los polímeros de arabinogalactano están constituidos por arreglos lineales de D-arabinosa y D-galactosa, con apéndices de D-arabinosa extendidos

lateralmente (2,6,25). La ausencia del L-isómero más común de arabinosa en la pared micobacteriana sugiere una mayor resistencia a la degradación por enzimas del hospedero, contribuyendo así a la persistencia del material de la pared en la célula huésped aún después de la muerte de la micobacteria. Los ácidos micólicos, se encuentran esterificados a la arabinosa terminal, lo cual contribuye a la hidrofobicidad de la pared de M. leprae (3,7) en donde existen dos grupos de ácidos micólicos, los alfa y los beta micolatos, los cuales pueden ser usados con fines taxonómicos para distinguir a M. leprae de otras micobacterias (52,65,88). Mientras que los peptidoglicanos, los arabinogalactanos y los micolatos contribuyen significativamente a la

integridad estructural de la pared celular de M. leprae y otras micobacterias, parecen no jugar un papel sobresaliente como inmunógenos, en vez de ellos, otros compuestos como glicolípidos (27,65) glicopeptidolípidos (17,18), mezclas de lípidos complejos (35), y la tetrahelosa que contiene lipooligosacáridos (59,60,61) se han reportado como componentes inmunológicamente activos de la micobacteria.

El componente inmunodominante más notable es el glicolípido fenólico I (PGL-I), el cual se ha demostrado que es especie específico e inmunogénico durante la infección con M. leprae (19,133).

La estructura general del PGL-I fué establecida por Brennan (17, 62) y está constituido por una molécula de trisacárido compuesta de 3,6-dimetil-beta-D-glucosa (1-4) 2,3-dimetil-alfa-L-9 ramosa (1-2) 3 metil-alfa-L-ramosa unida a ptiocerol a través de un grupo fenólico. El azúcar terminal 3,6-dimetil-beta-D-glucosa, constituye la región más inmunodominante del trisacárido junto con el penúltimo componente 2,3-dimetil-alfa-L-ramosa completando el epítipo nativo (61). El PGL-I parece estar asociado a la parte externa de la superficie de M. leprae (14, 133) y ha sido aislado de bacterias purificadas así como de tejido infectado en concentraciones relativamente altas. Los datos en conjunto sugieren que PGL-I, puede representar la cápsula de M. leprae, lo cual puede ser un factor de virulencia clave constituyendo una interfase importante entre el hospedero y el parásito, este hecho pudiera ser crítico para el mantenimiento de la parasitosis. La inmunogenicidad de PGL-I durante la infección en humanos y otros animales ha sido firmemente establecida (41), aunque no se ha definido su papel en los diferentes estudios de la enfermedad ni existen datos comparativos con respecto a otros glucolípidos extracelulares (14).

Más recientemente Hunter y Brennan (58) aislaron y caracterizaron un grupo de lipopolisacáridos fosforilados de M. leprae que contenían arabinosa y manosa. En otros trabajos sobre la misma fracción rica en carbohidratos de

micobacterias (14) y en particular de M. leprae (11), se logró establecer la reactividad serológica del componente arabinomanana pero no su localización celular.

En un detallado estudio de Hunter y su grupo (59), se estableció que el componente serológicamente activo, lipoarabinomanana B (LAM-B) estaba acetilado y contenía fosfatidilinositol y puede estar asociado a la membrana. Se ha demostrado que LAM-B es altamente inmunogénico en la mayoría de las infecciones por micobacterias, induciendo fuertes respuestas de anticuerpos, pero debido a que LAM-B es común a todas las micobacterias no puede ser usado eficazmente para pruebas serológicas para detectar una infección temprana. Sin embargo, los datos sugieren que los altos niveles de anti LAM-B están correlacionados con altas cargas de bacterias en pacientes con lepra (78). Esto hace posible la estimación de la eficacia de la quimioterapia por medio de un monitoreo de los anticuerpos séricos anti LAM-B.

**Antígenos proteicos de M. leprae.** - La información inmunoquímica combinada con los análisis de la estructura fina de la pared celular del bacilo y de las moléculas asociadas, ha permitido conocer que la pared de la célula está esencialmente libre de proteínas y/o polipéptidos, pero debido a que éstas juegan un papel principal en los sistemas biológicos, es obvia la necesidad de encontrar el papel que juegan las proteínas de la microbacteria en la patogenia de la lepra. El principal impedimento lo constituye el hecho de que el bacilo de la Lepra no se puede cultivar en el laboratorio, por lo que la cantidad de bacilos obtenidos y por lo tanto el material proteico para su estudio es muy limitado. De hecho, antes del advenimiento de las técnicas de anticuerpos monoclonales y del ADN recombinante el estudio inmunoquímico de las proteínas de M. leprae era difícil y complejo. La mayoría del trabajo descriptivo se hizo obteniendo información mediante las técnicas como la inmunoprecipitación de proteínas y otros antígenos con antisueros

policlonales y de inmunoelectroforesis en geles de agarosa de dos dimensiones (55,70), sin embargo, la estrategia de trabajo mencionada no ha producido los resultados esperados.

Recientemente, se incluyó el uso de "sondas" de anticuerpos monoclonales para identificar y caracterizar a los antígenos del bacilo. El primer anticuerpo monoclonal reportado reconoce una proteína de 65 kD la cual parece estar asociada a la pared celular de la bacteria, mediante estudios de inhibición competitiva se han encontrado hasta 14 epítopes diferentes (22,50,51), la mayoría de ellos cruzaban y presentaban homología con proteínas de 65 kD de otras micobacterias. Se han realizado pruebas serológicas en humanos para detectar la presencia de anticuerpos contra esta proteína, encontrando que los pacientes con LL tienen concentraciones importantes de dichos anticuerpos (77).

La organización Mundial de la Salud ha descrito epítopes de reacción cruzada con otras micobacterias y epítopes especie específicos en M. leprae, utilizando 20 diferentes anticuerpos monoclonales, los epítopes mencionados parecen estar presentes en proteínas de los siguientes pesos moleculares: 12, 18, 38, 36, 55, 65, y 200 Kd (43). Sin embargo, aún no queda clara la relevancia de estas proteínas respecto a la respuesta inmune que inducen durante la infección en el humano. Parece obvio suponer que, al saber cuales son las proteínas inmunogénicas para el huésped, se podrán tener elementos que lleven a la construcción de vacunas contra la lepra, pero se requieren estudios detallados para definir la capacidad de estimulación para las células T y B de tales moléculas.

Por otro lado, a pesar de que se ha obtenido información importante acerca de la pared celular del bacilo y de las estructuras asociadas, todavía no se conoce el papel que ésta puede jugar en la expresión de su virulencia.

Por último, se requieren nuevas estrategias de estudio que permitan definir la relación entre estructura y función de tales proteínas, con el objeto de entender mejor los mecanismos de patogenicidad de M. leprae.

**Biología Molecular de M. leprae.** – Si asumimos que el tamaño del genoma de M. Leprae fue alguna vez equivalente y similar en extensión al de todas las otras micobacterias, es decir alrededor de 4.4 Mb, entonces se puede afirmar que los 3.3 Mb del genoma del bacilo de la lepra, es producto de un decaimiento genético importante (ver esquema). Ahora, si se analiza su proteoma y si todo este genoma decadente fuera activo, resultaría que M. Leprae tendría capacidad para expresar unas 3,000 proteínas, menos que en el caso de M. Tuberculosis, sin embargo debido a la presencia de múltiples pseudogenes sólo codifica 1,116 proteínas (21,30). Por otra parte, el análisis del tamaño del genoma y de la relación de las bases guanina/citocina son dos de las características importantes en las bacterias, usadas en el análisis filogenético de estos microorganismos. El análisis del ADN purificado de M. leprae en relación al contenido guanina/citocina y al tamaño del genoma indican que M. leprae también es diferente de otras especies de micobacterias (16,21,28,32,62). El contenido de la relación guanina/citocina se ha establecido en 57.79 % comparado con el 65.61 % mostrado por la mayoría de las otras micobacterias, otros datos como el número de genes que codifican proteína en porcentaje y número absoluto, pseudogenes, densidad genética, y el promedio de longitud de los genes en pares de bases así como el promedio de longitud de los genes no conocidos se muestran en la tabla anexa.

La genética y la fisiología de M. leprae que habían permanecido inexplorados hasta el desarrollo de las metodologías del ADN recombinante, revelan que existen productos génicos importantes en la micobacteria relacionados con su función, lo que ha permitido conocer mejor el



metabolismo de esta bacteria (28,30,64). Además, se han hecho algunos análisis de proteínas antigénicas (22,135), así como algunos estudios taxonómicos entre especies micobacterianas semejantes.

Lo anterior fué posible en parte cuando se logró el cultivo de M. leprae en armadillo (69), lo que permitió tener grandes cantidades de bacterias a las cuales se les puede extraer el ADN para recombinarlo, otro hecho importante fué el advenimiento de las bibliotecas genómicas manipulables en otras bacterias como E. coli, donde se logró expresar y estudiar los genes de M. leprae y sus productos proteicos, con pequeños segmentos de ADN de M. leprae que van de 4 a 20 kilobases que pueden ser manipulados de acuerdo a las necesidades experimentales. Por ejemplo, un pequeño segmento de ADN de M. leprae, localizado en un plásmido o bacteriófago puede ser acarreado por el vector hacia su transcripción y la subsecuente traducción del ARN resultante que codifica una proteína importante. Dicha proteína puede estar completa o incompleta, y es posible estudiarla de acuerdo a su naturaleza, como enzima o como antígeno relevante. Teóricamente, se podrían describir rutas metabólicas completas implicadas en el crecimiento de la bacteria y sugerir estrategias para el cultivo in vitro de M. leprae. Por otro lado, sería posible identificar sitios blanco potenciales para los agentes quimioterapéuticos con actividad contra M. leprae. Además, es posible identificar proteínas inmunogénicas relevantes para la inducción de protección en el huésped (vacunas) o en su caso proteínas implicadas en la evasión de la respuesta inmune del parásito (55).

Dentro de las rutas metabólicas que se han estudiado mediante bibliotecas genómicas de M. leprae, encontramos a la que utiliza las enzimas citrato sintetasa y la dihidroquinasa sintetasa, estudiadas en el vector cósmido pH79 y el vector plásmido pY A626 por el grupo de Clark-Curtis (28,64) éstas se han expresado tanto en E. coli como en B. subtilis, los cuales tienen el problema de ser fisiológicamente diferentes entre sí y con respecto a

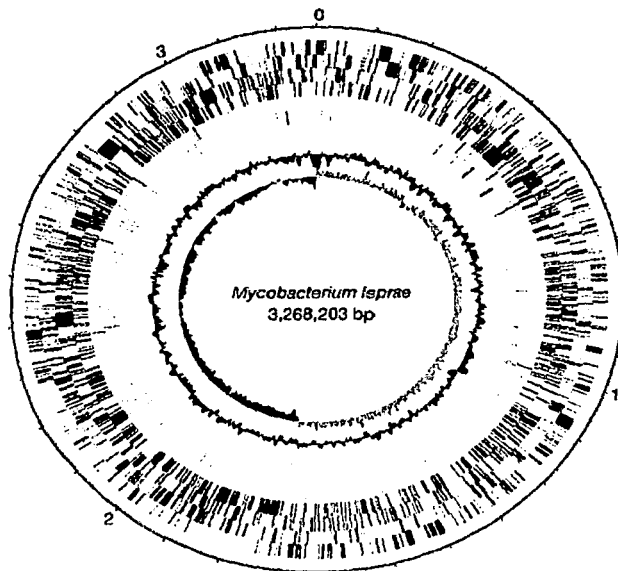
M. leprae, lo ideal sería poder cultivar a M. leprae in vitro para estudiar directamente su metabolismo.

El otro avance significativo que ha tenido la biología molecular en relación a M. leprae, ha sido la construcción de bibliotecas genómicas en el bacteriófago lambda GT1 expresado en E. coli (135). En este sistema han sido expresadas cinco proteínas de M. leprae, de tal forma que ha sido posible estudiarlas en detalle (85,94,134). Por otra parte, se han clonado segmentos de DNA del bacilo de la lepra que han dado información valiosa de los importantes antígenos de 18 y 65 kD, los cuales parecen ser buenos inmunógenos cuando se vacuna con M. leprae (94,95). La comparación de estos determinantes entre las diferentes especies de M. leprae, M. bovis, BCG y M. tuberculosis han permitido establecer los antígenos de reacción cruzada entre ellas (124).

Estudios similares realizados con clones de células T podrían dar información valiosa relacionada con el reconocimiento de ciertas regiones de los diferentes antígenos de M. leprae y otras micobacterias, las cuales pueden ser importantes en los mecanismos de protección o supresión de la respuesta inmune. Más aún, secuencias de péptidos derivadas de ADN de las bibliotecas genómicas podrían ser útiles para estudiar la relación de esos determinantes con moléculas de clase I ó II codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad en estudios de presentación del antígeno. Si se llevan a cabo estudios de este tipo se podrían elucidar los mecanismos moleculares de activación de las células T que promuevan una RIC capaz de proteger contra M. leprae (39, 55).

Por último, la aplicación de la biología molecular puede ser útil para fines taxonómicos, en donde se pueden apoyar las propuestas de subespecies patógenas con criterios moleculares, ya que hasta ahora sólo se han tomado en cuenta criterios basados en diferencias fenotípicas (30,55) por medio de las cuales se afirma que está representada solo el 20 % de la capacidad

genómica de un microorganismo, por lo que los principales genes que codifican para proteínas reveladoras de la expresión patogénica no serían detectados. En el caso de microorganismos que hasta el momento no son cultivables *in vitro* como es el caso de M. leprae, se ha realizado ya en principio un análisis detallado de los diferentes fragmentos del genoma de M. leprae (30,44,102) con el objeto de poder asociar este conocimiento con su fisiología lo cual permitirá incidir en el control de la patogenia de la lepra.



**Esquema** Mapa del Genóma circular de *M. leprae* que muestra la posición y orientación de los genes conocidos, pseudogenes y secuencias repetitivas. De afuera hacia adentro: Los círculos 1 y 2 (en el sentido de las manecillas del reloj) los genes sobre la banda - y la cadena +, respectivamente; círculos 3 y 4, pseudogenes; 5 y 6, genes específicos de *M. leprae*; 7, secuencias de repetición; 8, contenido G+C; 9, G/C bias (G+C)/(G-C). Los Genes están coloreados con un código de acuerdo a las siguientes categorías funcionales: metabolismo de lípidos (gris oscuro); metabolismo intermediario y respiración (amarillo); rutas de información (rojo); proteínas reguladoras (azul pálido); proteínas hipotéticamente conservadas (naranja); proteínas con función desconocida (verde pálido); secuencias de inserción y funciones relacionadas con fagos (rosa); ARN estable (azul oscuro); pared celular y procesos celulares (verde); Familias de proteínas PE y PPE (magenta); virulencia, dastoxificación, adaptación (café). Ver [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_leprae](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae) o <http://genolist.pasteur.fr/Leproma/> para información adicional acerca de la función de los genes. La escala en Mb este indicada (numeros sobre la parte externa del genoma).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla anexa.- Comparación de las características del genoma de *M. Leprae* y *M. Tuberculosis* (30).**

Característica	<i>M. Leprae</i>	<i>M. Tuberculosis</i>
Tamaño del genoma	3,268,208	4,411,532
G + C ( % )	57.79	65.61
Genes que codifican proteína ( % )	49.5	90.8
Genes que codifican proteína ( No )	1,604	3,959
Pseudogenes	1,116	6
Densidad genética (p de b por gene)	2,037	1,114
Promedio de la longitud de genes (p de b)	1,011	1,012
Promedio de la longitud de genes (p de b) (no conocidos)	338	653

**Respuesta Inmune a Bacterias Intracelulares.** - La Respuesta Inmune Celular (RIC) es la principal respuesta protectora en contra de bacterias intracelulares como *M. leprae*. El primero en identificarla fué Georges Mackaness en los años 1950s, haciendo experimentos con *L. monocytogenes*. La RIC consiste de dos tipos de reacciones que incluyen el control de los microorganismos fagocitados como resultado de la activación de los macrófagos por citocinas producidas por células T, particularmente Interferón gamma (IFN-gamma) (97,123) y por otro lado, la lisis de células infectadas, acción llevada a cabo por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los antígenos protéicos de las bacterias intracelulares estimulan tanto a las células T CD4<sup>+</sup> como a las células T CD8<sup>+</sup>. Se presume que las células T CD4<sup>+</sup> responden a antígenos liberados por las bacterias intracelulares que son internalizadas y presentadas por las células presentadoras del antígeno (APC), en

combinación con moléculas de clase II codificados por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Un ejemplo de lo anterior lo constituye el derivado protéico purificado (PPD) de M. tuberculosis. Los antígenos como el PPD (118,132), estimulan la producción de IFN-gamma por las células NK y de IL-12 por los macrófagos, ambas citocinas (IFN-gamma e IL-12) inducen el desarrollo de células que a su vez secretan más IFN-gamma el cual activa a los macrófagos. Dicha activación provoca la producción de formas activas de oxígeno, óxido nítrico y enzimas que matan a las bacterias fagocitadas. El IFN-gamma también estimula la producción de anticuerpos isotípicos (por ejemplo IgG2 en el ratón), que activan factores opsonizantes del complemento para hacer más eficiente la fagocitosis. Las células que secretan IFN-gamma también producen TNF, el cual induce inflamación local. La importancia de estas citocinas en la inmunidad a bacterias intracelulares ha sido demostrada en muchos modelos experimentales, de tal forma que las sustancias que inhiban la síntesis de IFN-gamma y TNF tienden a empeorar la RIC a estos agentes infecciosos. Por ejemplo, las cepas de ratones Knockout, que tienen bloqueado el gene para IFN-gamma y o el receptor para el TNF (p55), son extremadamente sensibles a las infecciones a M. tuberculosis y a L. monocytogenes respectivamente (34,81). Si la bacteria sobrevive dentro de la célula fagocítica infectada y libera sus antígenos en el citoplasma, éstos se unirán a moléculas de clase I del CMH expresados en la membrana e inducirán la activación de células CD8+ citotóxicas (CTLs) que producirán más IFN-gamma lisando al mismo tiempo a las mencionadas células fagocíticas infectadas. Estos dos efectores de la RIC: macrófagos activados y CTLs, actúan en concierto y pueden complementarse mutuamente. Además se han realizado experimentos de transferencia adoptiva de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con la bacteria L. monocytogenes a ratones normales, los cuales se someten al desafío con la bacteria para determinar qué célula

es la responsable del efecto protector inmune-específico. A partir del resultado de esos experimentos se ha concluido que ambas subpoblaciones de linfocitos T, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, son necesarias para eliminar la infección. Las células CD4<sup>+</sup> producen IFN-gamma que activa a los macrófagos que quedan listos para matar a las bacterias fagocitadas (81).

Las estrategias de algunos microorganismos para evadir esta fuerte respuesta es muy interesante: L. monocitógenes produce una proteína, la hemolisina, que permite a la bacteria escapar del fagolisosoma al citoplasma del macrófago. Ahí la bacteria queda protegida de los mecanismos bactericidas (especies de oxígeno reactivo) del lisosoma. La función de las células CD8<sup>+</sup> en este caso es matar a los macrófagos que tengan a la bacteria productora de hemolisina fuera del fagolisosoma. La activación de los macrófagos para eliminar a las bacterias intracelulares también puede causar daño al tejido propio, manifestado como la típica hipersensibilidad retardada (DTH) a los antígenos proteicos de micobacterias como el PPD mencionado anteriormente. Por otro lado, ya que las bacterias intracelulares pueden evadir el efecto bactericida del macrófago, éstas persisten por largos periodos de tiempo dentro de las células fagocíticas causando una estimulación antigénica prolongada de las células T, que a su vez activan a los macrófagos. Lo anterior puede provocar la formación de granulomas que rodean al microorganismo infectante, dando a la imagen histopatológica una característica típica de las infecciones causadas por bacterias y hongos intracelulares.

Esta reacción granulomatosa puede ser útil en la contención de los microbios, pero frecuentemente está asociada a necrosis y fibrosis del tejido causadas por las enzimas de los lisosomas del macrófago, de tal forma que la propia respuesta inmune del "huésped" es la principal causa del daño tisular en las infecciones causadas por bacterias intracelulares. El concepto de que la inmunidad protectora puede coexistir con la respuesta de hipersensibilidad

considerada como patológica queda perfectamente ejemplificado en el caso de enfermedades causadas por micobacterias, ya que ambas son manifestaciones del mismo fenómeno inmunológico.

Otra característica importante observada en las infecciones causadas por micobacterias, es la diferencia de patrones de respuesta inmune y un ejemplo típico lo constituye la lepra humana causada por *Mycobacterium leprae*, la cual tiene dos formas polares aunque algunos otros pacientes caen dentro de grupos clínicos menos claros de la enfermedad. Los pacientes que presentan la forma polar de la lepra lepromatosa (LL) presentan altos títulos de anticuerpos pero una débil RIC a antígenos de *M. leprae*. La *Mycobacteria* prolifera dentro de los macrófagos y se detectan muchos bacilos en los exámenes de especímenes obtenidos de la cola de la ceja y del lóbulo auricular. El crecimiento bacteriano y la inadecuada activación de los macrófagos producen lesiones destructivas de la piel y del tejido más profundo cercano a los huesos. En contraste, los pacientes que presentan la lepra tuberculoide (LT) la otra forma polar de la enfermedad, tienen una respuesta inmune celular relativamente "eficiente" con un título muy bajo de anticuerpos. Este perfil de inmunidad se refleja en la típica formación del granuloma alrededor de los nervios, dando lugar a la pérdida de la sensibilidad con lesiones secundarias de la piel, pero con menos destrucción tisular y con muy pocos o ningún bacilo encontrado en biopsias de ceja y lóbulo auricular (81).

Los mecanismos responsables de que la RIC no sea óptima en pacientes con LL no son del todo conocidos. Algunos estudios indican que los pacientes con la forma de LT de la enfermedad, producen altos títulos de IFN-gamma e Interleucina-2 (IL-2) en las lesiones, mientras que los pacientes con la forma de LL de la enfermedad parecen producir títulos de IL-4 e IL-10 relativamente altos.



Tanto la deficiencia de IFN-gamma así como los efectos inhibitorios del macrófagos causados por IL-4 e IL-10 pueden resultar en un debilitamiento de la RIC en enfermedades crónicas como la lepra. Es también posible que la forma de LL se deba a una anergia específica de células T a antígenos de M. leprae. Como se podría esperar, la inyección intradérmica de IFN-gamma, tiene un efecto benéfico sobre las lesiones de la piel de los pacientes con LL .

**Evasión de las bacterias intracelulares a los Mecanismos Inmunológicos.** - Un importante mecanismo de sobrevivencia de las bacterias intracelulares es la resistencia que éstas presentan a su eliminación por los macrófagos. En especial las Micobacterias son muy hábiles para inhibir la fusión fago-lisosoma, quizá por medio de la interferencia del movimiento del lisosoma (42,66). Particularmente, el glicolípido fenólico de M. leprae funciona como un degradante de formas reactivas de oxígeno. La mencionada producción de hemolisina por las especies virulentas de L. monocitogenes , le permiten escapar del fagolisosoma al citoplasma del macrófago evadiendo así, la acción mortífera de los macrófagos y pueden también inhibir la presentación del antígeno. La bacteria intracelular Legionella pneumophila que causa la llamada enfermedad de los "legionarios" inhibe también la fusión fago-lisosoma, mutantes de ella que pierden esta capacidad también pierden la virulencia. La instalación de la infección por estos organismos frecuentemente depende de los mecanismos microbicidas de los macrófagos y de la resistencia microbiana. Por otro lado, existen otros mecanismos de "evasión" de la respuesta inmune que además de los ya mencionados pueden ayudar a que el agente infeccioso "burle" la respuesta inmune (42). Recientemente se ha reportado que algunos parásitos como Plasmodium son capaces de producir proteínas codificadas por alrededor de 150 genes diferentes para evadir la respuesta inmune del huésped, debido a que se producen las mismas variantes de la misma

proteína. Un ejemplo serían las proteínas de adherencia a eritrocitos, las cuales cambian su estructura antigénica una vez que se ha montado una respuesta inmune contra ellos, haciéndose ésta totalmente ineficiente (98). En este trabajo se sugieren otros posibles mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

**Inmunología de la Lepra.** - Como se mencionó antes, la infección activa del hospedero producida por M. leprae se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones histopatológicas y clínicas así como de las respuestas inmune humoral (RIH) y celular (RIC). Los individuos con la forma de LT manifiestan una fuerte reacción de hipersensibilidad retardada a los antígenos de M. leprae, pero producen una débil respuesta de anticuerpos. Por el contrario, en la forma polar de LL existe una fuerte respuesta de anticuerpos con una progresiva disminución de la RIC que puede llegar a la anergia. Para explicar lo anterior han surgido en la literatura algunas hipótesis: La primera en tiempo está relacionada con las células T supresoras CD8 (12,79) a las cuales a pesar de demostrarse experimentalmente su función, nunca se les ha podido demostrar su existencia en términos de la descripción de su mecanismo de acción a través del aislamiento de alguna molécula ("supresina") que explique su función. Otra hipótesis se basa en la existencia de subpoblaciones de célula T cooperadoras. Desde 1985, Mossman y Cofman y otros (92,111,112) han propuesto la existencia fisiológica (al menos en ratones) de subpoblaciones de células T cooperadoras TH1 y TH2 que se regulan mutuamente. Las células TH1 se caracterizan por secretar IL-2 e IFN-gamma asociadas con la RIC, mientras que las células TH2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que participan en la respuesta inmune humoral. Las células TH2, al secretar IL-4 e IL-10 regulan negativamente la actividad de las TH1 las cuales dejan de producir las linfocinas IL-2 e IFN-gamma, lo que se traduce en una deficiente RIC.

Algunos estudios indican que las células linfoides obtenida de lesiones cutáneas de los pacientes con la forma de LT de la enfermedad, producen altos niveles de RNAm para IFN-gamma e IL-2, sugiriendo una actividad tipo TH1 (92) mientras que los pacientes con la forma de LL de la enfermedad, producen RNAm principalmente para IL-4 e IL-10, como las TH2 (131), esto apoya la idea del efecto regulador que tienen estas linfocinas en la respuesta inmune en la lepra. Sin embargo, aunque se ha descrito la presencia de RNA mensajero para IL-4 e IL-10 (131) no se han encontrado niveles significativamente elevados de estas citocinas (57). La existencia de un patrón típico de secreción de interleucinas y con esto, la división de los linfocitos en TH1 y TH2 en lepra, es controversial lo cual será analizado ampliamente en la sesión de discusión (68,83,92,93).

Por otro lado, Lechler y cols (79), propusieron la existencia de células T anergizantes con capacidad supresora en el humano, lo cual de algún modo concilia la propuesta original de la función de células T supresoras. Más recientemente, el grupo de Lechler y el de Mueller e independientemente el de Fitch (23,47,79) han obtenido células T específicamente anergizadas por medio de anticuerpos anti-CD3 o antígeno soluble, en ausencia de células presentadoras del antígeno. Al ponerse en contacto las células anergizadas con sistemas de células respondedoras para el mismo antígeno, éstas últimas dejan de responder. La explicación formulada por los autores es que: la falta de cooperación de la célula presentadora de antígeno determina que la célula respondedora deje de ser sensible al estímulo antigénico. Por otro lado, se plantea que la IL-2 producida por las células estimuladas puede ser consumida por las células T previamente anergizadas impidiendo su utilización por células respondedoras. Tanto la deficiencia de IFN-gamma y los efectos inhibitorios del macrófagos causados por IL-4 e IL-10, como una anergia específica de las célula T a M. leprae podrian resultar en un debilitamiento de la RIC en enfermedades crónicas como la lepra. Como se

podría esperar, la inyección intradérmica de IFN-gamma, tiene un efecto benéfico sobre las lesiones de la piel de los pacientes con LL .

**Antecedentes Experimentales.** - El grupo de trabajo del que formo parte ha realizado experimentos en esta área desde 1985 a la fecha. Uno de los primeros trabajos se refiere al estudio de algunos aspectos fisiológicos del linfocito T en pacientes con LL, analizando específicamente la presencia de subpoblaciones de linfocitos con receptores para el FC de IgG en pacientes con LL ya que Moretta (91) y Keller (67) habían sugerido que tales receptores sólo estaban presentes en los linfocitos T con características supresoras, lo cual no pudo sostenerse a la luz de la caracterización de marcadores de superficie, sin embargo, cabe destacar que los pacientes con LL mostraron cantidades de linfocitos T totales disminuidas, comparadas con las de individuos sanos ( $36 \% \pm 3$  vs  $54 \% \pm 2$ ), lo cual era congruente con la baja proliferación de linfocitos frente al estímulo con concanavalina A, dichos pacientes mostraron una mayor proporción de linfocitos con receptor para FC de IgG ( $15 \% \pm 3$  vs  $11 \% \pm 1$ ), (24). Precisamente una de las controversias no resueltas hasta el momento es la de la existencia de una subpoblación de linfocitos T supresores, ya que como se ha discutido antes, no ha sido posible encontrar un marcador de superficie característico o definitorio de una subpoblación de células T supresoras. Por otro lado, la existencia de dos subpoblaciones de linfocitos CD4 funcionalmente diferentes (TH1, TH2) en el modelo murino, sugeriría que bajo ciertas circunstancias su función pudiera resultar antagónica (92). Sin embargo, la existencia de estas subpoblaciones de linfocitos CD4 no ha quedado resuelta sobre todo en los humanos, no obstante que el grupo de Modlin, Bloom, Yamura y Salgame (14,12,131) y por otro lado Mossman y Coffman, (92,93) aseguran que la división de las células CD4 en TH1 y TH2 es real, basándose en el hecho de que en linfocitos obtenidos de las lesiones leprosas de pacientes con LL es posible encontrar

RNAm para IL-4 aumentado, así como en el análisis no confirmado por otros investigadores del perfil de producción de citocinas de células de pacientes con LL. Por su parte Othenhoff y Mutis (96,100) han encontrado que, líneas de linfocitos citotóxicos CD8 humanos, secretan IL-4 tal y como se plantea que ocurre con las células TH2. Uno de los objetivos secundarios de este trabajo es saber si los linfocitos de pacientes con LL secretan niveles altos de IL-4. En cuanto a la respuesta proliferativa de linfocitos T obtenidos de pacientes con LL, nuestro grupo demostró que al parecer la respuesta inespecífica a mitógenos policlonales (Con A) también se encuentra disminuida, lo que sugiere que la alteración en la respuesta inmune en dichos pacientes no es antígeno específica ya que otras poblaciones de linfocitos no relacionados son igualmente incapaces de proliferar frente a un estímulo mitogénico (63). En este mismo trabajo se encontró que la causa de la baja proliferación frente al estímulo descrito con Con A era la baja producción y/o liberación de IL-2, ya que al probar el sobrenadante de los cultivos de linfocitos T de pacientes con LL estimulados previamente con Con A, no fue posible estimular el crecimiento y proliferación de linfocitos de la línea de células CTLL-2 dependiente de IL-2 usada como bioensayo.

Lo anterior podría deberse también a la ausencia del receptor para IL-2 (rIL-2) en la superficie del linfocito T de estos pacientes. Sin embargo, se demostró que el receptor para IL-2 sí está presente, ya que al adicionar IL-2 de una fuente exógena, a linfocitos de pacientes con LL provenientes de un cultivo primario, lavados y preparados para un cultivo secundario, éstos proliferan igual que los linfocitos de sujetos sanos también provenientes de un cultivo primario (63). Lo anterior demuestra que en los linfocitos de pacientes con LL aunque la IL-2 no se produce o se libera de manera no funcional el rIL-2 sí se encuentra presente de una manera funcional. Para demostrar la presencia física del receptor de IL-2 se empleó el anticuerpo monoclonal anti TAC, gentilmente proporcionado por el Dr. Waldman (46), utilizando para ello un

ensayo de inmunofluorescencia de linfocitos T de pacientes LL usando como control linfocitos T de sujetos sanos. En este experimento prácticamente no hubo diferencia entre la población de linfocitos provenientes de sujeto LL y la población de linfocitos proveniente de sujetos normales (46). Los resultados anteriores sugieren que una terapia a base de IL-2 podría ser benéfica para restaurar la respuesta inmune en pacientes inmunodeficientes como los enfermos con LL.

Por otro lado, Mohaghepour (89,90) propuso que el problema de no proliferación de los linfocitos de pacientes con LL, no se relaciona con una baja producción de IL-2 sino con una incorrecta expresión del rIL-2 por lo tanto la adición de IL-2 de una fuente exógena no podría corregir la proliferación de los linfocitos provenientes de pacientes con LL.

Lo anterior se planteó como un impedimento estérico del receptor de células T por fracciones antigénicas de M. leprae (89), las cuales impedirían la activación del linfocito T. Sin embargo, la incubación durante 24-48 horas en medio de cultivo, permitía la liberación de la fracción antigénica del rIL-2 con lo que restablecía la capacidad de respuesta del linfocito en presencia de algún estímulo específico o inespecífico.

Por el contrario, nuestro grupo encontró que al parecer no hay interferencia del antígeno de M. leprae con el receptor de IL2 sobre la superficie del linfocito T en pacientes con LL (45).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo nos avocamos a estudiar el efecto de la estimulación de los linfocitos T del paciente con LL frente a diferentes fracciones antigénicas de M. leprae .

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de las fracciones del antígeno de M. leprae y su papel en la modificación de las señales de transducción del gene de la IL-2 ha sido apenas abordado (4,44). Otro aspecto poco estudiado es respecto a la identificación de fracciones antigénicas de M. leprae que inducen la proliferación de células linfoides de pacientes con LL ó de sus contactos y si existe o no una relación específica entre antígenos de M. leprae y la producción de citocinas características de células TH1 Y TH2. Paralelamente a lo anterior, en los últimos años ha habido un creciente interés en el análisis de proteínas secretadas o constitutivas de M. leprae , (29,49,60,118,119,125) que inducen la formación de anticuerpos en el individuo infectado y que pudieran ser un marcador específico de algunas de las diferentes fases de la enfermedad (8,17,20,24,37,39,40,75,76,82,103,108,120,121,127,129,133). Se han descrito en la literatura (15,17,53,55,76,110,116,118,120,121,127,132), una gran diversidad de antígenos obtenidos de M.leprae con diferente composición bioquímica, los cuales son reconocidos por anticuerpos o células T de pacientes con lepra o que inhiben la función de linfocitos T humanos (20,48). Uno de ellos es el glicolípido fenólico (33,88,101,119), al parecer importante en el diagnóstico de las formas multibacilares de la LL pero no de la forma paucibacilar de LT (53). Por otro lado, se han podido definir qué antígenos de M. leprae son los más frecuentemente reconocidos por anticuerpos séricos de pacientes con diferentes formas clínicas de lepra (17,26,73,76,127), lo cual podría ser útil tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de la enfermedad especialmente en aquellos casos de lepra indeterminada en los cuales la presencia de anticuerpos dirigidos contra fracciones antigénicas específicas de un estudio clínico (LL ó LT) podría predecir la evolución hacia una forma de lepra tuberculoide o lepra lepromatosa.

## **OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es caracterizar de acuerdo al método descrito por Larralde y cols., (72), marcadores serológicos que definan las siguientes condiciones: a) Paciente con LL, b) Individuos Contacto.

Posteriormente al tener una mejor idea de la relación de los marcadores de enfermedad, se determinará la respuesta inmune celular probandose esos determinantes antigénicos en cultivos de linfocitos de pacientes con LL y de sus contactos.

Finalmente se estudiará si dichas fracciones antigénicas son capaces de inducir la proliferación de células TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> en cultivo, así como la inducción de la síntesis de IL-4 en esos linfocitos estimulados con PHA.



## HIPOTESIS

Los anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes con LL están dirigidos contra determinantes antigénicos definidos de M. leprae . Dichos anticuerpos tienen una especificidad diferente a la de los anticuerpos anti M. leprae encontrados en el suero de los individuos cercanos al paciente con LL. Estas diferencias de especificidad permiten definir fracciones antigénicas del bacilo, relacionadas con el proceso de enfermedad o con la exposición al agente infeccioso.

## MATERIALES Y METODOS

**Individuos incluidos en el estudio, (suero).**- Se incluyeron en total 45 pacientes: 20 hombres y 15 mujeres de entre 20 y 65 años, del Instituto Dermatológico de Jalisco, México, diagnosticados como pacientes con LL de acuerdo a los criterios internacionalmente aceptados (109). Todos recibieron un tratamiento irregular de entre 2 y 15 años con 100 mg de dapsone por día. El suero de los pacientes con LL se colectó antes y durante el tratamiento. También se colectó suero de 19 sujetos contactos de pacientes (10 hombres y 9 mujeres de entre 20 y 50 años de edad) y del grupo control (20 sujetos clínicamente sanos), todos por punción venosa. Todos los grupos de estudio se aparearon en sexo y edad tanto como fué posible. Los sueros se dividieron en tres partes y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . hasta su uso.

**Antígenos.** - Se utilizaron extractos sónicos de M. leprae cultivado en armadillo que se prepararon de acuerdo al protocolo de Drapper publicado por TDR/IMMLEP (130). El bazo de los armadillos que habían sido infectados un año antes con un leproma humano, se pesó, homogeneizó y resuspendió en una solución amortiguadora compuesta de 9 partes de NaCl 0.15 M, 1 parte de Tris base 1 M y MgSO<sub>4</sub> 1M, adicionada de hidrocloreuro de benzamidina 1 mM en un litro de agua bidestilada. El tejido se homogeneizó con esta solución (4 ml / g de tejido) utilizando un homogenizador-politron (Sorvall Omminix). El homogenado se centrifugó a 10,000 x g durante 10 minutos, se separó el sobrenadante rico en glicolípidos específicos de M. leprae , se resuspendió el sedimento a la misma relación con la solución homogenizadora descrita y se recentrifugó. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en solución amortiguadora de lavado que consistía de HEPES 0.15 M ajustada a pH 7.2 con NaOH y adicionada de MgSO<sub>4</sub> 1

mM y 0.1 % de Tween 80 (peso/volumen). El procedimiento anterior se realizó a menos de 100°C y la exposición del homogenizado al medio no excedió de 20 min., cada vez. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en una solución amortiguadora de DNAasa que consistió de 0.1 % tween 80 preparado recientemente a partir de una solución stock concentrada 10x, que además contenía 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M y 20 ml de HEPES 0.15 M por litro, a un pH 7.2. Se utilizó una proporción de 100 ml de esta solución amortiguadora de DNAasa por cada 25 g de tejido original, adicionando la enzima hasta alcanzar una concentración de 4 unidades por ml.

Se agitó durante una hora a 20°C y se filtró a través de un filtro con un contenedor de acero inoxidable.

Posteriormente se centrifugó a 10,000 x g por 10 min, el sedimento se resuspendió en la solución amortiguadora de Tween al 30% en una solución de Percoll (v / v), se usaron 100 ml de esta solución por cada 25 g de tejido original. Se distribuyó en tubos de centrifuga de 25 ml y se centrifugó el gradiente de Percoll a 27,000 x g por una hora en un rotor de ángulo libre. Se colectó la banda correspondiente a las bacterias cerca del botón del fondo del tubo el cual se resuspendió de nuevo en solución amortiguadora de Tween, lavando por centrifugación entre 8,000 y 10,000 x g durante 10 min 3 veces. El paquete se resuspendió en el menor volumen posible de solución amortiguadora de Tween y se adicionó a un sistema de sedimentación acuosa de dos fases, el cual consistió en 7 g de Dextran (T500 Pharmacia Inc Chemicals Upsala Sweden), 4.9 g de polietilenglicol (PEG) 6000, 0.1 g de polietilenglicol-palmitato (monopalmitato de PEG) y unos 70 g de agua, permitiendo a los polímeros disolverse. Se añadieron 0.5 ml de NaCl 2M, 2 ml de KOH 0.5 M a pH 6.9. El material con las micobacterias se agitó bien y después se separaron las dos fases en un matraz de separación. Se separó la fase superior y se diluyó en igual volumen de agua con Tween 80 al 0.1%. Se colectó y se lavó el material en solución amortiguadora de Tween y el

material de la interfase y de la fase inferior se descartó. Finalmente, los bacilos purificados obtenidos se rompieron por medio de ultrasonido a 100 watts y se centrifugaron a 10,000 x g. Al sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas y se ajustó a razón de 1,000 mg/ml (80).

Para los ensayos de proliferación, se utilizaron los antígenos de 18, 28 y 65 Kda, gentilmente donados por el Dr. J.W. Rees (Clinical Research Centre, Harrow, U.K.) y que corresponden al lote CD99, preparados de acuerdo al documento del Immllep, de la Organización Mundial de la Salud: TDR/IMM-LEP-SWG [5] 80.3, p23, 1980, en algunos experimentos se usaron los antígenos electroeluidos en nuestro laboratorio.

**Corrimiento del antígeno en Geles de Poliacrilamida e Inmuno-electrotransferencia.** - Los extractos sonicados fueron fraccionados en Geles de Poliacrilamida-Dodecil sulfato de Sodio al 10% (PA-DSS) en condiciones reductoras (71), a 150 V durante 60 min., usando el equipo para minigeles (Bio-Rad Labs, Richmond, CA, USA).

La electroforesis en geles de PA-DSS constituye un método barato, reproducible y rápido para comparar, semicuantificar y caracterizar las proteínas de M. leprae. Este método permite separar los determinantes antigénicos, basado en principio en su peso molecular: la adición del DSS permite a éste unirse a lo largo de la cadena polipeptídica de tal forma que el complejo DSS-proteína reducida corre a través del gel de PA en función de su peso molecular. La relativa facilidad de elaboración de esta técnica de geles de PA-DSS así como la de transferencia de dichas proteínas (Western blot) a papel de nitrocelulosa utilizando para ello un campo eléctrico, han hecho de ellas una importante arma analítica en muchos campos de la investigación.

La tinción de los geles se realizó con Azul de Coomassie, que permite detectar hasta 0.1 mg de proteína en una sola banda, quitando el exceso de

tinción con una solución de metanol al 10 %, ácido acético glacial al 10% en agua. En algunos casos se utilizó tinción de plata a base de nitrato de plata, lo que permite reconocer hasta 2 ng de proteína.

Las proteínas fraccionadas fueron entonces transferidas a hojas de nitrocelulosa de 0.45 mm (Bio-Rad) durante toda la noche a 4 mA. Esta técnica inmunoquímica llamada inmunotinción, inmunoblotting o Western blotting ha sido usada para detectar proteínas inmobilizadas en una matriz de nitrocelulosa (126).

Para probar que la transferencia se realizó correctamente se procedió a teñir reversiblemente las hojas de nitrocelulosa por medio de la técnica de amido negro usando marcadores con peso molecular definido, se lavó en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.2, y se cortaron en tiras de 3x65 mm, se colocaron en moldes individuales de plástico y se bloquearon con 5 % de leche deslipidizada en SAF con tween 20 al 0.1 % Las tiras se incubaron durante toda la noche. A continuación se lavó 3 veces en SAF pH 7.2 y se procedió a incubar durante 1.5 horas con una dilución 1:50 de cada suero, las tiras se lavaron 10 min 3 veces, y se incubaron durante una hora con el segundo anticuerpo anti humano producido en cabra y conjugados a peroxidasa de rábano. A continuación las tiras se lavaron tres veces, y se adicionó el sustrato (diaminobenzidina), (Sigma Chem Co. St Louis MO, USA) suspendido en 10 ml de SAF, 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 70 ml de una solución de cloruro de calcio al 1 %, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir el desarrollo de color, la reacción se detuvo lavando las tiras con agua destilada y una vez secas, se fotografiaron antes de ser almacenadas. La intensidad de cada banda fué determinada por dos escrutadores diferentes y se clasificaron como altamente positivos (++) , ó ligeramente positivos (+), el peso molecular de cada banda fué calculado de acuerdo a los marcadores de peso molecular (Amersham) previamente incluidos en los geles y transferidos a las hojas de nitrocelulosa (126).

**Elución Electroforética de las Proteínas de M. leprae** - Se llenó un tubo de 160 mm con una solución de acrilamida a una altura de 20 mm por debajo de la boca y se esperó a que polimerizara. Este gel se utilizó como soporte de los geles que contienen la banda de la proteína fraccionada (18, 28, 65 kD). Se enjuagó la superficie del gel con la solución amortiguadora utilizada en la electroforesis y se precorrió (preelectroforesis) durante 3 horas aplicando una corriente de 2 mA a cada tubo. Posteriormente se enjuagaron con una solución con Tris 0.025M, Glicina 0.075M y 30 % de glicerol (v / v) a un pH de 8.8. (solución I). En la parte superior del gel de soporte se colocó el gel con la banda proteica evitando la formación de burbujas y se le agregó 0.15 ml de la solución I. El tubo se llenó con una solución de NaCl 2M (solución II) evitando la mezcla de la 2 soluciones.

Una vez preparados los tubos de esta manera se colocaron en el aparato para electroforesis lleno con la solución utilizada en la separación de las proteínas. La electroforesis se realizó con una polaridad inversa (reversa, contraria) (la cámara superior conteniendo el ánodo) y la electroforesis se realizó durante 120 minutos aplicando una corriente de 4 mA a cada tubo, tiempo durante el cual la proteína migró desde el gel que la contenía hasta la solución I. El monitoreo de este proceso se realiza utilizando proteínas marcadas con cromóforos o grupos fluorescentes como fue sugerido por Otto (101). En lo casos en los que se agregó SDS, después de la electroforesis se formó un anillo en la frontera entre las soluciones I y II, mientras que las proteínas eluidas se encontraron de igual modo en la solución I. Para mantener el pequeño volumen de la proteína eluida y para minimizar la contaminación de la proteína con NaCl, la solución II se retiró con una jeringa. Una vez retirado el gel que contenía la banda de proteína, el gel de soporte se reusó 2 o 3 veces. Finalmente se hizo la determinación cuantitativa de la proteína recuperada (101).

**Análisis de Frecuencia de Reconocimiento Antigénico.** - Para este propósito se utilizó el llamado Immunoplot (72). Este procedimiento, consiste en graficar en ejes cartesianos la frecuencia de reconocimiento de cada fracción de antígeno de M. leprae por los anticuerpos presentes en cada uno de los sueros en estudio, contra la frecuencia de reconocimiento obtenida con los sueros de los sujetos normales. Este método permite la inmediata identificación de los determinantes antigénicos que reaccionan sólo con el suero de pacientes LL (eje x), de sujetos normales (eje y), o bien, bandas reconocidas por ambos grupos de sueros (plano entre los dos ejes). Constituyen en general reactividades con antígenos de reacción cruzada. Esta metodología permite identificar fracciones antigénicas específicamente reconocidas en este caso por los individuos con LL y que además son reconocidas por mas del 50 % de la población estudiada, por otro lado, idealmente esas mismas fracciones no deberán ser reconocidas por anticuerpos del grupo de individuos sanos (controles), en tales circunstancias es posible seleccionar aquellas fracciones antigénicas directamente relacionadas con la forma lepromatosa de la enfermedad.

**Células Mononucleares y Ensayo de Proliferación.**- Las células mononucleares se obtuvieron a partir de sangre heparinizada de cada uno de los sujetos de la población a estudiar. La muestra obtenida por punción venosa se sometió a un gradiente de Ficoll-Hypaque de acuerdo a la técnica de Boyum (63) a 400x g, las células mononucleares se recuperaron y lavaron tres veces con solución salina balanceada de Hank's. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, New York, USA), suplementado con 5% de suero fetal de ternera, 2mM de glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 10 mM de HEPES,  $5 \times 10^{-5}$  mercaptoetanol y penicilina-estreptomicina 100

U/ml y 100 mg/ml respectivamente. Posteriormente la suspensión celular se distribuyó en placas de 96 pozos a razón de  $2 \times 10^{-5}$  células por pozo, utilizando triplicados para probar cada una de las siguientes condiciones: 10 µg de PHA, 1, 5 y 10 µg de cada fracción del antígeno de M. leprae, correspondientes a 18, 28 y 65 kD. Los cultivos se incubaron por triplicado con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 48 horas en el caso de PHA y cuatro días para el extracto total y cada una de las fracciones antigénicas. Los triplicados se pulsaron con 1 mCi de <sup>3</sup>H-timidina (actividad específica 6.7 Ci/m.moles; New England Nuclear, Boston Massachusetts, U.S.A) y después de 18 horas de incubación, se cosecharon las células y se midió la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en un contador para emisiones beta (Packard). Algunos de los sobrenadantes del cultivo de células estimuladas con PHA se utilizaron también para probar la presencia de IL-4.

**Determinación del Marcador CD8 y CD4 por Citofluorometría.** - Las células T de los sujetos contacto y de pacientes con LL fueron llevadas a un citofluorómetro de flujo (Coulter (R) Epics) para medir automáticamente la concentración de células con marcador CD8 y CD4 por medio de anticuerpos monoclonales murinos antiCD4 y CD8 humanos, usando un segundo anticuerpo anti IgG murino hecho en cabra, todo de la marca Coulter (R), (USA) (31).

**Determinación de IL-4.**- Se procedió a utilizar la prueba de ELISA IL-4 ELISA TEST (Genzyme, Cambridge, MA 02139 U.S.A), para determinar la producción de IL-4 humana en los cultivos de células linfoides de los pacientes con LL y de sus contactos estimulados con PHA. El inmunoensayo unido a una fase sólida emplea el principio del "sandwich". A los pozos se les adicionó 100 µl de una dilución adecuada (indicada por el fabricante) de un anticuerpo monoclonal producido en conejo, específico contra IL-4 humana,



se dejó incubar toda la noche a 4<sup>0</sup>C y al día siguiente se lavó tres veces con una solución salina a base de fosfatos con surfactante Tween 20 a pH 6.75 y se adicionaron 100 µl de estándares de IL-4 para la construcción de la curva estándar (desde 3 ng hasta 0.045 ng), los sobrenadantes o los sueros se probaron por duplicado, incubando durante 2 horas. Se aspiró el sobrenadante y se lavó cuatro veces con la solución de lavado a temperatura ambiente, los pozos se sacudieron para eliminar el exceso de líquido y se les añadieron 100 µl de la dilución del segundo anticuerpo cabra (anti-inmunoglobulina de conejo hecho en cabra) incubando a temperatura ambiente durante 45 min. Se aspiró el líquido y los pozos se lavaron cuatro veces como se indicó anteriormente y se agregaron 100 µl de una dilución de estreptavidina-peroxidasa dejando incubar 40 min, a continuación se descartó el sobrenadante y se lavó cuatro veces. Por último, se adicionaron 100ml de una dilución del sustrato OPD-peroxidasa incubando durante 5 a 10 min hasta observar el desarrollo de color. Cuando el color era evidente en todos los pozos la reacción se paró con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Posteriormente se procedió a realizar las lecturas en un lector de ELISA a una longitud de onda de 492 nm, construyendo la curva de referencia (57).

## RESULTADOS

**Inmuno-Electro-Transferencias (Western blots).** - En la Figura 1 se pueden apreciar ejemplos de la reactividad de anticuerpos de la clase IgG e IgM presentes en el suero de pacientes con LL, de sus contactos y de sujetos normales (controles) frente a antígenos de *M. leprae*. Ahí podemos observar que el suero de los pacientes reconoció 15 determinantes antigénicos, cuyos pesos moleculares oscilaban entre 97 y 14 kD. El suero de los sujetos contactos reconoció 12 diferentes bandas con pesos moleculares en el mismo intervalo que los observados en el grupo de pacientes (97-14 kD), finalmente los sueros de sujetos normales reconocieron 7 bandas. En todos los casos se muestra a la izquierda de la figura marcadores de peso molecular.

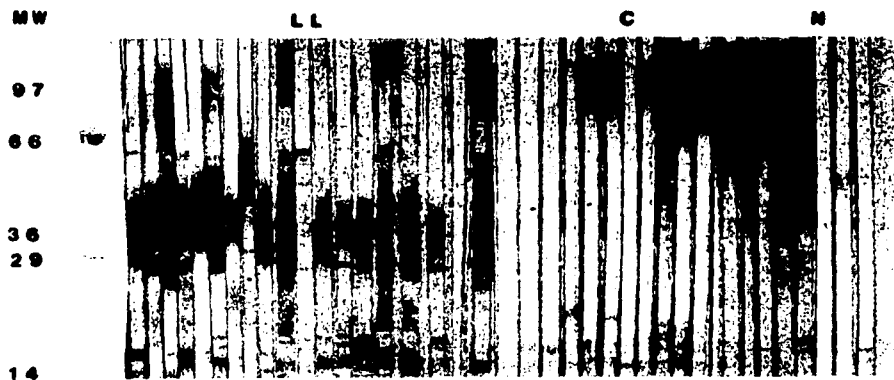


FIGURA 1. Ejemplos ilustrativos de las inmunolectrotransferencias (western blots) utilizando sueros de pacientes con Lepra lepromatosa, sus contactos y sujetos normales que reaccionaron con los extractos sónicos de *M. leprae*.

**Análisis de frecuencia de reconocimiento antigénico (Immunoblots).-**

La Figura 2 muestra el análisis de frecuencias del reconocimiento los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes LL de dos proteínas: una de aproximadamente 28 kD en valores del 63% ( $f = 0.63$ ), y otra de aproximadamente 65 kD a una frecuencia del 68% ( $f = 0.68$ ), comparadas con el reconocimiento de los anticuerpos de los sueros de sujetos normales, que no las reconocieron. También hubo algunos determinantes de *M. leprae*, que fueron frecuentemente reconocidos por ambos grupos de sueros (sobre el plano entre los dos ejes) (Figura 2A). En la figura 2B podemos observar la inmunográfica de frecuencias obtenidas del análisis de los Western blots realizados con el suero de sujetos contactos (eje x) y con el suero de sujetos normales (eje y). Aquí se puede apreciar que el suero de los sujetos contactos reconocieron una proteína de aproximadamente 16-18 kD a una frecuencia de 57% ( $f = 0.57$ ), mientras que los sueros de sujetos normales, la reconocieron también frecuentemente ( $f = 0.65$ ), por lo que parece ser un antígeno de reacción cruzada. Aparentemente las fracciones antigénicas de aproximadamente 28 y 65 kD, parecen ser suficientemente reconocidas solo por anticuerpos de individuos enfermos (LL) por lo que se pueden considerar marcadores de la condición LL. Por otro lado, las bandas de aproximadamente 16-18 kD podrían estar relacionadas con el contacto frecuente con individuos enfermos, lo cual será discutido en la sección correspondiente.

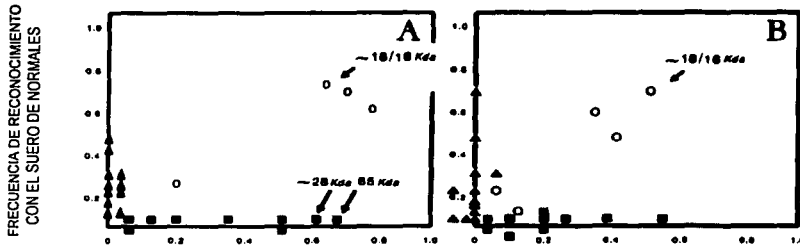


FIGURA 2. Inmunoblots: En A se puede observar, la gráfica de valores de frecuencia de reconocimiento antigénico en pacientes LL versus los valores obtenidos en los sujetos normales y en B se pueden observar la gráfica de valores de frecuencia de reconocimiento antigénico obtenido en los sujetos contactos versus los valores obtenidos en los sujetos normales de acuerdo a su reacción con antígenos de *M. leprae*. En A, podemos observar los antígenos de aproximadamente 28 y 65 kD que fueron frecuentemente reconocidos como marcadores de la condición LL. En B, se muestra al determinante de aproximadamente 16-18 kD frecuentemente reconocido por sujetos normales y contacto.

**Ensayo de proliferación con las fracciones de *M. leprae*.** - En las Tablas 1, 2, Figura 3A, 3B, y Cuadro 1, se pueden observar los resultados de las incubaciones, con PHA, extracto total y cada una de las fracciones antigénicas importantes en el Western blot (18, 28, y 65 kD), de las células provenientes de 24 de los sujetos LL y de 20 de sus contactos:

Cuando las células de los sujetos contactos se incubaron con PHA, presentaron un promedio de  $26,624 \pm 2929$  cpm y  $1072 \pm 281$  cpm cuando se incubaron con medio de cultivo, con un índice de estimulación de 24.8, mientras que cuando las células de los sujetos LL se estimularon con PHA, mostraron  $16,479 \pm 2775$  cpm en promedio, y  $1142 \pm 195$  cpm, cuando dichas células se incubaron con medio de cultivo, en este caso el índice de estimulación fué de 14.4 (Tablas 1 y 2, Figura 3B).

Cuando las células de los sujetos contactos fueron estimuladas con el extracto sonicado total de M. leprae, presentaron en promedio  $3311 \pm 661$  cpm ( $1871 \pm 281$  cpm del medio de cultivo), con un índice de estimulación de 1.76 (Tabla 1, Fig 3B). Aquí, cabe resaltar que 3 de 12 sujetos contactos tuvieron índices mayores o iguales a 2 (Cuadro 1). Sin embargo cuando las células de los sujetos LL se incubaron con el mismo extracto total presentaron una incorporación 3HTdR de  $1,921 \pm 598$  cpm (vs  $1,707 \pm 347$  cpm del control, con un índice de estimulación de 1.12 (Tabla 2), siendo que ningún paciente LL respondió con índices mayores o iguales que 2 al extracto (Cuadro 1).

Cuando las células de los sujetos contactos fueron incubadas con la fracción de 18 kD de M. leprae, estas mostraron ahora, menos incorporación de timidina marcada con tritio de  $2,061 \pm 445$  cpm vs  $1,871 \pm 285$  cpm del medio de cultivo, con un índice de 1.10 (Tabla 1). Aquí 5 de 18 sujetos contacto respondieron con índices mayores o iguales que 2 (Cuadro 1). Cuando las células provenientes de los sujetos LL se incubaron con la fracción de 18 kD, éstas mostraron una proliferación de  $1,940 \pm 943$  cpm vs  $1,707 \pm 347$  cpm), con índice de 1.13, con solo un paciente LL con índice mayor que 2 (Tabla 2, Cuadro 1). Sin embargo, en el caso de la fracción de 28 kD de M. leprae se encontró una incorporación de timidina tritiada de las células de sujetos contactos indicada en cpms de  $1829 \pm 338$  cpm contra las  $1,871 \pm 285$  cpm cuando fueron incubadas sólo con medio de cultivo, con un índice de 0.97 (Tabla 1. Solo 3 sujetos de 18, respondieron a este antígeno con índice superior a 2 (Cuadro 1).

Cuando las células de los sujetos LL se incubaron con esa fracción de 28 kD, mostraron  $1,903 \pm 904$  cpm contra las  $1,707 \pm 347$  cpm referidas del medio solo, con un índice de 1.11, solo el paciente #20 respondió al estímulo con un índice mayor que 2 (Tabla 2, Cuadro 1).

Por último, cuando las células de los sujetos contactos fueron puestas en presencia de la fracción de 65 kD, mostraron  $1801 \pm 378$  cpm ( $1,871 \pm 285$  cpm obtenidos en el control de células cultivadas sin antígeno), con un índice de 0.96, con 3 sujetos de 17 con I.E. mayores de 2 (Tabla 1, Cuadro 1).

En el caso de las células de pacientes LL, éstas no se estimularon: con el determinante de 65 kD ( $1,666 \pm 674$  cpm vs  $1,707 \pm 347$  cpm, con un índice de 0.97), excepto el mismo referido paciente #20 (Tabla 2, Cuadro 1).

Además los resultados anteriores en conjunto, se pueden apreciar en la Figura 3B.

**TABLA 1.- ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y DETERMINACIÓN DE MARCADORES CD4 Y CD8 DE LAS CÉLULAS DE SUJETOS CONTACTOS DE LOS PACIENTES LL CON EL EXTRACTO TOTAL Y LAS FRACCIONES 18,28 Y 65 kD de *M. leprae*.**

C	M3	M5	PHA	ET	18 kD	28kD	65kD	18CD4	18CD8	28CD4	28CD8	65CD4	65CD8
1	105	230	9,096 (87)	572(2.5)	217 (0.9)	270(1.2)	269(1.2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	221	1,625	35,381(160)	1,673(1)	302(0.2)	4,371(2.8)	5,015(3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	785	3,143	25,291(32)	4,810(1.5)	1,093(0.3)	1,079(0.3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	1,131	5,253	38,654(34)	8,119(1.5)	1,617(0.3)	2,554(0.5)	3,801(0.7)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	869	3,702	21,612(24)	5,754(1.8)	4,130(1.1)	3,951(1.0)	2,124(0.5)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	525	2,407	18,391(35)	4,748(2)	4,706(2)	331(0.1)	5,148(2.1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	662	991	56,028(85)	581(0.6)	2,481	5,200	592(0.8)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	488	1,246	19,877(41)	2,549(2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	343	2,403	22,743(66)	4,157(1.7)	1,047(0.4)	1,915(0.8)	1,695(0.7)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	1,467	2,415	53,311(36)	2,198(0.9)	821(0.3)	1,520(0.8)	764(0.3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	1,663	2,690	24,016(14)	3,314(1.2)	1,990(0.7)	2,090(0.8)	1,994(0.7)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	1,420	ND	1,261(0.9)	1,251(0.9)	1,501(1)	1,580(1.1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	3,121	1,378	29,950(9.8)	ND	1,074(0.8)	283 (0.2)	239 (0.2)	50	25	53	22	44	21
14	393	869	21,975(56)	ND	768 (0.9)	734 (0.8)	862 (1)	47	14	45	24	44	21
15	4,854	201	23,720(5)	ND	528 (2.6)	213 (1)	416 (2.1)	53	20	50	20	58	19
16	310	1,580	13,624(44)	ND	1,688 (1)	1,574 (1)	949 (0.8)	61	15	56	17	49	17
17	1,354	ND	5,453(4)	ND	ND	ND	ND	55	19	45	15	47	26
18	1,498	1,466	24,334(18)	ND	1,464 (1)	1,801(1.2)	1,430 (1)	27	29	47	25	49	26
19	455	1,888	26,569(58)	ND	7,937(4.3)	2,187(1.2)	2,927(1.6)	47	12	42	19	30	21
20	411	643	14,672(35)	ND	1,362(2.1)	1,367(2.1)	813(1.3)	50	33	59	21	50	19
X	1,080	1,871	26,624 (8)	3,311 (1.7)	2,061 (2.1)	1,829 (0.97)	1,801 (0.86)	49	20	49	20	46	24

M3.- Células en medio de cultivo 3 días

M5.- Células en medio de cultivo 5 días

PHA.- Fitohemaglutinina (10 ug / ml)

 ET.- Extracto Total de *M. leprae*

 18, 28, 65 kD.- Antígenos fraccionados de *M. leprae*

(resultados en c.c.p.m)

(Índices de Estimulación entre paréntesis)

CD4, CD8.- Marcadores de superficie

(resultados en % de células positivas)

ND.- No Determinada

TABLA 2.- ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y DETERMINACIÓN DE MARCADORES CD4 Y CD8 DE LAS CÉLULAS DE SUJETOS CON LEPROMATOSA (LL) CON EL EXTRACTO TOTAL Y LAS FRACCIONES 18,28 Y 65 kD de *M. leprae*.

LL	M3	M5	PHA	ET	18kD	28kD	65kD	18CD4	18CD8	28CD4	28CD8	65CD4	65CD8
1	887	ND	12,837(1.3)	838(0.8)	ND	ND	131(0.1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	1157	2557	33,154(29)	969(0.4)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	292	325	10,847(37)	373(1)	464(1.4)	253(0.8)	259(0.8)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	413	4002	443(1)	762(0.2)	389(0.1)	839(0.2)	2,586(0.8)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	1357	420	3,241(2)	204(0.5)	185(0.4)	291(0.7)	373(1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1312	1058	30,363(23)	1,422(1.3)	ND	ND	1,113(1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	1068	6060	5,258(5)	6,467(1)	1,230(0.2)	1087(0.2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	1549	3036	11,047(7)	2,512(0.8)	2,383(0.8)	2,296(0.8)	2,246(0.7)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	3063	ND	2,349(0.5)	1,399(0.5)	1,443(0.5)	1,401(0.5)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	2590	ND	3,314(1.2)	1,990(0.7)	2,090(0.8)	184(0.7)	31	22	34	38	34	38
11	927	853	7,994(8.8)	ND	943(1)	889(0.8)	720(0.84)	30	13	44	12	49	12
12	896	1027	4,627(5)	ND	826(0.8)	785(0.78)	1245(1.12)	30	13	44	12	49	12
13	2418	417	18,562(7.7)	ND	372(0.9)	409(0.98)	429(1)	33	22	42	20	30	22
14	287	347	18,531(6.4)	ND	351(1)	538(1.6)	475(1.4)	56	13	52	13	48	16
15	481	240	11,611(23)	ND	240(1)	190(0.8)	201(0.8)	27	24	29	28	28	23
16	1562	1814	25,059(1.6)	ND	2088(1.3)	1,364(0.8)	2,038(1.3)	46	19	47	23	48	14
17	2948	1066	40174(13.6)	ND	845(0.8)	990(0.9)	853(0.8)	73	38	ND	26	72	52
18	306	1423	2,626(87)	ND	1157(0.8)	1902(1.3)	1178(0.8)	50	19	48	21	45	22
19	3772	921	1,826(9)	ND	1313(1.4)	1035(1)	1064(1.2)	71	48	71	53	70	50
20	356	1423	16,897(47)	ND	16,815(12)	16,156(11)	13,414(9)	83	12	64	11	53	10
21	1588	ND	49,917(31)	ND	ND	ND	793(0.5)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	575	ND	6054(12)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41	36
23	418	ND	5071(12)	ND	ND	ND	ND	50	37	ND	ND	35	44
24	515	ND	6,150(12)	ND	ND	ND	ND	33	54	ND	ND	61	39
X	1142	1707	16,447(14.4)	182(1.12)	1940(1.13)	1803(1.11)	1666(1)	46	24	47	23	47	28

M3.- Células en medio de cultivo 3 días

M5.- Células en medio de cultivo 5 días

PHA.- Fitohemaglutinina (10 ug / ml)

ET.- Extracto Total de *M. leprae*

18, 28, 65 kD.- Antígenos fraccionados de *M. leprae*.

(resultados en .cp.m),

(Índices de Estimulación entre paréntesis)

CD4, CD8.- Marcadores de superficie

(resultados en % de células positivas)

ND.- No Determinada



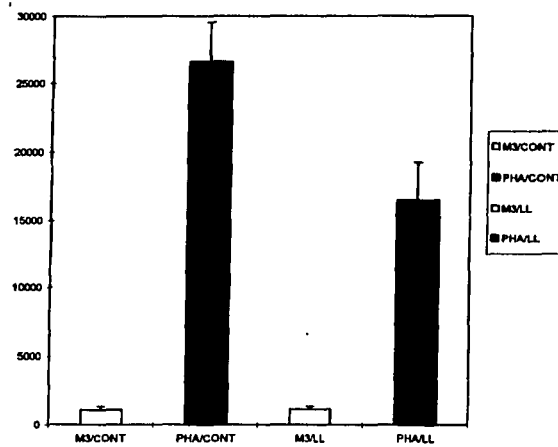


Figura 3.A.- Ensayo de proliferación de células de sujetos contacto y LL estimulados con PHA.

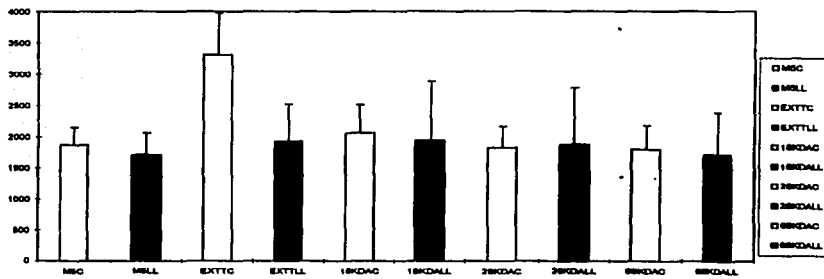


Figura 3.B.- Ensayo de proliferación de células de sujetos contacto y LL estimulados con el extracto total y las fracciones de 18, 28 y 65 KDa de M. leprae.

<b>CONTACTOS</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	19
<b>EXTRACTO TOTAL</b>	X					X		X				N	N	N	N	N	N	N
18 Kda						X	X	N						X			X	X
28 Kda		X					X	N										X
65 Kda		X	N			X		N						X				

<b>LL</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>EXTRACTO TOTAL</b>											N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18 Kda	N	N				N														X	N
28 Kda	N	N				N														X	N
65 Kda		N					N													X	

- = Índice de estimulación > 2 (Respondedor)
- = Índice de estimulación < 2 (No Respondedor)
- N = No Realizados

**CUADRO 1.-** Respuesta Individual proliferativa de linfocitos de sangre periférica de sujetos CONTACTOS Y LL al EXTRACTO TOTAL y las fracciones antigénicas de M.leprae de 18, 28 y 65 Kda.

**Citofluorometría.**- De manera análoga, en la Tabla 1, 2 , Figura 4, y Cuadro 2, se pueden observar los resultados de la proporción de los marcadores CD4+ y CD8+ determinadas por citofluorometría de las células de 8 sujetos contacto y 14 sujetos LL, expuestas a los determinantes antigénicos de M. leprae de 18, 28 y 65 kD.

Podemos observar que, cuando una alicuota de las células referidas de sujetos contacto incubadas con el antígeno de 18 kD, tuvieron una expresión promedio de 49% de células que expresan el marcador CD4+, considerado normal. Cuando se midió el marcador CD8+, sobre la membrana de estas células, estas tuvieron una proporción de 20%, el cociente de estas dos cifras (49%, 20%), dió 2.45, lo cual es considerado normal, en virtud de que se ha observado que las células de sujetos normales presenta una proporción de dos entre las células CD4+ y CD8+ (Tabla 1). En el Cuadro 2 se puede ver que 6 de 8 contactos tuvieron índices mayores o iguales que 2. Cuando las células de estos sujetos contactos se expusieron en el cultivo al antígeno de 28 kD, éstas mostraron una proporción promedio de 49% de células CD4+ y cuando se midió el marcador CD8+, éstas mostraron un porcentaje de 20 (Tabla 1), sin embargo todos los individuos de esta categoría tuvieron cocientes CD4+/CD8+ mayores o iguales que 2 (Cuadro 2). En el caso de las células en cultivo de sujetos contactos, expuestas al antígeno de M. leprae correspondiente a 65 kD, estas presentaron una proporción de 46% de células T CD4+ y cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales para detectar el marcador CD8+ estas exhibieron 24% de sus células positivas (Tabla 1), aquí 6 de los 8 sujetos contactos presentaron índice mayor o igual que 2 (Cuadro 2). Además el sujeto contacto número 19 mostró una proporción de células CD4+ de solo 30%. contra 21 % de CD8+ con una relación de 1.5 (Tabla 1).

En el caso de las células en cultivo de sujetos LL expuestas al antígeno de 18 kD, éstas presentaron una proporción de 45% de células CD4+ y de 24% cuando se midió el marcador CD8+, siendo la relación de 1.8 (Tabla 2), con 8 de 13 sujetos LL que tuvieron una relación igual o mayor que dos entre estas dos subpoblaciones de células T (Cuadro 2). Cabe destacar que aunque en el promedio no se detecta mayor alteración de estas cifras, en realidad hay tres pacientes (17, 19 y 20), que presentan una desproporcionada alta cantidad de células CD4+, lo cual podría indicar la habilidad de este antígeno de inducir el marcador referido de células T cooperadoras, sin embargo otro de los pacientes (el número 24), presenta una desproporción de estas células CD4+ a favor de las CD8+ (33vs54%). También destaca el sujeto LL número 15 con 27% de células CD4+, que en su relación con la proporción de células que expresan el marcador CD8+ (24%), este sujeto presentó un cociente menor que uno (0.93)

Cuando el antígeno de M. leprae, utilizado fué el de 28 kD, las células de los sujetos LL presentaron en promedio 47% de células CD4+ contra 23% de células CD8+ (Tabla 2), de nuevo, aunque en promedio se podría considerar normal, aquí 7 de 10 sujetos LL (cuadro 2), tuvieron una relación mayor o igual que dos. El cociente de dos mostrado, en promedio, en realidad encubre relaciones desproporcionadas entre las dos subpoblaciones de células T CD4 y CD8, dejando para la discusión el comentario particular de los resultados de los pacientes LL números: 10, 11, 12, 14, 15, 19 y 20.

Por último, cuando el antígeno de 65 kD fué utilizado, de nuevo el promedio de células CD4+ de los pacientes LL, fue de 47% y el CD8+ fué de 27.8%, lo cual dió una relación de 1.7 entre ambas, aquí 6 de 14 individuos contacto tuvieron relación CD4+/CD8+ mayor o igual que dos. Otra vez, los pacientes referidos arriba tuvieron desproporciones considerables (Tabla 2, Cuadro 2).

LL	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
18 CD4/CD8		X	X		X		X	X	X		X	N	N	X	
28 CD4/CD8		X	X	X	X		X	N	X		X	N	N	N	N
65 CD4/CD8		X	X		X		X		X		X				

CONTACTOS	13	14	15	16	17	18	19	20
18 CD4/CD8	X	X	X	X	X		X	
28 CD4/CD8	X	X	X	X	X	X	X	X
65 CD4/CD8	X	X	X	X	X			X

- X = Índice CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> > 2  
 = Índice CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> < 2  
 N = No Realizados

**CUADRO 2.-** Relación de la respuesta individual de la proporción de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de sujetos CONTACTOS después de cultivarse con los determinantes antigénicos de 18, 28 y 65 Kda de M. leprae.

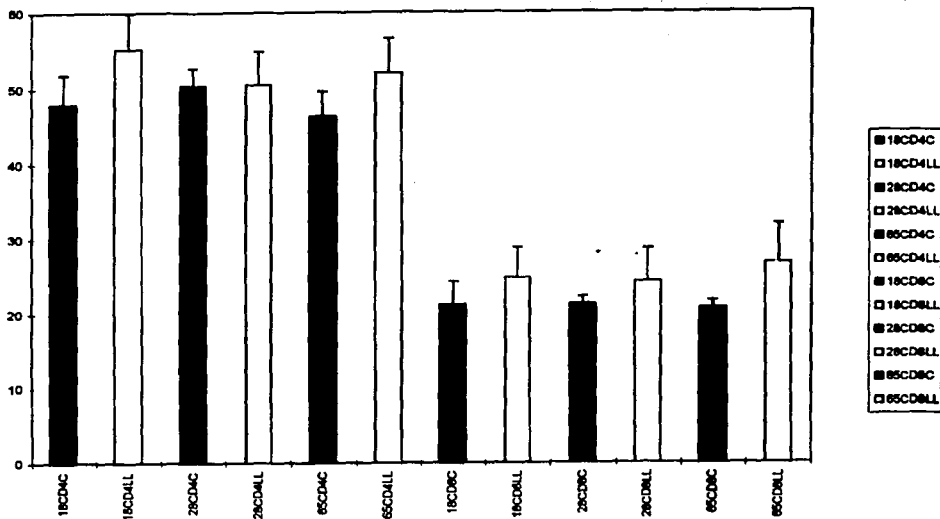


Figura 4.- Proporción de células T CD4+ y CD8+ de sujetos contacto y LL medidas por citofluorometría, después de cultivarse con los determinantes antigénicos de 18, 28 y 65 KDa de *M. leprae*.

**Determinación de IL-4.**- En la Tabla 3 se muestra la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de seis cultivos de linfocitos de seis sujetos normales no estimulados (medio de cultivo) en donde se observa que tales sobrenadantes contenían un promedio de  $0.162 \pm 0.092$  ng/ml de esta linfocina.

Cuando esos linfocitos de sujetos normales se estimularon con PHA el promedio de la concentración de IL-4 en los seis cultivos fué ahora  $0.233 \pm 0.113$  ng/ml. Por otro lado la concentración de IL-4 de los sobrenadantes no estimulados de cuatro cultivos de cuatro sujetos contacto fué de  $0.271 \pm 0.023$  ng/ml. Cuando los cultivos de los mismos sujetos contacto fueron estimulados con PHA ahora se observaron  $0.299 \pm 0.039$  ng/ml. Por último, cuando se evaluarón los sobrenadantes de 8 cultivos no estimulados de 8 pacientes LL éstos contenían un promedio de  $0.233 \pm 0.080$  ng/ml de IL-4, mientras que cuando esos mismos cultivos fueron puestos en contacto con PHA ahora el promedio fué  $0.294 \pm 0.140$  ng/ml (Tabla 3).

**TABLA 3.- Concentración de Interleucina 4 (IL-4 en ng/ml) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de pacientes con Lepra Lepromatosa (LL), contactos y sujetos normaes**

<b>NORMALES</b>		<b>CONTACTOS</b>		<b>PACIENTES LL</b>	
MEDIO	PHA	MEDIO	PHA	MEDIO	PHA
ng / ml	ng / ml	ng / ml	ng / ml	ng / ml	ng / ml
0.045	0.045	0.265	0.248	0.045	0.060
0.045	0.223	0.274	0.291	0.217	0.233
0.203	0.398	0.302	0.341	0.223	0.569
0.198	0.234	0.245	0.316	0.254	0.256
0.231	0.231		0.299	0.282	0.274
0.257	0.257			0.234	0.307
				0.285	0.327
				0.285	0.327
				0.324	0.316
					0.294
<b>X</b> 0.162 +- 0.092	0.233 +- 0.113	0.271+- 0.023	0.299+- 0.039	0.233+- 0.080	0.294+- 0.140

Por otro lado, cuando se valoró la concentración de IL-4 en el suero de los pacientes LL comparado con la concentración de IL-4 de sujetos normales, los pacientes LL mostraron un promedio de 0.239 ng/ml y los individuos normales 0.294 ng/ml (Tabla 4).

**TABLA 4.- Concentración de Interleucina 4 (IL-4 en ng/ml) en el suero de pacientes con Lepra Lepromatosa (LL) y sujetos normales**

<b>NORMALES</b>	<b>PACIENTES LL</b>
ng / ml	ng / ml
0.279	0.302
0.313	0.361
0.279	0.310
0.279	0.192
0.324	0.195
0.286	0.369
0.298	0.220
0.261	0.147
<b>X 0.294±0.02</b>	0.220
	0.147
	0.220
	0.150
	0.223
	0.167
	0.178
	0.183
	0.378
	<b>X 0.239±0.08</b>



## DISCUSION

La inspección de bandas reconocidas por anticuerpos de pacientes con LL, sus contactos y sujetos normales en los Western blots no es una tarea fácil. El uso del llamado "Inmunoplot" propuesto por Larralde (72), ha permitido ordenar los resultados de las inmunoelctrotransferencias de tal manera que mezclas complejas de antígenos de las micobacterias causantes de la enfermedad pueden ser inmediatamente categorizadas de una manera cuantitativa y específica. Este método constituye una útil y potente arma para discriminar bandas que poseen información notable. De acuerdo a lo anterior, las dos proteínas reconocidas específicamente por los anticuerpos de los sueros de pacientes LL, de aproximadamente 65 y 28 kD pueden ser consideradas marcadores de las condición de enfermedad. Con éstos determinantes antigénicos de M. leprae, se puede desarrollar una prueba serológica como el ELISA, fácil de hacer en el laboratorio, con el objeto de predecir si un sujeto contacto se está moviendo al estado patológico (LL) antes de su detección clínica, lo cual es un aporte concreto de este trabajo. Por otro lado, es necesario saber con certeza si la proteína de 16-18 kD (104,127), reconocida frecuentemente por los tres grupos (normales, contactos y LL) pudiera ser una proteína relacionada con la inducción de células CD4<sup>+</sup> y contribuir en la inmunidad protectora. . En este sentido, Dockrell (40) ha reportado que una proteína de, 18 kD de M. leprae induce la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>. Para explorar lo anterior, se hicieron cultivos con los determinantes arriba mencionados con células de sujetos contactos y con células de pacientes LL,

ahí se pudo observar (Tablas 1 y 2, Fig 3A, 3B y Cuadro 1), que el grado de reconocimiento y respuesta de las células de sujetos contactos a PHA, al extracto total y los antígenos de 18, 28 y 65 kD de M. leprae es mayor que en el caso de las células provenientes de los sujetos LL. Al analizar los resultados en promedio resulta claro que las células de estos sujetos contactos de manera visible y significativa responden mejor que las células anérgicas de los sujetos LL. En cuanto a la respuesta al extracto total y a las diferentes fracciones antigénicas de M. leprae no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Figura 3B). Sin embargo cabe mencionar que cuando se analizó la reactividad individual a los mencionados antígenos, un mayor número de individuos contactos (5 de los 19), fueron capaces de acuerdo a Dockrell (40) de responder a estos, especialmente a la fracción de 18 kD, mientras solamente uno de los pacientes LL, respondió (Cuadro 1)

Por otra parte, es importante hacer notar que, la incapacidad de los linfocitos de los paciente LL de responder a los antígenos de M. leprae no solo se presenta cuando el estímulo a las células T es hecho con antígenos específicos, sino que también es notable la incapacidad para responder de los linfocitos T de los pacientes LL frente a estímulos mitogénicos policlonales por lo que lo afirmado tradicionalmente en el sentido de que la Lepra es una enfermedad que cursa con inmunodeficiencia solo a los antígenos de M. leprae, puede no ser del todo cierto y la inmunodeficiencia observada en dichos pacientes pudiera ser más generalizada. Lo anterior se apoya además en los resultados mostrados en este trabajo (fig 3A) y además en estudios no mostrados y aún no publicados de datos obtenidos de los expedientes del Instituto Dermatológico de Jalisco en los cuales se puede constatar que los pacientes LL pueden presentar otras infecciones que comprometen la RIC, tales como tuberculosis e histoplasmosis.

Por otro lado es interesante resaltar que en los resultados de este trabajo, no existe correlación entre la respuesta de anticuerpos a los diferentes antígenos

y la respuesta proliferativa a ellos, ya que mientras los anticuerpos de los pacientes con LL, reconocieron frecuentemente las bandas de 28 y 65 Kda, no mostraron una respuesta proliferativa a ellas, por el contrario algunos individuos contactos dieron una respuesta proliferativa a estos antígenos sin que mostraran anticuerpos específicos contra ellos. esto podría deberse a que los anticuerpos y las células respondedoras en los ensayos de proliferación, reconocen epítopes diferentes en dichos segmentos antigénicos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mendez-Samperio y cols (87).

Por otra parte, en nuestro trabajo, al medir por citofluorometría la proporción de células con marcador CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> se encontró que solamente 2 de 8 individuos contacto (el # 18 y el # 20 del cuadro 2) presentaron alteraciones en la relación éstas dos subpoblaciones, en contraste a lo observado en el grupo de enfermos LL (cuadro 2), aproximadamente el 50 % de estos individuos, mostraron alteraciones. Sin embargo estas alteraciones fueron muy heterogeneas, ya que en algunos casos parecen deberse a un aumento en la cantidad de células CD8<sup>+</sup> y en otros a una disminución en el número de células CD4<sup>+</sup>, lo cual sugiere que la anergia observada en el grupo de pacientes, podría deberse a una desproporción de la relación de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> que al solo aumento de la población CD8<sup>+</sup>, como ha sido sugerido por otros autores (12, 13, 100).

En el caso del paciente #20 (Tabla 2), se puede observar de manera interesante que respone de con un I.E de 12 para el determinante de 18 kD, un I.E. de 11 para el antígeno de 28 kD y un I.E. de 9 para el determinante de M. leprae de 65 kD. Sin embargo, ese mismo paciente presenta una relación de marcadores CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de 5.25, 5.8 y 5.3, respectivamente, para los antígenos de 18, 28 y 65 kD, lo que hace pensar que el determinante de 18, pero también el de 28 y 65 kD están induciendo un número de células CD4<sup>+</sup>, que pueden influir en un mejor estado clínico de ese paciente. En trabajos

posteriores se estudiará si esto se confirma, asimismo se aislarán estas células para obtener líneas que permitan estudiar la posible relación entre los diferentes determinantes antígenicos y el tipo de subpoblación de células estimuladas. Con los datos encontrados en este trabajo se puede concluir que la gama de respuestas del grupo de sujetos estudiados es muy heterogénea y que corresponde hacer un análisis caso por caso, debiéndose en el futuro hacer un análisis, entre el hallazgo inmunológico y el estado clínico. Otra posibilidad es que la anergia observada en los pacientes lepromatosos, pueda ser causada por diferentes mecanismos, como los propuestos por Bloom (12, 13) o aún por Lombardi (79).

En el sentido arriba mencionado otro de los objetivos importantes en este trabajo, fué, determinar, si las células de los sujetos LL, producían una mayor cantidad de IL-4 cuando eran estimuladas en esta primera serie de experimentos con PHA, con el objeto de comprobar después de la hipótesis del grupo de Modlín (12), respecto a que los sujetos con LL, presentan una mayor actividad de células tipo TH2, que pudieran estar jugando un papel supresor en el sistema fisiológico del enfermo, no fué así, los resultados de la determinación de IL-4, no muestran ninguna diferencia en la producción de IL-4 entre los tres grupos estudiados, es más, cuando se busco la concentración de IL-4 en el suero de sujetos normales, contactos y LL, tampoco se pudieron encontrar diferencias (Tablas 3 y 4) (12,13,14,44,57,56, 68). Sin embargo, estos resultados aparentemente contradictorios sobre los niveles de IL-4 encontrados en pacientes con LL, podrían deberse a que, si bien, a nivel circulante no se observan diferencias significativas de los niveles de IL-4, estas son evidentes cuando se estudian los niveles de expresión de RNA mensajero que codifica IL-4 en los sitios de las lesiones, tal como ha sido reportado anteriormente (12, 13, 56, 57 ). Existe la alternativa de probar la propuesta del grupo de Lechler (79), en cuanto a la posibilidad de generación de células T anérgicas por los mecanismos planteados en los

antecedentes experimentales respecto a la falta de cooperación adecuada de la célula presentadora del antígeno y la competencia por IL-2 para el caso de Lepra lepromatosa, pero diferentes a los planteados por el grupo de Modlin (131). El presente trabajo, sugiere que al menos en los pacientes LL del Instituto Dermatológico de Jalisco no parece haber una correlación con la propuesta hecha por Mossmann y Coffman (92), en modelos de ratones, ni correlacionan del todo con lo afirmado por el grupo de Bloom (12,13,44,131), quienes atribuyen la enfermedad a un desequilibrio de las poblaciones de células CD4<sup>+</sup> TH1 -disminuidas- y TH2 -aumentadas-, con la consecuente presencia de altos niveles de IL-4, que este trabajo no pudo confirmar, al menos en linfocitos circulantes.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo resaltan la necesidad de realizar estudios similares en grupos de individuos con características clínicas relativamente homogéneas, tales como tipo de LL, tiempo de evolución, tiempo de tratamiento, respuesta al tratamiento, características generales, etc, etc., con el objeto de poder hacer una correlación de eventos inmunológico y clínicos que nos ayuden a entender mejor esta compleja enfermedad que azota todavía a una significativa parte de la población, local, nacional y mundial.

## SUMMARY

A great diversity of antigens from M. leprae have been described. One practical approach should be to utilize them as markers in knowing when a household contact subject has the risk of become infected and them move to an active form of leprosy. For this purpose, sonic extracts of *M. leprae* were fractioned in 10% SDS-PAGE under reducing conditions. The fractioned proteins were then transferred to nitrocellulose sheets and incubated with sera from LL, their contacts and normal subjects in order to reveal the frequency of antigen recognition of each set of sera. The results showed that sera from LL patients, frequently recognized two proteins: one of approximately 28 KDa and other of near 65 KDa, when compared with sera from normal subjects. The contacts and normal subjects, but LL patients too, frequently recognized a »16-18 KDa antigenic band.

According to the results, the recognized proteins from M. leprae (28 y 65 KDa) can be considered markers of the above mentioned conditions. From these an easy serological test as an ELISA can be developed in order to predict if a contact is moving to the LL state of leprosy before the detection of clinical symptoms.

Furthermore these antigens were put in contact with cells from LL patients and their contacts in culture, the results show that cells from contacts were more reactive to the total extract, 18, 28 and 65 kD from M. leprae, than cells from LL with interesting individual differences including CD4+/CD8+ ratio, which suggest, the study of cells from patients in the same clinic phase and generation of cell Lines from these subjects. Finally when IL-4 was measured by ELISA from supernatants from cultures from the three groups of study of PHA stimulated T cells, it was not observed any difference between normal, contact or LL patients.

## REFERENCIAS

1. Abe, M. M., Yoshino, Y., Ozawa, T., Saikawa, K., Saito, T. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. Int. J. Leprosy. 1980;48:109-19.
2. Abou-Zeid, C., Filley, E., Steele, J., Rook, G. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide converting bands cut from western blots into antigen-bearing particles. J. Immunol. Meth 1987;90: 5-10.
3. Abou-Zeid, C., Harboe, M., Sundsten, B., Cocito, C. Cross reactivity of antigens from the cytoplasm and cell walls of some *Corynebacteris* and *Mycobacteris* and *Mycobacteria*. J. Infect. Dis. 1985;151: 170-8.
4. Alfaro-Bustamante, F., Fafutis-Morris, M., Gonzalez-Mendoza, A., Morales-Ortiz, R, Islas-Rodríguez, A. Transferrin receptor on T cells of LL Patients. Int. J. Leprosy. Enviado a la Rev. Invest. Salud. 2002.
5. Asselineau, C. S., Clavel, F., Clement, M., Daffe, H., David, M. *Mycobacterium leprae* isolé detatou infecté experimentalement. Ann. Microbiol. 1981;132A : 19-30.
6. Azuma, I, Kumura, H., Niinaka, T., Aoiki, T. and Yamamura Y. Chemical and immunological studies on mycobacterial polyssacharides. I. Purification and properties of polysaccharides from human tubercle bacilli. J. Bacteriol. 1968;95:263-71.
7. Azuma, I, Y., Yamamura, and Misaki, A. Isolation and characterization of arabinose mycolate from firmly bound lipids of mycobacteria. J. Bacteriol. 1969;98:331-3.
8. Bair, J. S., Wang, C. R., Sun, C. C., Chaung, C. Y. The diagnostic value of IgM to natural trisaccharide phenylproionyl bovine serum albumin in leprosy patients: a preliminary report from Taiwan. Taiwan. I. Hsueh. Hui. Chin. 1991;90 :1099-102.
9. Barksdale L, K. S. Kim. *Mycobacterium*. Bacteriol. Rev. 1977; 41:217-362.

10. Berlin, O. G., Young, W. L. S., Floyd-Reising, S. A., Bruckner, D. A. Comparativity in vitro activity of the new macrolide A-56268 against mycobacteria. Eur. J. Microbiol. 1987;6 :486-7.
11. Bjorvatn, B., Barneston, B. R., Kronvall, G., Zubler, R. P., Lambert, H. Immune complexes and complement hypercatabolism in patients with leprosy. Clin. Exp. Immunol. 1976;26:388-96..
12. Bloom, B. R., Modlin, R. L., Salgame, P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. Ann. Rev., of Immunol. 1992;10:453-8.
13. Bloom, B. R., Salgame, P., Diamond, B. Revisiting and revising supressor T cells. Immunology Today 1992;13 :131-6.
14. Bloom, B. R. Tuberculosis; Pathogenic protection and control. ASM Press. Washington, D.C. 1994..
15. Booth, R. J., Williams, D. L., Moudgil, K. D., Noonan, L.,C., Grandison, P. M., McKee, J. J., Prestidge, R. L., Watson, J. D. Homologs of Mycobacterium tuberculosis 19-Kilodalton antigens in other mycobacteria. Infect. Immun. 1993;61:1509-15.
16. Bradley, S. G. Relationships among mycobacteria and nocardia based upon deoxyribonuclei acid reassociation. J Bacteriol. 1973;113 :645-51.
17. Brennan, P. J., Aspinall, G. O., and Nam Shin, J. E. Structure of the specific oligocaccharides from the glycopeptidolipid antigens of serovars in the Mycobacyerium avium , Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium scrofulaumex serocomplex. J. Biol Chem. 1981;256:6817-22.
18. Brennan, P. J., and Goren, M. B. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the Mycobacyerium avium, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium-scrofulaum, serocomplex. J. Biol Chem. 1979;254:4205-11.
19. Brennan, P. J., and Barrow, W. W. Evidence for species-specific lipid antigens in Mycobacterium leprae. Int. J. Lepr 1980; 48 :382-7.
20. Britton, W., Bellqvist, J., Garsia, R., Basten, A. Antigens of Mycobacterium leprae identified by immunoprecipitation with sera from leprosy and tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 1988;71:394-8.



21. Brosch, R, Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Garnier, T. Cole S.T. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. Res Microbiol . 2000;151 (2): 135-42.
22. Buchanan, T. M., Nomaguchi, H., Anderson, D. C., Young, R. A., Gillis, T. P., Britton, W. J., Ivanyi, J., Kolk, A. H. K., Closs, O., Bloom, B.R., and Mehra, V. Characterization of antigen-reactive epitopes on the 65,000 daltons protein molecules of Mycobacterium leprae. Inf. immun. 1987;55 :1459-63.
23. Carmella, W. L., Whaley, D., Mondigo, A., Mueller, D. L. Blocked signal transduction to ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+T cells. Science 1996;271:1272-6.
24. Castellanos, C., Islas, A. E., Gonzalez, A., Zambrano, S., Ortíz-Ortiz, L. Lepromatous leprosy; study of some subpopulations of lymphocytes and its functional analysis. Arch. Invest. Med. 1985; 16 : 217-24.
25. Cellona, R. V., Walsh, G. P., Fajardo, T. T Jr., Abalos, R. M., De la Cruz, E. C., Guido-Villahermosa, L., Felicio-Balagon, M.V., Steenberg, G. J., Douglas, J. T. Cross-sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND- O-BSA) in Cebu, The Philippines. Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis. 1993;61:192-8.
26. Chakrabarty, A., Maire, A., Lambert, P.. SDS-PAGE analysis of *M.leprae* protein antigens reacting with antibodies from sera from lepromatous patients and infected armadillos. Clin. Exp. Immunol. 1982;49 :523-31.
27. Chakravarti, M. R., and Vogel, F. A. A twin study on leprosy. Trop. Hum. Genet. 1973;1 :1-23.
28. Clark-Curtis, J.,E., Jacobs, W. R., Docherty, M. A., Ritchie, L. R., Curtis III, R. Molecular analysis of DNA and Construction of genomic libraries of Mycobacterium leprae. J. Bacteriol. 1985;161 :1093-102.
29. Closs, O., Harboem M., Axelsen, N. H., Bunch-Christensen, K., Magnusson, M. The antigens of Mycobacterium bovis, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis a reference system. Scand. J. Immunol. 1980;12 :249-63.

30. Cole, S.T., Eiglmeier., K., Parkhill., J., James , K. D., Thomson, N. R. Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham , D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, Feltwell , T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M. A., Rajandream., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds , M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S, and Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., & Barrell, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 409: 1007-1011.
31. Colligan, J. E., Kruisbeck, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., Shover, W. *Current Protocols In Immunology*. ed. N.Y.: Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, 1991.
32. Collins, D. M., Delisle, G. W. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 1984;130 :1019-21.
33. Colston, M. J., Hilson, G. R. F. Growth of *M. leprae* and *M. murinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature (London)* 1976;262:736-41.
34. Cooper, A. M., Dalton, D. K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D. G., Orme, I. M., Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene disrupted mice. *J.Exp. Med.* 1993;178:2243-7.
35. Cox, J. S., Chen, B., McNeil, M., Jacobs, W.R. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999;402 (6757): 79-83.
36. Daffe, M., Draper, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 1998;39: 131-203.
37. David, H. L, Papa, F., Craud, P., Berlie, H.C, Maroja, M.F, Salem, J. I., and Costa, M.F. Relationships between titers a of antibodies immunoreacting against glycolipid antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*, the Mitsuda and Mantoux reactions, and bacteriological loads implications in the pathogenesis, epidemiology and serodiagnosis of leprosy and tuberculosis. *Int. J. Lepr. Other. Mycobac. Dis.* 1992;60:208-24.

38. De Voss, J. J., Rutter, K., Benjamin, G., Schroeder, B., Su, H., Zhu, Y, and Barry III, C. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *PNAS*. 2000;97 (3): 1252-1257.
39. Dockrell, H., Stoker, N., Lee, S., Jackson, M., Grant, K., Jouy, N. Lucas, S., Hasan, R., Hussain, R., and Mcadam, K.. T cell recognition of the 18-KDa antigens of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1989;57:1979-83.60.
40. Dockrell, H.M., Eastcott, H., Young, S., MacFarlane, A., Hussain, R., Waters, M.F. Possible transmission of *Mycobacterium leprae* in a group of UK leprosy contacts. *Lancet*. 1991;338:739-43.
41. Drowart, A., Chanteau, S., Huygen, K., De-Cooock, M Cartel, J. L., De-Bruyn, J., Launois, P., Yernault., J.C., Van-Vooren, J. P. Effects of chemotherapy on antibody levels directed against PGL-I and 85A and 65B protein antigens in lepromatous patients. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 1993; 61 :29-34.
42. Eiglmeier, K., Fsihi, H., Heym, B., Cole, S. T. On the catalase-peroxidase gene, *katG*, of *Mycobacterium leprae* and the implications for treatment of leprosy with isoniazid. *FEMS Microbiol Lett* . 1997;149 (2): 273-8.
43. Engers, H. Results of a World Health Organization sponsored workshop on monoclonal antibodies t o *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1985;48:603-5.
44. Fafutis-Morris, M., Alfaro-Bustamante, F., Gonzalez-Mendoza, A., Morales-Ortiz, R., Islas-Rodríguez, A. Effect of phorbol myristate acetate and the ionophore A23187 on the proliferative response of T cells from LL patients. *Int. J. Leprosy.* 1997;65 :73-9 .
45. Fafutis-Morris, M., Alfaro-Bustamante, F., Gonzalez-Mendoza, A., Morales-Ortiz., R., Islas-Rodríguez, A. Response to Phytohemagglutinin of LL Patients'lymphocytes preincubated in culture media. *Int. J. Leprosy.* 1991;59 :480-2.

46. Fafutis-Morris, M., Mejia-Arreguin, S., Gonzalez-Mendoza, A., Morales-Ortiz, R., Islas-Rodríguez, A. Detection of Interleukin-2 receptor (IL-2r) by indirect immunofluorescence with anti-tac monoclonal antibody on the surface of T lymphocytes from patients with lepromatous leprosy. *Int.J.Leprosy.* 1990;58:126-8.
47. Fields, P.E., Gajewski, T.F., Fitch, F.W., Fields, P.E., Gajewski, T.F., Fitch, F..W., Blocked RAS activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 1996;271:1276-8.
48. Fournie, J., Adams, E., Mullins, R., Baste, A. Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenol glycolipid. *Infect. Immun.* 1989; 57 :3653-9.
49. Gaylord, H., and Brennan, P. J. Leprosy: antigens and host-parasite interactions. ed. New York.: In T. W. Pearson (ed). *Parasite antigens: Toward new strategies for vaccines.* Marcel Delker, Inc., New York. 1991.
50. Gillis, T. P., Miller, R. A., young, D. B., Khanollar, S. R., Buchanan, T. M. Immunochemical characterization of a protein associate with the cell wall of *Mycobacterium leprae*. *Infec. Immun.* 1985;49 :275-81.
51. Gillis, T. P., and Buchanan, T. M.. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infec. Immun.* 1982; 37 :172-8.
52. Goren, M. B. Mycobacterial lipids: selected topics. *Bacteriol. Rev.* 1972;36 :33-64.
53. Gupte, M. D., Anantharaman, D. S., Nagaraju, B., Kannan, S., Vallishayee, R. S. Experiences with *Mycobacterium leprae* soluble antigens in a leprosy endemic population. *Lepr.Rev.* 1990;61:132-44.
54. Harboe, M. Leprosy. The immunology of leprosy. Churchill Livigstone. Ltd. ed. Edimburgh. 1985. p. p. 53-87.
55. Hastings, R., Gillis, T., Krahenbuhl, J., Franzblau, S. Leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 1988;1 : 330-48.
56. Huizar, R., Ramírez, G., Fafutis, M., Santerre, A., Alfaro, F., Islas, A., Interleukin 4 (IL-4) levels from patients with lepromatous leprosy (LL). 2002. Enviado al *Int. J. Lepr.*

57. Huizar, R., Guillen, C., and Islas, A. Determinación de Interleucina 4 (IL-4) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T y en sueros de pacientes con lepra promatosa. 1993. Congreso Nacional de Inmunología.
58. Hunter, S., Brennan, P. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possible involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 1981;147:728-35.
59. Hunter, S. W, Gaylord, H., Brennan, P. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.* 1986;261 : 12345-51.
60. Hunter, S. W, Murphy, R. C., Clay, K., Goren, M. B., Brennan, P. J. Trehalose-containing lipoligosaccharides: a new class of antigens from species-specific antigens from mycobacteria. *J. Biol. Biol. Chem.* 1983;258:10481-7.
61. Hunter, S. W., Fujiwara, T., Brennan, P. J.. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem.* 1982;257 .
62. Imaeda, T. W., Kirchheimer, W. F., Barsdate, L. DNA isolated from *Mycobacterium leprae* : genome size, base ratio and homology with other related bacteria as determined by optical DNA-DNA reassociation. *J. Bacteriol.* 1982;150: 414-7.
63. Islas-Rodríguez, A. E., Morales-Ortiz, R., Fafutis-Morris, M, Gonzalez-Mendoza, A., Ortiz-Ortiz, L. Deficiency in the biosynthesis of Interleukin-2 (IL-2) and functional presence of the IL-2 receptor in lepromatous leprosy. *Int. J. Leprosy.* 1987;55 :566-9.
64. Jacobs, W. R, Doherty, M. A, Curtis, R III., Clark-Curtis, J. E. Expression of *Mycobacterium leprae* from a *Streptococcus mutans* promoter in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986;83 :1926-30.
65. Jenkis, P. A. Lipids analysis in the identification of mycobacteria an appraisal. *Rev. Infect. Dis.* 1981;3 :862-6.
66. Kaufmann, S. H. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. immunol.* 1993;11:129.

67. Keller, R. H., Libnoch, J., Patrick, C. W., Blake, D. G., Choi, H., Hanson, G. Fc bearing T cells by non-Hodking lymphoma. *Diag. Immunol.* 1983;1 : 27-31.
68. Kelso, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost. *Immunology Today.* 1995;16 :374-9.
69. Kirchheimer, W.F., and Storrs, E. E. An Attempt to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Lin) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Leprosy.* 1979;39 :693-702.
70. Klatser, P., van Rens, M., Eggelte, T. Immunochemical characterization of *Mycobacterium leprae* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis immunoperoxidase technique (SGIP) using patients sera. *Clin. Exp. Immunol.* 1984;56 :537-44.
71. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227 ( 62): 680-5.
72. Larralde, C., Montoya, R., Sciutto, E., Diaz, M., Govezensky, T., Coltori, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens ( *Taenia solium*, *Equinococcus granulosus*, and *Taenia crassisepe* ) reacting with sera from neurocisticercosis and hydatidic disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40:282-90.
73. Launois, P., Niang, M. N., Sarthou, J. L., Rivier, F., Drowart, A., Van-Vooren, J.P., Millan, J., Huygen, K. T-cell stimulation with purified mycobacterial antigens in patients and healthy subjects infected with *Mycobacterium leprae*: secreted antigen 85 is another immunodominant antigen. *Scand. J. Immunol.* 1993;38 :167-76.
74. Lederer, E. A, Adam, A., Ciorbaru, J, F., Petit, and Wietzerbin, J. Cell walls of mycobacteria and related organisms: chemistry and immunostimulant properties. *Mol. Cell. Biochem.* 1975;7 : 87-104.
75. Lee, S., Stoker, N., Grant, K., Handzel, Z., Hussain, R., McAdam, K., and Dockrell, H.. Cellular immune response of leprosy contacts to fractionated *Mycobacterium leprae* antigens. *Infect. Immun.* 1989; 57:2475-80.

76. Lefford, M. J., Hunegnaw, M., Siwik, E. The value of IgM antibodies to PGL-I in the diagnosis of leprosy. *Int. J. Lepr. and Other Mycobact. Dis.* 1991; 59 : 432-40.
77. Levis, W. R., Meecker, H. C., Schuller-Levis, G. B., Gillis, T. P., Marino, L. J., Zabriskie, J. Serodiagnosis of leprosy: relationships between antibodies to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid 1 and proteins antigens. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24 :917-21.
78. Levis, W. R., Meecker, H. C., Schuller-Levi, G. E., Sersen, Brennan, P. J., Schwerer, B. Mycobacterial carbohydrate antigens for serological testing of patients with leprosy. *J. Infec. Dis.* 1987;156:763-9.
79. Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor., R., Letchler., R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994;264 : 1587-9.
80. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R. J. Protein measurements with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193 : 265-70.
81. Lukacs, N. W., Boros, D. L. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Clin Immunol.Immunopathol.* 1993;68:57-63.
82. Mahajan, P., Jogaikar, D. G., Jadhav, V. H., Metha, J. M. Gelatin particle agglutination assay to detect anti-PGL-I antibodies in leprosy patients and in household contacts : a preliminary study. *Indian. J. Lepr.* 1992;64 : 461-7.
83. Manetti, R., Gerosa., F., Grazia-Gudizi, M., Biagiotti, R., Parronchi, P., Piccini, M. P. Sampognaro, S., Maggi, E., Romagnini, S., Trinchieri, G. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN gamma production in established Th2 cell clones. *J. Exp. Med.* 1994; 179:1273-83.
84. Marques, M., Chitale, S., Brennan, P., and Pessolani, M. Mapping and Identification of the Major Cell Wall-Associated Components of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1998;66 (6): 2625-2631.
85. Mehra, V. D., Sweeter., and Young, R. A. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83:7013-7.

86. Melancon-Kaplan, J., Hunter, S. W., McNeil, M., Stewart, C., Modlin, R. L., Rea, T. H., Convit, J., Salgame, P., Mehra, V., Bloom B. R. Immunological significance of *Mycobacterium leprae* cell walls. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85(6):1917-21 1988.
87. Mendez-Samperio, P., Lamb, J., Bothamley, G., Stanley, P., Ellis, C., Ivanyi, J. Molecular Study of the repertoire in family contacts and patients with leprosy. J.Immunol. 1989;142:3599-604.
88. Minnikin, D. E. Lipids: Complex lipids. Their chemistry, biosynthesis and roles. The Biology of the mycobacteria. Academic Press, Inc. (London), Ltd. ed. London.: In C. Rutledge and J. L. Stanford (Ed.); p. p. 95-186.1988
89. Moghaghehpour, N., Gelber, R., Engleman, E. G., T cell defect in lepromatous leprosy is reversible in the absence of exogenous growth factors. J. Immunol. 1987;138 :570-4.
90. Moghaghehpour, N., Gelber, R., Larrick, J. W., Sasaki, D. T., Brennan, P. J., Engleman, E. G., Defective T cell mediated immunity in leprosy: a failure of T cells from lepromatous leprosy patients to respond to *Mycobacterium leprae* is associated with the defective expression of interleukin-2 receptors and is not reconstituted by interleukin-2. J.Immunol. 1985;135 :1433-49.
91. Moretta, L., Webb, S. R., Grossi, C. E., Lydyard, P. M, Cooper, M. D. Functional analysis of two human subpopulations: help and suppressors of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM and IgG. J. Exp. Med. 1977;146:184-9.
92. Mossman, T. R, Coffman, R. L. Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 1989;7 :145-73.
93. Mossman, T. R., Sad, S. S. The expanding universe of T cells subsets: TH1, TH2 and more. Immunol Today. 1996;17 :138-46.
94. Mustafa, A. S., Gill, H. K., Nerland, A., Britton, W. J., Mehra, V., Bloom, B. R., Young, R.A., and Godal, T. Human T-cell Clones recognize a major *Mycobacterium leprae* protein expressed in *E. coli*. Nature (London) 1986;319 :63-6.



95. Mustafa, A. S., Offgun, F., Gill, H. K, Natvig, I. Characteristics of human T cell clones from BCG and killed *M.leprae*-vaccinated subjects and tuberculosis patients. *Lepr. Rev* 1986;57 (suppl 2): 123-30.
96. Mutis, T., Kraakman, E. M., Cornelisse, Y. E., Spits, H., de Vries R. R. P., Othenhoff, T. H. Analysis of cytokine production by mycobacterium reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae* nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J. Immunol.* 1993;150 :4641-51.
97. Nathan, C. F., Murray, H. W, Wiebe, M. E, Rubin, B. Y. Identification of Interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 1983;158
98. Nowak, R. How the parasite disguises itself. *Science* 1995; 269: 755.
99. Nuñez-Sánchez, L., Bogaert-Díaz, H. Estudios reaccionales de la lepra. *Rev. Dom. Dermatol.* 1992;19: 9-19.
100. Othenhoff, T.H. Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. 1994;62 :108-21.
101. Otto, M., Snejdárková, M. A simple and rapid method for the quantitative isolation of protein from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1981; 111:111-4.
102. Patel, R. J., Kvach, T., Mounts, P. Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. *J. Gen. Microbiol.* 1986;132 :541-51 .
103. Patil, S. A., Katoch, K., Sengupta, U. A method for the detection of *Mycobacterium leprae* antigens in urine of leprosy patients by gel electrophoretic techniques and significance in diagnosis. *Acta- Leprol.* 1991; 7 :403-7.

104. Patil, S.A., Tyagi, P., Katoch, K., Sengupta, U. Antigenes of *Mycobacterium leprae* in the cerebrospinal fluid of leprosy patients : detection by monoclonal antibody based sandwich immunoradiometric assay and avidin / biotin immunoblotting. Clin- Exp- Immunol. 1991;84:515-21.
105. Ramakrishnan, L., Federspiel, N., Falkow, S. Granuloma-Specific Expression of *Mycobacterium* Virulence Proteins from the Glycine-Rich PE-PGRS Family. Science. 2000;288: 1436-1439.
106. Rambukkana, A., Salzer, J. L., Yurchenco, P. D., and Tuomanen, E.I. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. Cell. 1997;88 (6): 811-21.
107. Rambukkana, A., Yamada, H., Zanazzi, G., Mathus, T., Salzer, J.L., Yurchenco, P.D., Campbell, K.P., Fischetti, V.A. Role of  $\alpha$ -Dystroglycan as a Schwann Cell Receptor for *Mycobacterium leprae*. Science. 282 (1998): 2076-2079.
108. Reddy, B. S., Shantaraman, R., Harish, B. N., Sheriff, M. O., Rao, R. S., Garg, B. R. Utility of gelatin particle agglutination test (MLPA) for rapid serodiagnosis of leprosy in a hyperendemic area. Indian. J. Lepr. 1992;64 :469-73.
109. Ridley, D., Jopling, W. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. Int. J. Lepr. 1966;34: 255-73.
110. Rinke-de Wit, T.F., Bekelie, S., Osland, A., Wieles, B., Janson, A. A., Thole, J. E. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: Identification of the genes for the 85A, 85C and related MPT51 proteins. Infec. Immun. 1993; 61:3642-7.64.
111. Romagnani, S., Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol. Today. 1991;12 : 256-7.
112. Rook, G. A. W., Hernandez-Pando, R, Lightman, S. Hormones, peripherally activated prohormones, and regulation of the TH1/TH2 balance. Immunol Today. 1994;15 :301-3.
113. Saad, M. H., Medeiros, M. A., Gallo, M. E., Fonseca, L. S., Use of the anti-PGL-I antibody ELISA and the Mitsuda reaction in early diagnosis of leprosy. Braz. J. Med. Biol. Res. 1991;24 :801-5.

114. Sabin, T. B. Temperature-linked sensory loss: a unique pattern in leprosy. *Arch Neurol.* 1969;20:257-62.
115. Salgame, P, Abrams, J. S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R.L. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254 :279-82.
116. Sampaio, E. P., Duppre N. C., Nery J. A., Moreira A. L., Sarno E. N., Development of giant reaction in response to PPD skin test in lepromatous leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 1993; 61:205-13.
117. Saul, A. *Lecciones de Dermatología.* 1986. Edit. F. Mendez Cervantes.
118. Schleifer, K. H., and Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 1972;36:407-77.
119. Seibert, F. B., and Watson, D. W. Isolation of the polysaccharides and nucleic acid of tuberculin by electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1941; 140: 55-69.
120. Sengupta, U. Studies on lepromin and soluble antigens of *Mycobacterium leprae*: their classification standardization and use. *Indian. J. Lepr.* 1991; 63 :457-65.
121. Sengupta, U. *Mycobacterium leprae* antigens and their utility in immunodiagnosics of leprosy. *Trop. Med. Parasitol.* 1990; 41:361-2.
122. Shimoji, Y., NG, V., Matsumara, K., Fischetti, V.A., and Rambukkana, A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96: 9857-9862.
123. Shinde, S, R., Chiplunkar, S., Butlin, R., Samson, P. D., Deo, M. G., Gengal, S. G. Lymphocyte proliferation, IFN-gamma production and limiting dilution analysis of T-cell responses to ICRC and *Mycobacterium leprae* antigens in leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact.Dis.* 1993; 61 : 51-8.

124. Shinnick, T. M., Sweetser, M. D., Tholle, J., Van Embden, J., Young, R. A., The etiologic agents of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein with the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1987; 55 :1932-5.
125. Sinha, S., Chaturvedi, V., Mishara, B., Sengupta, U.. Analisis of circulating immune complexez from leprosy patients for *Mycobacterium leprae* antigens. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 1992;60 :396-403.65.
126. Towbin, H., Staebelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:4350-4.
127. Vega-Lopez, F., Stoker, N., Locniskar, M., Dockrell, H., Grant, K., Mc Adam, K. Recognition of mycobacterial antigens by sera from patients with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26 :2474-9.
128. Warren, H. S., Vogel, F. R., Chedid, L. A. Current Status of immunological adjuvants. *Annu. Rev. Immunol.* 1986; 4:369-8.
129. Watson, J. Leprosy: understanding protective immunity. *Immunol. Today.* 1989;10 : 218-21.
130. WHO Report on the fifth meeting of the Scientific Working Group on the Immunology of Leprosy (IMMLEP). (1980 and 1984).
131. Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H, Bloom, B. R., and Modlin, R.L.. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254 : 277-9.
132. Youmans, G. P. *Tuberculosis.* ed. Philadelphia.: WB Saunders; 1979.
133. Young, D., and Buchanan, T.A.. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1983;221:1057-9.
134. Young, D. S., Khanolkar, S. R., Barg, L. L., Buchanan, T. M. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1984;43 :183-8.
135. Young, R.A., Mehra, V., Sweetser, D., Buchanan, T., Clark-Curtis, J., Davis, R. W., and Bloom, B. R.. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae* . *Nature.* (London) 1985;316 : 450-2.

**PRODUCCION CIENTIFICA RELACIONADA CON EL TRABAJO DE TESIS  
DOCTORAL**

Recibido: 30 de octubre de 1984  
Aceptado: 11 de diciembre de 1984

Received: October 30th, 1984  
Accepted: December 11th, 1984

**CARLOS CASTELLANOS-BARBA  
ALFONSO ISLAS-RODRIGUEZ  
ROBERTO MORALES  
AMADOR GONZALEZ-MENDOZA  
SERGIO ZAMBRANO-VILLA  
LIBRADO ORTIZ-ORTIZ**

*Carlos Castellanos-Barba y Alfonso Islas-Rodríguez.* Instituto de Patología Infecciosa Experimental, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

*Roberto Morales.* Instituto Dermatológico de Guadalajara, Secretaría de Salubridad y Asistencia, Guadalajara, Jalisco, México.

*Amador González-Mendoza.* Unidad de Investigación Médica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México.

*Sergio Zambrano-Villa.* Servicio de Alergia e Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México.

Solicitud de sobretiros (request for reprints): *Librado Ortiz-Ortiz.* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

## lepra lepromatosa: estudio de algunas subpoblaciones de linfocitos y su análisis funcional

## lepromatous leprosy: study of some subpopulations of lymphocytes and its functional analysis

### Resumen

Se investigaron en un grupo de pacientes de lepra lepromatosa y en otro de sujetos clínicamente sanos los niveles de linfocitos T totales por medio de formación de rosetas E, determinación de linfocitos T supresores Fc-gamma y de la capacidad de transformación blastoide de sus células linfoides cuando se estimularon con concanavalina A. La determinación de linfocitos T por medio de rosetas E mostró que los pacientes tenían disminución en comparación con el grupo testigo de sujetos normales. La determinación de linfocitos T supresores Fc-gamma evaluados por la formación de rosetas con eritrocitos de pollo sensibilizados con IgG, demostró en los enfermos un incremento significativo en los niveles de dichos linfocitos T supresores. En el cultivo de linfocitos de sangre periférica, la transformación blastoide inducida por estimulación con concanavalina A y medida por incorporación de timidina tritiada presentó niveles bajos en los pacientes leproso.

Los estudios mencionados demostraron que los enfermos de lepra lepromatosa presentan un número significativamente superior de linfocitos T supresores que los mostrados en sujetos clínicamente sanos, y que aquéllos pueden ser los causantes de la transformación insuficiente de sus células linfoides tras el estímulo mitogénico de linfocitos T.

### Abstract

Total T lymphocytes levels were investigated in a group of patients with lepromatous leprosy and in another one made up by clinically healthy individuals, by the capacity to form E rosettes, together with Fc-gamma suppressor T lymphocytes and blastoid transformation capacity of the lymphoid cells, when stimulated with concanavalin A. The determination of T lymphocytes by E rosettes showed patients had decreased levels when compared to normal control subjects. The determination of Fc-gamma suppressor T lymphocytes evaluated by rosette formation with chicken erythrocytes sensitized with IgG, showed significantly increased levels of such lymphocytes. In the culture of peripheral blood lymphocytes, blastoid transformation induced by concanavalin A and mediated by tritiated thymidine revealed low levels in leprosy patients.

The studies mentioned demonstrated that patients with lepromatous leprosy course with significantly increased numbers of suppressor T lymphocytes than those appearing in clinically healthy individuals. This could be the cause of insufficient transformation of lymphoid cells after mitogenic stimulation by T lymphocytes.

Los pacientes de lepra lepromatosa experimentan depresión generalizada de la inmunidad celular<sup>1</sup> que se manifiesta, entre otras cosas, como incapacidad para reaccionar a los antígenos de *Mycobacterium leprae* en pruebas de transformación blastoide.<sup>2,3</sup> Se ha postulado que en los enfermos de lepra lepromatosa la causa es un estado de tolerancia inmunológica adquirida, con falta de resistencia al padecimiento,<sup>4</sup> función alterada de sus macrófagos para presentar adecuadamente los antígenos de *M. leprae* a las células inmunológicamente suficientes<sup>5</sup> y disminución de su reacción inmunitaria celular mediada por células supresoras.<sup>6</sup>

No se conocen los mecanismos causantes de estas alteraciones, y es necesario determinarlos ya que son esenciales para entender las características inmunológicas de la lepra. Por lo antes expresado, y con objeto de obtener información adicional referente a la supresión de la reacción inmunitaria celular, se realizó un estudio comparativo entre pacientes de lepra lepromatosa y sujetos clínicamente sanos, investigando la subpoblación de linfocitos T supresores de la reacción inmunitaria celular, así como la capacidad de proliferación de las células linfoides a la estimulación con concanavalina A (Con A).

#### Material y métodos

**Sujetos de estudio.** Se estudiaron 24 pacientes de lepra lepromatosa del Instituto Dermatológico de la SSA, en Guadalajara, Jalisco. La edad de los pacientes fluctuaba entre 20 y 70 años, de los cuales 19 correspondieron al sexo masculino y cinco al femenino. El diagnóstico clínico correspondió en 18 de los enfermos a lepra lepromatosa nodular y en seis a lepra lepromatosa difusa. Todos ellos se encontraban bajo tratamiento con diaminodifenilsulfona a dosis de 100 mg diarios por tiempos que variaron entre dos y 15 años.

**Obtención de células mononucleares.** Se obtuvo sangre heparinizada (20 UI/ml) por punción venosa, la cual se sometió a centrifugación en un gradiente de ficoll-hypaque.<sup>7,8</sup> Las células mononucleares se obtuvieron en la interfase de la mezcla centrifugada, y se lavaron tres veces con solución salina balanceada de Hanks (SSBH). Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco), enriquecido con 5 por ciento de suero fetal de ternera.

Patients with lepromatous leprosy course with a generalized depression of cellular immunity<sup>1</sup> which becomes manifest among other things, by an incapacity to react to the antigens of *Mycobacterium leprae* in blastoid transformation tests.<sup>2,3</sup> It has been postulated that an acquired immunologic tolerance is responsible for the lack of resistance that patients with leprosy have for this entity,<sup>4</sup> due to altered function of their macrophages to present antigens to *M. leprae* adequately to immunologically competent cells<sup>5</sup> and to the diminished cellular immune response mediated by suppressor cells.<sup>6</sup>

The mechanisms responsible for these alterations are still unknown and it is necessary to determine them since they are essential to understand the immunologic characteristics of leprosy. Based on these concepts and with the object of obtaining additional information pertaining to the suppressed cellular immune response, a comparative study between patients with lepromatous leprosy and clinically healthy individuals was performed, to investigate T lymphocyte subpopulation of the cellular immune response, as well as the capacity to proliferate of concanavalin A (Con A) stimulated lymphoid cells.

#### Material and methods

**Study subjects.** The study comprised 24 patients with lepromatous leprosy from the Instituto Dermatológico de la Secretaría de Salud in Guadalajara, Jalisco. Their ages fluctuated between 20 and 70 years and 19 were males, with 5 females. In 18 of the subjects leprosy was of the nodular variety, while six coursed with the diffuse type. All of them were under treatment with diamino-diphenyl-sulfone at a dose of 100 mg a day for periods varying between 2 and 15 years.

**Obtention of mononuclear cells.** Heparinized blood was obtained (20 IU/ml) by venous puncture and was centrifuged in a Ficoll-Hypaque gradient.<sup>7,8</sup> The mononuclear cells were obtained at the interphase of the centrifuged mixture, and were washed three times with Hank's balanced saline solution (HBSS). Then, the cells were resuspended in RPMI-1640 culture medium (Gibco), enriched with 5 per cent calf serum.

75

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Determinación de linfocitos derivados del timo (T) totales.* Los linfocitos T humanos se identificaron por medio de su capacidad de formar rosetas con eritrocitos de carnero; a estos linfocitos se les denomina "células formadoras de rosetas E" (CFR-E).<sup>9,11</sup> Para este objeto las células mononucleares purificadas se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  por cada 0.25 ml de medio RPMI-1640 enriquecido con 5 por ciento de suero fetal de ternera. A continuación, se les añadieron 0.25 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2 por ciento en SSBH (v/v) y se incubaron 15 min a 37°C. Posteriormente la suspensión celular se centrifugó a 100 g durante 10 min, se llevó a 4°C durante 18 h, se resuspendió el paquete de células cuidadosamente y se contó el número de CFR-E que tenían tres o más eritrocitos de carnero adheridos a su membrana. Finalmente se calculó el porcentaje de células viables por medio de incorporación de azul tripano (0.4 por ciento) y se descartaron aquellas que incorporaron el colorante vital.

*Determinación de linfocitos T supresores (LTS).* Tanto los LTS como los linfocitos B y los macrófagos presentan receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Por lo tanto, para determinar el número de LTS fue necesario purificar esta población para eliminar a los linfocitos B y los macrófagos que poseen el receptor similar para el Fc de la IgG. Con este objeto, se obtuvieron primero las CFR-E, las cuales se sometieron a un gradiente de ficoll-hypaque (1 ml), lo que permitió separarlas de los linfocitos B y los macrófagos. Después de centrifugar a 200 g durante 20 min a temperatura ambiental, la suspensión de células que contenían las CFR-E se obtuvieron en el fondo del tubo; las células se resuspendieron y se lavaron dos veces con SSBH a 200 g durante 10 min a temperatura ambiental, y finalmente se sometieron a un choque hipotónico. Con tal propósito se añadieron al concentrado de células cinco gotas de agua destilada estéril durante tres segundos, e inmediatamente se resuspendieron en SSBH. La mezcla se centrifugó a 200 g durante 15 min a 22°C, y el sedimento celular se resuspendió en 0.25 ml de RPMI-1640 enriquecido con suero fetal de ternera. A los linfocitos T se les añadió una suspensión de eritrocitos de pollo al 2 por ciento, los cuales se habían cubierto previamente con una dosis subaglutinante de IgG antipollo; la mezcla se incubó durante 30 a 60 min a 37°C, se centrifugó a 100 g durante 10 min, se repitió la incubación a 37°C ahora por 5 min y, finalmente, el sedimento celular se llevó a 4°C durante 18 h. Después de este periodo se contaron los linfocitos que tenían adheridos a su membrana tres o más eritrocitos de pollo sensibilizados con su anti-

*Determination of total lymphocytes derived from the thymus (T).* Human T lymphocytes were identified by their capacity to form rosettes with calf erythrocytes, which were then referred to as "E-rosette forming cells" (E-RFC).<sup>9,11</sup> To this end, the purified mononuclear cells were adjusted to a concentration of  $2 \times 10^6$  per 0.25 ml of RPMI-1640 medium, enriched with 5 per cent fetal calf serum. Then, 0.25 ml of a suspension of calf erythrocytes was added at 2 per cent in SSBH (v/v) and was incubated 15 minutes at 37°C. Later the cellular suspension was centrifuged at 100 g during 10 minutes and taken to 4°C during 18 hours, then the package of cells was carefully resuspended and the E-RFC which had more than three calf erythrocytes adhering to their membrane, were counted. Finally, the percentage of viable cells was calculated by means of trypan blue (0.4 per cent) and those that incorporated the vital dye, were discarded.

*Determination of suppressor T lymphocytes (STL).* STL, B lymphocytes and macrophages present receptors for the Fc fragment of immunoglobulin G (IgG). In order to determine the number of STL it was necessary to purify this population to eliminate B lymphocytes and macrophages possessing the same Fc receptor for IgG. To this end, the E-RFL were obtained first, by subjecting the suspension to a Ficoll-Hypaque gradient (1 ml), which allowed their separation from B lymphocytes and macrophages. After centrifuging at 200 g for 20 minutes at room temperature, the suspension of cells containing E-RFC were obtained at the bottom of the tube and resuspended, washed twice with SSBH at 200 g during 10 minutes at room temperature and finally subjected to hypotonic shock. With this purpose, to the package of cells were added five drops of sterile distilled water during three seconds and immediately resuspended in SSBH. The mixture was centrifuged at 200 g during 15 minutes at 22°C and the cellular sediment was resuspended in 0.25 ml of RPMI-1640 enriched with fetal calf serum. To the T lymphocytes was added a suspension of chicken erythrocytes at 2 per cent, which had previously been covered with a subagglutinating dose of anti-chicken IgG; the mixture was incubated during 30 to 60 minutes at 37°C and centrifuged at 100 g for 10 minutes and incubated again at 37°C this time for 5 minutes and finally, the sediment was taken to 4°C during 18 hours. After this period, the lymphocytes which had three or more chicken erythrocytes sensitized to its specific antibody, adhering to their membrane, were counted. With the information obtained, the number of rosette forming cells with the sensitized erythrocytes (T-Fc-IgG) were determined per ml or in percentages.<sup>12,13</sup>



cuerpo específico. Con la información obtenida se determinó el número de células que formaron rosetas con los eritrocitos sensibilizados (T-Fc-IgG) por ml o en porcentaje.<sup>12,13</sup>

**Sensibilización de eritrocitos de pollo con IgG anti-pollo.** La IgG anti-pollo se obtuvo por el método descrito por Garvey y col.<sup>14</sup> usando para la inmunización de conejos una suspensión de eritrocitos de pollo previamente lavados con SSBH. Se preparó una solución de IgG anti-pollo que contenía 1 mg/ml en SSBH y se determinó su título de hemaglutinación contra una suspensión de eritrocitos de pollo al 2 por ciento. Para la sensibilización de los eritrocitos de pollo se usó la primera dilución de la IgG anti-pollo que no presentó hemaglutinación visible a la inspección ocular.

**Cultivo de linfocitos para determinar la proliferación celular.** La prueba se realizó con la suspensión de células mononucleares que se obtuvieron después de la centrifugación en el gradiente de ficoll-hypaque.<sup>7</sup> El cultivo de linfocitos para medir la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) en la división celular se realizó midiendo la incorporación de timidina marcada con tritio (<sup>3</sup>H-TdR) en el DNA de la célula. El método consistió en cultivar  $2.5 \times 10^5$  células en 0.1 ml de medio RPMI-1640 complementado con 5 por ciento suero fetal de ternera que contenía penicilina y estreptomycin.<sup>15</sup> Las células se estimularon con diferentes concentraciones de Con A en volúmenes de 0.1 ml, las cuales en estudios preliminares habían mostrado una estimulación óptima. Después de 48 h de incubación a 37°C en una atmósfera de 5 por ciento de CO<sub>2</sub> en aire, se añadió 1  $\mu$ Ci/10  $\mu$ l de <sup>3</sup>H-TdR (metil-<sup>3</sup>H-TdR, actividad específica 1.9 Ci/mmol) y se continuó la incubación por 18 h más. Al finalizar el cultivo las células se cosecharon sobre papeles filtro en un microcosechador Brandel y los filtros se introdujeron en líquido de centelleo para su lectura posterior en un contador beta. Los cultivos se realizaron por cuadruplicado. Los resultados se informan en cuentas por minuto (cpm) que indican la marca radioactiva incorporada.

---

#### Resultados

---

**Número de células mononucleares.** El número de células mononucleares periféricas de pacientes de lepra lepromatosa aisladas por gradiente de ficoll-hypaque se encontró significativamente disminuido en 16 de

**Sensitization of chicken erythrocytes with anti-chicken IgG.** Antichicken IgG was obtained by the method of Garvey et al.<sup>14</sup> with rabbits immunized by a suspension of chicken erythrocytes previously washed in HBSS. A solution was prepared in antichicken IgG containing 1 ml/ml in HBSS and its titer of hemagglutination was determined against a suspension of chicken erythrocytes at 2 per cent concentration. The first dilution was used for the sensitization of chicken erythrocytes of antichicken IgG that did not present visible hemagglutination on ocular inspection.

**Lymphocyte culture to determine cellular proliferation.** The test was performed with the suspension of mononuclear cells obtained after centrifugation in the Ficoll-Hypaque gradient.<sup>7</sup> The culture of lymphocytes to measure synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) in cellular division, was performed by thymidine incorporation labeled with tritium (<sup>3</sup>H-TdR), in the DNA of the cell. The method consisted in culturing  $2.5 \times 10^6$  cells in 0.1 ml de RPMI-1640 medium supplemented with 5 per cent fetal calf serum containing penicillin and streptomycin.<sup>15</sup> The cells were stimulated with different concentrations of Con A in volumes of 0.1 ml, which in previous trials had shown optimal stimulation. After 48 hours of incubation at 37°C in an atmosphere of 5 per cent CO<sub>2</sub> in the air, 1  $\mu$ Ci/10  $\mu$ l of <sup>3</sup>H-TdR (methyl-<sup>3</sup>H-TdR specific activity 1.9 Ci/mole) was added and incubation was continued for 18 additional hours. At the end of this period the cells were harvested on paper filters in a microharvester Brandel and the filters were introduced in scintillation fluid for a later reading in a beta counter. Cultures were performed in quadruplicate and the results reported in counts per minute (cpm) which indicate the incorporated radioactive label.

---

#### Results

---

**Number of mononuclear cells.** The number of peripheral mononuclear cells in patients with lepromatous leprosy isolated by Ficoll-Hypaque gradient, was significantly diminished in 16 of the 24 patients

los 24 pacientes estudiados cuando se le comparó con el grupo de los sujetos sanos testigos ( $P < 0.02$ ) (cuadro I).

studied, when compared with the group of healthy control subjects ( $P < 0.02$ ) (table I).

**CUADRO I. NUMERO DE CELULAS MONONUCLEARES OBTENIDAS DE SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES DE LEPROA LEPRMATOSA POR MEDIO DE UN GRADIENTE DE FICOLL-HYPAQUE**  
**TABLE I. NUMBER OF MONONUCLEAR CELLS OBTAINED FROM THE BLOOD OF PATIENTS WITH LEPRMATOUS LEPROSY BY MEANS OF A FICOLL-HYPAQUE GRADIENT**

Grupo Group	No.	Células/ $\mu$ l Cells/ $\mu$ l
Enfermos Patients	24	800 $\pm$ 78*
Sanos Controls	32	1 500 $\pm$ 102

\* Media aritmética  $\pm$  error tipo. La diferencia entre los grupos es significativa ( $P < 0.02$ ).

\* Arithmetical mean  $\pm$  type error. The difference between the group is significant ( $P < 0.02$ ).

*Determinación de linfocitos T totales.* La determinación de linfocitos T por medio de la formación de CFR-E en 14 pacientes de lepra lepromatosa mostró valores significativamente disminuidos ( $P < 0.02$ ) en relación con el grupo testigo de individuos sanos (cuadro II).

*Determination of total T lymphocytes.* The determination of T lymphocytes by means of E-RFC in 14 patients with lepromatous leprosy showed significantly diminished values ( $P < 0.02$ ) in relation to the healthy control group (table II).

**CUADRO II. DETERMINACION DE LINFOCITOS T TOTALES Y T SUPRESORES EN SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES DE LEPROA LEPRMATOSA**  
**TABLE II. TOTAL T AND SUPPRESSOR LYMPHOCYTE DETERMINATION IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH LEPRMATOUS LEPROSY**

Grupo Group	Linfocitos T T lymphocytes			
	Totales Total		Supresores Suppressors	
	No.	%	No.	%
Enfermos Patients	14	36 $\pm$ 3	10	15 $\pm$ 3*
Sanos Controls	16	54 $\pm$ 2	8	11 $\pm$ 1

\* Media aritmética  $\pm$  error tipo. La diferencia entre los distintos grupos es significativa ( $P < 0.01$ , análisis factorial  $2 \times 2$ ).

\* Arithmetical mean  $\pm$  type error. The difference between the groups is significant ( $P < 0.01$ , factorial analysis  $2 \times 2$ ).

**Enumeración de LTS.** Los pacientes con lepra lepromatosa mostraron en general un mayor número de LTS (T-Fc-IgG) que los encontrados en sujetos sanos. La diferencia analizada por la prueba factorial de  $2 \times 2$  fue significativa ( $P < 0.01$ ) (cuadro II).

**Efecto de la Con A sobre los linfocitos de pacientes de lepra lepromatosa.** Con objeto de determinar la actividad de los linfocitos T de pacientes con lepra lepromatosa, se realizaron estudios de transformación blastoide usando para el caso la estimulación de los linfocitos T con Con A. La estimulación de los linfocitos T de pacientes y testigos se llevó a cabo con la dosis óptima de Con A, específicamente  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  del mitógeno. Se incluyeron los testigos apropiados de ambos grupos, los cuales no recibieron Con A. Como puede observarse en el cuadro III, los linfocitos de los pacientes lepromatosos reaccionan menos al estímulo de Con A que los linfocitos de los sujetos sanos. Los resultados muestran que la incorporación de la timidina tritiada es significativamente menor ( $P < 0.02$ ) en el grupo de lepromatosos que en el de testigos sanos. Los datos sugieren que los linfocitos T de los enfermos leproso lepromatosos experimentan una alteración en su capacidad de proliferación frente al estímulo mitógeno.

**Enumeration of suppressor T lymphocytes.** In general, patients with lepromatous leprosy coursed with higher numbers of STL (T-Fc-IgG) than those found in healthy subjects. The difference analyzed by the factorial  $2 \times 2$  test proved to be significant ( $P < 0.01$ ) (table II).

**Effect of Con A on lymphocytes from patients with lepromatous leprosy.** With the object of determining the activity of T lymphocytes from patients with lepromatous leprosy, studies of blastoid transformation were performed in this case by using Con A to stimulate lymphocytes. Stimulation of lymphocytes from patients and controls was performed with optimal dose of Con A, specifically  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  of this mitogen. Appropriate controls were included from both groups, which did not receive Con A. As can be seen in table III, the lymphocytes from patients with leprosy respond less to Con A stimulation than lymphocytes from healthy people. The results show that tritiated thymidine incorporation is significantly lower ( $P < 0.002$ ) in the group with leprosy than in healthy controls. These data suggest that T lymphocytes of patients with lepromatous leprosy present altered capacity to proliferate when faced with mitogenic stimulation.

CUADRO III. EFECTO DE LA CONCANAVALINA A SOBRE LOS LINFOCITOS DE PACIENTES DE LEPRO LEPROMATOSA  
TABLE III. EFFECT OF CONCANAVALIN A ON THE LIMPHCYTES OF PATIENTS WITH LEPROMATOUS LEPROSY

Grupo	No.	Incorporación de timidina tritiada (CPM)
Group		Incorporation of tritiated thymidine (CPM)
Enfermos Patients	16	45 132 $\pm$ 10 294
Sanos Controls	17	104 233 $\pm$ 11 089*

\* Media aritmética  $\pm$  error tipo. La diferencia entre los grupos es significativa ( $P < 0.02$ ).

\* Arithmetical media  $\pm$  type error. The difference between the groups is significant ( $P < 0.02$ ).

#### Discusión

Los resultados que aquí se presentan indican que los enfermos de lepra lepromatosa muestran una depresión de la reacción inmunitaria celular aunada a otras

#### Discussion

The results presented here indicate that people affected with lepromatous leprosy course with a depression of the cellular immune response linked to other alte-

alteraciones. Así, los enfermos lepromatosos mostraron una disminución en el número de células mononucleares ( $P < 0.02$ ) y en la proporción de linfocitos T totales ( $P < 0.02$ ) de sangre periférica en relación con los testigos sanos estudiados. Además, el número de LTS (T-Fc-IgG) se encontró aumentado significativamente ( $P < 0.02$ ). Esto sugiere que en la población de linfocitos T totales predomina el número de LTS, que probablemente ejercen una represión de la reacción celular en los enfermos de lepra lepromatosa.

En los pacientes lepromatosos la transformación blastoide inducida por Con A ( $10 \mu\text{g}$  por ml) estaba disminuida ( $P < 0.02$ ), lo cual concuerda con los resultados de estudios previos.<sup>2,3,16</sup> Puede decirse que en los sujetos leproso la disminución de los linfocitos T totales y el aumento relativo de LTS pueden explicar la alteración de la reacción linfocitaria a la Con A *in vitro*; además, existe una marcada tendencia a la proliferación celular disminuida, seguramente por la disminución en la proporción de linfocitos T que reaccionan al mitógeno y que refleja actividad alterada a nivel de los linfocitos T efectores circulantes.

Las células supresoras parecen actuar por medio de la interacción célula T supresora-macrófago-células T y B efectoras; esta estrecha relación se efectúa por reconocimiento de receptores específicos de superficie y producción de linfocinas.<sup>17,18</sup> La actividad primordial del macrófago cuando ha sido activado por linfocinas es presentar el antígeno a los linfocitos y destruir a *M. leprae*. El macrófago puede tener también una función importante como célula supresora,<sup>19-22</sup> cuando lo estimulan micobacterias, mediante liberación de factores solubles supresores como las mananas y las prostaglandinas;<sup>21</sup> así, se ha encontrado que al eliminar al macrófago de algunos cultivos se puede restituir la reacción al mitógeno. La acción supresora puede deberse a que libera factores supresores o que deja de liberar factores cooperadores, como sucede en condiciones normales.

Se ha encontrado que existe deficiencia en la liberación de factores del crecimiento para linfocitos T (interleucina-2, IL-2) en ratones leproso.<sup>23</sup> En estudios preliminares en el laboratorio de los autores se ha encontrado que existe deficiencia en la producción de IL-2 en enfermos de lepra lepromatosa. La importancia de las interleucinas radica en los efectos biológicos que ejercen sobre la reacción inmunitaria celular y en sus propiedades que la hacen potencialmente un arma terapéutica y de diagnóstico.<sup>24-26</sup>

En conclusión, los enfermos de lepra lepromatosa presentan un número significativamente superior de

rations. In this series patients showed a diminished number of mononuclear cells ( $P < 0.02$ ) as well as a proportion of total T lymphocytes ( $P < 0.02$ ). In peripheral blood in relation to the healthy controls in the study. Besides, the number of STL (T-Fc-IgG) appeared significantly higher ( $P < 0.02$ ). This suggests that the total T lymphocyte population prevails over the number of STC, which probably exert repressive cellular responses in patients with lepromatous leprosy.

In patients with lepromatous leprosy, the blastoid transformation induced by Con A ( $10 \mu\text{g}$  per ml) was diminished ( $P < 0.02$ ), which is in keeping with previous studies.<sup>2,3,16</sup> It can be said that in leprosy the diminished total T lymphocytes and the relative increase of STL, are capable of explaining the altered lymphocytic response to Con A *in vitro*; there is, besides, a marked tendency to diminished cellular proliferation, due most assuredly to the diminished proportion of T lymphocytes which respond to the mitogen and which reflects an altered activity at the level of circulating effector T lymphocytes.

Suppressor cells seem to act through interaction: suppressor T cell macrophage and B effector cell; this tight relation comes about with the recognition of specific surface receptors and with the production of lymphokines.<sup>17,18</sup> The primordial activity of macrophages when activated by lymphokines is to present the antigen to the lymphocyte and to destroy *M. leprae*. The macrophage can play an important part as a suppressor cell<sup>19,22</sup> when stimulated by mycobacteria through the liberation of soluble suppressor factors such as mananas and prostaglandins;<sup>21</sup> it has been found that by eliminating the macrophage from certain cultures it is possible to reconstitute the response to the mitogen. The suppressor action could be due to the liberation of suppressor factors or to the lack of release of cooperating factors as occurs under normal conditions.

It has been found that there is a deficiency in the release of T lymphocyte growth factor (interleukin 2, IL 2) in lepromatous mice.<sup>23</sup> Preliminary studies in this laboratory have shown that there is a deficiency of IL 2 in patients with lepromatous leprosy. The importance of interleukins stems from the biological effects they exert on the cellular immune response and on their properties, which potentially convert them into therapeutic and diagnostic tools.<sup>24,26</sup>

In conclusion, patients with lepromatous leprosy course with a significantly more elevated number of suppressor T lymphocytes than those present in clini-

linfocitos T supresores que los determinados en sujetos clínicamente sanos, y que podrían ser los causantes de la transformación insuficiente de sus células linfoides al estímulo mitógeno de los linfocitos T.

cally healthy subjects and they could be responsible for an insufficient transformation of lymphoid cells under the mitogenic stimulus of T lymphocytes.

#### Referencias

#### References

1. MYRVANG, B.; GODAL, T.; RIDLEY, D.S.; FROLAND, S.S.; SONG, Y.K.: *Immune responsiveness to Mycobacterium leprae and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy*. Clin. Exp. Immunol., 1973; 14:541.
2. ULRICH, M.; DE SALAS, B.; CONVIT, J.: *Lymphocyte transformation with phytomitiogens in leprosy*. Int. J. Lepr., 1971; 40:4.
3. DIERCKX, R.E.; SHEPARD, C.C.: *Effect to PHA and various mycobacterial antigens on lymphocyte culture from leprosy patients*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968; 127:391.
4. GODAL, T.; MYRVANG, G.; FROLAND, S.S.; SHAO, J.; MELAKU, G.: *Evidence that the mechanism of immunological tolerance ('central failure') is operative in the lack of host resistance in lepromatous leprosy*. Scand. J. Immunol., 1972; 1:311.
5. HIRSCHBERG, H.: *The role of macrophages in the lymphoproliferative response to Mycobacterium leprae in vitro*. Clin. Exp. Immunol., 1978; 34:46.
6. MEHRA, V.; MASON, L.H.; FIELDS, J.; BLOOM, B.R.: *Lepromin induced suppressor cells in patients with leprosy*. J. Immunol., 1979; 123:1813.
7. BÖYUM, A.: *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968; 21:77.
8. HOKLAND, P.; HOKLAND, M.; HERON, I.: *An improved technique for obtaining E rosettes with human lymphocytes and its use for B cell purification*. J. Immunol. Metab., 1976; 13:175.
9. HOFMAN, M.F.; KANESBERG, B.; SMITH, D.; GARRISON, D.; SEVIER, E.D.: *Stability of T and B cell numbers in human peripheral blood*. Am. J. Clin. Pathol., 1982; 77:710.
10. NOWACZYK, M.; SHOPINSKA, E.: *Fractionation of human T lymphocytes on the basis of their high, medium and low SRBC-rosette-forming affinity: efficiency of the method*. Arch. Immunol. Ther., 1978; 26:393.
11. MORETTA, L.; FERRARINI, M.; MINGANI, M.C.; MORETTA, A.; WEBB, S.R.: *Subpopulation of human T cells identified by receptor for immunoglobulins and mitogen responsiveness*. J. Immunol., 1976; 17:2171.
12. MORETTA, L.; WEBB, S.R.; GROSSI, C.E.; LYDYARD, P.M.; COOPER, M.D.: *Functional analysis of two human subpopulations: help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM and IgG*. J. Exp. Med., 1977; 146:184.
13. KELLER, R.H.; LIBNOCH, J.; PATRICK, C.W.; BLAKE, D.G.; CHOI, H.; HANSON, G.: *Fc-bearing T cells by non-Hodgkin lymphoma*. Diag. Immunol., 1983; 1:27.
14. GARVEY, J.S.; CREMER, N.E.; SURSDORF, D.H.: *Methods in immunology*. Benjamin, Londres, 1977. Pág. 207.
15. BRADLEY, L.: *Cell proliferation*. En: Mishell, B.B.; Shiigi, S.M. (eds.) Selected methods in cellular immunology., W.H. Freeman Co., 1980, pág. 153.
16. DWYER, J.M.; BULLOCK, W.; FIELDS, J.P.: *Disturbance of the blood T:B lymphocyte ratio in lepromatous leprosy*. N. Eng. J. Med., 1973; 288:1036.
17. DUMONDE, D.C.; WOLSTENCRAFT, A.R.; PANAYL, S.G.; MATTHEW, M.; MORLEY, M.; HOWSON, T.W.: *Lymphokines: nonantibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation*. Nature, 1969; 224:38.
18. BACH, F.J.: *The use of regulatory biological products to manipulate immune responses*. Prog. Immunol., 1980.
19. STOBO, J.D.: *Immunosuppression in man: suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T lymphocytes*. J. Immunol., 1977; 119:518.
20. WADEE, A.A.; SHER, R.; RABSON, A.R.: *Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with Mycobacteria*. J. Immunol., 1980; 125:1380.
21. ELLNER, J.J.: *Suppressor adherent cells in human tuberculosis*. J. Immunol., 1978; 121:2573.
22. SATHISH, M.; BHUTANI, L.K.; SHARMA, A.K.; NATH, I.: *Monocyte-derived soluble suppressor factor(s) in patients with lepromatous leprosy*. Infect. Immun., 1983; 42:890.
23. HOFFENBACH, A.; LAGRANGE, P.H.; BACH, M.A.: *Defect of interleukin 2 production associated with impaired T cell proliferative response in Mycobacterium leprae-murium infection*. Infect. Immun., 1983; 39:109.
24. GILLIS, S.: *IL-2: Biology and biochemistry*. J. Clin. Immunol., 1983; 3:1.
25. KENDALL, A.; LOWERENCE, S.; LACHMAN, B.; OPENHEIM, J.J.; FAVATA, M.F.: *The functional relationship of the interleukins*. J. Exp. Med., 1980; 151:1551.
26. WAGNER, H.; HARDT, C.; HEEG, K.; PFIZENMAIER, K.; SOLBACH, W.; BARTLETT, R.; STOCKINGER, H.; RÖLLINGHOFF, M.: *T-T cell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) response: T cell derived helper factor (interleukin 2) as a probe to analyze CTL responsiveness and thymic maturation of CTL progenitors*. Immunol. Rev., 1980; 52:215.

ence of endosymbionts. Third, *M. leprae* may itself be an endosymbiont.

In view of these possibilities, it would be of interest to examine protozoa in those environments where the earth-burrowing armadillos have been infected with *M. leprae*, as well as to attempt the infection of various protozoa with this pathogen in the hope of developing a "cell line" for drug-resistance studies and large-scale propagation.

—John M. Grange, M.Sc., M.D.  
—C. Ann Dewar, M.I.Biol.

Cardiothoracic Institute  
University of London  
Fulham Road  
London SW3 6HP, U.K.

—Timothy J. Rowbotham, B.Sc., Ph.D.  
Public Health Laboratory  
Bridle Path  
York Road  
Leeds LS15 7TR, U.K.

#### REFERENCES

1. BHARDWAJ, N., NASH, T. W. and HORWITZ, M. A. Interferon- $\gamma$ -activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J. Immunol.* 137 (1986) 2662–2669.
2. JADIN, J. B. Amibies "limax" vecteurs possibles des mycobactéries et de *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol.* 59–60 (1975) 57–66.
3. KATO, L. Absence of mycobactin in *Mycobacterium leprae*; probably a microbe dependent microorganism. Implications. *Indian J. Lepr.* 57 (1985) 58–70.
4. KATO, L. A multifactorial culture medium with growth factors from leprosy-derived mycobacteria proposed in cultivation trials for *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 54 (1986) 310–311.
5. MYEROWITZ, R. L., PASCULLE, A. W., DOWLING, J. N., PAZIN, G. J., PUERZER, M., YEE, R. E., RINALDO, C. R. and HAKALA, T. R. Opportunistic lung infection due to "Pittsburgh pneumonia agent." *N. Engl. J. Med.* 301 (1979) 953–958.
6. PROCA-CIOBANU, M., LUPASCU, G., PETROVICI, A. and IONESCU, M. D. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int. J. Parasitol.* 5 (1975) 49–56.
7. ROWBOTHAM, T. J. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* 36 (1983) 978–986.

## Deficiency in the Biosynthesis of Interleukin 2 (IL-2) and Functional Presence of the IL-2 Receptor in Lepromatous Leprosy

#### TO THE EDITOR:

Patients with lepromatous leprosy (LL) have a depressed cellular immune capacity to respond to antigens from *Mycobacterium leprae*, a reduction in effector and helper T cells, and an increase in suppressor T cells (2,4,11,16). A reduction in the synthesis of interleukins has been postulated in some murine models (9). In man, it has been shown that upon the addition of interleukin 2 (IL-2) to cultures of lymphocytes from patients with LL, these lymphocytes recover their capacity to proliferate (7,8). However, in another paper (12) it has been pointed out that this phenomenon does not occur.

We report here the results of a study looking for the production of IL-2 by lymphocytes from patients with LL, and the func-

tional presence of IL-2 receptors on their lymphocytes.

**Study subjects.** Twenty patients, 11 men and 9 women, from the Instituto Dermatológico at Guadalajara, Jalisco, México, were diagnosed as having nodular LL according to international criteria (14). All presented positive bacilloscopy, and all received an irregular treatment of 100 mg of dapsone (diaminodiphenyl sulfone) per day. The length of treatment ranged from 2 to 15 years. Fourteen patients were studied for the biosynthesis of IL-2 by T lymphocytes obtained from peripheral blood, and the functional presence of the IL-2 receptor on T lymphocytes was studied in 6 patients. Controls consisted of 14 unrelated healthy subjects for the first study and 6 apparently

normal subjects for the second, all matched for sex and age as much as possible.

**Mononuclear cells.** Heparinized blood (20 IU/ml) was obtained from each subject by venipuncture. After the blood had been centrifuged on a Ficoll-Hypaque gradient<sup>(3,10)</sup> at  $400 \times g$ , the mononuclear cells were recovered and washed three times with Hanks' balanced salt solution (HBSS). The cells were then resuspended in RPMI 1640 culture medium (GIBCO, Grand Island, New York, U.S.A.) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 10 mM HEPES,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, and penicillin 100 U/ml and streptomycin 100  $\mu$ g/ml.

**Biosynthesis of IL-2 by T lymphocytes.** To  $2 \times 10^5$  mononuclear cells for culture (which included T lymphocytes), 10  $\mu$ g/ml of concanavalin A (ConA) was added. The cultures were incubated for 48 hr at 37°C in a mixture of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Thereafter, each supernatant was assayed for IL-2 activity<sup>(5)</sup>.

**IL-2 activity assay.** The assay method used was that described by Gillis<sup>(5,6)</sup>. In brief, a cytotoxic T-cell line (CTL-2) obtained from C57BL/6 mouse spleen was maintained in culture for long periods through the use of T-cell growth factor (IL-2)<sup>(7)</sup>. These cells were washed in HBSS, resuspended in 0.1 ml of culture medium in a concentration of  $1 \times 10^4$  cells, and added to each well of a 96-well microplate (Costar 3596, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.). Serial dilutions of the supernatants (0.1 ml) from the ConA-stimulated T-lymphocyte cultures were added to these cells with alpha methyl mannoside at a final concentration of 0.1 M, and incubated for 24 hr under culture conditions. Thereafter, each well was pulsed with 1  $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H-thymidine (specific activity 6.7 Ci/ $\mu$ mole; New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.). After 18 hr of incubation, the cells were harvested and the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was measured in a beta counter (Packard).

**Functional presence of IL-2 receptors on the surface of T cells.** To test the presence of IL-2 receptors on the surface of T cells from LL patients and controls which had been previously stimulated by ConA for 72 hr (activated T cells)<sup>(1)</sup>, these cells were

harvested, washed twice in HBSS, and placed in a 96-well microplate at a concentration of  $1 \times 10^4$  cells (0.1 ml) per well and at a final concentration of 0.1 M alpha methyl mannoside. Serial dilutions of commercial purified IL-2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) or of IL-2-enriched supernatants from cultures of Wistar rat spleen cells which had been stimulated with ConA were added to the microplate (0.1 ml per well). After 24 hr of incubation under culture conditions, each well was pulsed with <sup>3</sup>H-thymidine as described above. The cells were harvested 18 hr later, and the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was measured<sup>(5,15)</sup>. The data obtained were analyzed by the Student's *t* test.

Results from the 14 LL patients in whom biosynthesis of IL-2 was looked for are expressed in Table 1. It can be seen that the production of IL-2 by previously ConA-stimulated T lymphocytes from LL patients was significantly diminished compared with those from a healthy subject control group ( $p < 0.001$ ).

Table 2 shows the result of adding IL-2 supernatants from rat spleenocytes or commercial purified IL-2 to previously ConA-stimulated T lymphocytes from LL patients in order to show the receptor for IL-2. Such T lymphocytes showed a lower incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine when they were previously stimulated with ConA (mean 24,871) compared with a healthy subject group (mean 75,686) ( $p < 0.01$ ). Although both groups of T cells produced IL-2, the amount produced by those from LL patients was significantly lower than the amount produced by those from normal subjects. However, when these T-activated lymphocytes in both groups (LL patients and controls) were supplemented with exogenous IL-2 added to the cell cultures, the cells from LL patients showed normal activity (mean 10,352) when compared with controls (mean 9198).

It is important to point out that the number of cells tested in the second part of this experiment was lower ( $1 \times 10^4$  cells) than in the first part ( $2 \times 10^5$  cells); this fact explains why the counts per minute (cpm) were lower in this second part.

The group of 20 LL patients represents a heterogeneous group. However, when these

TABLE 1. Stimulation of CTLL-2<sup>a</sup> cells by interleukin-2 present in the culture supernatants of T lymphocytes activated with ConA from patients with lepromatous leprosy and healthy subjects.

Experiment <sup>b</sup>	Counts per minute from		
	Cells plus medium (background)	Cells stimulated with IL-2 supernatants	
		LL patients <sup>c</sup>	Healthy subjects
1	3,966	4,488	31,336
2	3,498	4,336	21,663
3	2,230	4,745	14,106
4	1,786	3,794	20,576
5	3,699	3,184	12,180
6	3,894	3,254	9,168
7	5,870	27,406	37,565
8	5,491	11,261	38,430
9	4,543	2,031	16,293
10	4,220	3,505	16,200
11	4,512	5,014	11,485
12	5,543	6,505	20,530
13	5,810	5,045	21,570
14	5,540	5,306	22,333

<sup>a</sup> Cytotoxic T-lymphocyte line-2 (CTLL-2) from spleen of C57BL/6 mice 10,000 per culture in 0.2 ml medium.

<sup>b</sup> The dilution in which the maximum IL-2 activity was present was 1:256 for all the experiments.

<sup>c</sup> Significantly less than healthy subjects,  $p < 0.001$ , Student's *t* test.

patients were diagnosed all had a positive bacilloscopy and a biopsy with a heavy load of bacilli. Treatment with dapsone was started once they were diagnosed but, unfortunately, as frequently happens, the treatment was not followed in a regular manner. For this reason, bacilloscopy remained positive in all of them for a period of treatment as long as 15 years. Also for this reason, it is difficult to determine the action dapsone could have played (if any) in modifying the immune response of the host.

In the 14 cases studied, the T lymphocytes of LL patients exhibited reduced levels of IL-2 activity. These data suggest that the T cells of the patients may have an alteration in the biosynthesis of IL-2, confirming previous results from Nogueira, *et al.* (13). This may explain the inability of these cells to adequately proliferate after stimulation with mitogens and their inability to help in the control of *M. leprae* infection.

It has been reported in specific systems (7, 8) that when IL-2 is added to T-cell cultures stimulated with *M. leprae* the cells regain their full capacity to proliferate. On the other hand, Mohaghehpour, *et al.* (12) reported that when exogenous IL-2 is added

TABLE 2. Presence of IL-2 receptor on previously ConA-stimulated T lymphocytes obtained from LL patients.

Diagnosis	Counts per minute of			
	Medium (unstimulated)	ConA-stimulated T lymphocytes <sup>a</sup>	Medium (not supplemented)	ConA-activated T lymphocytes <sup>b</sup> supplemented with exogenous IL-2
LL	826 ± 65	32,100 ± 3,440	664 ± 120	16,035 ± 552
LL	1,447 ± 325	13,504 ± 2,444	238 ± 53	14,386 ± 254
LL	1,357 ± 231	22,959 ± 5,002	617 ± 32	6,176 ± 580
LL	1,531 ± 514	39,878 ± 3,590	410 ± 206	6,374 ± 750
LL	1,594 ± 252	28,801 ± 1,825	356 ± 91	8,071 ± 1,040
LL	1,569 ± 205	11,987 ± 958	535 ± 132	10,876 ± 474
Mean ± S.D.	1,387 ± 288	24,871 <sup>c</sup> ± 10,879	470 ± 163	10,352 <sup>d</sup> ± 4,139
Healthy	1,273 ± 44	74,396 ± 5,904	1,064 ± 154	15,376 ± 340
Healthy	924 ± 219	65,730 ± 3,504	864 ± 207	8,573 ± 349
Healthy	2,246 ± 1,651	56,041 ± 7,044	550 ± 118	7,155 ± 900
Healthy	927 ± 118	71,042 ± 2,511	421 ± 122	15,079 ± 278
Healthy	519 ± 74	58,584 ± 3,001	1,228 ± 108	7,042 ± 278
Healthy	643 ± 12	128,291 ± 5,544	909 ± 63	1,964 ± 105
Mean ± S.D.	1,089 ± 780	75,680 ± 26,713	839.5 ± 305	9,198 ± 5,182

<sup>a</sup>  $2 \times 10^5/0.2$  ml lymphocytes were used for these experiments.

<sup>b</sup>  $1 \times 10^4/0.2$  ml lymphocytes were used for these experiments.

<sup>c</sup> Significantly less than healthy subjects,  $p < 0.001$ , Student's *t* test.

<sup>d</sup> No significant difference from healthy subjects.

84

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



to T-cell cultures stimulated with *M. leprae*, they do not regain their capacity to proliferate because they lack the IL-2 receptor. Here, in another system, we have studied the functional presence of the IL-2 receptor on ConA-activated T cells from LL patients, and we have demonstrated that the addition of exogenous IL-2 to cell cultures did, indeed, restore adequate proliferation of ConA-stimulated T cells, thereby implying that the IL-2 receptor was present and functioning on the surface of the LL patients' cells.

Finally, in 3 LL patients with type 2 reaction, in which all of the above-mentioned experiments were done, their ConA-stimulated T cells were incapable of responding to the addition of exogenous IL-2, suggesting that in this particular case (leprosy reaction) the receptor for IL-2 was absent or not functioning. More work is in progress, however, in order to test if this last statement is true or not.

—Alfonso Enrique Islas-Rodriguez, M.Sc.

—Roberto Morales-Ortiz, M.D.

—Mary Fafutis-Morris, M.T.

—Amado González-Mendoza, M.D.

—Liberado Ortiz-Ortiz, Ph.D.

*Instituto de Patología  
Infecciosa y Experimental  
de la Universidad de Guadalajara  
Calle Hospital 278  
Sector Hidalgo  
44280 Guadalajara, Jalisco, México*

#### REFERENCES

- ASHWELL, J. D., ROBB, R. J. and MALEK, T. R. Proliferation of T lymphocytes in response to interleukin 2 varies with their state of activation. *J. Immunol.* **137** (1986) 2572-2578.
- BLOOM, B. R. and MEHRA, V. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol. Rev.* **80** (1984) 5-28.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation, and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21** Suppl. 97 (1968) 77-89.
- CASTELLANOS, C., ISLAS, A. E., GONZÁLES, A., ZAMBRANA, S. and ORTIZ-ORTIZ, L. Lepromatous leprosy; study of some subpopulations of lymphocytes and its functional analysis. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)* **16** (1985) 217-224.
- GILLIS, S., FERM, M. M., OU, W. and SMITH, K. A. Cell growth factor: parameters of production and quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120** (1978) 2027-2032.
- GILLIS, S. and SMITH, K. A. Long term culture of tumor-specific cytotoxic T cells. *Nature* **268** (1977) 154-156.
- HAREGEWOIN, A., GODAL, T., MUSTAFA, A. S., BELEHU, A. and YEMANEBERHAN, T. T-cell conditioned media reverse T-cell unresponsiveness in lepromatous leprosy. *Nature* **303** (1983) 342-344.
- HAREGEWOIN, A., MUSTAFA, A. S., HELLE, I., WATERS, M. F. R., LEIKER, D. L. and GODAL, T. Reversal by interleukin-2 of the T-cell unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium lepraemurium*. *Immunol. Rev.* **80** (1984) 77-86.
- HOFFENBACH, A., LAGRANGE, P. H. and BACH, M.-A. Deficit of interleukin 2 production associated with T cell proliferative response in *Mycobacterium lepraemurium* infection. *Infect. Immun.* **39** (1983) 109-116.
- LIM, S.-D., KISZKISS, D. F., JACOBSON, R. R., CHOI, Y. S. and GOOD, R. A. Thymus-dependent lymphocytes of peripheral blood in leprosy patients. *Infect. Immun.* **9** (1974) 394-399.
- MEHRA, V., MASON, L. H., ROTHMAN, W., REINHARZ, W., SCHLOSSMAN, E. and BLOOM, B. R. Delineation of a human T cell subset responsible for lepromin-induced suppression in leprosy patients. *J. Immunol.* **125** (1980) 1183-1188.
- MOHAGHEGHPOUR, N., GELBER, R. H., LARRICK, J. W., SASAKI, D. T., BRENNAN, P. J. and ENGLEMAN, E. G. Defective cell-mediated immunity in leprosy: failure of T cells from lepromatous leprosy patients to respond to *Mycobacterium leprae* is associated with defective expression of interleukin 2 receptors and is not reconstituted by interleukin 2. *J. Immunol.* **135** (1985) 1443-1449.
- NOGUEIRA, N., KAPLAN, G., LEVY, E., SARNO, E. N., KUSHNER, P., GRANELL-PIPERNO, A., VIERIRA, L., COLOMER GOULD, V., LEVY, W., STEINMAN, R., YIP, Y. K. and COHN, Z. A. Defective  $\gamma$  interferon production in leprosy; reversal with antigen and interleukin 2. *J. Exp. Med.* **158** (1983) 2165-2170.
- RIDLEY, D. S. and JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int. J. Lepr.* **34** (1966) 255-273.
- ROSENBERG, S. A., GRIMM, E. A., MCGROGAN, M., DOYLE, M., KAWASAKI, E., KOTHS, K. and MARK, D. F. Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science* **223** (1984) 1412-1415.
- STRICKLAND, N. H. The influence of immunosuppression and immunodeficiency on infections with leprosy and tuberculosis. *Int. J. Lepr.* **53** (1985) 86-100.

Detection of Interleukin-2 Receptor (IL-2r)  
by Indirect Immunofluorescence with Anti-Tac  
Monoclonal Antibody on the Surface of T Lymphocytes  
from Patients with Lepromatous Leprosy

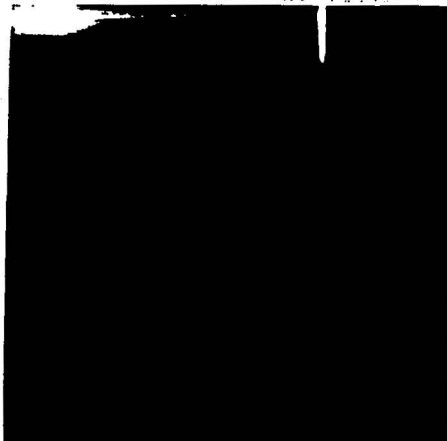
TO THE EDITOR:

We have recently published that lymphocytes from patients with lepromatous leprosy (LL) stimulated with concanavalin A (ConA) are deficient in the synthesis of interleukin-2 (IL-2); however, the cells possess receptors for IL-2 (IL-2r) in such a manner that when activated lymphocytes are cultured *in vitro* and exogenous IL-2 is added, they recover their capacity to proliferate as demonstrated by the incorpora-

tion of tritiated thymidine (<sup>3</sup>H). A demonstration of the physical presence of IL-2r on the surface of T lymphocytes activated with phytohemagglutinin (PHA) by means of indirect immunofluorescence (IIF) using an anti-Tac monoclonal antibody (4, 8, 9, 11) is reported here. (The anti-Tac monoclonal antibody was kindly provided by Dr. T. A. Waldmann, Metabolism Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A., and we thank him for his courtesy.)

Five women and eight men between the ages of 20 and 40 years old were studied at the Instituto Dermatológico de Guadalajara, Jalisco, México. All of them had nodular or diffuse LL, a positive bacilloscopy, and had been receiving irregular treatment with 100 mg of dapsone daily for from 2 to 15 years. The control group consisted of eight healthy persons, of similar sex and age, not related to the patients.

The mononuclear cells from heparinized venous blood were obtained by means of Ficoll-Hypaque and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (?). The IL-2r was studied and detected by IIF (!) on the membrane of the lymphocytes using anti-Tac monoclonal antibody; for this purpose two groups of cells were studied. The first group (To) corresponds to lymphocytes without any stimulation; the second group (T<sub>72</sub>) consisted of lymphocytes previously activated with PHA for 72 hr. Cells ( $1 \times 10^6$ ) obtained from experiments To and T<sub>72</sub> were incubated for 30 min at 4°C with anti-Tac monoclonal antibody diluted 1:500. The cells were then washed and again incubated for 30 min at 4°C with anti-mouse IgG antibody labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.), and were analyzed by fluorescence microscopy. Data were obtained by count-



THE FIGURE. Tac+ cells revealed by indirect immunofluorescence. Anti-Tac monoclonal antibodies are bound to IL-2r and demonstrated by fluorescent anti-mouse IgG antibodies.

ing 300 cells and the percent of Tac+ cells was calculated for each of the studied groups.

The data obtained by IIF show that both the cells from the group of LL patients and those of the control group not activated with PHA (To) had practically no Tac+ cells (The

THE TABLE. Presence of IL-2r on the surface of T lymphocytes by IIF with anti-Tac antibody.

Case	LL cases (N = 13)		Control group (N = 8)	
	To <sup>a</sup>	T <sub>72</sub> <sup>b</sup>	To <sup>a</sup>	T <sub>72</sub> <sup>b</sup>
1	1.0	72.0	0.0	70.3
2	1.0	63.1	0.0	60.0
3	1.5	51.1	3.0	80.0
4	4.7	57.9	0.0	64.4
5	6.4	22.2	2.0	54.7
6	0.6	69.3	1.0	51.4
7	0.0	70.2	0.3	76.8
8	1.0	64.8	2.0	65.0
9	0.9	80.1		
10	0.0	63.0		
11	1.0	62.0		
12	0.0	69.3		
13	0.0	53.0		
Mean ± S.D.	1.3 ± 1.8	60.0 ± 13.4*	1.04 ± 1.08	65.3 ± 9.4*

<sup>a</sup> Mononuclear cells from peripheral blood taken from LL patients and controls without stimuli.

<sup>b</sup> Mononuclear cells cultured 72 hr with PHA (10 µg/ml).

\* Difference not statistically significant; Student's *t* test.

Table). However, in both groups after activation with PHA for 72 hr ( $T_{72}$ ) the percentages were  $60.8 \pm 13.4$  for cells from LL subjects and  $65.3 \pm 9.4$  for the control group. These results were not different statistically when an independent Student's *t* test was performed.

This study demonstrates the physical presence of the IL-2r by the specific union of anti-Tac monoclonal antibodies to the 55-kDa chain of the high-affinity IL-2r<sup>(6-9)</sup>, and confirms that T cells of LL patients truly possess IL-2r but are incapable of proliferating adequately due to the deficiency of IL-2 biosynthesis<sup>(2-4)</sup>. It should be mentioned that Mohaghehpour, *et al.* found similar results using ConA<sup>(5)</sup>, but the percentages of T cells expressing IL-2r (Tac+) were lower than those found by us; this difference is probably due to the fact that PHA is a better inducer of IL-2r<sup>(11)</sup>.

—Mary Fafutis-Morris, M.Sc.  
Silvia Mejia-Arreguin, M.T.  
Amado Gonzalez-Mendoza, M.D.

Unidad de Investigacion  
Biomedica de Occidente  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Division de Patologia Experimental  
Sierra Mojado 800  
Guadalajara, Jalisco, Mexico

—Roberto Morales-Ortiz, M.D.

Instituto Dermatologico de  
Guadalajara SSA  
Guadalajara, Jalisco, Mexico

—Alfonso Islas-Rodriguez, M.Sc.

Instituto de Patologia Infecciosa  
y Experimental  
Universidad de Guadalajara  
Guadalajara, Jalisco, Mexico

#### REFERENCES

- COONS, A. H. Histochemistry with labeled antibody. *Int. Rev. Cytol.* 5 (1956) 1-4.
- HARBEGWON, A., MUSTAFA, A. S., HELLE, I., WATERS, M. F., LEIKER, D. L. and GODAL, T. Reversal by interleukin-2 of the T-cell unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium leprae*. *Immunol. Rev.* 80 (1984) 76-86.
- ISLAS, R. A., MORALES, O. R., FAFUTIS, M. M., GONZALEZ, M. A. and ORTIZ, O. L. Deficiency in the biosynthesis of interleukin-2 (IL-2) and functional presence of the IL-2 receptor in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* 55 (1987) 566-569.
- LEONARD, W. J., DEPPER, J. M., UCHIYAMA, T., SMITH, A. and WALDMANN, T. A. A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. *Nature* 300 (1982) 267-269.
- MOHAGHEHPOUR, N., GELBER, R. H., LARRICK, J. W., SASAKI, D. T., BRENNAN, P. J. and ENGLEMAN, E. G. The effective cell-mediated immunity in leprosy: failure of T cells from lepromatous leprosy patients to respond to *Mycobacterium leprae* is associated with the defective expression of interleukin-2 receptors and is not reconstituted by interleukin-2. *J. Immunol.* 135 (1985) 1433-1449.
- NOGUEIRA, N., KAPLAN, G., LEVY, E., SARNO, E. N., KUSHNER, P., GRANELLI-PIPERNO, A., VIEIRA, L., GOULD, V. C., LEVIS, W., STEINMAN, R., YIP, Y. K. and COHN, Z. A. Defective  $\gamma$  interferon production in leprosy: reversal with antigen and interleukin 2. *J. Exp. Med.* 158 (1983) 2165-2170.
- RIDLEY, D. S. and JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int. J. Lepr.* 34 (1966) 255-273.
- ROBB, R. J., GREENE, N. C. and RUSJ, C. M. Low and high affinity cellular receptors for interleukin-2; implications for the level of Tac antigen. *J. Exp. Med.* 160 (1983) 1126-1146.
- ROBB, R. J., MUNCK, A. and SMITH, K. A. T cell growth factor receptors; quantification, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154 (1982) 1455-1474.
- SMITH, K. A. The 2-chain structure of high-affinity IL-2 receptors. *Immunol. Today* 8 (1987) 11-14.
- UCHIYAMA, T., BRODER, S. and WALDMANN, T. A. I. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.* 126 (1981) 1393-1397.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Response to Phytohemagglutinin of LL Patients' Lymphocytes Preincubated in Culture Media

### TO THE EDITOR:

Patients with leprosy present a well-known, wide spectrum of clinical manifestations (1). Recently, we have published that lymphocytes from lepromatous (LL) patients stimulated with T mitogens are deficient in the synthesis of interleukin-2 (IL-2). However, the cells possess receptors for IL-2 (3,4). Mohagheghpour, *et al.* (6) have published that the failure of T lymphocytes from LL patients to respond to *Mycobacterium leprae* was associated with the defective expression of IL-2 receptors, and that this deficiency was not corrected by exogenous IL-2. Later, they reported (7) that when T lymphocytes from LL patients were preincubated in culture media for 48 hr and then stimulated with specific antigen, the cells recovered their ability to proliferate.

According to the above, we wondered if T cells from LL patients were also able to recover their capacity of proliferation when they were preincubated in culture media and then stimulated with a nonspecific T mitogen, such as phytohemagglutinin (PHA).

**Study subjects.** Based on Mohagheghpour, *et al.*'s patients' classifications (5) as "responders" and "nonresponders," we tested 23 patients (8 "responders" and 15 "nonresponders") from the Instituto Dermatologico at Guadalajara, Jalisco, Mexico, diagnosed as having LL according to international criteria (7).

**Mononuclear cells.** Heparinized blood (20 IU/ml) was obtained from each subject by venipuncture. After centrifugation on a Ficoll-hypaque gradient (1), the mononuclear cells were recovered and washed. The

THE TABLE. Response to phytohemagglutinin of LL patients' lymphocytes preincubated in culture media.

	Nonpreincubated lymphocytes		Preincubated lymphocytes	
	$\Delta$ cpm <sup>a</sup> (mean $\pm$ S.D.)	SI <sup>b</sup>	$\Delta$ cpm <sup>a</sup> (mean $\pm$ S.D.)	SI <sup>b</sup>
Nonresponders				
	1,592 $\pm$ 97	1.0	1,553 $\pm$ 547	1.9
	6,409 $\pm$ 212	1.0	7,734 $\pm$ 349	1.2
	16,295 $\pm$ 2,400	3.4	18,606 $\pm$ 2,294	2.9
	14,193 $\pm$ 305	2.7	17,013 $\pm$ 4,512	2.9
	14,643 $\pm$ 644	3.2	9,485 $\pm$ 285	1.0
	4,912 $\pm$ 1,013	3.2	17,934 $\pm$ 1,742	10.3
	2,845 $\pm$ 324	2.7	1,780 $\pm$ 190	2.4
	1,417 $\pm$ 190	1.8	5,350 $\pm$ 110	3.7
	7,853 $\pm$ 58	1.1	15,641 $\pm$ 192	3.8
	7,475 $\pm$ 239	1.0	7,961 $\pm$ 452	1.2
	11,424 $\pm$ 1,654	4.3	16,145 $\pm$ 1,686	5.2
	10,404 $\pm$ 574	3.9	20,072 $\pm$ 2,093	6.3
	10,560 $\pm$ 789	4.2	5,971 $\pm$ 193	4.4
	1,361 $\pm$ 153	2.5	3,359 $\pm$ 341	5.6
	15,803 $\pm$ 1,059	5.7	2,850 $\pm$ 186	1.4
Mean $\pm$ S.D.	8,479 $\pm$ 647	2.8	10,096 $\pm$ 1,011	3.6
Responders				
	25,296 $\pm$ 2,228	5.2	27,865 $\pm$ 228	4.8
	18,897 $\pm$ 162	14.5	26,899 $\pm$ 2,514	23.7
	36,860 $\pm$ 3,069	29.3	56,069 $\pm$ 3,245	35.4
	72,312 $\pm$ 3,051	35.7	84,721 $\pm$ 238	39.0
	30,288 $\pm$ 2,189	21.7	47,339 $\pm$ 3,609	36.3
	17,682 $\pm$ 519	7.0	26,921 $\pm$ 2,980	7.0
	39,286 $\pm$ 1,194	28.0	52,776 $\pm$ 2,180	33.8
	28,410 $\pm$ 1,798	27.3	7,667 $\pm$ 741	4.1
Mean $\pm$ S.D.	33,628 $\pm$ 1,776	21.0	41,282 $\pm$ 1,966	23.0

<sup>a</sup>  $\Delta$  cpm = Increase of counts per minute of nonstimulated cells to counts per minute of stimulated cells in culture.

<sup>b</sup> SI = Stimulation index (ratio between stimulated and nonstimulated cells in culture).

No significant differences between responses of nonpreincubated and preincubated lymphocytes were found.

cells were then resuspended in RPMI 1640 culture medium (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.) and supplemented as previously reported (\*).

**Lymphoproliferation assay.** To  $2 \times 10^5$  mononuclear cells, 10  $\mu$ g/ml PHA or supplemented RPMI 1640 medium was added. The cultures were incubated for 48 hr at 37°C in a mixture of 95% air-5% CO<sub>2</sub>. Thereafter they were pulsed with 1  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-thymidine (specific activity 6.7 Ci/ $\mu$ mole; New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.). After 24-hr incubation, the cells were harvested, and the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was measured in a Packard beta counter (\*).

**Preincubation.** Simultaneously,  $2 \times 10^5$  mononuclear cells were incubated for 48 hr at 37°C in a mixture of 95% air-5% CO<sub>2</sub>.

Thereafter they were assayed for lymphoproliferation as mentioned above.

The results from the eight patients of the "responder" group showed that in 2 (patients nos. 2 and 5) of the 8 patients the T cells increased their proliferation capacity (The Table). On the other hand, T lymphocytes from only 1 (patient no. 6) of the 15 LL patients of the "nonresponder" group did not recover that capacity.

Mohaghehpour, *et al.* (\*) have shown that the inability of T lymphocytes from LL patients to proliferate in response to specific antigen was reversible if the cells were preincubated in culture medium alone for 48 hr. This fact suggests that in those conditions an excess of *M. leprae* antigen is released or that the cell surface receptors are re-expressed. Based on this study (\*), we tried

to ascertain whether the inability of T lymphocytes from LL patients to proliferate in response to PHA stimulation was also reversible by preincubating those cells.

This hypothesis was not confirmed; our results showed that in only 3 of 23 cases did T lymphocytes from LL patients recover proliferation capacity. These results are not in contradiction with those obtained by Mohaghehpour, *et al.* who used specific antigen for proliferation of T cells. They only show that PHA cannot induce proliferation under the above-mentioned conditions, that perhaps the failure of T lymphocytes to respond to the mitogen stimulus is due to inadequate calcium metabolism, T-cell cycle and IL-2 synthesis (\*) and not to the steric obstruction of the receptor to PHA with *M. leprae* antigen.

—Mary Fafutis-Morris, M.Sc.  
Fernando Alfaro-Bustamante, M.Sc.  
Amado Gonzalez-Mendoza, M.D.  
Roberto Morales-Ortiz, M.D.  
Alfonso E. Islas-Rodriguez, M.Sc.

Centro de Investigacion  
en Inmunologia y Dermatologia  
Universidad de Guadalajara  
Apartado Postal 51-189  
Col. Las Aquilas  
Guadalajara, Jalisco 45080, Mexico  
Reprint requests to A. E. Islas-Rodriguez.

#### REFERENCES

1. BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 Suppl. 197 (1988) 77-85.
2. BULLOCK, W. E. Leprosy: a model of immunological perturbation in chronic infection. *J. Infect. Dis.* 137 (1981) 341-354.
3. FAFUTIS-MORRIS, M., MEJIA-ARREGUIN, S., GONZALEZ-MENDOZA, A., MORALES-ORTIZ, R. and ISLAS-RODRIGUEZ, A. E. Detection of interleukin-2 receptor (IL-2r) by indirect immunofluorescence with anti-Tac monoclonal antibody on the surface of T lymphocytes from patients with lepromatous leprosy. (Letter) *Int. J. Lepr.* 58 (1990) 126-128.
4. ISLAS-RODRIGUEZ, A. E., MORALES-ORTIZ, R., FAFUTIS-MORRIS, M., GONZALEZ-MENDOZA, A. and ORTIZ-ORTIZ, L. Deficiency in the biosynthesis of interleukin-2 (IL-2) and functional presence of the IL-2 receptor in lepromatous leprosy. (Letter) *Int. J. Lepr.* 55 (1987) 566-569.
5. MOHAGHEHPOUR, N., GELBER, R. H. and ENGLEMAN, E. G. T cell defect in lepromatous leprosy is reversible in vitro in the absence of exogenous growth factors. *J. Immunol.* 138 (1987) 570-574.
6. MOHAGHEHPOUR, N., GELBER, R. H., LARRICK, J. W., SASAKI, D. T., BRENNAN, P. J. and ENGLEMAN, E. G. Defective cell-mediated immunity in leprosy: a failure of T cells from lepromatous leprosy patients to respond to *Mycobacterium leprae* is associated with the defective expression of interleukin-2 receptors and is not reconstituted by interleukin-2. *J. Immunol.* 135 (1985) 1433-1449.
7. RIDLEY, D. S. and JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int. J. Lepr.* 34 (1966) 255-273.
8. THEODOROU, I. D., BOUSMELL, L., CALVO, C.-F., GOUY, H., BERAL, H. M. and DEBRE, P. CD1 stimulation of human T cell lines induces a rapid increase in the intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration and the production of IL-2. *J. Immunol.* 144 (1990) 2518-2523.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Recognition of *Mycobacterium leprae* Antigens with Antibodies Present in Sera from Patients with Lepromatous Leprosy<sup>1</sup>

Alfonso E. Islas-Rodríguez, Cecilia M. Guillén-Vargas,  
Mary Fafutis-Morris, Fernando Alfaro-Bustamante,  
Roberto Morales-Ortiz, Amado Gonzalez-Mendoza, and  
Iris Estrada-Parra<sup>2</sup>

As has been described in the literature<sup>(6)</sup>, there are a great many antigens obtained from *Mycobacterium leprae* with different biochemical compositions that are recognized by antibodies from patients with leprosy or that inhibit the function of human T lymphocytes<sup>(2-5)</sup>. One of these antigens is phenolic glycolipid-I (PGL-I)<sup>(7,18)</sup> which appears to be significant in the diagnosis of the multibacillary lepromatous form of leprosy but not of the tuberculoid form<sup>(15)</sup>. Recently, SDS-PAGE and Western blot techniques have been used as methods for obtaining a marker of the disease, using the antibodies present in the sera from leprosy patients to study the recognition of *M. leprae* proteins<sup>(3,8,15)</sup>. One practical approach to the use of these markers should be to ascertain when a household contact subject is at risk of becoming infected and then moving to the lepromatous or tuberculoid type of the disease.

Here we report, using a sonic extract of *M. leprae* in SDS-PAGE and Western blot techniques, the presence of antigenic markers for lepromatous leprosy cases, for their

contacts, and for normal subjects using the frequency analysis described by Larralde, *et al.*<sup>(10)</sup>.

### MATERIALS AND METHODS

**Subjects (sera).** Twenty-one patients (10 males, 11 females) between the ages of 20-65 years from the Instituto Dermatológico at Guadalajara, Jalisco, México, were diagnosed as having lepromatous leprosy according to international criteria<sup>(13)</sup>. All of them received an irregular treatment of 100 mg of dapsone per day. The length of treatment ranged from 2 to 15 years.

Sera were obtained from the 21 patients by venipuncture. Sera were also collected from 19 contacts of the patients as a second study group (10 males and 9 females between 20 and 50 years old). The control group consisted of 20 clinically normal subjects, all matched with the two study groups for sex and age as much as possible. All sera were divided into three parts and frozen at -20°C until used.

**Antigens.** Sonic extracts of *M. leprae* from armadillo were prepared according to the Draper protocol<sup>(17)</sup>. Briefly, the spleen of armadillos infected 1 year before with a human leproma were obtained, homogenized, resuspended in DNase buffer solution, and purified in Percoll gradients. Finally, the purified bacilli obtained were sonicated at 100 W, centrifuged at 10,000 × g, and the soluble supernatant adjusted to 1000 µg/ml of protein by the method of Lowry, *et al.*<sup>(12)</sup>.

**Western blots.** The sonic extracts were fractionated in 10% SDS-PAGE under reducing conditions<sup>(9)</sup> at 150 V for 60 min using Bio-Rad minigel equipment (Bio-Rad Lab-

<sup>1</sup> Received for publication on 7 July 1992; accepted for publication in revised form on 20 January 1993.

<sup>2</sup> A. E. Islas-Rodríguez, M.Sc.; C. M. Guillén-Vargas, M.T.; M. Fafutis-Morris, M.Sc.; R. Morales-Ortiz, M.D.; A. Gonzalez-Mendoza, M.D., Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología, Universidad de Guadalajara/Instituto Dermatológico de Guadalajara (SSBS), Apartado Postal 51-189, Colonia Las Águilas, 45080 Guadalajara, Jalisco, México. F. Alfaro-Bustamante, M.Sc., Dirección de Desarrollo Académico, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. I. Estrada-Parra, Ph.D., Laboratorio de Inmunología Molecular II del Departamento de Investigación de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México.  
Reprint requests to A. E. Islas-Rodríguez.





FIG. 1. Western blots of sera from patients with lepromatous leprosy, their contacts, and normal subjects reacting with sonic extract of *M. leprae*.

oratories, Richmond, California, U.S.A.). The fractionated proteins were then transferred<sup>(14)</sup> to 0.45- $\mu$ m nitrocellulose sheets (Bio-Rad) overnight at 4 mA. The sheets were reversibly dyed with Amido black to test the molecular weight of the transferred proteins, washed in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, dried, cut into 3  $\times$  65-mm wide strips, and placed in individual plastic tracks. They were blocked with 5% skim milk in PBS-0.1% Tween 20, and incubated 1.5 hr with a 1:50 dilution of each serum. They were washed three times for 10 min each with PBS-Tween 20, and incubated with a second peroxidase-conjugated goat antibody against human IgG for 1 hr, then washed again three times. The substrate (diaminobenzidine; Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.) was added in 10 ml of PBS plus 20  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70  $\mu$ l of a 1% calcium chloride solution for the development of color. The reactions were stopped by washing the membranes with distilled water. The strips were washed, dried, and photographed. The intensity of each band was determined by two different observers and classified as highly positive (++) or slightly positive (+). The molecular weight of each band was calculated according to molecular markers (Sigma) previously included in the gels and transferred to the sheets.

**Analysis of frequency of antigen recognition.** The so-called Immunoplot method

proposed by Larralde, *et al.*<sup>(10)</sup> was used to analyze the frequency of antigen recognition. Briefly, the recognition frequency from 0 to 1 of each individual antigen in the Western blot is plotted against each set of sera from lepromatous patients, their contacts, and normal subjects. This method allows the immediate identification of antigens reacting only with normal sera (y axis) or lepromatous sera (x axis), or antigenic bands that are recognized by both sets of sera (plane between both axes). This method considers that a band plotted on one of the axes (for example, on x or y) with a frequency above 0.5 constitutes a specific marker; bands recognized by both sera lack significance<sup>(10)</sup>.

## RESULTS

**Western blots.** Illustrative Western blots of the *M. leprae* antigens reacting with sera from lepromatous patients and their contacts, as well as with sera from normal subjects, are shown in Figure 1 (molecular weight markers are shown on the left). Sera from lepromatous patients recognized 21 bands of molecular weights ranging from 97-14 kDa. The sera from their contacts recognized 18 different bands ranging in the same interval (97-14 kDa). Sera from normal subjects recognized 19 bands.

**Immunoplots.** The immunoplot of frequencies showed that sera from lepromatous patients frequently recognized two pro-

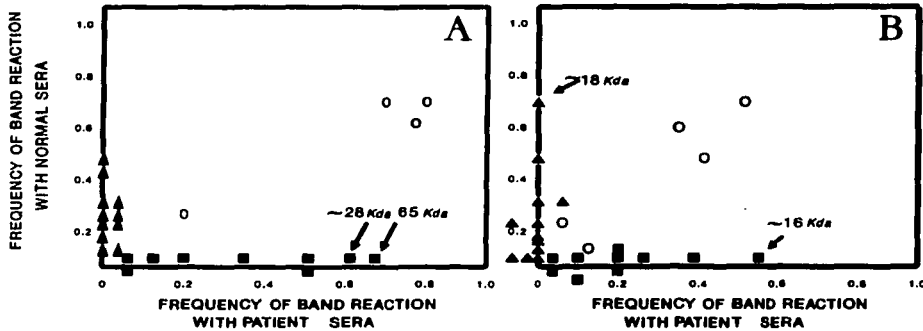


FIG. 2. Immunoplots of (A) lepromatous patients versus normal individuals and (B) household contacts versus normal individuals as they reacted with antigens of *M. leprae*. In A we see the approximately 28-kDa and 65-kDa frequently recognized antigens as markers of lepromatous leprosy. In B we see the approximately 16-kDa frequently recognized antigen as a marker of the contacts, and the approximately 18-kDa antigen as a possible marker of normal individuals.

teins—one of approximately 28 kDa ( $f = 0.63$ ), the other of approximately 65 kDa ( $f = 0.68$ )—when compared with normal subjects' sera which did not recognize significantly any antigenic band (Fig. 2A). Several proteins from *M. leprae* were frequently recognized by both sets of sera (plane between the axes). Figure 2B shows the immunoplot of frequencies, comparing data from Western blots with sera from contacts (x axis) against sera from normal subjects (y axis). Here we can see that sera from contacts frequently ( $f = 0.57$ ) recognized an approximately 16-kDa antigenic band, while sera from normal subjects frequently ( $f = 0.65$ ) recognized one protein of approximately 18-kDa molecular weight. Here, again, there were several nonsignificant antigenic bands that were recognized by both sets of sera.

#### DISCUSSION

Inspection of the bands recognized by the antibodies present in sera from lepromatous patients, their contacts, and normal subjects in Western blots is not an easy task. The use of immunoplots as described by Larralde, *et al.* (<sup>10</sup>) has made it possible to order the results from immunoelectrotransferences in such a way that complex mixtures of antigens from mycobacteria can be categorized immediately in a quantitative and specific manner. This method constitutes a useful and potent method for discriminating bands of potential biologic significance.

In our study, therefore, the four recognized proteins of approximately 65, 28, 18 and 16 kDa can be considered markers for lepromatous patients, their household contacts, or control subjects. From these *M. leprae* antigens, an easy serological test (such as an ELISA) can be developed in order to predict if a household contact is moving toward the lepromatous state of leprosy before the detection of clinical symptoms. It is necessary to use gradient and bidimensional SDS-PAGE and monoclonal antibodies (<sup>16</sup>) to ascertain whether the protein of approximately 16 kDa (found as a marker in contacts) and the approximately 18 kDa polypeptide (found as a marker in normal subjects) could, in fact, be the same protein. Dockrell, *et al.* (<sup>4</sup>) have reported that an 18-kDa polypeptide from *M. leprae* induced the proliferation of CD4 T lymphocytes. Therefore, this 18-kDa protein frequently recognized in normal subjects and, perhaps, by contacts in our study could be involved in protective immunity. We are performing the necessary experiments to ascertain if, indeed, this is true (<sup>11</sup>).

#### SUMMARY

A great diversity of antigens from *Mycobacterium leprae* have been described. One practical approach should be to utilize them as markers to indicate when a household contact is at risk of becoming infected and then moving to an active form of leprosy.

94

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

For this purpose, sonic extracts of *M. leprae* were fractionated in 10% SDS-PAGE under reducing conditions. The fractionated proteins were then transferred to nitrocellulose sheets and incubated with sera from lepromatous leprosy cases, their contacts, and normal subjects in order to reveal the frequency of antigen recognition of each set of sera. The results showed that sera from lepromatous leprosy patients frequently recognized two proteins, one of approximately 28 kDa and the other of approximately 65 kDa, when compared with the sera from normal subjects. The contacts frequently recognized an approximately 16-kDa antigenic band, while sera from normal subjects recognized one protein of approximately 18 kDa. According to the results, the four recognized proteins from *M. leprae* can be considered markers of the above conditions (approximately 65 kDa, approximately 28 kDa for lepromatous leprosy, approximately 16 kDa for contacts, and approximately 19 kDa for normal subjects). From these, an easy serological test, such as an ELISA, can be developed to predict if a contact is moving toward lepromatous leprosy before detection of the actual clinical signs or symptoms.

### RESUMEN

Se ha descrito una gran variedad de antígenos del *Mycobacterium leprae*. Una aplicación práctica de esto podría ser la utilización de estos antígenos como marcadores del riesgo que tienen los contactos de infectarse y de moverse después hacia alguna forma activa de la lepra. Con este propósito se fraccionaron extractos sonicados de *M. leprae* por PAGE-SDS en geles al 10% bajo condiciones de reducción. Las proteínas fraccionadas se transfirieron después a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con sueros de casos de lepra lepromatosa, de sus contactos, y de sujetos normales, para poder revelar la frecuencia de reconocimiento antigénico de cada juego de sueros. Los resultados mostraron que los sueros de los pacientes lepromatosos reconocieron frecuentemente dos proteínas, una de aproximadamente 28 kDa y otra de aproximadamente 65 kDa, los contactos reconocieron frecuentemente una banda de aproximadamente 16 kDa, y los sueros de los individuos normales reconocieron una proteína de aproximadamente 18 kDa. De acuerdo a estos resultados, las cuatro proteínas reconocidas del *M. leprae* podrían considerarse como marcadores de las condiciones anteriores (aproximadamente 65 kDa y aproximadamente 28 kDa para lepra lepromatosa, aproximadamente 16 kDa para contactos, y aproximadamente 19 kDa para individuos sanos). Con

base en los resultados señalados, se podría desarrollar una prueba serológica, tal como un ELISA, para predecir el desplazamiento de un contacto hacia el extremo lepromatoso de la lepra, antes de la aparición de los síntomas y signos clínicos de la enfermedad.

### RÉSUMÉ

Une grande diversité d'antigènes en provenance de *Mycobacterium leprae* ont été décrits. Une approche orientée vers la pratique pourrait être de les utiliser comme marqueurs pour indiquer quand un contact domiciliaire est à risque de s'infecter et ensuite de migrer vers une forme active de lèpre. Dans ce but, des extraits soniques de *M. leprae* ont été fractionnés par SDS-PAGE à 10% dans des conditions réductrices. Les protéines fractionnées ont alors été transférées sur des membranes de nitrocellulose et incubées avec du serum de patients lépromateux, leurs contacts et des sujets en bonne santé, afin d'étudier la fréquence de reconnaissance de l'antigène dans chaque set de sérums. Les résultats ont montré que les sérums de malades lépromateux reconnaissaient fréquemment deux protéines, l'une d'environ 28 kDa et l'autre d'environ 65 kDa, par comparaison avec les sérums des personnes en bonne santé. Les contacts reconnaissaient fréquemment une bande antigénique d'approximativement 16 kDa, tandis que les sérums provenant d'individus sains reconnaissaient une protéine d'environ 18 kDa. D'après les résultats, les quatre protéines provenant de *M. leprae* qui ont été reconnues peuvent être considérées comme des marqueurs des conditions ci-dessus (environ 65 kDa et environ 28 kDa pour la lèpre lépromateuse, environ 16 kDa pour les contacts et environ 19 kDa pour les individus en bonne santé). A partir de celles-ci, un test sérologique aisé, tel qu'un ELISA, peut être développé afin de prédire, avant la détection des signes cliniques ou des symptômes, si un contact est en train de migrer vers une lèpre lépromateuse.

**Acknowledgment.** This work was supported in part by the postgraduate program of the Facultad de Medicina of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) under the tutory of Dra. Cecilia Kimenez at the Departamento de Medicina Experimental.

### REFERENCES

1. ABOU-ZEID, C., FILLEY, E., STEELE, J. and ROOK, G. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. *J. Immunol. Meth.* **90** (1987) 5-10.
2. BRITTON, W., BELLOVIST, J., GARSIA, R. and BASTEN, A. Antigens of *Mycobacterium leprae* identified by immunoprecipitation with sera from leprosy and tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* **71** (1988) 394-398.
3. CHAKRABARTY, A., MAIRE, A. and LAMBERT, P. SDS-PAGE analysis of *M. leprae* protein antigens

- reacting with antibodies from sera from lepromatous patients and infected armadillos. Clin. Exp. Immunol. 49 (1982) 523-531.
4. DOCKRELL, H., STOKER, N., LEE, S., JACKSON, M., GRANT, K., JOUY, N., LUCAS, S., HASAN, R., HUSSAIN, R. and MCADAM, K. T cell recognition of the 18-kDa antigens of *Mycobacterium leprae* Infect. Immun. 57 (1989) 1979-1983.
  5. FOURNIE, J., ADAMS, E., MULLINS, R. and BASTEN, A. Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenol glycolipid. Infect. Immun. 57 (1989) 3653-3659.
  6. HASTINGS, R., GILLIS, T., KRAHENBUHL, J. and FRANZBLAU, S. Leprosy. Clin. Microbiol. Rev. 1 (1988) 330-348.
  7. HUNTER, S. and BRENNAN, P. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. J. Bacteriol. 147 (1981) 728-735.
  8. KLATSER, P., VAN RENS, M. and EGGELTE, T. Immunochemical characterization of *Mycobacterium leprae* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis immunoperoxidase technique (SGIP) using patients' sera. Clin. Exp. Immunol. 56 (1984) 537-544.
  9. LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970) 680-685.
  10. LARRALDE, C., MONTOYA, R., SCIUTTO, E., DIAZ, M., GOVEZENSKY, T. and COLTORI, E. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Equinococcus granulosus*, and *Taenia crassisepe*) reacting with sera from neurocisticercosis and hydatidic disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40 (1989) 282-290.
  11. LEE, S., STOKER, N., GRANT, K., HANDZEL, Z., HUSSAIN, R., MCADAM, K. and DOCKRELL, H. Cellular immune response of leprosy contacts to fractionated *Mycobacterium leprae* antigens. Infect. Immun. 57 (1989) 2475-2480.
  12. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-270.
  13. RIDLEY, D. and JOPLING, W. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. Int. J. Lepr. 34 (1966) 255-273.
  14. TOWBIN, H., STAEBELIN, T. and GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (1979) 4350-4354.
  15. VEGA-LOPEZ, F., STOKER, N., LOCNISKAR, M., DOCKRELL, H., GRANT, K. and MCADAM, K. Recognition of mycobacterial antigens by sera from patients with leprosy. J. Clin. Microbiol. 26 (1988) 2474-2479.
  16. WATSON, J. Leprosy: understanding protective immunity. Immunol. Today 10 (1989) 218-221.
  17. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the fifth meeting of the Scientific Working Group on the Immunology of Leprosy (IMMLEP). Geneva; World Health Organization, 1990, Annex 4, p. 3. TDR/IMM-LEP-SWG (5) 80.3.
  18. YOUNG, D. and BUCHANAN, T. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. Science 221 (1983) 1057-1059.

## Effect of Phorbol Myristate Acetate (PMA) and Ionophore A23187 on Interleukin-2 Levels and Proliferation of Activated T Lymphocytes from Patients with Lepromatous Leprosy<sup>1</sup>

Fernando Alfaro-Bustamante, Gabriela Ramirez-Flores, Amado Gonzalez-Mendoza, Alfonso Islas-Rodriguez, and Mary Fafutis-Morris<sup>2</sup>

Lepromatous leprosy is characterized, among other peculiarities, by an antispecific energy of the cellular immune response (<sup>10</sup>). This immunodeficiency consists of the limited proliferation of T lymphocytes, and is explained in part by the impaired synthesis of interleukin-2 (IL-2) (<sup>12, 19</sup>). In normal resting T cells, antigens or mitogens induce their proliferation by means of the synthesis of IL-2 and its receptor; the participation of diacylglycerol (DAG) and calcium, that produce the activation of protein kinase C (PKC) (<sup>17, 23</sup>), is mandatory. Phorbol esters such as PMA can substitute for DAG and are mitogenic to human T and B cells, producing membrane alterations, modulation of cell-surface receptors (<sup>3, 5, 7, 11, 15, 18</sup>) and activation of several cytokine-encoding genes (<sup>3, 5, 13, 15</sup>).

Ionophore A23187 increases calcium permeability across the cellular membrane into the cytosol of lymphoid cells, and is considered by several authors as a co-mitogen of T lymphocytes (<sup>1, 16, 24</sup>). We report here the use of PMA, an analog of DAG and ionophore

A23187 (calcium increaser), in cultures of mitogen-activated T lymphocytes from lepromatous leprosy patients in order to induce the expression of the IL-2 gene, thus correcting the inadequate proliferation of T cells from these lepromatous patients.

### MATERIALS AND METHODS

**Study subjects.** Twenty-two patients, 11 males and 11 females between the ages of 20 and 65 years, from the Instituto Dermatológico at Guadalajara, Jalisco, Mexico, were diagnosed as having polar lepromatous leprosy (LL) according to international criteria (<sup>21</sup>). All presented positive bacilloscopy and all received an irregular treatment of 100 mg of dapsone (diaminodiphenyl sulfone) per day. The length of treatment ranged from 2 to 15 years. The control group consisted of 20 normal subjects, all matched with the study group for sex and age as much as possible.

**Mononuclear cells.** Heparinized blood (20 IU/ml) was obtained from each subject by venipuncture. After the blood had been centrifuged on a Ficoll-Hypaque gradient (<sup>6</sup>) at 400 × g, the mononuclear cells were recovered and washed three times with Hanks' balanced salt solution (HBSS). The cells were then suspended in RPMI 1640 culture medium (GIBCO, Grand Island, New York, U.S.A.) supplemented with 5% heat inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 10 mM HEPES, 5 × 10<sup>-5</sup> M 2-mercaptoethanol, and penicillin 100 U/ml, and streptomycin 100 µg/ml. Finally, the cells were adjusted to 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml (<sup>12</sup>).

**Proliferation assay.** In order to activate T cells from these LL patients, 10 µg/ml of

<sup>1</sup> Received for publication on 13 February 1995; accepted for publication in revised form on 20 November 1996.

<sup>2</sup> F. Alfaro-Bustamante, M.Sc.; A. Islas-Rodriguez, M.Sc.; Laboratorio de Inmunobiología, Departamento Biología Celular y Molecular, División Ciencias Biológicas y Ambientales, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico. G. Ramirez-Flores, M.T.; A. Gonzalez-Mendoza, M.D.; M. Fafutis-Morris, M.Sc.; Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología, Universidad de Guadalajara/Instituto Dermatológica de Jalisco, Apartado Postal 5-149, C.P. 45040 Col. Chapalita, Guadalajara, Jalisco, Mexico.

Reprint requests to Mary Fafutis-Morris.

phytohemagglutinin (PHA) was added to  $2 \times 10^5$  mononuclear cells, and/or 10 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA), and/or 1  $\mu$ g of ionophore A23187 to the corresponding well, i.e., all possible combinations among the three reagents. The cultures were incubated for 48 hr at 37°C in a mixture of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Thereafter, they were pulsed with 1  $\mu$ Ci of <sup>3</sup>H-thymidine (specific activity 6.7 Ci/ $\mu$ mole; New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A.).

After a 24-hr incubation, the cells were harvested, and the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was measured in a Packard beta counter. The results were expressed as a stimulation index (SI) according to the following (<sup>19</sup>):

$$SI = \frac{\text{cpm of experimental}}{\text{cpm of medium}}$$

**IL-2 assay.** The Quantikine Human IL-2 Immunoassay (R and D Systems, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.) was used for the quantitative determination of human IL-2 concentrations present in the culture supernatants after 48 hr (<sup>20</sup>).

## RESULTS

The Table presents the results of experiments measuring the T-cell proliferation by means of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation (SI) in PHA-stimulated cell cultures. It can be observed that PHA-activated T lymphocytes from LL patients can be separated into two groups: 1) 9 responders (R) with a SI of > 10 and 13 nonresponders (NR) with a SI of < 10.

Figure 1 shows the proliferative responses of cells from LL(R), LL(NR), and normal subjects stimulated with: I, PHA, PMA, PMA+I, PHA+PMA and PHA+PMA+ionophore (PPI). It can be seen that ionophore A23187 alone does not cause proliferation. The most important result occurs in LL(NR) patients since their cells that do not respond to PHA stimulation alone increase their proliferation to normal levels when they are stimulated with PHA in the presence of PMA. When lymphocytes from LL(NR) patients are stimulated with PMA+I, they again are less responsive than the LL(R) patients and normal controls. On the other hand, all three groups

THE TABLE. Stimulation index (SI) of activated T lymphocytes from LL patients [responders (R) and nonresponders (NR)] and controls.\*

LL patients		Controls
R	NR	SI
SI	SI	SI
35	6.3	10
13	1.7	14
26	4.3	21
29	7.4	12
37	2.0	39
11	4.0	17
46	1.0	48
17	5.2	37
17	2.0	27
	1.2	11
	5.0	26
	2.6	36
	1.9	21
		15
Mean 25.6	Mean 3.4	Mean 23.8
p < 0.0005	p < 0.005	
S.E. = 4	S.E. = 2	S.E. = 3.24

\*The range of the cpm values in the cultures receiving medium alone in the LL(R) patients was 1195–2199 cpm; in the LL(NR) group, 753–2437 cpm; in controls, 984–2648 cpm.

(NR, R and normals), strongly increased their responses when they were incubated with PPI.

The significance levels of the differences in each of the following combinations used in the cell cultures from LL(R), LL(NR) and normal subjects were: for PHA,  $p < 0.001$  (NR vs each of the other two groups); for PMA,  $p < 0.004$  (R vs each of the other two groups); when PMA+I was used,  $p < 0.03$  (R vs each of the other two groups); PHA+PMA,  $p < 0.3$  (no differences among groups) and, finally, PPI,  $p < 0.001$  (NR vs each of the other groups).

In Figure 2, the IL-2 concentration in the supernatants of cultures of T lymphocytes from LL(NR), LL(R) and controls stimulated with I, PHA, PMA, PMA+I, PHA+PMA and PPI are shown. It can be seen that cells from LL(NR) and LL(R) patients and normals do not produce detectable IL-2 levels in the presence of ionophore A23187 alone, and they produce relatively low levels of IL-2 when they are incubated with PHA or PMA. Nevertheless, the combina-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

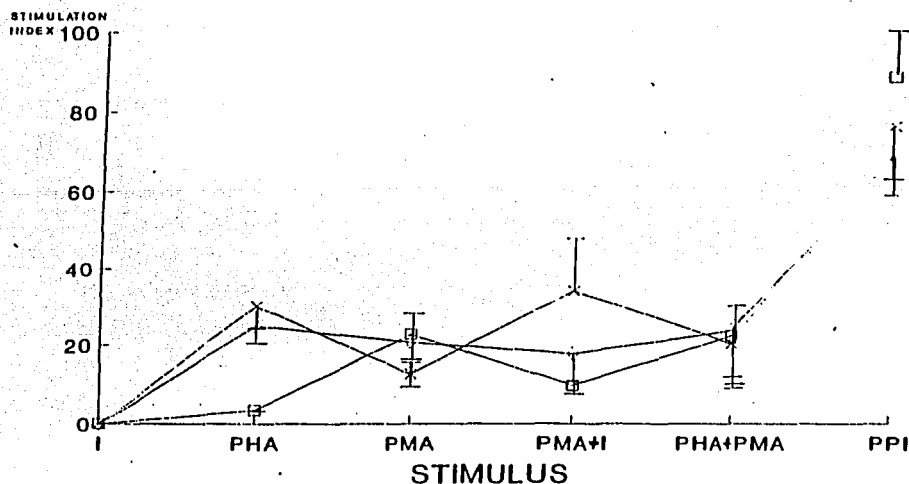


FIG. 1. Proliferative responses (stimulation index) of cells from LL patients [responders (R) and nonresponders (NR)] and normal subjects stimulated with ionophore A23187 (I), PHA, PMA, PMA+I, PHA+PMA, and PHA+PMA+ionophore (PPI). The significance levels of the differences in the SI in each of the following combinations used in the cultures of cells from LL(R), LL (NR) and normal subjects were: for PHA,  $p < 0.001$  (NR vs each of the other two groups); for PMA,  $p < 0.004$  (R vs each of the other two groups); for PMA+I,  $p < 0.03$  (R vs each of the other two groups); for PHA+PMA,  $p < 0.3$  (no differences among groups); for PPI,  $p < 0.001$  (NR vs each of the other groups). 1 = Nonresponder (NR); x = responders (R); p = normal subjects.

tion of ionophore and PMA causes the cells from LL(NR) patients and normals to increase their IL-2 levels. When the PHA+PMA combination is used, cells from all three groups produce their highest levels of IL-2. Finally, when ionophore A23187 is added to PHA+PMA there is a slight decrease in the production of IL-2 in all of these groups. The significance level of the differences of IL-2 from supernatants of normal cells versus both groups of patients was  $p < 0.03$  when PMA was used; the difference between IL-2 of cells from LL(R) patients versus the other two groups had a significance level of  $p < 0.04$  when PMA+I is used and, finally, the difference between IL-2 of cells from LL(NR) patients versus the other two groups was  $p < 0.03$  when PPI was used.

#### DISCUSSION

The immunodeficient behavior of T lymphocytes in LL patients has been characterized by a limited proliferation of T cells and

a decreased activity of IL-2<sup>9, 12, 19</sup>. Because IL-2 production is, in part, dependent on the intracellular calcium levels and the generation of DAG to activate PKC, we decided to assay the effect of substances that increase cytosolic calcium levels, such as ionophore A23187, and/or substances that mimic DAG such as PMA alone or combined with PHA and ionophore. Our results indicate different kinds of lymphocyte responses from the different groups studied to the above-mentioned stimuli. The first difference is related to the response to PHA of lymphocytes from LL(NR) patients against the LL(R) and normal subjects. The remarkable point is that about 95% of LL(NR) patients become responders when their T cells are stimulated with PMA; the other 5% required the presence of PHA to respond (in the PHA+PMA combination as well as in PPI). When ionophore A23187 is added to PMA their SI decreases, but when PHA+PMA is used they again recover their SI. Conversely, cells from LL(R) patients

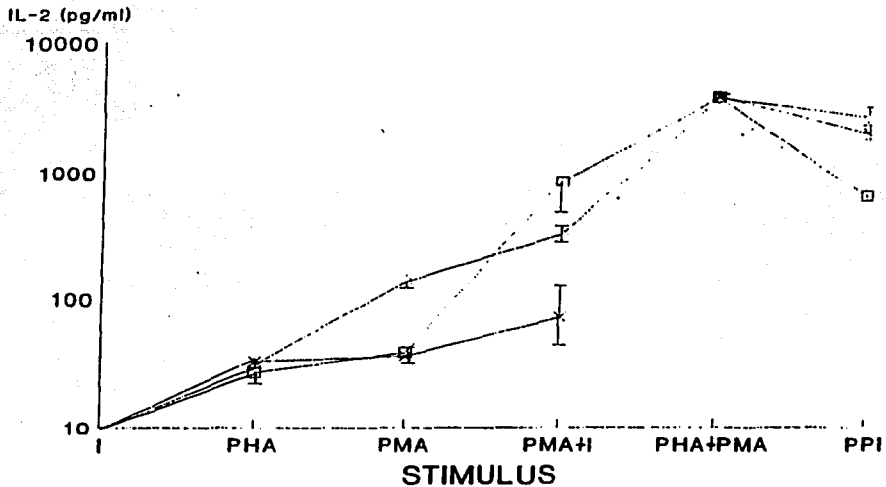


FIG. 2. Interleukin 2 (IL-2) levels found by ELISA in supernatants of cultures of lymphocytes stimulated with ionophore A23187 (I), PHA, PMA, PMA+I, PHA+PMA and PHA+PMA+ionophore (PPI). The significance levels of the differences of IL-2 concentrations detected by ELISA from supernatants of cells of normals vs both groups of patients was  $p < 0.03$  when PMA was used; the difference between IL-2 of cells from LL(R) patients vs the other two groups had a significance level of  $p < 0.04$  when PMA+I was used; the difference between IL-2 of cells from LL(NR) patients vs the other two groups had a  $p < 0.03$  when PPI was used. 1 = non-responder (NR); × = responder (R); p = normal subjects.

respond in a mirror image related to the LL-(NR) group when PMA+I is used.

All of the groups (normals, responders, nonresponders) reach their highest SI when the triple combination (PPI) is used, implying that PHA, PMA, and ionophore A23187 can trigger enough transduction signals and  $Ca^{2+}$  levels to have "the optimum conditions" for expressing the IL-2 gene, producing the adequate concentration of IL-2.

The explanation for the above-mentioned data is that in the case of cells from LL-(NR) patients, PMA is activating PKC, p21 ras (guanosine triphosphate-binding protein), ERK 1 and 2 (extracellular signal-regulated protein kinases), RAF (protein kinase, member of the cascade upstream ERK), and MEK (protein kinase, member of the cascade upstream ERK) that had not been activated by PHA alone, implying the

expression of the fos gene (<sup>8,14</sup>). In the case of LL(R) patients, ionophore A23187 permits enough  $Ca^{2+}$  levels to activate the JNK (c-jun NH2 terminal kinase) system in order to activate the jun gene (<sup>8,14</sup>). In these experiments, the necessary additions have been done in order that both pathways, in the case of LL(NR) patients and in the LL-(R) patients, recover the production of AP-1 (regulatory protein, composed of fos and jun proteins) and, finally, the expression of the IL-2 gene (<sup>8,14,22</sup>) in order to progress from the G1 phase of the cell cycle to the S phase, G2 and mitosis. This is supported by the fact that IL-2 levels are very high when cells from LL(NR), and LL(R) patients are cultured in the presence of PHA+PMA. The reason why the combination PPI induces the highest SI but not the highest IL-2 levels could be attributed to the fact that IL-2 levels have an optimum dose response ef-

100

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



fect. An excess of IL-2 does not necessarily imply the highest proliferation index because IL-2 receptors may be shedding from the plasma membrane, thus neutralizing their effect.

In order to corroborate the above explanations, we have initiated experiments that will measure the PKC, ERK, JNK activities (<sup>8, 12, 14</sup>).

### SUMMARY

The immunodeficiency present in patients with lepromatous leprosy is characterized by the limited proliferation of T lymphocytes, and is explained in part by the impaired synthesis of interleukin-2 (IL-2). Diacylglycerol (DAG) and calcium produce the activation of PKC, ERK and JNK kinases, implying a normal IL-2 response. Phorbol esters, such as PMA, can substitute for DAG and are mitogenic to human T and B cells activating several cytokine-encoding genes. Ionophore A23187 increases calcium permeability across the cellular membrane to the cytosol of lymphoid cells and is considered a co-mitogen of T lymphocytes.

Here we report that: 1) PHA-activated T lymphocytes from LL patients can be separated into two groups: a) responders (R) with a stimulation index (SI) of > 10 and b) nonresponders (NR) with a SI of < 10. 2) The proliferative responses of cells from LL(R), LL(NR) and normal subjects were measured after being stimulated with: I, PHA, PMA, PMA+I, PHA+PMA and PHA+PMA+ionophore (PPI). The most important result occurs in LL(NR) patients whose cells did not respond to PHA stimulation but increased to normal levels of proliferation when they were stimulated with PMA. Furthermore, the three groups (NR, R and normals) strongly increased their responses when they were incubated with PPI. 3) Finally, IL-2 concentrations in the supernatants of cultures of T lymphocytes from LL(NR), LL(R) and controls were relatively low when they were incubated with PHA or PMA, but the addition of ionophore to PMA and the combination of PHA+PMA strongly increased the production of IL-2 in all of them, reaching the optimum IL-2 concentration when PPI is used.

It can be concluded that the use of PMA, analogous to DAG, and ionophore A23187

(calcium increaser) in cultures of mitogen-activated T lymphocytes from LL patients induced the expression of the IL-2 gene, thus correcting the inadequate proliferation of T cells from LL patients.

### RESUMEN

La inmunodeficiencia presente en los pacientes con lepra lepromatosa se caracteriza por la limitada proliferación de los linfocitos T, y se explica en parte por la síntesis disminuida de interleucina-2 (IL-2). El diacylglicerol (DAG) y el calcio producen la activación de las cinasas PKC, ERK y JNK, implicando una respuesta normal de IL-2. Los ésteres forbólicos, como el PMA, pueden substituir al DAG y son mitogénicos para las células T y B humanas, donde actúan activando varios genes codificantes de citocinas. El ionóforo A23187 (I) aumenta la penetración del calcio al citosol de las células linfoides y se considera como co-mitógeno de los linfocitos T. En este trabajo nosotros reportamos: (1) Que los linfocitos T (de pacientes LL) activados con PHA pueden separarse en dos grupos: (a) respondedores (R), con índices de estimulación (IE) de > 10 y (b) norespondedores (NR), con IE de < 10. (2) Que se midieron las respuestas proliferativas de las células (de LLR, LLNR y sujetos normales) estimuladas con I, PHA, PMA, PMA+I, PHA+PMA y PHA+PMA+ionóforo. Aquí, los resultados más importantes ocurrieron en los pacientes LLNR cuyas células no respondieron a la estimulación con PHA pero incrementaron su respuesta proliferativa a valores normales cuando se estimularon con PMA. Además, los 3 grupos, NR, R y normales, aumentaron marcadamente sus respuestas proliferativas cuando se incubaron con PHA+PMA+ionóforo (PPI). (3) Que las concentraciones de IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de los linfocitos T de LLNR, LLR y controles, fueron relativamente bajas cuando las células se incubaron con PHA o con PMA, pero la adición del ionóforo al PMA y las combinaciones de PHA+PMA aumentaron fuertemente la producción IL-2 en todos ellos. La producción óptima de IL-2 se logró con la combinación PPI.

Puede concluirse que el uso de PMA (análogo del DAG) y del ionóforo A23187 (incrementador de calcio) en los cultivos de linfocitos T (LL) activados con mitógeno, estimula la expresión del gene para IL-2, y corrige la proliferación inadecuada de las células T de los pacientes con lepra.

### RÉSUMÉ

L'immunodéficience présente chez les patients ayant une lèpre lépromateuse est caractérisée par la prolifération limitée des lymphocytes T, et s'explique en partie par l'altération de la synthèse d'interleukine-2 (IL-2). Le diacylglycerol (DAG) et le calcium produisent l'activation des cinases PKC, ERK et JNK, ce

101

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

qui suppose une réponse d'IL-2 normale. Des esters de phorbol, tels que le PMA, peuvent être substitués au DAG et sont mitogènes pour les cellules humaines T et B, activant divers gènes encodant des cytokines. L'ionophore A23187 accroît la perméabilité du calcium à travers la membrane cellulaire au cytosol des cellules lymphoïdes, et est considéré comme un co-mitogène des lymphocytes T.

Nous rapportons ici que: 1) Les lymphocytes T activés par le PHA et provenant de patients LL peuvent être séparés en deux groupes: a) les répondeurs (R), avec un index de stimulation (IS) > 10 et b) les non-répondeurs (NR) avec un IS < 10. 2) Les réponses prolifératives de cellules de patients LL(R), LL(NR) et de sujets normaux ont été mesurées après stimulation avec I, PHA, PMA, PMA-I, PHA-PMA et PHA+PMA+ionophore. Le résultat le plus important survient chez les patients LL(NR) dont les cellules ne répondaient pas à la stimulation avec PHA mais augmentaient à des niveaux normaux de prolifération quand elles étaient stimulées par le PMA. De plus, les trois groupes R, RR et normaux ont fortement augmenté leurs réponses quand ils ont été incubés avec PHA+PMA+ionophore (PPI). 3) Finalement, les concentrations d'IL-2 dans le supernatant des cultures de lymphocytes T en provenance de LL(NR), LL(R) et témoins étaient relativement basses quand elles étaient incubées avec PHA ou PMA, mais l'addition d'ionophore au PMA et les combinaisons de PHA+PMA ont fortement augmenté la production d'IL-2 dans tous les cas, atteignant la concentration optimale d'IL-2 quand on utilisait le PPI.

On peut conclure que l'utilisation du PMA, analogue du DAG et l'ionophore A23187 (accroisseur du calcium) dans les cultures de lymphocytes T activés par des mitogènes provenant de patients LL, comprime l'expression du gène de l'IL-2, corrigeant donc la prolifération inadéquate de cellules T provenant de patients LL.

## REFERENCES

1. AKERMAN, K. E. O. and ANDERSSON, L. C. Direct mitogenic effect of ionophore A23187 on isolated human helper lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 14 (1984) 286-288.
2. AKITA, Y., OHINO, S., KONNO, Y., YANO, A. and SUZUKI, K. Expression and properties of two distinct classes of the phorbol ester receptor family, four conventional protein kinase C types, and a novel protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 354-362.
3. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WATSON, J. D. *Molecular Biology of the Cell*, 2nd edn. New York: Garland Publishing, 1989.
4. BAZZI, M. D. and NELSESTUEN, G. L. Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152 (1988) 336-343.
5. BERRY, N., ASE, K., KIKKAWA, U., KISHIMOTO, A. and NISHIZUKA, Y. Human T cell activation by phorbol esters and diacylglycerol analogues. *J. Immunol.* 143 (1989) 1407-1413.
6. BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 21 Suppl. 197 (1988) 7785.
7. CHAUHAN, A., CHAUHAN, V. P. S., DESHMUKH, D. S. and BROCKERTHOFF, B. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate competitively inhibits phorbol ester binding to protein kinase C. *Biochemistry* 28 (1989) 4952-4956.
8. FIELDS, P. E., GAJEWSKI, T. F. and FITCH, F. W. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271 (1996) 1276-1278.
9. HAREGEWOIN, A., MUSTAFA, A. S., HELLE, L., WATERS, M. F., LEIKER, D. L. and GODAI, T. Reversal by interleukin-2 of the T-cell unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium leprae*. *Immunol. Rev.* 80 (1984) 76-86.
10. HASTINGS, R. C., GILLIS, T. P., KRAHENBUHL, J. L. and FRANZBLAU, S. G. *Leprosy*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1 (1988) 330-348.
11. ISAKOV, N. and ALTMAN, A. Human T lymphocyte activation by tumor promoters: role of protein kinase C. *J. Immunol.* 138 (1987) 3100-3107.
12. ISLAS, R. A., MORALES, O. R., FAFUTIS, M. M., GONZALEZ, M. A. and ORTIZ, O. L. Deficiency in the biosynthesis of interleukin 2 (IL-2) and functional presence of the IL-2 receptor in lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.* 55 (1987) 566-569.
13. KORETSKY, G. A., DANIELE, R. P., GREENE, W. C. and NOWELL, P. C. Evidence for an interleukin-independent pathway for human lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (1983) 3444-3447.
14. LI, W., WHALEY, C. D., MONDINO, A. and MUELLER, D. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271 (1996) 1272-1276.
15. MEAGER, A. *Cytokines*. Buckingham, U.K.: Open University Press, 1990.
16. MILLS, G. B., CHEUNG, R. K., GRINSTEIN, S. and GELFAND, E. W. Increase in cytosolic free calcium concentration is an intracellular messenger for the production of interleukin 2 but not for the expression of the interleukin 2 receptor. *J. Immunol.* 134 (1985) 1640-1643.
17. MILLS, G. B., MAY, C., HILL, M. and GELFAND, E. W. Role of protein kinase C in interleukin 1, anti-T3, mitogenic lectin-induced interleukin 2 secretion. *J. Cell. Physiol.* 141 (1989) 310-317.
18. MILLS, G. B., STEWART, D. J., MELLORS, A. and GELFAND, E. W. Interleukin 2 does not induce phosphatidylinositol hydrolysis in activated T cells. *J. Immunol.* 136 (1986) 3019-3024.
19. MOHAGHBHOUR, N., GELBER, R. H. and ENGLEMAN, E. G. T cell defect in lepromatous leprosy is reversible *in vitro* in the absence of exogenous growth factors. *J. Immunol.* 138 (1987) 570-574.

102

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

20. *Quantikine Human IL-2 Immunoassay*. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.: R & D Systems, 1994.
21. RIDLEY, D. S. and JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int. J. Lepr.* **34** (1966) 255-273.
22. SCHWARTZ, R. H. Anergia de las celulas T. *Invest. Cien.* **205** (1993) 24-31.
23. SZAMEL, M., REIERMANN, B., KREBS, B., KURRIE, R. and RESH, K. Activation signals in human lymphocytes. *J. Immunol.* **143** (1989) 2806-2813.
24. TRONEH, A., ALBERT, F., GOLSTEIN, P. and SCHMITT-VERHUIST, A. M. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* **313** (1985) 318-320.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA