



**PRODUCCION ESPONTANEA E INDUCIDA DEL FACTOR
ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS
Y MACROFAGOS (FEC-GM). POR LAS
CELULAS MONONUCLEARES (CMN)
DE PACIENTES CON
LEPRA**

TESIS

**QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

**PRESENTA:
ANA CRISTINA CUBILLAS TEJEDA**

MONTERREY, N.L.

1993

TM

Z6658

FM

1993

C8

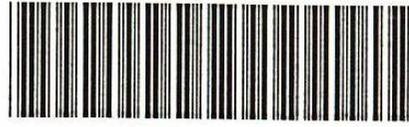
TM

Z6658

FM

1993

C8



1020071216

PRODUCCION ESPONTANEA E INDUCIDA DEL FACTOR
ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS
Y MACROFAGOS (FEC-GM), POR LAS
CELULAS MONONUCLEARES (CMN)
DE PACIENTES CON
LEPRA

POR

ANA CRISTINA CUBILLAS TEJEDA

TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

MONTERREY, N.L.

1993

TM
26658
FM
1993
CB



FONDO TESIS

24066

PRODUCCION ESPONTANEA E INDUCIDA DEL FACTOR ESTIMULADOR DE
COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS (FEC-GM), POR CELULAS
MONONUCLEARES (CMN) DE PACIENTES CON LEPROA.

Aceptada por la Subdirección de Investigación y Estudios
de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad
Autónoma de Nuevo León, el _____



COMISION DE TESIS:

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS DE POST-GRADO

N O M B R E

F I R M A

Presidente: Dra. Ma. del socorro Flores de c.

Secretario: Dr. Mario Alberto Garza Elizondo

Primer vocal: Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza

Segundo vocal: Dr Jesús. Fidel Salazar González

Tercer vocal: Dr. Mario César Salinas Carmona

ASESOR DE LA TESIS.

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Depto. de Inmunología, Fac. de Medicina U.A.N.L.

COASESOR DE LA TESIS.

Dr. Jesús Fidel Salazar González
Lab. de Inmunología, Fac. de Ciencias Químicas/CIEP
U.A.S.L.P.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO LA TESIS.

Departamento de Inmunología del Hospital Universitario
"Dr. E. González"
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo Leon.

INSTITUCION QUE LA AUSPICIO.

Facultad de Medicina, U.A.N.L.
Facultad de Ciencias Químicas/CIEP, U.A.S.L.P.

Entre más estudio
la Naturaleza,
más admirado estoy
de la obra del Creador.

Louis Pasteur.



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS:

* Doy gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de estudiar una maestría, y porque en todo momento está a mi lado.

* De una manera muy especial, dedico esta tesis a mis papás, Javier y Ma. Cristina, porque siempre me apoyaron y animaron, para que saliera adelante con mis estudios. A ellos debo todo lo que soy y todo lo que tengo, por eso los quiero con toda el alma.

* Agradezco con todo cariño a mis hermanos, Marilú, Gaby y Javier, por su comprensión y apoyo durante todo este tiempo, y porque en las buenas y en las malas siempre han estado a mi lado.

* De todo corazón dedico esta tesis a mis abuelitas, Consuelo y Concepción, ya que gracias a sus consejos y cariño, he aprendido mucho en la vida.

* Doy gracias a toda mi familia, ya que todos me ayudaron de alguna manera para que pudiera salir adelante.

* Con todo mi cariño y respeto, dedico esta tesis y agradezco a la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, Asesor de la tesis, ya que gracias a su apoyo, consejos y comprensión, logré terminar esta etapa tan importante en mi vida. Realmente aprendí muchas cosas a su lado, pero principalmente aprendí a no darme por vencida, pase lo que pase.

* Con mucho cariño y admiración, dedico esta tesis y agradezco al Dr. Jesús Fidel Salazar González, Coasesor de la tesis, por su apoyo durante todo este tiempo, y por todo lo que he aprendido a su lado. A él, más que a nadie, debo el haber tomado la decisión de realizar una maestría en el área de Inmunología.

* Con todo cariño quiero agradecer al Dr. Mario César Salinas Carmona, a la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda y al Dr. Carlos Medina de la Garza, Profesores del Departamento de Inmunología, por todo lo que aprendí a su lado y por su apoyo durante todo este tiempo. No sólo los admiro como Investigadores, sino principalmente por su calidad como seres humanos.

* Agradezco de todo corazón, a todos mis compañeros del Departamento de Inmunología, por su amistad apoyo y comprensión, y sobre todo por los momentos que compartimos durante todo este tiempo.

* Quiero agradecer al Departamento de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. E. González", de la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. principalmente al Dr. Oliverio Welsh L. y al Dr. Sergio González G., por su colaboración para que este proyecto se llevara a cabo.

* Con todo cariño y admiración doy las gracias a la Dra. Iris Estrada G., del Instituto Politécnico Nacional, por habernos proporcionado el Ag. sonicado de Mycobaterium leprae, gracias a su gran ayuda se pudo realizar este proyecto

* De una manera muy especial, agradezco al Dr. Fernando Toro V., Profesor-Investigador de la Fac. de Ciencias Químicas/CIEP de la U.A.S.L.P., por su asesoría en el análisis estadístico de este trabajo.

* En las diferentes etapas de la vida, existen personas que nos influyen de una manera muy importante, ya sea por su cariño, por sus consejos, por su comprensión, por su apoyo, o simplemente por su manera de ser. Quiero agradecer con todo mi corazón y además dedicar mi tesis a las personas que de alguna manera, influyeron en mí, para que pudiera salir adelante en esta etapa tan importante de mi vida:

A MIS AMIGOS, CON TODO MI CARIÑO.

TABLA DE CONTENIDO:

	PÁGINA
INTRODUCCION	8
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y METODOS	25
RESULTADOS	44
DISCUSION	69
RESUMEN	85
BIBLIOGRAFIA	87

PRODUCCION ESPONTANEA E INDUCIDA DEL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS (FEC-GM), POR CELULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES CON LEPROSA.

INTRODUCCION:

CITOCINAS:

La palabra citocina es un término general dado a un grupo de proteínas celulares con funciones reguladoras, que incluye linfocinas, monocinas, interleucinas e interferones. Son producidas por una gran variedad de células en el cuerpo y tienen un papel muy importante en varias respuestas fisiológicas. Este grupo de proteínas heterogéneas tienen varias características comunes: 1) Las citocinas son proteínas de secreción de bajo peso molecular (< 80 kDa), las cuales, por lo general están glicosiladas. 2) Están involucradas en inmunidad e inflamación, en donde regulan la magnitud y duración de la respuesta. 3) Generalmente son producidas en forma transitoria y local, y actúan de una manera parácrina o autócrina, más que endócrina. 4) Las citocinas son extremadamente potentes, llevan a cabo su función a concentraciones picomolares. 5) Interactúan con los receptores de superficie celular de alta afinidad, específicos para cada citocina. 6) Su unión a la superficie celular origina un cambio en el patrón celular de ARN y síntesis de proteínas,

por lo que se alteran las características celulares.

Las citocinas actúan en una red: primero, se inducen unas a otras; segundo, modulan los receptores de superficie específicos para determinadas citocinas, y tercero, por interacciones sinergistas, aditivas o antagonistas, sobre la función celular que modulan.

Los factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (FCDP), así como los factores estimuladores de colonias, tales como el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FEC-GM), el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (FEC-M), entre otros, también son llamados citocinas, (1).

FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS:

En la actualidad se han descrito siete factores de crecimiento involucrados en el desarrollo y activación de los elementos hematopoyéticos. Entre estos se encuentran la Interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-3 (conocidas también como factores estimuladores de colonias múltiples). Estas interleucinas parecen ser importantes para la supervivencia, proliferación y activación de las células pluripotenciales. La IL-1 tiene la capacidad de aumentar la expresión de los receptores para factores de crecimiento específicos, tales

como Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (FEC-M), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FEC-GM) y Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (FEC-G). El FEC-GM estimula además de células polimorfonucleares, a monocitos y macrófagos. El FEC-G promueve la proliferación, maduración e integridad funcional de granulocitos neutrófilos maduros y el FEC-M, parece ser específico para la proliferación, maduración y activación de los monocitos y los macrófagos maduros.

Otro de los siete factores de crecimiento principales es la eritropoyetina (EPO), la cual actúa sobre la unidad eritroide formadora de blastos, y posteriormente continúa la ruta de la unidad formadora de colonias eritroides (UFC-E) y promueve la maduración de las células rojas sanguíneas (2-6).

PROPIEDADES DEL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACROFAGOS:

El FEC-GM humano es una glicoproteína de 22,000 daltones. El peso molecular de la proteína varía de 21 a 60 KDa. El punto isoeléctrico es de 3.5 a 8.0, pero la mayoría de las células productoras secretan FEC-GM con un pI de 4.0 a 5.2; los diferentes pesos moleculares y formas isoeléctricas no parecen diferir en la actividad biológica del FEC-GM. Existe un receptor específico para el FEC-GM. Este receptor se

representa como una sola clase de receptores de alta afinidad ($K_a = 10^8 - 10^{11} M$). El peso molecular de este receptor varía de 50 a 180 KDa.

El factor producido por la expresión de un cADN en una bacteria no se encuentra glicosilado, mientras que el producto de la expresión de células eucariotas se encuentra glicosilado en forma variable. La glicosilación no se requiere para su bioactividad in vivo o in vitro, pero puede afectar la farmacocinesis del FEC-GM (5-7).

PRODUCCION DEL FEC-GM:

Se ha observado que el FEC-GM es sintetizado por los linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos, los astrocitos, las células endoteliales, las células mesenquimatosas, los osteoblastos, los fibroblastos, las células de músculo liso y las células epiteliales, (5-12).

El FEC-GM de diferentes tipos celulares muestra propiedades biológicas similares, pero difiere en su peso molecular, pI e hidrofobicidad, sugiriendo que estas variaciones pueden ser por modificación postraduccional, lo que depende de la fuente celular productora, (6,9-11). La regulación de la producción del FEC-GM se ha estudiado principalmente en los monocitos y los linfocitos, se han utilizado inhibidores metabólicos del ARN y de la síntesis de

proteínas. Estos estudios sugieren que la producción del factor es regulada tanto por mecanismos transcripcionales, como post-transcripcionales (8).

Se han realizado estudios en los cuales se demuestra el efecto de la concanavalina A (Con A), la fitohemaglutinina (PHA), y el anticuerpo monoclonal OKT3, en la estimulación de la producción del FEC-GM por células mononucleares de sangre periférica (13-15), además, se han identificado varios agentes endógenos y exógenos que modulan la secreción del FEC-GM, (6,16-20). Entre los factores que la incrementan se encuentran:

CITOCINAS: IL-1, IL-2, Factor de Necrosis Tumoral (FNT)
e interferones en dosis bajas.

MICROORGANISMOS Y SUS PRODUCTOS:

Lipopolisacáridos (LPS)
Bacilo de Calmette-Guérin
Leishmania tropica major
Schistosoma japonicum
Listeria monocytogenes
Corynebacterium parvum
Nocardia rubra
Virus herpes simple.

SUSTANCIAS: Litio, indometacina, cisteína, glutatión, selenito de sodio, alfa-tocoferol, superóxido dismutasa, ácido retinóico, ésteres de forbol.

OTROS: Cirugía y radiaciones.

El FEC-GM es sintetizado por células las endoteliales, los fibroblastos, los monocitos y los linfocitos T cuando son estimulados por mediadores de la inflamación tales como IL-1, FNT-alfa o LPS, y se ha reportado que es generado constitutivamente por las células endoteliales y los fibroblastos. Se ha reportado que la IL-1 incrementa la transcripción del gene del FEC-GM, por lo que se requiere de una secuencia promotora en el gene del FEC-GM para la respuesta a IL-1. Los elementos reguladores del gene de FEC-GM son específicos de tejidos. El promotor del gene se encuentra activado en células endoteliales en reposo (8-10).

Ya que la IL-1 y el FEC-GM son sintetizados por varias de las mismas células, y el FEC-GM puede inducir la secreción tanto de la IL-1 y del Factor de Necrosis Tumoral, se piensa que puede existir una red de amplificación para la producción de estas dos citocinas (6).

Entre los factores que disminuyen la producción del FEC-GM se encuentran (6):

CITOCINAS: Interferones a altas dosis.

SUSTANCIAS: Lactoferrina, transferrina, vitamina D, prostaglandinas, etanol.

EFFECTOS DEL FEC-GM in vitro:

El efecto del FEC-GM sobre el compartimiento hematopoyético ha sido ampliamente documentado (5-7). Las células blanco del FEC-GM son de diferentes tipos, dichas células expresan el receptor específico del FEC-GM, entre estas se encuentran: los neutrófilos, los eosinófilos, los basófilos, los monocitos, los macrófagos, los linfocitos T, las células endoteliales y los queratinocitos, (6,21).

Evidencias recientes indican que el FEC-GM parece jugar un papel en los mecanismos de inmunidad. En los neutrófilos, el FEC-GM incrementa las actividades del metabolismo oxidativo, como: la fagocitosis de levaduras opsonizadas, la fagocitosis de bacterias y la fagocitosis mediada por Ig A; también aumenta su citotoxicidad, quimiotaxis, número de receptores para f-Met-Leu-Phe, actividad microbicida, producción de leucotrienos, adhesión celular, así como la secreción de FEC-G, y FEC-M (6,22). Ciertos estudios demostraron que cuando las neutrófilos son incubados con FEC-GM biosintético humano durante 10 a 15 minutos, muestran un aumento en la quimiotaxis en respuesta a f-Met-Leu-Phe y un

incremento en la expresión de proteínas de adherencia en la membrana del neutrófilo. Los neutrófilos tratados con FEC-GM por 1 ó 2 horas muestran un aumento en la producción del anión superóxido en respuesta a la exposición subsecuente a quimiotácticos. Se ha observado además, que el FEC-GM aumenta la muerte de Trypanosoma cruzi inducida tanto por los neutrófilos, como por los monocitos, e incrementa la citotoxicidad de los neutrófilos hacia células de leucemia humana (23-28). Más aún, el FEC-GM induce la secreción de citocinas por los leucocitos polimorfonucleares, tales como, el activador de plasminógeno, IL-1 alfa e IL-1 beta. Actualmente se ha señalado que el FEC-GM puede inducir a los granulocitos polimorfonucleares para la producción de FEC-M y FEC-G (29). Recientes estudios muestran que la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos hacia células blanco infectadas con HIV se aumentó marcadamente con FEC-GM y FEC-G, se observaron resultados similares tanto con los neutrófilos de donadores normales como de los pacientes con SIDA, (30).

El FEC-GM ayuda al desarrollo y maduración de monocitos (31), además, actúa sobre monocitos y macrófagos aumentando el metabolismo oxidativo y la fagocitosis (32). Se ha demostrado que el FEC-GM estimula la proliferación de monocitos y de macrófagos tisulares y aumenta su capacidad de responder al FEC-M, (33), e induce la expresión de FEC-G por los monocitos

(34). Se ha demostrado que el FEC-GM tiene efecto sinergista con algunas citocinas en su acción sobre monocitos y macrófagos, entre las que se encuentran: La Interleucina-1 (IL-1) (19), el Interferon gamma (IFN-gamma) (35), la Interleucina 6 (IL-6) (36), la Interleucina 7 (IL-7) (37), y el Factor Transformador de Crecimiento (TGF-beta) (38), lo cual, sugiere un papel en los mecanismos de inmunorregulación.

En la actualidad, se ha observado que el FEC-GM humano recombinante aumenta la habilidad de los monocitos humanos para funcionar como células accesorias en ensayos de proliferación de linfocitos T estimulados con Ag o mitógenos. Así mismo se observó que dicho factor aumenta la expresión de moléculas HLA-DR y estimula la secreción de la IL-1, ambos fenómenos importantes para la estimulación de los linfocitos T por antígeno (39,40). Diversos reportes sugieren un papel del FEC-GM en la resistencia hacia patógenos. Se ha demostrado que el FEC-GM aumenta la capacidad microbicida de los monocitos y los macrófagos hacia ciertos patógenos, tales como Leishmania tropica (41), Trypanosoma cruzi (42), Leishmania donovani (43), Leishmania mexicana amazonensis (44) y Candida albicans (45,46).

Su acción sobre eosinófilos incluye el aumento de la citotoxicidad hacia Schistosoma mansoni, así como, de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Además, aumenta su

actividad fagocítica (6,23,24).

El FEC-GM muestra un efecto sobre los basófilos, aumentado su capacidad de liberación de histamina (6).

La acción del FEC-GM no parece restringirse al sistema hematopoyético y se ha reportado su efecto sobre las células endoteliales, los queratinocitos y algunas células malignas. En algunos estudios, se observó un incremento en la migración de las células endoteliales, tratadas con diferentes preparaciones de rFEC-G y rFEC-GM, a través de filtros de policarbonato; así como un incremento en la incorporación de timidina tritiada (^3H timidina), (6,47,48).

EFFECTOS in vivo DEL FEC-GM:

Se han observado varios efectos in vivo del FEC-GM (6) tales como:

En el ratón:

- aumenta la fagocitosis por macrófagos.
- incrementa el número de receptores Fc.
- aumenta la expresión de moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad.
- aumenta la expresión de IL-1 de membrana y secretoria de los macrófagos.
- incrementa el número de macrófagos tisulares.

- incrementa el número de neutrófilos circulantes.

En el mono:

- aumenta la cuenta de neutrófilos.
- incrementa el número de plaquetas.
- aumenta el metabolismo oxidativo de los neutrófilos.
- aumenta la actividad microbicida de los neutrófilos en contra de Escherichia coli.

En el hombre, el FEC-GM ha sido recientemente empleado para el tratamiento de diversos trastornos y su efecto se describe en la siguiente sección.

APLICACIONES CLINICAS DEL FEC-GM:

El FEC-GM ha sido utilizado en varias enfermedades y a diferentes dosis, entre estas enfermedades están las anemias aplásticas, los síndromes mielodisplásicos, SIDA, sarcomas, trasplantes de la médula ósea, mielosupresión inducida por quimioterapia y en accidentes por radiaciones. En general, la toxicidad del FEC-GM por vía parenteral es dosis dependiente y predecible. Entre los efectos colaterales, la fiebre es común a todas las dosis, así como, retención de fluidos, edema

pulmonar y formación de trombos. Se cree que algunos efectos adversos pueden ser mediados indirectamente por la producción de otras citocinas o segundos mensajeros, más que por el FEC-GM, (49-53).

Este factor tiene varias aplicaciones clínicas potenciales, entre estas, en la estimulación de neutrófilos en pacientes para incrementar su resistencia a parásitos intracelulares (51). Otras posibles aplicaciones del FEC-GM incluyen la proliferación in vitro de células leucocíticas obtenidas en los bancos de sangre; el aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos llevada a cabo por las células mononucleares y los neutrófilos de pacientes tratados con anticuerpos monoclonales en la terapia para el cáncer; el mejoramiento de las defensas de pacientes sometidos a cirugía, en pacientes con quemaduras, en pacientes con infecciones tales como osteomielitis, y en el tratamiento de infecciones parasitarias, para aumentar las funciones de los eosinófilos (49).

LA LEPRO Y SUS CARACTERISTICAS:

La lepra es una de las enfermedades más antiguas que se conocen, se tienen datos de que existe desde hace aproximadamente 5 milenios y se atribuye a Egipto ser la cuna

de la enfermedad. En 1873, un médico noruego de apellido Hansen descubre que la lepra es una enfermedad causada por el patógeno intracelular Mycobacterium leprae, por lo que se descartan las creencias de que la lepra era un castigo divino o un mal hereditario. El agente causal es una bacteria ácido alcohol resistente, que se multiplica principalmente en las células de Schwann y en macrófagos. Hasta la fecha esta bacteria no ha podido cultivarse in vitro, sin embargo, se ha logrado su desarrollo in vivo en el cojinete plantar de los ratones, o bien, en el armadillo de nueve bandas (Dassypus novemlineatus), al cual se le considera un reservorio natural. La transmisión de esta enfermedad es directa de persona a persona; las vías respiratorias superiores, son la vía principal de contagio. Esta enfermedad afecta aproximadamente a 10-15 millones de personas en todo el mundo, si bien, es más común en los trópicos y subtrópicos, con una incidencia de aproximadamente 10 a 20 personas por cada 1000. (54). En México existen aproximadamente 17,000 personas con esta enfermedad, según datos de la Secretaría de Salubridad y Asistencia en 1990. Los estados más afectados son Sinaloa y Colima (55).

Esta enfermedad proporciona una oportunidad para el estudio de los circuitos inmunorreguladores y de las citocinas, ya que la respuesta inmune hacia M. leprae por

parte del hospedero determina la forma clínica de la enfermedad (56). En un polo del espectro clínico, la lepra tuberculoide (TT), los pacientes muestran una fuerte reactividad inmune mediada por células contra los antígenos de M. leprae, tanto in vivo como in vitro; sin embargo, esta respuesta no es suficiente para erradicar totalmente a la micobacteria de los tejidos y los pacientes muestran lesiones en la piel. En el otro extremo del espectro, la lepra lepromatosa (LL), los pacientes carecen de inmunidad celular en contra de la micobacteria y desarrollan numerosas lesiones en la piel con abundantes bacilos dentro de los macrófagos. Una supresión activa llevada a cabo por las células CD8⁺, CD28⁻ (57,58) ha sido propuesta como un posible mecanismo para explicar la ausencia de respuesta inmune específica y la disminución en la producción de interleucinas observada en los pacientes lepromatosos. Así mismo los macrófagos fracasan para destruir a la micobacteria intracelular, y esto es probablemente debido al efecto secundario de la producción deficiente de citocinas activadoras de macrófagos (59).

Actualmente no existe una vacuna eficiente contra la lepra, y el tratamiento se lleva a cabo utilizando una terapia multidrogas (60-62), sin embargo, el tratamiento es muy largo, y existen efectos colaterales causados por los medicamentos utilizados (63,64). Recientemente, algunos grupos de

investigadores prueban ciertas citocinas como medida terapéutica para el tratamiento de la lepra (65). En algunos estudios se ha administrado IFN-gamma recombinante en las lesiones de los pacientes con lepra lepromatosa, y se ha observado una mejoría muy notoria en las lesiones, ya que existe una conversión histológica hacia el polo tuberculoide (66,67). En otros estudios se ha utilizado IL-2 recombinante para administrarse intradérmicamente, y se ha observado una disminución en el número de bacilos en las lesiones de los pacientes lepromatosos, (68,69).

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS:

Debido a que ya ha sido demostrado que el FEC-GM aumenta la capacidad microbicida de los macrófagos para ciertos microorganismos intracelulares (41-46) y en base a que el agente causal de la lepra es un microorganismo intracelular, el cual no es erradicado eficientemente por los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, pensamos que este factor pudiera tener un papel muy importante en la inmunopatología de esta enfermedad, por lo que nos planteamos la siguiente hipótesis.

HIPOTESIS DE TRABAJO:

Si el FEC-GM tiene la capacidad de aumentar la actividad microbicida y la función presentadora de antígeno de los macrófagos: la producción y/o respuesta de las células del sistema inmune a este factor, posiblemente se encuentre disminuída en los pacientes con lepra lepromatosa (LL), en comparación con los pacientes con lepra tuberculoide (TT).

OBJETIVOS:

1) Estandarización de la Técnica de ELISA para la determinación del FEC-GM en los sobrenadantes de cultivo.

2) Determinar la producción espontánea del FEC-GM por las células mononucleares (CMN) de sangre periférica de sujetos sanos, así como la inducida por LPS (lipopolisacárido), PHA (fitohemaglutinina), IL-1r beta (interleucina 1 beta recombinante) y el antígeno sonicado de Mycobacterium leprae.

3) Determinar la producción espontánea del FEC-GM por las CMN de sangre periférica de pacientes con lepra lepromatosa, así como la inducida por LPS, IL-1r, PHA y Ag.

4) Determinar la producción espontánea del FEC-GM por las CMN de sangre periférica de pacientes con lepra tuberculoide, así como la inducida por LPS, IL-1r, PHA y Ag.

5) Comparar los resultados obtenidos con cada grupo de sujetos.

MATERIAL Y METODOS:

I) METODO INMUNOENZIMATICO (ELISA) PARA LA CUANTIFICACION DEL FEC-GM EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO:

A) ESTANDARIZACION DEL METODO EN EL LABORATORIO.

a) MATERIAL:

- 1.- Microplacas de ELISA (Costar, 96-well Assay Plates).
- 2.- FEC-GM recombinante. Conc.110 ng/ml (Behringwerke).
- 3.- Anticuerpo monoclonal anti FEC-GM (Behringwerke)
- 4.- Anticuerpo policlonal anti FEC-GM (Behringwerke)
- 5.- Anticuerpo anti-IgG biotinilado (Vector Laboratories)
- 6.- Conjugado de avidina-peroxidasa (Vector Laboratories)
- 7.- Solución amortiguadora de Carbonato/Bicarbonato:
Este amortiguador se utiliza para pegar el anticuerpo monoclonal en la placa de ELISA. Se preparó de la siguiente manera:
* 0.8 gr de Na_2CO_3 * 1.47 gr de NaHCO_3

* 500 ml de agua tridestilada.

* Se ajustó el pH a 9.6

Nota: Hacerlo el día que se va a utilizar.

8.- Solución amortiguadora de lavados. El amortiguador PBS-Tween es usado para lavar las placas entre cada paso del procedimiento, y también sirve como base para otros amortiguadores. Se preparó de la siguiente manera:

Solución PBS stock 10X:

* 4 gr KH_2PO_4

* 44 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ó 23.2 gr de Na_2HPO_4 anhidro.

* 4 gr de KCl

* 2 litros de agua tridestilada. Se almacenó a 4°C.

Solución salina stock 10X:

* 160 gr de NaCl

* 2 litros de agua tridestilada. Se almacenó a 4°C.

Amortiguador PBS-Tween 1X:

* Se añadieron 200 ml de PBS 10X a un matraz de 2 litros.

* Se añadieron 200 ml de solución salina 10X.

* Se completaron los 2 litros con agua tridestilada.

* Se añadió 1 ml de Tween-20 (polioxi-etileno sorbitan monolaurato).

* Se mezcló perfectamente, y se ajustó el pH a 7.4.

NOTA: El amortiguador PBS-Tween 1X debe prepararse el día del ensayo; la solución que no se use puede guardarse por 24 horas a 4°C.

9.- Amortiguador de bloqueo. Se utilizó como solución bloqueadora, el amortiguador PBS-Tween suplementado con 1% de leche en polvo. Se preparó de la siguiente manera:

* 2 gr de leche en polvo Carnation

* Se disolvieron en 200 ml del amortiguador PBS-Tween 1X.

* Se mezcló por 5 min. aproximadamente.

* Se ajustó el pH a 7.4.

NOTA: Se almacena a 4°C y conviene prepararse un día antes del ensayo.

10.- Solución amortiguadora de Reacción. El amortiguador de reacción se prepara exactamente antes de usarse, y sirve sólo durante 15 minutos después de la adición del OPD (Ortofenilendiamina) y del H₂O₂. La solución de ácido cítrico y la solución de fosfatos pueden

prepararse y almacenarse a 4°C.

Solución 0.1 M de Ac. Cítrico:

* 19.2 gr de ac. cítrico anhidro ó 21 gr de ac. cítrico monohidratado.

* Se disolvieron en 1 litro de agua tridestilada.

Solución 0.2 M de Fosfato:

* 28.4 gr de Na_2HPO_4 .

* Se disolvieron en 1 litro de agua tridestilada.

Solución Amortiguadora de reacción:

* Se añadieron 24 ml de la solución 0.1 M de ac. cítrico a un matraz de 100 ml.

* Se añadieron 26 ml de la solución 0.2 M de fosfato.

* Se mezclaron con 50 ml de agua tridestilada.

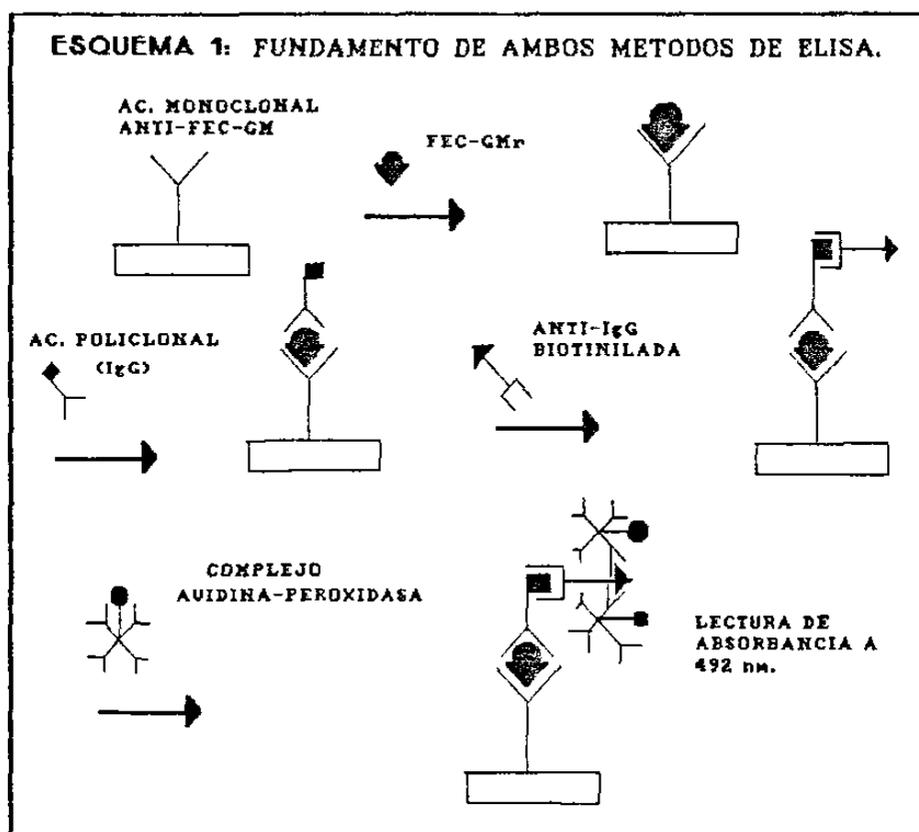
* Se añadieron 40 mg de OPD (ortofenilendiamina).

* Se añadieron 40 ul de H_2O_2 al 30%.

b) TECNICA:

Se estudiaron varias condiciones para llevar a cabo el ensayo inmunoenzimático, en las cuales se varió la concentración de los diferentes anticuerpos utilizados, los

tiempos de incubación y las condiciones de bloqueo de la placa de ELISA. Las condiciones finales seleccionadas, se especifican en la sección de Resultados. En el esquema 1 se puede observar el fundamento de la técnica utilizada.



ESQUEMA GENERAL:1.- Recubrimiento de la placa con el Ac. monoclonal.

* Se preparó una solución del Ac monoclonal con el amortiguador de carbonato/bicarbonato, y se analizaron diferentes concentraciones (1 ug/ml, 2 ug/ml, 3 ug/ml y 4 ug/ml).

* Se añadieron 100 ul de esta solución a cada pozo de la placa de ELISA.

* Se cubrió la placa con parafilm, y se incubó toda la noche a 4°C.

2.- Bloqueo de la placa.

* Se aspiró el líquido de la placa, se lavó con el amortiguador de PBS-Tween 4 veces y se secó la placa por inversión en papel absorbente.

* Se añadieron 50 ul del amortiguador PBS-Tween-leche a cada pozo, y se incubó a 37°C, se analizaron diferentes tiempos de incubación (0, 5, 15 y 30 minutos).

3.- Adición de los Estándares.

* Se prepararon los estándares correspondientes (10ng/ml, 5ng/ml, 1 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.01 ng/ml). Los estándares se diluyeron con el amortiguador PBS-Tween-leche. Como control, es decir, 0 ng/ml, se utilizó el mismo buffer en el que se diluyeron los estándares.

* Se añadieron 50 ul de los estándares correspondientes,

o bien de los sobrenadantes problema, a sus respectivos pozos, los cuales contenían 50 ul del amortiguador PBS-Tween-leche, se cubrió la placa y se incubó a 37°C, se estudiaron diferentes tiempos de incubación (1 hora y 2 horas).

4.- Incubación con el Segundo Anticuerpo (Ac. Policlonal anti-FEC-GM obtenido en conejo).

* Se aspiró el líquido de la placa, y se lavó 4 veces con el amortiguador PBS-Tween. Se secó la placa con un papel absorbente.

* Se preparó una solución del anticuerpo policlonal con el amortiguador PBS-Tween-leche y se analizaron diferentes concentraciones (2ug/ml y 3ug/ml) y se añadieron 100 ul de dicha solución a cada pozo de la placa.

* Se cubrió la placa y se incubó a 37°C por una hora.

5.- Incubación con el Tercer Anticuerpo (Ac anti-IgG biotilidado de conejo, obtenido en chivo).

* Se aspiró el líquido de la placa, y se lavó 4 veces con el amortiguador PBS-Tween. Se secó la placa con papel absorbente.

* Se preparó una solución del tercer anticuerpo con el amortiguador PBS-Tween-leche, probándose diferentes concentraciones (1 ug/ml, 2 ug/ml, 3 ug/ml y 4 ug/ml). Se

añadieron 100 ul a cada pozo.

* Se cubrió la placa y se incubó a 37°C por una hora.

6.- Adición del complejo Avidina-Peroxidasa.

* Se aspiró el líquido de la placa, y se lavó 4 veces con el amortiguador de lavado. Se secó la placa con papel absorbente.

* Se preparó una solución del complejo avidina-peroxidasa con el amortiguador PBS-Tween-leche y se estudiaron diferentes concentraciones (1 ug/ml, 2 ug/ml, 3ug/ml y 4 ug/ml). Se añadieron 100 ul a cada pozo.

* Se cubrió la placa y se incubó a 37°C por una hora.

7.- Reacción del Substrato.

* Se aspiró el líquido de la placa, y se lavó 4 veces con el amortiguador de lavados, se secó la placa con papel absorbente.

* Se añadieron 200 ul de la solución amortiguadora de reacción a cada pozo, y se dejó que se llevara a cabo la reacción durante 10 minutos.

* Se añadieron 50 ul de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción.

* Se midió la absorbancia en un contador de ELISA (espectro) de la marca Organon Teknika, utilizando un filtro de 492 nm.

8.- Cálculos y Elaboración de una Gráfica con los resultados obtenidos.

Se utilizó el programa Lotus 1,2,3, para llevar a cabo los cálculos y hacer la gráfica.

B) UTILIZACION DEL EQUIPO COMERCIAL DE ELISA PARA LA DEPECCION DEL FEC-GM.

El equipo comercial de ELISA para cuantificar el FEC-GM humano (Genzyme, Corporation), es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, que emplea el principio del sandwich con múltiples anticuerpos. En el Esquema 1 se demuestra el fundamento de la técnica, dicho fundamento es similar al que se utilizó en la estandarización del método de ELISA en el laboratorio.

Durante el primer día del ensayo, se cubrió la placa de poliestireno de 96 pozos con el anticuerpo monoclonal de ratón anti FEC-GM humano, y la placa se incubó durante toda la noche a 4°C.

Durante el segundo día del ensayo, el anticuerpo monoclonal se removió por aspiración. Los pozos se lavaron, y se "bloquearon" por adición de una solución de albúmina sérica bovina (ASB), para prevenir la unión no específica de los reactivos subsecuentes. La ASB no

adherida se removió por aspiración de los pozos. Los estándares apropiados y los sobrenadantes problema se añadieron a la placa y se incubaron 1 hora a 37°C. El material no adherido en las muestras se removió por aspiración de los pozos, y posteriormente se lavó la placa para eliminar substancias residuales. Posteriormente, se añadió un segundo anticuerpo (Ac. policlonal anti FEC-GM humano, elaborado en conejo), este anticuerpo se une a múltiples epítopes del FEC-GM contenido en la fase sólida. Se incubó por 1 hora a 37°C. De nuevo el anticuerpo no adherido se eliminó por aspiración y lavado. Se añadió un tercer anticuerpo (Ac policlonal anti-IgG de conejo, elaborado en chivo, marcado con biotina), y se incubó durante 45 minutos a 37°C, al terminar el tiempo de incubación, el anticuerpo no adherido se eliminó por aspiración y lavado de los pozos. Subsecuentemente, se añadió el complejo Avidina-Peroxidasa y se incubó la placa por 40 minutos a 37°C. Se aspiró y lavó la placa para eliminar la Avidina-Peroxidasa no adherida. Finalmente se añadió el buffer de reacción, el cual contiene peróxido y OPD, se desarrolló un color amarillo en los pozos donde se detectó FEC-GM. El desarrollo de color se detuvo a los 10 minutos, por adición de ácido sulfúrico a cada pozo. Se determinó la

absorbancia mediante un espectro de la marca Organon Teknika, con filtro de 492 nm. La medida de la absorbancia es proporcional a la concentración del FEC-GM. La concentración del FEC-GM en los sobrenadantes de cultivo se determinó por comparación de las absorbancias obtenidas, con las absorbancias de los estándares. Se utilizó el programa Lotus 1,2,3, para llevar a cabo los cálculos. (Ver detalles en el panfleto proporcionado por la compañía manufacturadora).

II) SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES EN GRADIENTES DE PERCOLL:

a) MATERIAL:

1.- Individuos: Se trabajó tanto con sujetos sanos como con pacientes con lepra lepromatosa (LL) y pacientes con lepra tuberculoide (TT). Los pacientes fueron diagnosticados en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. E. González" de la U.A.N.L., y se clasificaron de acuerdo al criterio de Ridley y Joplin (56).

2.- Percoll (SIGMA Chemicals Co.)

* Preparación de Percoll para separar células mononucleares (CMN):

- se preparó una solución de Percoll al 100% de la siguiente manera:

- * 9 partes de percoll (1.129 g/ml)
- * 1 parte de PBS 10X (libre de calcio y magnesio), el se esterilizó en autoclave.

- Se preparó una solución de Percoll al 60% a partir de percoll al 100 % añadiendo PBS 1X. El percoll al 60% tiene una densidad de 1.077 g/ml.

3.- PBS libre de calcio y magnesio:

- * NaCl 8.0 gr
- * Na_2HPO_4 1.15 gr
- * KCl 0.2 gr
- * KH_2PO_4 0.2 gr

Se disolvieron estas sales en 1 litro de agua tridestilada y libre de pirógenos. Se ajustó el pH a 7.4 - 7.6, y se esterilizó 20 min. a 15 lbs.

Nota: Para preparar PBS 10X en lugar de disolver en 1 litro de agua, se disuelven las sales en 100 ml de agua tridestilada.

b) TECNICA:

- Se obtuvieron aproximadamente 15 ml de sangre venosa (+ 20 U/ml de heparina) de cada uno de los individuos estudiados.
- Se diluyó la sangre con igual volumen de PBS.

- Se añadieron con cuidado 10 ml de la sangre diluída a 3 ml de percoll ($d= 1.077 \text{ g/ml}$) en un tubo cónico de plástico estéril de 15 ml de capacidad y se centrifugó inmediatamente a 1,300 rpm X 30 min. en una centrífuga refrigerada Beckman modelo TJ-6.

- Se removi6 con una pipeta la monocapa de células mononucleares y se transfirieron a un tubo cónico estéril de 15 ml de capacidad. Se diluyeron las células con un exceso de PBS, se mezclaron y centrifugaron (1,500 rpm, 15 min).

- Se descart6 el PBS, se resuspendieron las células y se aadi6 PBS hasta llenar el tubo y se centrifugaron (1,300 rpm, 10 min), se repiti6 el procedimiento 3 veces.

- Se resuspendieron las células en RPMI + 5% de suero AB humano y se contaron con azul tripano, (se espera obtener 1 millón de CMN por cada ml de sangre completa). Se ajust6 el volumen de la suspensión celular a $2 \times 10^6 \text{ cel /ml}$ con medio de cultivo.

III) INDUCCION DE LA PRODUCCION DEL FEC-GM in vitro POR
LAS CMN:

a) MATERIAL:

1.- Medio de Cultivo RPMI 1640 (SIGMA, Cell Culture Reagents).

- Para hacer 1 lt:

* Se añadieron 800 ml de agua tridestilada y libre de pirógenos a un vial de RPMI deshidratado.

* Se disolvieron 2 gr de bicarbonato de sodio.

* Se añadió suficiente agua para hacer 1 lt.

* Se reconstituyó el vial de l-glutamina (292 mg) con 10 ml de medio para obtener una concentración de 200mM. Si se añade a 1 lt de medio se obtiene una concentración 2mM (óptima concentración para cultivo de tejidos).

* Se añadieron 100 U/ml de medio de penicilina G (SIGMA) y 100 ug/ml de medio de estreptomina (SIGMA).

* Se esterilizó mediante el paso por un filtro de poro 0.22 um en la campana de flujo laminar, y se dividió en botellas de 100 ó 200 ml.

* Se añadió 2-Mercaptoetanol (2-ME), y suero AB humano (inactivado por calor a 57°C por 30 min.) al medio

de cultivo que se utilizó exactamente el día del experimento:

- 35 ul de 2-ME (14.33 M) en 10 ml de PBS (stock = 5×10^{-2} M). Se añadieron 100 ul del stock de 2-ME a 100 ml de RPMI. Concentración final 2-ME= 5×10^{-5} M.
- Se añadió suero AB humano para hacer una conc. al 5%: 5ml de suero AB a 100 ml de medio RPMI.

2.- Estímulos:

- * Ag sonicado de Mycobacterium leprae, donado por la Dra. Iris Estrada, del Instituto Politécnico Nacional, el cual se obtuvo en armadillos.
- * Lipopolisacárido (LPS) de E. coli (SIGMA Chemicals Co.)
- * IL-1 beta recombinante (Genzyme Corporation).
- * Fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA Chemicals Co.).

3.- Microplacas de Cultivo de 96 pozos de fondo plano y fondo en "U" (Corning Culture Plates).

b) Técnica:

En el Esquema 2, se puede observar el diagrama de flujo de la metodología empleada para la estimulación de las CMN de sangre periférica para la producción del FEC-GM. Los pasos que se siguieron son los siguientes:

- 1.- Una vez obtenidas las CMN de los diferentes individuos, se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 cel/ml en medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 2-ME, 5% de suero AB humano, glutamina y antibióticos. Se añadieron 100 ul de la suspensión celular a cada pozo de cultivo (200,000 células por pozo).

- 2.- Se llevaron a cabo dos procesos de incubación:
 - a) Se preincubaron las CMN durante 3 días antes de la adición de los estímulos.
 - b) Las CMN no se preincubaron, por lo que los estímulos se añadieron el mismo día en que se obtuvieron las CMN.

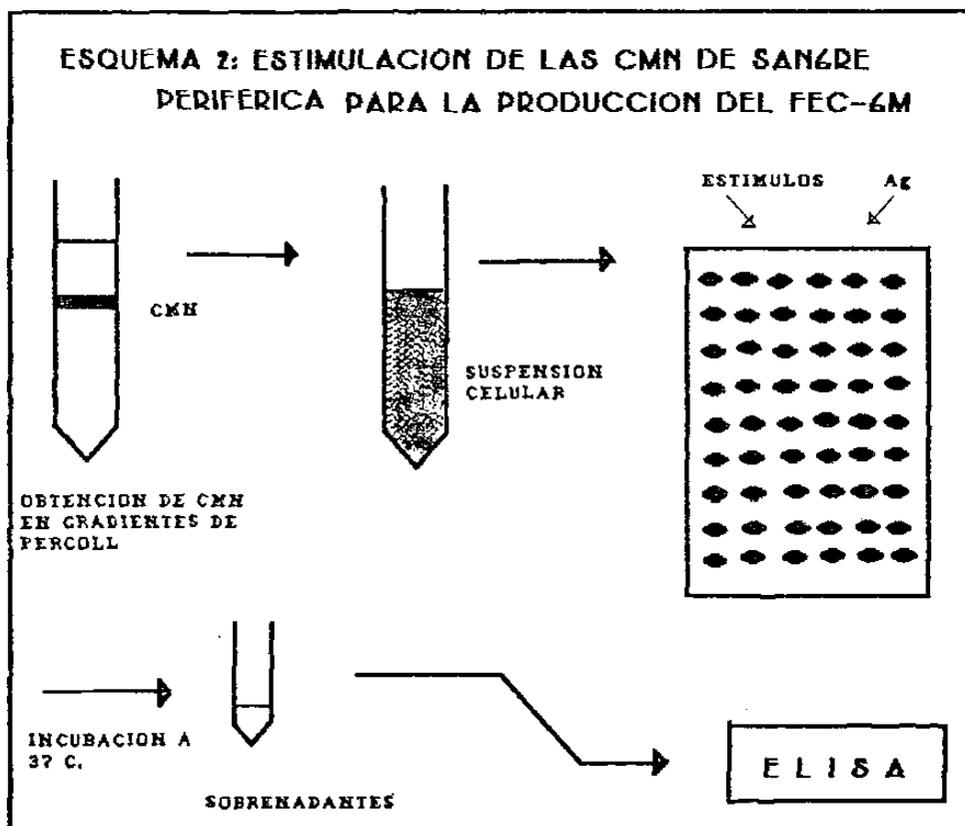
- 3.- La adición de los inductores de la producción del FEC-GM se llevó a cabo bajo el siguiente esquema: A los pozos apropiados de la placa de cultivo se añadieron:
 - a) 100 ul de medio (control)
 - b) 10 ul de M. leprae sonificado (400 ug/ml) + 80 ul de medio (conc. final 20 ug/ml).
 - c) 20 ul LPS (100 ug/ml) + 80 ul de medio (conc. final 10 ug/ml).

- d) 20 ul de PHA-M (1:10) + 80 ul de medio (final 5 ug/ml).
- e) 20 ul IL-1 (500 pg/ml) + 80 ul de medio (final 50 pg/ml).

4.- Se incubó la microplaca a 37° C en una incubadora de CO₂ (Imperial II-CO₂ Incubator, Lab Line Instruments Inc.), en una atmósfera de 5% de CO₂ y saturada de humedad, por 1, 3 y 5 días, para las CMN incubadas con LPS, IL-1 y PHA, y durante 3,5 y 7 días para las CMN incubadas con el Ag.

CONDICIONES DE LA MICROPLACA

	DIA 1	DIA 3	DIA 5
	1-4	5-8	9-12
A	RPMI	RPMI	RPMI
B	<u>M. leprae</u>	<u>M. leprae</u>	<u>M. leprae</u>
C	LPS	LPS	LPS
D	PHA	PHA	PHA
E	IL-1	IL-1	IL-1



- 5) Se colectaron los sobrenadantes (sn) de los pozos en tubos marcados, se centrifugaron (1,300 rpm x 10 min), y de nuevo se colectaron los sn libres de células y se congelaron a -20°C . Posteriormente se determinó el FEC-GM, en cada uno de los sn, por un método inmunoenzimático de ELISA.

Se analizaron diferentes tiempos de incubación, ya que no se conoce la cinética de producción del FEC-GM. Se utilizaron diferentes tipos de estímulos, para poder darnos una idea de la subpoblación celular involucrada en la producción del FEC-GM. El LPS estimula principalmente a macrófagos y linfocitos B, la IL-1r estimula en mayor proporción a linfocitos T y a macrófagos, la PHA tiene mayor efecto sobre linfocitos T, y el Ag estimula a linfocitos que reconocen de manera específica a dicho Ag.

En algunos experimentos se utilizaron placas de cultivo de fondo en "U", para saber si es necesario un contacto celular para la producción del FEC-GM, sin embargo, en la mayoría de los experimentos se utilizaron placas de cultivo de fondo plano.

IV) ANALISIS ESTADISTICO:

Los resultados se analizaron mediante el empleo del Método estadístico Factorial, utilizando la T de Student.

RESULTADOS.

I) METODO INMUNOENZIMATICO PARA LA CUANTIFICACION DEL FEC-GM:

Las condiciones óptimas encontradas en la estandarización del método de ELISA fueron:

a) Recubrimiento de la placa con el anticuerpo monoclonal anti-FEC-GM (IgG de ratón), a una concentración de 2 ug/ml.

b) Bloqueo de la placa con el amortiguador PBS-Tween-leche durante 15 minutos a 37°C.

c) Incubación de los estándares de FEC-GM recombinante y los sobrenadantes, durante 1 hora a 37°C.

d) Adición del anticuerpo secundario, anticuerpo policlonal anti-FEC-GM (IgG de conejo), a una concentración de 2 ug/ml.

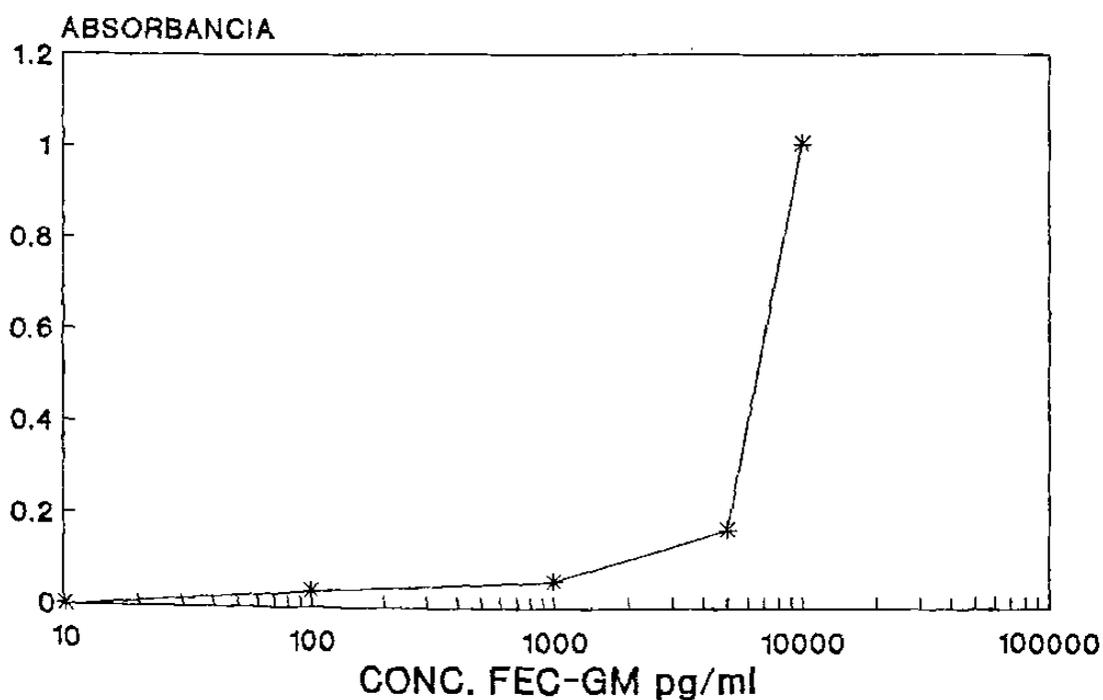
e) Adición del tercer anticuerpo, anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (IgG de chivo), a una concentración de 2 ug/ml.

f) Adición del complejo Avidina-Peroxidasa a una concentración de 2 ug/ml.

Mediante el uso de estándares de concentración conocida de FEC-GMr en el ELISA, se realizaron los cálculos para poder obtener una curva estándar (Gráfica 1). En esta gráfica

podemos ver que la sensibilidad del ELISA experimental no fue lo suficientemente alta, pues se esperaba tener una sensibilidad menor a 100 pg/ml y sin embargo, se detectaron aproximadamente 5000 pg/ml; dicha sensibilidad no fue la adecuada para detectar el FEC-GM en los sobrenadantes de cultivo.

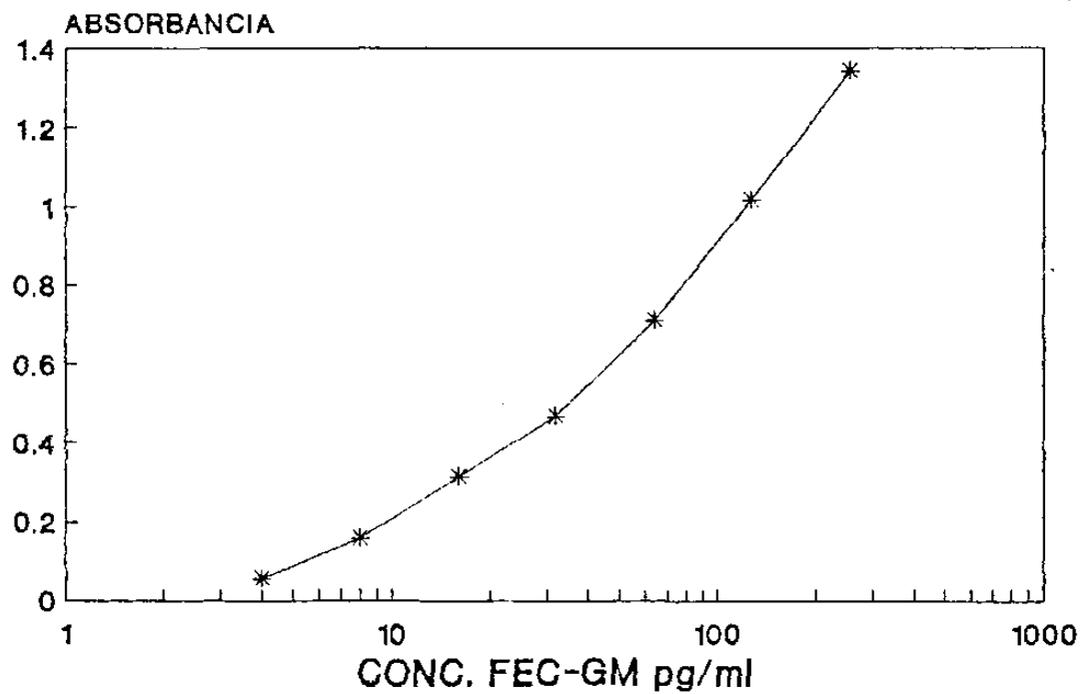
CUANTIFICACION DEL FEC-GM ELISA EXPERIMENTAL



GRAFICA 1

En contraste, el ELISA comercial mostró una mayor sensibilidad, por lo cual se decidió utilizarlo para llevar a cabo todos los experimentos. La sensibilidad del ELISA comercial reportado por la compañía manufacturadora se confirmó en el laboratorio y fue de 4 pg/ml (Gráfica 2).

CUANTIFICACION DEL FEC-GM ELISA COMERCIAL

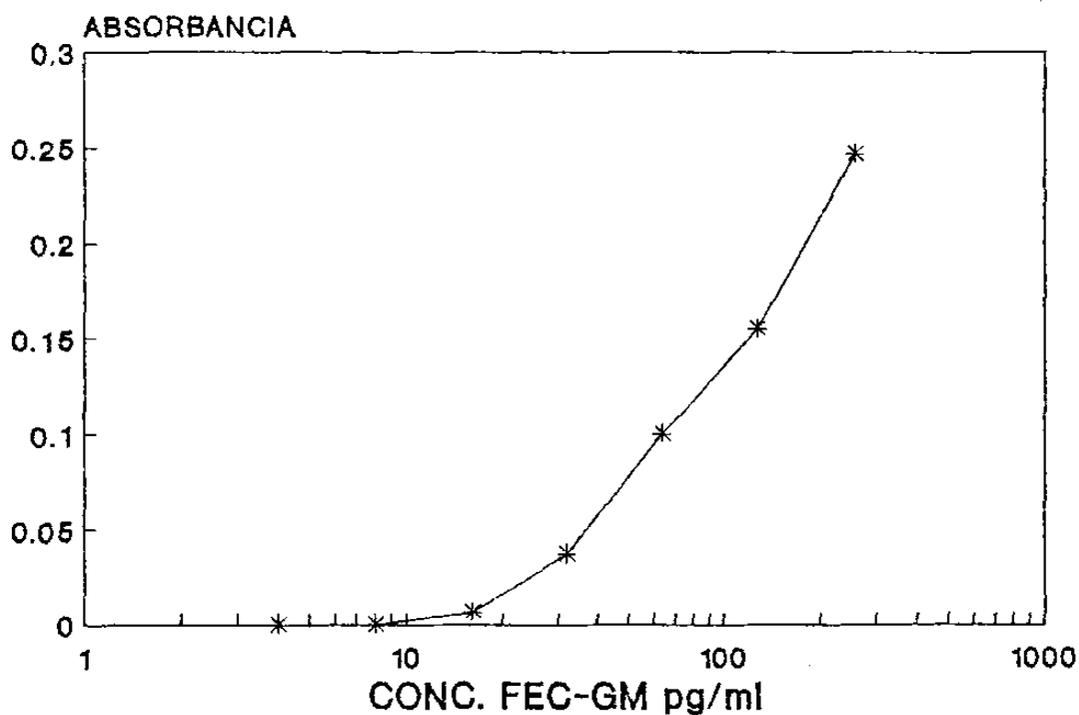


GRAFICA 2

A fin de investigar las causas de la menor sensibilidad del ELISA experimental, se analizaron los estándares empleados en los dos métodos de ELISA. De esta manera, con el ELISA comercial no se encontró una densidad óptica apreciable con los estándares de 100 y 1000 pg/ml del FEC-GMr (Behringwerke) utilizados en la calibración del ELISA experimental. Esto sugirió que el FEC-GMr de Behringwerke estaba degradado o no era reconocido óptimamente por el o los anticuerpos anti-FEC-GM de Genzyme. El ELISA experimental detectó los estándares de FEC-GMr (Genzyme), desde el de 256 pg/ml hasta el de 32 pg/ml, pero no los de 16, 8 y 4 pg/ml (Gráfica 3); es decir la sensibilidad del ELISA experimental parece ser de 32 pg/ml. Fue de interés notar que los estándares del FEC-GMr (Behringwerke) dieron una densidad óptica correspondiente a una concentración aproximadamente 100 veces menor a la indicada (datos no mostrados).

Considerando esto, es posible que la sensibilidad de 5000 pg/ml del ELISA experimental original, correspondiera a una sensibilidad de 50 pg/ml al emplear el FEC-GMr de Genzyme. Es conveniente continuar con la estandarización del método, para poder llevar a cabo estudios posteriores.

CUANTIFICACION DEL FEC-GMr de GENZYME
MEDIANTE EL ELISA EXPERIMENTAL



GRAFICA 3

II) DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE PRODUCCION DEL
FEC-GM POR CMN ESTIMULADAS CON DIVERSOS AGENTES:

Debido al alto costo del equipo de ELISA comercial, nos planteamos el objetivo de determinar el tiempo óptimo de producción del FEC-GM, inducida por los diversos agentes estimulantes y así reducir el número de muestras por analizar.

Para este fin, se obtuvieron las CMN en gradientes de Percoll, tanto de un sujeto sano, como de un paciente con lepra tuberculoide, el cual sí responde al antígeno de M. leprae . Se llevó a cabo la inducción de la producción del FEC-GM con los diferentes estímulos, y se incubó a diferentes tiempos. Al final de cada incubación, se colectaron los sobrenadantes y se cuantificó el FEC-GM por medio del ELISA comercial (Genzyme), se realizaron duplicados para cada determinación, y se calculó la media.

Como se observa en las tablas 1 y 2, existe una producción espontánea del FEC-GM por las CMN cultivadas en medio solo, la cual fue ligeramente mayor en el paciente tuberculoide en comparación al sujeto sano. Por otro lado, el antígeno de M. leprae, indujo un incremento modesto en la producción del FEC-GM por las CMN de ambos sujetos, en los días 3, 5 y 7. La PHA indujo una mayor producción del FEC-GM al día 5, mientras que el LPS y la IL-1 beta fueron más eficientes al día 3. El LPS fue un potente inductor del FEC-GM en el paciente tuberculoide estudiado, mientras que la IL-1 beta no tuvo ningún efecto. De acuerdo a estos datos y a los reportados en la literatura (14), se determinó que el LPS y la IL-1r inducen una producción mayor de FEC-GM al tercer día, y la PHA y el Ag al quinto día de estimulación.

TABLA 1

PRODUCCION DEL FEC-GM (pg/ml) EN UN SUJETO SANO

ESTIMULO	TIEMPO DE INCUBACION			
	1 DIA	3 DIAS	5 DIAS	7 DIAS
Rg <i>M. leprae</i>	-----	250 (72)	246 (69)	250 (73)
PHR	108 (0)	234 (56)	258 (81)	-----
LPS	100 (0)	350 (172)	N.D.	-----
IL-1 beta	183 (32)	225 (47)	211 (34)	-----
Control	161	178	177	-----

TABLA 2

PRODUCCION DEL FEC-GM (pg/ml) EN UN PACIENTE TUBERCULOIDE

ESTIMULO	TIEMPO DE INCUBACION			
	1 DIA	3 DIAS	5 DIAS	7 DIAS
Rg <i>M. leprae</i>	-----	255 (25)	257 (34)	274 (51)
PHR	182 (0)	247 (17)	281 (68)	-----
LPS	908 (707)	1005 (775)	900 (677)	-----
IL-1 beta	211 (10)	218 (0)	223 (0)	-----
Control	201	230	223	-----

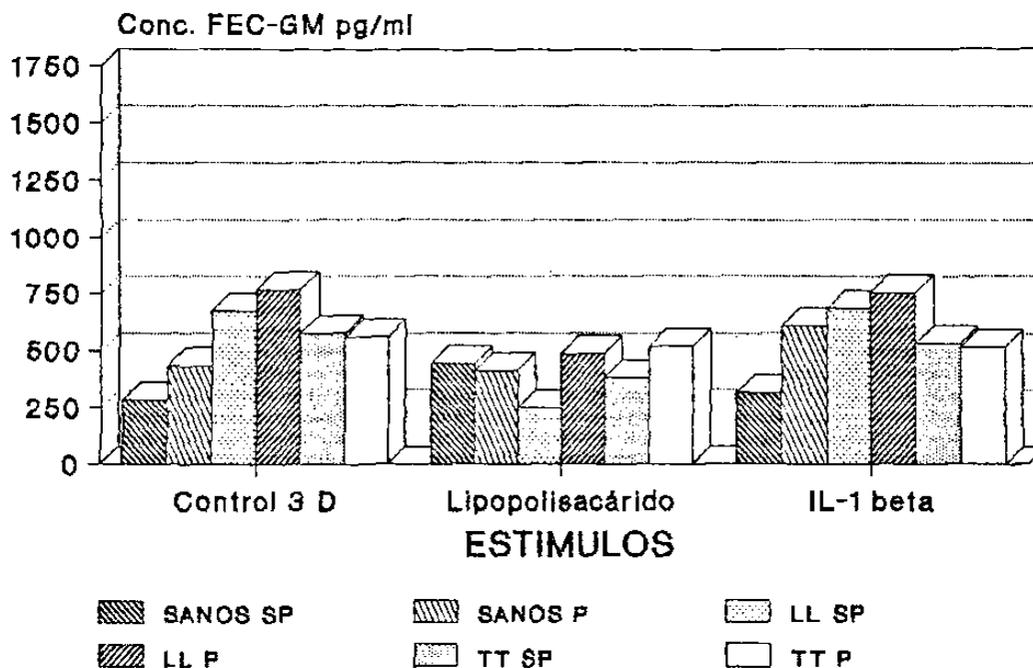
NDIA: Los números en paréntesis corresponden a la producción específica del FEC-GM.

Producción Específica = Producción total - Producción Espontánea

Antes de continuar el estudio con un número mayor de individuos, se analizaron las siguientes condiciones:

a) preincubación de las CMN durante tres días antes de la adición de los estímulos, y b) sin preincubación de las CMN, por lo que la adición de los estímulos se hizo el mismo día en que se obtenían las células. Este estudio se llevó a cabo, en vista de que los monocitos pueden tener una estimulación espontánea transitoria debido a la adherencia al plástico durante el cultivo, con la producción subsecuente de algunas citocinas. Para poder determinar una probable diferencia entre las dos condiciones, se realizó el experimento con 3 sujetos sanos, 3 pacientes lepromatosos y 3 pacientes tuberculoides. Se establecieron las dos condiciones: 1) Preincubación de las CMN durante 3 días y 2) Sin preincubación de las CMN. Una vez añadidos los diferentes estímulos, las CMN se incubaron durante 3 días para LPS e IL-1 α y durante 5 días para PHA y el Ag. Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 4, 5 y 6. Como se puede observar, no hubo una diferencia significativa entre células preincubadas y sin preincubar para los diferentes estímulos. Si bien existe una producción espontánea del FEC-GM en los tres grupos de sujetos estudiados, esta fué mayor en los pacientes lepromatosos, la cual se incrementó ligeramente al llevarse a cabo la preincubación de las CMN. El LPS y la IL-1 beta no indujeron

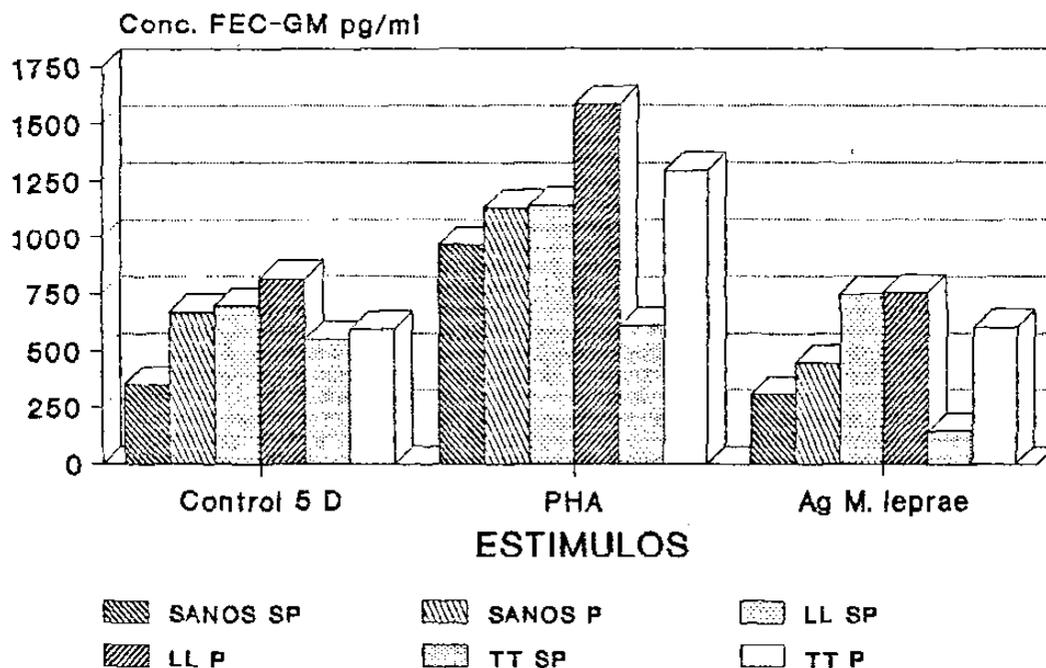
PRODUCCION TOTAL DEL FEC-GM POR CMN
 SIN PREINCUBAR (SP) Y PREINCUBADAS (P)



GRAFICA 4

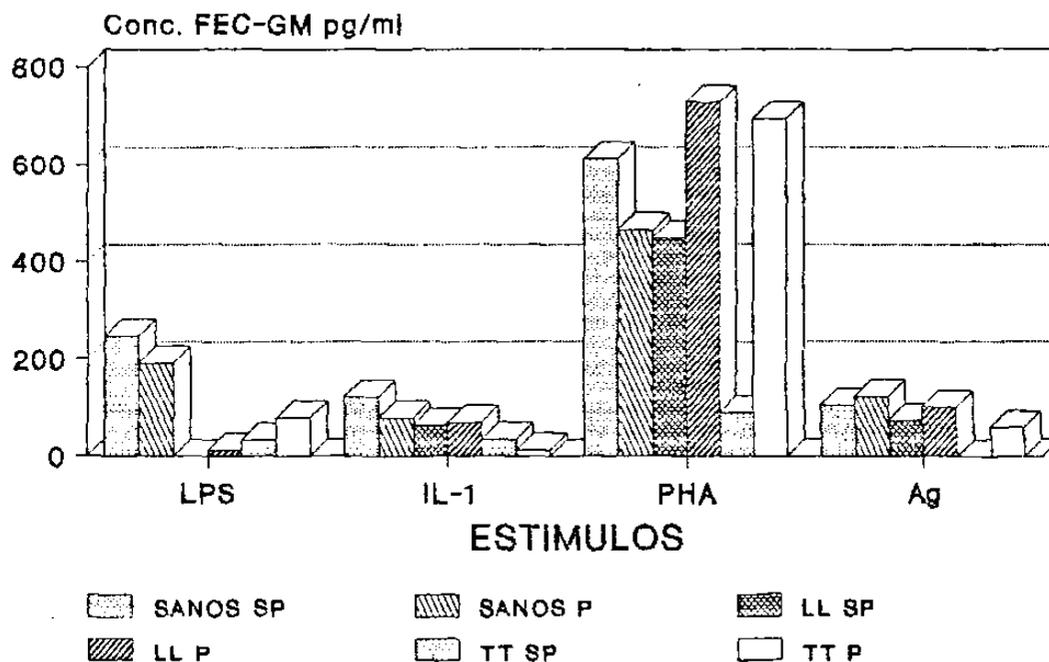
una producción considerable del factor en ninguna de las condiciones estudiadas. La PHA fue un potente inductor de la producción del FEC-GM por las CMN y se observa un aumento en la producción del factor cuando las CMN se preincubaron. En cuanto al Ag de M. leprae, fue un inductor moderado, sin embargo se observó un ligero aumento en la producción del

PRODUCCION TOTAL DEL FEC-GM POR CMN SIN PREINCUBAR (SP) Y PREINCUBADAS (P)



GRAFICA 5

PRODUCCION ESPECIFICA DEL FEC-GM POR CMN SIN PREINCUBAR (SP) Y PREINCUBADAS (P)



GRAFICA 6

factor al preincubarse las CMN. En la Gráfica 6 podemos observar que la producción específica (total - espontánea) tiende a ser mayor cuando las células fueron preincubadas, en comparación a las células sin preincubar en ambos grupos de pacientes. En contraste, los individuos sanos no mostraron incremento en la producción específica del factor después de la preincubación. En base a los resultados decidimos llevar a cabo la preincubación de las células antes de añadir cualquier agente estimulante.

III) CUANTIFICACION DEL FEC-GM EN SUJETOS SANOS Y PACIENTES CON LEPRO: .

En base a los resultados hasta ahora obtenidos, se llevó a cabo la cuantificación del FEC-GM en 10 sujetos sanos, 15 pacientes con lepra lepromatosa y 5 pacientes con lepra tuberculoide. Las características de los tres grupos se muestran en las tablas 3, 4 y 5. Para determinar la producción del FEC-GM, se obtuvieron las CMN de cada individuo en gradientes de Percoll, se preincubaron por 3 días, y se añadieron los diferentes estímulos; las CMN se estimularon durante 3 días con LPS e IL-1r, y durante 5 días con PHA y el Ag. Para cada tiempo de incubación se estableció un control de CMN cultivadas en RPMI-1640, es decir, sin estímulo. Se

TABLA 3: SUJETOS SANOS

SUJETO	SEXO	EDAD	SUJETO	SEXO	EDAD
1	F	27	6	M	30
2	F	26	7	F	35
3	F	23	8	F	32
4	M	25	9	M	24
5	M	27	10	M	27

TABLA 4: PACIENTES LEPROMATOSOS

SUJETO	SEXO	EDAD	TRATAMIENTO
1	M	50	SULFONA, RIFAMPICINA
2	M	39	SULFONA, RIFAMPICINA
3	M	45	SULFONA, RIFAMPICINA
4	M	50	SULFONA
5	F	44	SULFONA
6	F	48	SULFONA
7	F	52	SULFONA
8	F	48	SULFONA, RIFAMPICINA
9	M	49	SULFONA
10	F	69	SULFONA
11	M	49	SULFONA
12	M	71	SULFONA
13	F	53	SULFONA
14	F	40	SULFONA
15	F	45	SULFONA

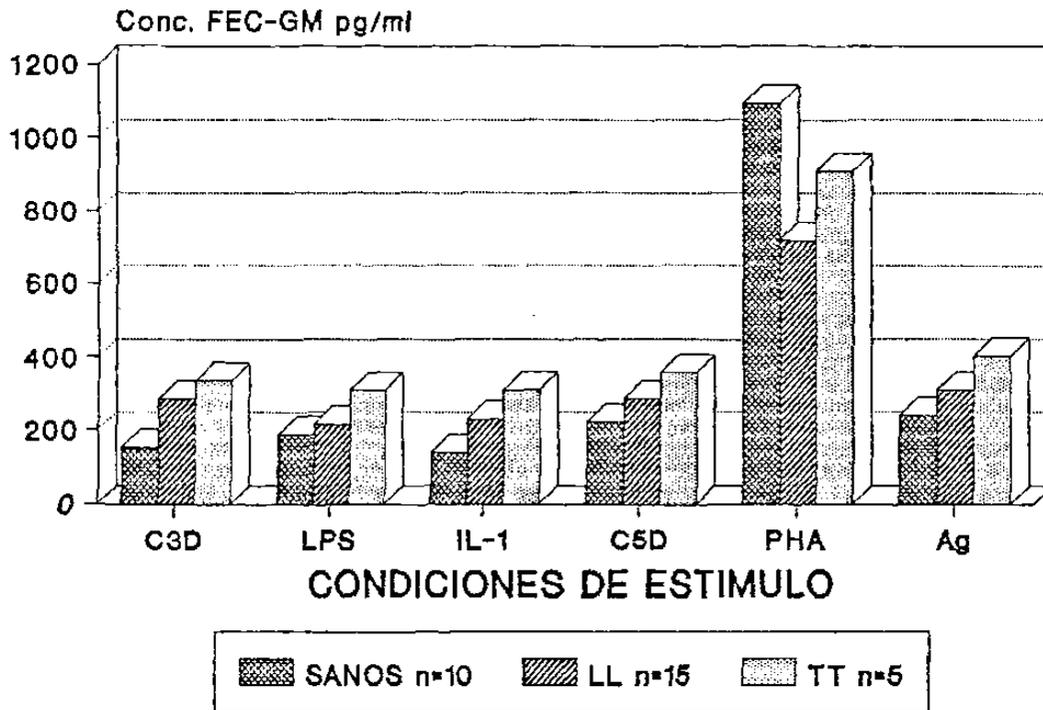
TABLA 5: PACIENTES TUBERCULOIDES

SUJETO	SEXO	EDAD	TRATAMIENTO.
1	F	45	SULFONA, RIFAMPICINA
2	F	60	SULFONA, RIFAMPICINA
3	F	36	SULFONA
4	M	85	PRIMERA CONSULTA
5	F	37	SULFONA

obtuvieron los sobrenadantes y se cuantificó el FEC-GM.

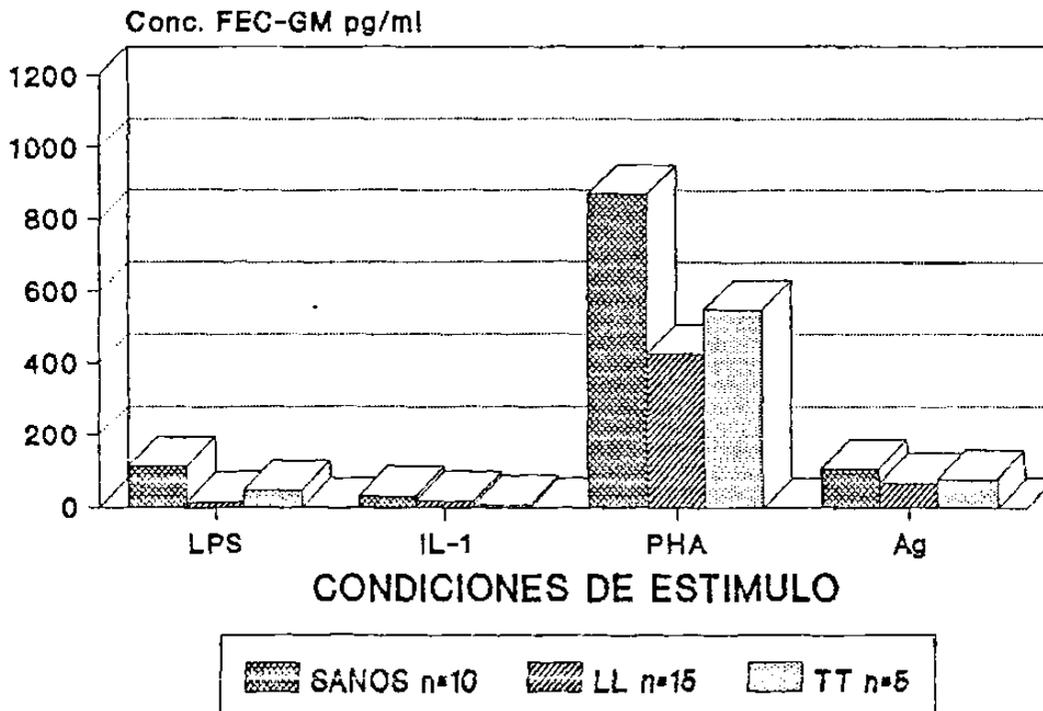
En las Gráficas 7 y 8 se observa la producción del FEC-GM inducida con los diferentes estímulos para cada grupo de sujetos, en las cuales se graficó la media de los resultados obtenidos, tanto de la producción total del factor (Gráfica 7), como de la producción específica (Gráfica 8). Los resultados mostraron una producción espontánea del FEC-GM por las CMN incubadas durante 3 días (posteriores a los tres días de preincubación), en los individuos sanos (155 ± 222 pg/ml), pacientes LL (286 ± 343 pg/ml), y pacientes TT (336 ± 394 pg/ml). No se observó un cambio apreciable en la producción espontánea del factor, entre células cultivadas por 3 ó 5 días adicionales a los 3 días de preincubación. El LPS y la IL-1 al parecer no son inductores del FEC-GM, ya que la producción específica del factor inducida por estos estímulos, fue muy baja (Gráfica 8). El Ag mostró ser un inductor débil de la producción del FEC-GM por las CMN de los tres grupos de sujetos estudiados, ya que la producción específica del factor fue de 107 ± 153 pg/ml en los sujetos sanos, 68 ± 129 pg/ml en los pacientes lepromatosos, y 80 ± 92 pg/ml en los pacientes tuberculoides. La PHA fue el inductor más potente en la producción del FEC-GM por las CMN de los tres grupos de sujetos. La producción específica del factor (Gráfica 8)

**PRODUCCION TOTAL DEL FEC-GM
EN SUJETOS SANOS Y PACIENTES CON LEPRA**



GRAFICA 7

**PRODUCCION ESPECIFICA DEL FEC-GM
EN SUJETOS SANOS Y PACIENTES CON LEPRA**



GRAFICA 8

inducida con este estímulo, fue de 873 ± 538 pg/ml en sujetos sanos, 427 ± 492 pg/ml en pacientes lepromatosos, y 551 ± 307 pg/ml en pacientes tuberculoides. Al analizar los datos por la T de Student, no se encontraron diferencias significativas debido a que hubo una gran variabilidad en la producción del FEC-GM entre los diferentes individuos. Por esta razón, se decidió analizar los resultados obtenidos empleando el método estadístico factorial. Este método ayuda a disminuir la variación que existe entre los diferentes individuos, y por lo tanto el error estándar se disminuye. Al emplear este método se obtuvo un error estándar de 240 pg/ml, lo cual indica el error de todo el experimento. Posteriormente se utilizó la T de Student para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos de sujetos, empleando los datos obtenidos por el método estadístico factorial.

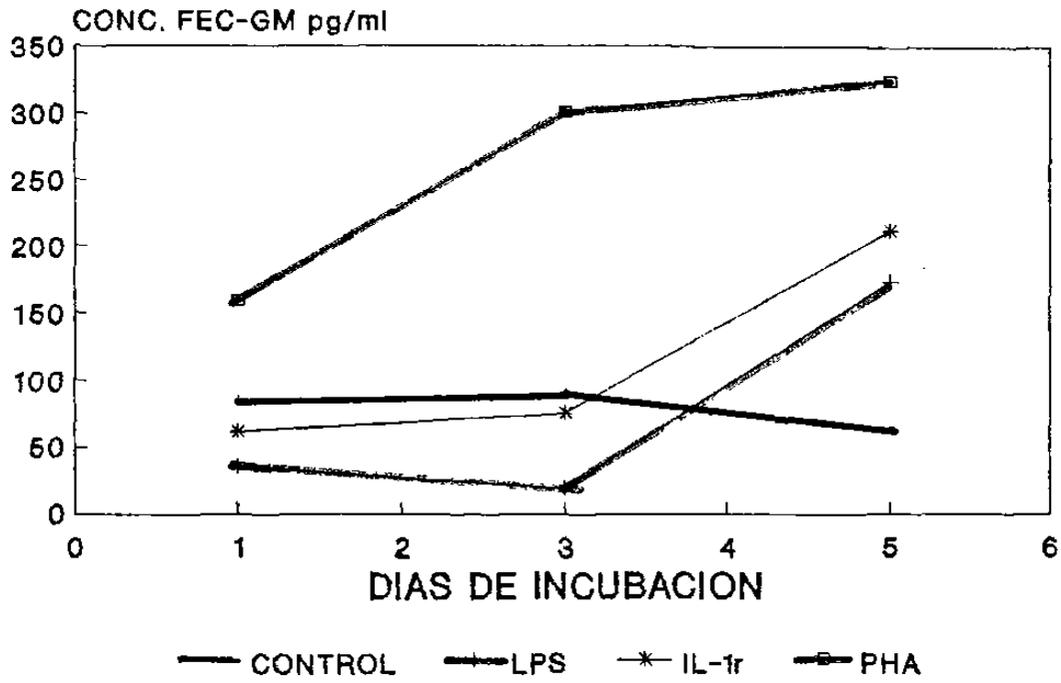
Al comparar la producción total del FEC-GM por las CMN estimuladas con PHA, se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre pacientes LL y sujetos sanos, pero no entre pacientes TT y sanos, ni entre pacientes LL y TT. La producción espontánea tiende a ser mayor en los pacientes (TT o LL), al compararlos con los sujetos sanos; sin embargo, estadísticamente no es significativa. Por otro lado, hubo una diferencia significativa en la producción específica del FEC-

GM, inducida con PHA, al comparar sanos con pacientes LL ($p \leq 0.01$) y sanos con pacientes TT ($p = 0.05$), pero no existieron diferencias con otros estímulos. En contraste, no hubo diferencia significativa entre pacientes LL y TT con ninguno de los estímulos.

IV) CINÉTICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM:

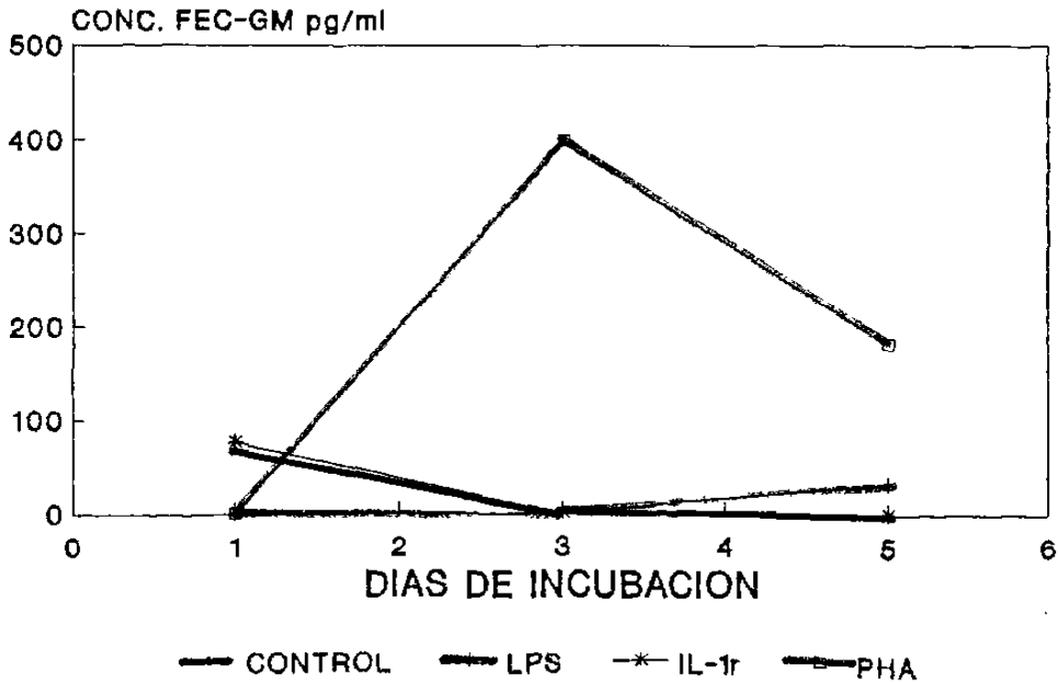
Debido a que se observó una gran variabilidad en la producción del FEC-GM entre los diferentes individuos, se decidió estudiar la cinética de producción del factor en un mayor número de individuos, para determinar si los tiempos elegidos eran realmente los adecuados. Se obtuvieron las CMN de 6 sujetos sanos, 6 pacientes con lepra lepromatosa y 2 pacientes con lepra tuberculoide, se preincubaron 3 días y posteriormente se llevó a cabo la adición de los diferentes estímulos, midiéndose la concentración del FEC-GM al 1º, 3º y 5º día de cultivo. Como puede observarse en las Gráficas individuales (ver Gráficas 9, 10 y 11), cada sujeto estudiado mostró una cinética de producción diferente. Además, las CMN de 2 sujetos sanos, 2 pacientes con lepra lepromatosa y 1 paciente con lepra tuberculoide, no produjeron FEC-GM con ninguno de los estímulos probados (resultados no mostrados).

**CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM
SUJETO SANO 1**



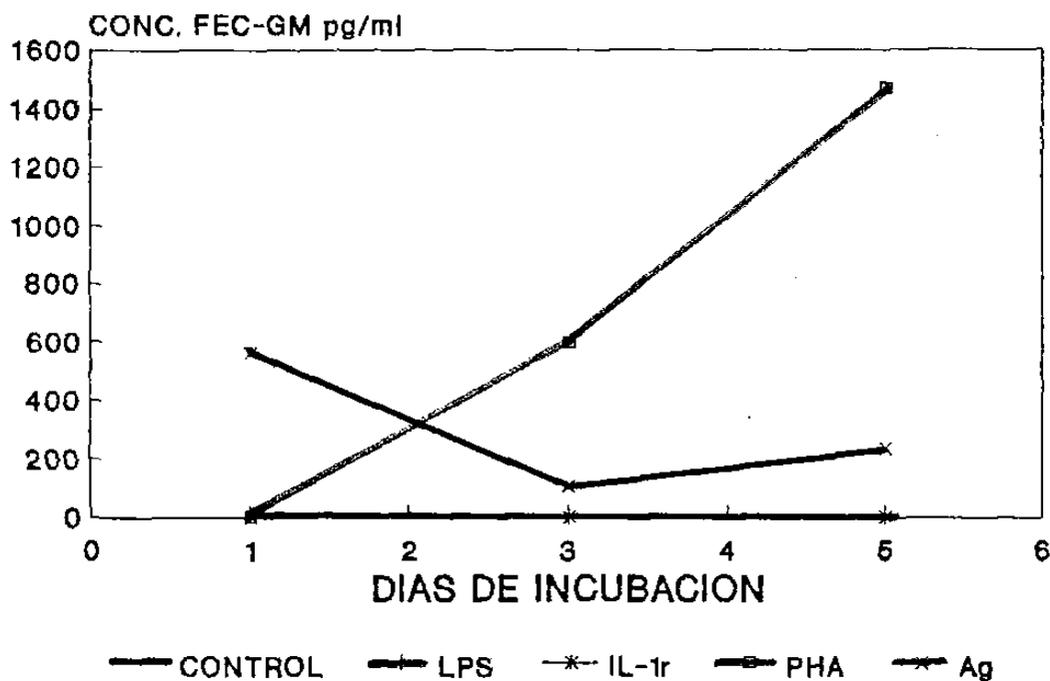
GRAFICA 9 A

**CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM
SUJETO SANO 2**



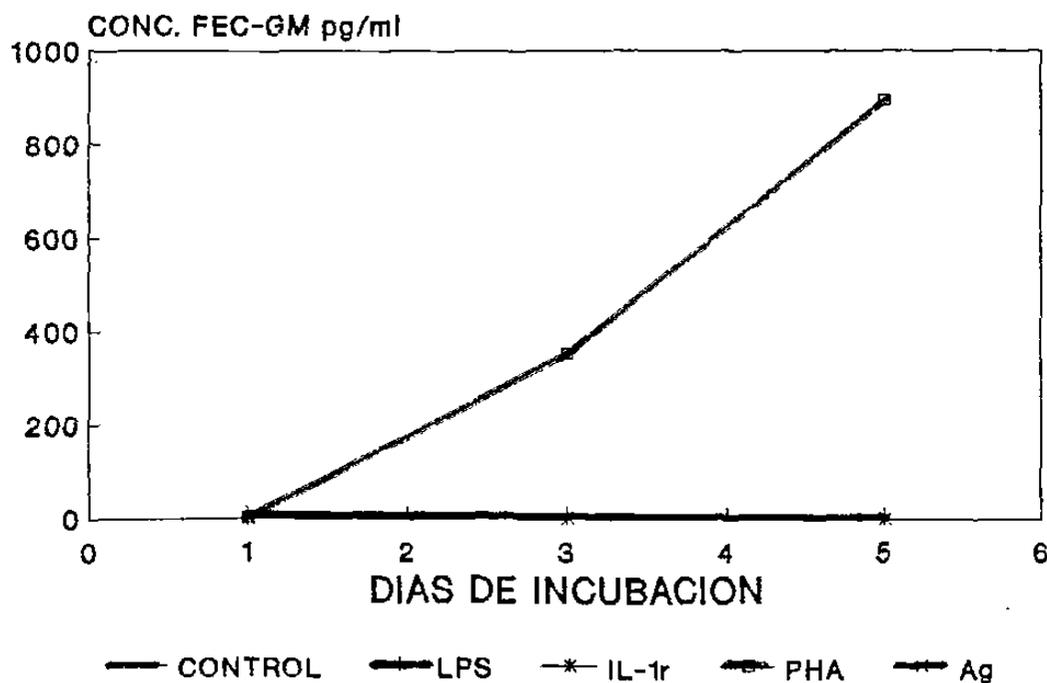
GRAFICA 9 B

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM SUJETO SANO 3



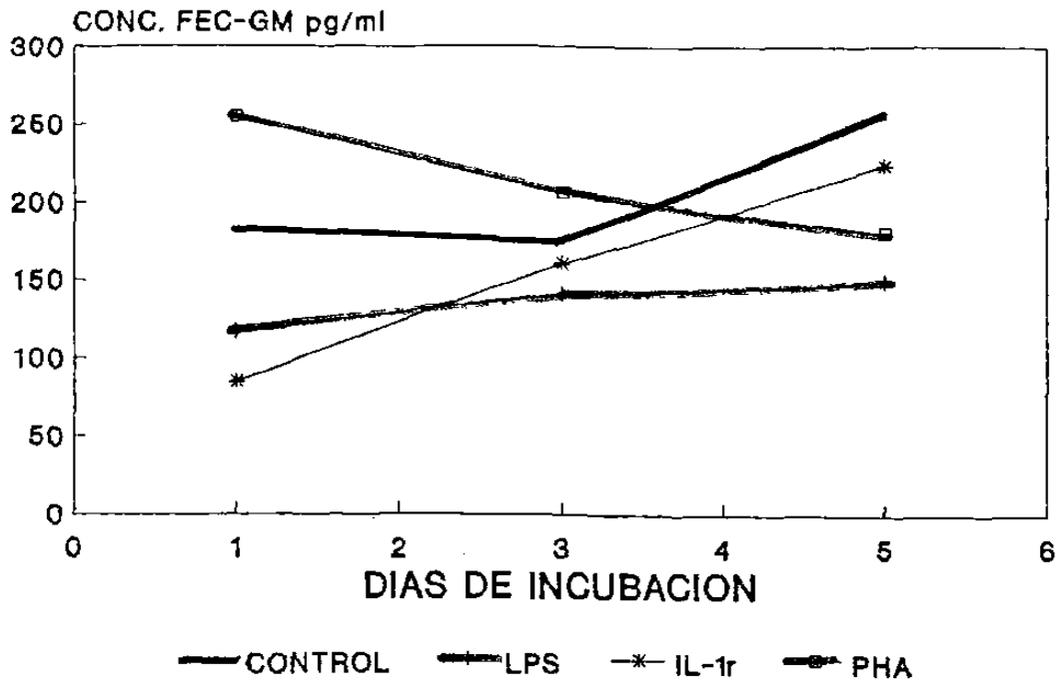
GRAFICA 9 C

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM SUJETO SANO 4



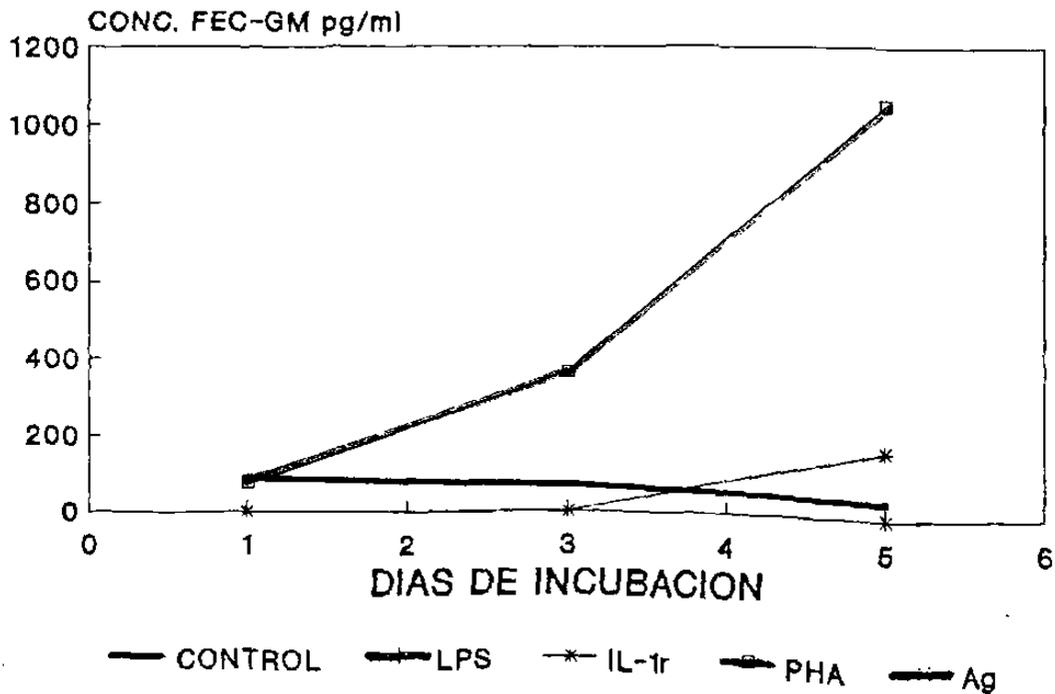
GRAFICA 9 D

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM
PACIENTE LL 1



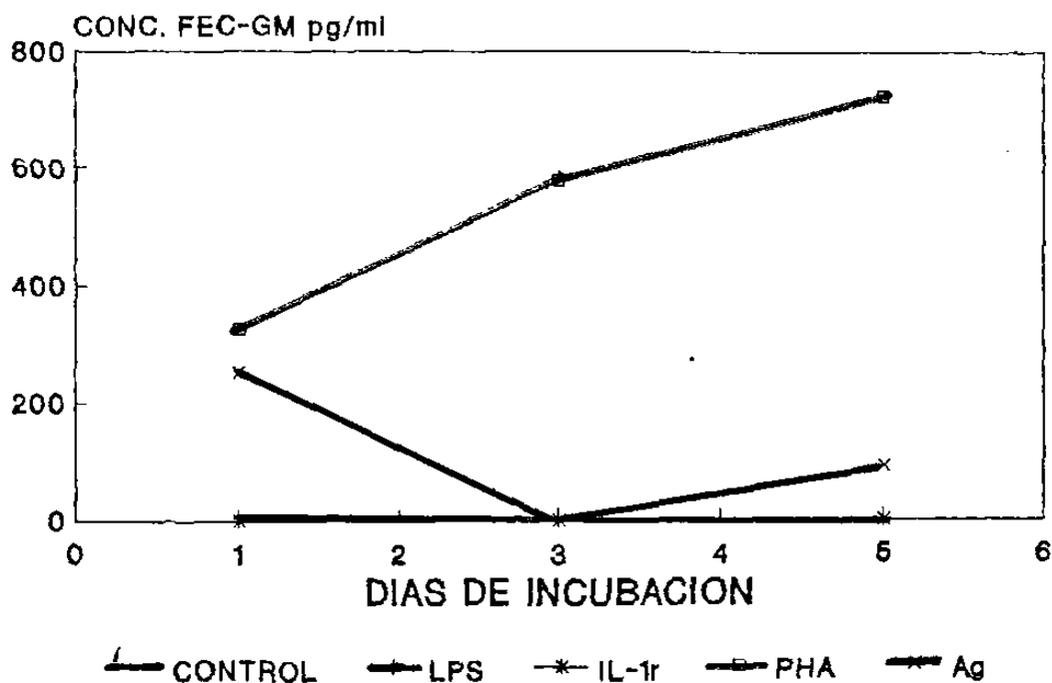
GRAFICA 10 A

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM
PACIENTE LL 2



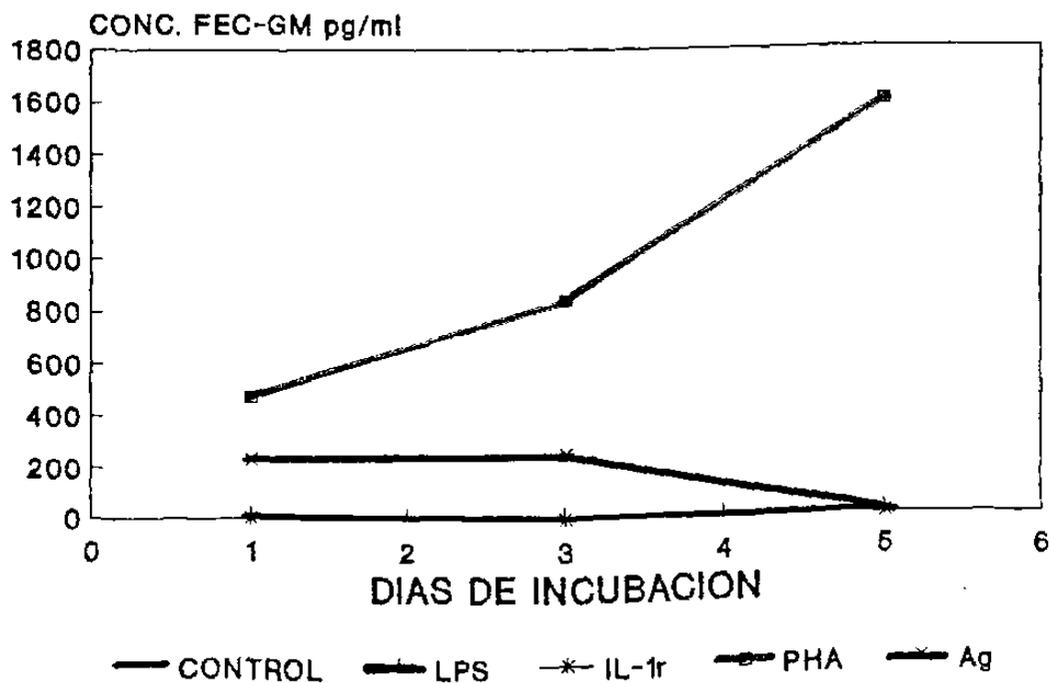
GRAFICA 10 B

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM PACIENTE LL 3



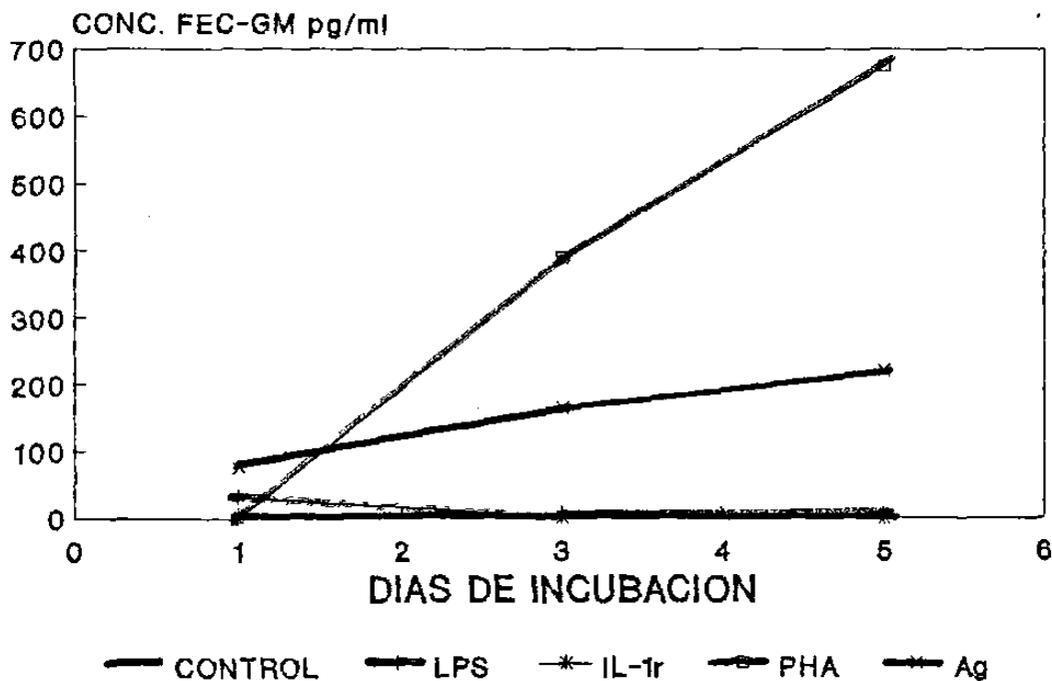
GRAFICA 10 C

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM PACIENTE LL 4



GRAFICA 10 D

CINETICA DE PRODUCCION DEL FEC-GM PACIENTE TT 1



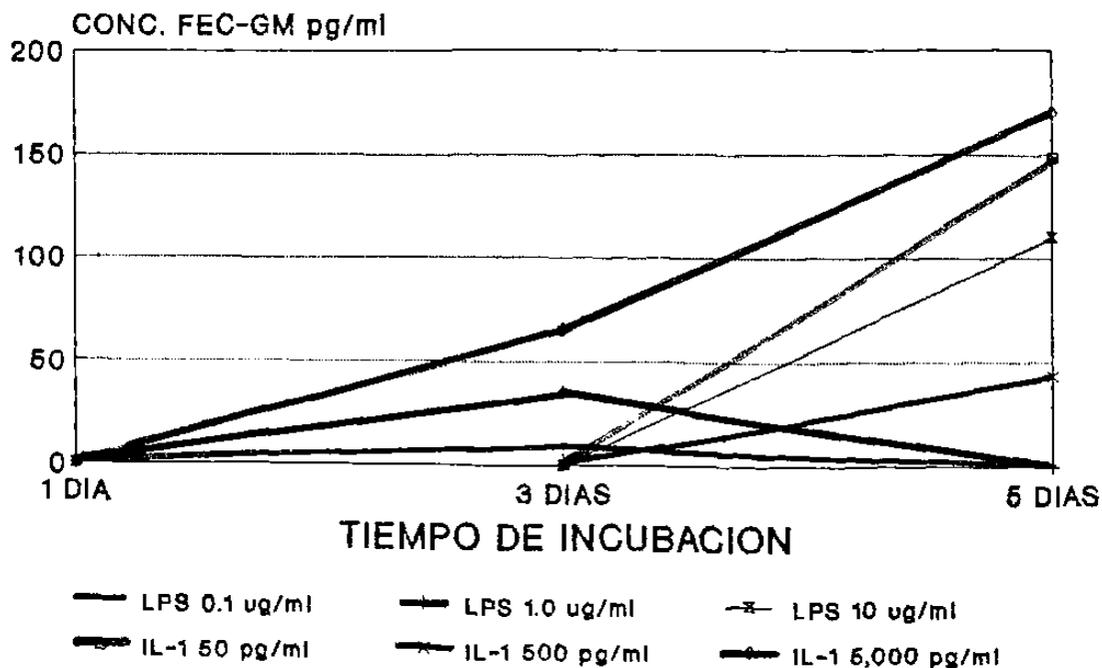
GRAFICA 11

IV) ESTUDIO DOSIS-RESPUESTA PARA LPS E IL-1r:

Debido a que el LPS y la IL-1 no indujeron una producción elevada del FEC-GM, se decidió también hacer un estudio de dosis-respuesta a diferentes tiempos, a fin de comprobar si la dosis del LPS y la IL-1r utilizada fue la adecuada. Se obtuvieron las CMN de dos sujetos sanos y un paciente con lepra lepromatosa, se preincubaron por 3 días y posteriormente

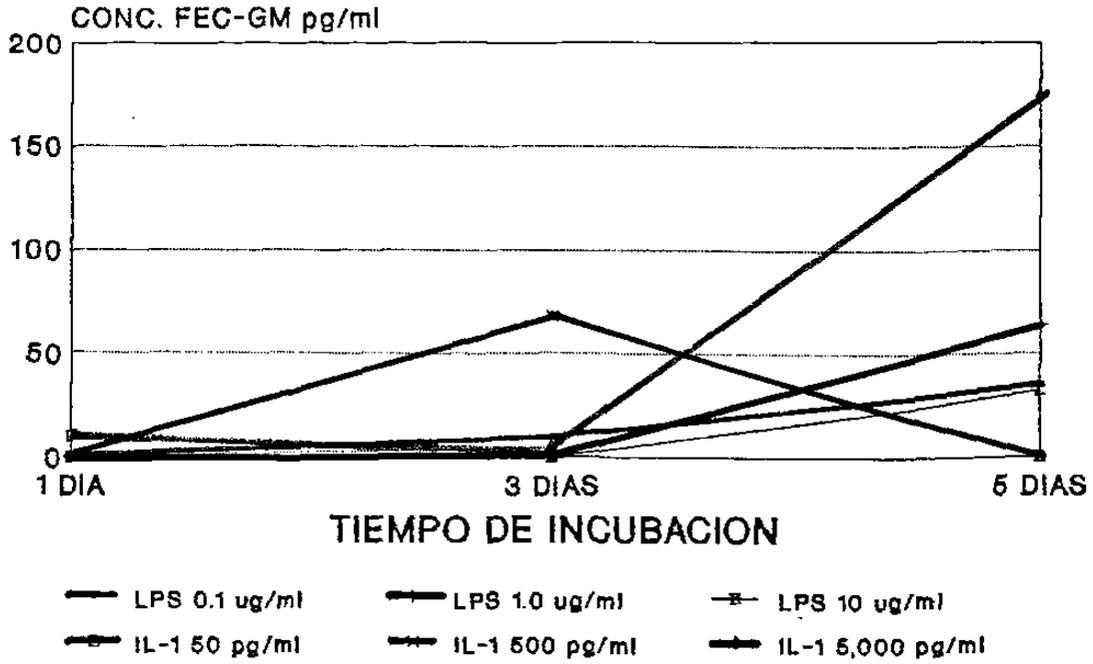
se llevó a cabo la inducción del FEC-GM, probando diferentes dosis de LPS (0.1 ug/ml, 1.0 ug/ml y 10 ug/ml), y de IL-1r (50 pg/ml, 500 pg/ml y 5,000 pg/ml). Para ambos estímulos se incubaron 1, 3 y 5 días, y se estableció un control (medio de cultivo solo) para cada tiempo de incubación. Como puede observarse en las Gráficas 12, 13 y 14, no se encontró una dosis óptima para LPS ni para IL-1r, ya que se obtuvieron resultados diferentes con cada individuo estudiado.

DOSIS-RESPUESTA PARA LPS E IL-1
PRODUCCION ESPECIFICA FEC-GM: S.SANO 1



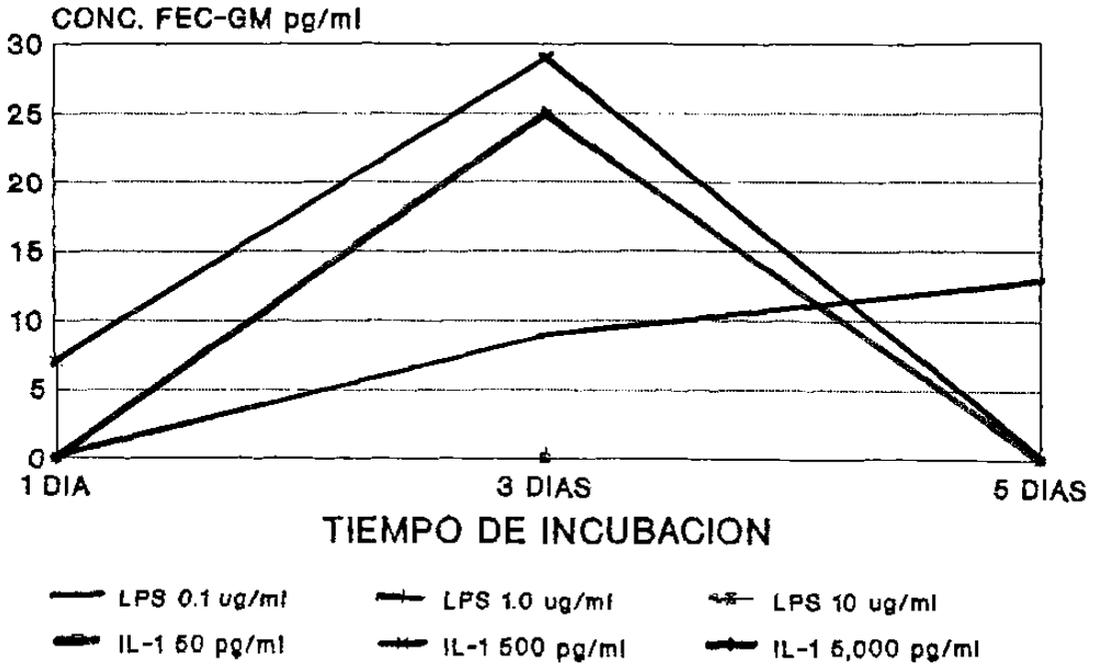
GRAFICA 12

DOSIS-RESPUESTA PARA LPS E IL-1
PRODUCCION ESPECIFICA FEC-GM: S. SANO 2



GRAFICA 13

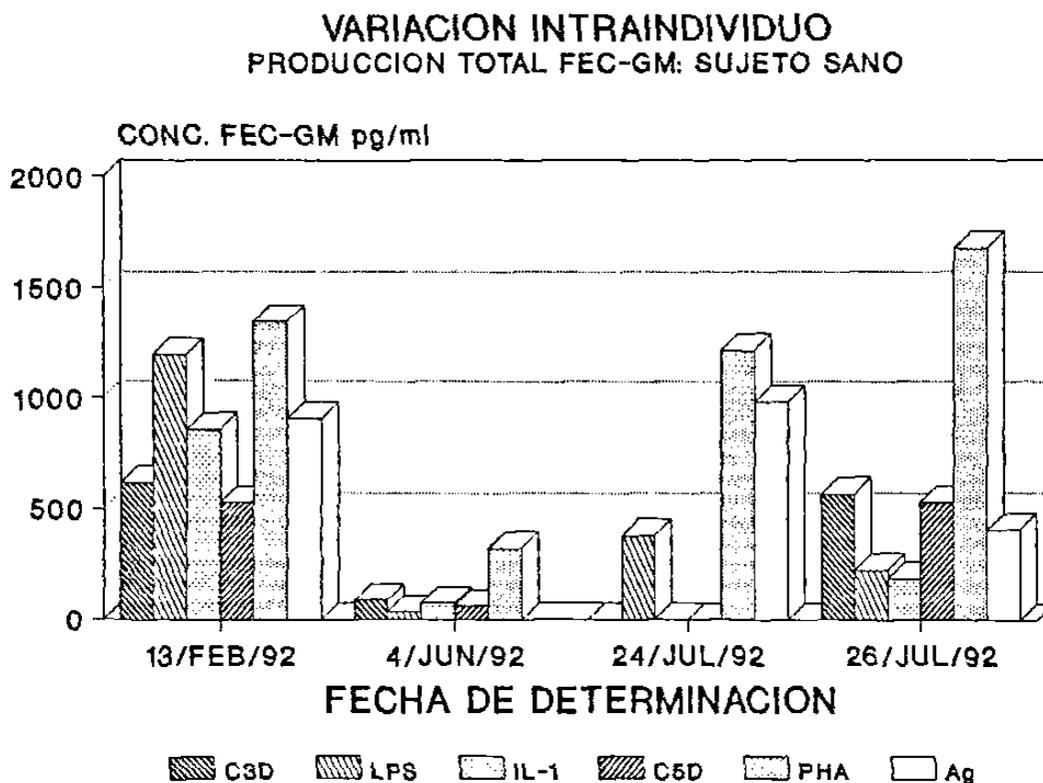
DOSIS-RESPUESTA PARA LPS E IL-1
PRODUCCION ESPECIFICA FEC-GM: PAC. LL 1



GRAFICA 14

V) ESTUDIO DE LA PRODUCCION DEL FEC-GM EN UN SOLO INDIVIDUO:

Debido a que los resultados hasta ahora obtenidos mostraron una gran variabilidad en la producción del factor entre los diferentes individuos, se decidió llevar a cabo un estudio para determinar si también existía diferencia intraindividuo. Se obtuvieron las CMN de una misma persona en



GRAFICA 15

diferentes días, y se llevó a cabo la inducción del FEC-GM con los diferentes estímulos. Se colectaron los sobrenadantes al final del tiempo de incubación, y se cuantificó el FEC-GM por el método de ELISA de fuente comercial. Como puede observarse en la Gráfica 15, existe una variabilidad intraindividuo en la producción del FEC-GM, ya que en las diferentes fechas en las que se indujo la producción del factor, se obtienen resultados diferentes.

DISCUSION:

Como pudimos demostrar, el ELISA experimental detectó el FEC-GMr de Genzyme hasta 32 pg/ml; y además, que el FEC-GMr (Behringwerke) tenía una concentración aproximadamente 100 veces menor a la indicada. Por lo tanto, esto sugiere la posibilidad de que el FEC-GMr de Behringwerke estuviera degradado o no tuviera la concentración indicada. Antes de decidir utilizar el equipo de ELISA comercial, para la cuantificación del FEC-GM, se pensaba llevar a cabo el estudio de la cinética de producción del Factor para cada uno de los individuos que se estudiara, ya que en la literatura no existen reportes claros a cerca de la cinética de producción del FEC-GM por células mononucleares de sangre periférica; sin embargo, debido al costo del equipo comercial fue necesario reducir el número de sobrenadantes en los cuales teníamos que cuantificar el Factor, por esta razón se planteó el objetivo intermedio de conocer el tiempo óptimo de producción del FEC-GM para cada uno de los estímulos a estudiar, pero sólo se trabajó con un sujeto sano y un paciente con lepra tuberculoide.

Al llevar a cabo este estudio se encontró que el FEC-GM se sintetizó en mayor cantidad al incubarse las CMN durante 3

días con LPS e IL-1r, y durante 5 días con PHA. La producción del FEC-GM inducida con el antígeno de M. leprae no sufrió una variación en los tiempos de incubación estudiados (Tablas 1 y 2). Erich Platzer y cols. (15), reportaron que la producción máxima del FEC-GM ocurre al 5º día cuando las CMN son estimuladas con el anticuerpo monoclonal OKT3. EN base a este estudio, se decidió incubar durante 5 días a las CMN con el antígeno sonicado de M. leprae, para la inducción de la producción del FEC-GM.

Como se mencionó anteriormente, se decidió llevar a cabo el estudio mediante la preincubación de las CMN, ya que nos apoyamos en los trabajos sobre IL-1 realizados por el Dr. Unanue (comunicación personal), en los cuales se menciona, que las CMN sufren una estimulación inespecífica debido a su manipulación al obtenerse, y por su adhesión al plástico en las microplacas de cultivo. Al preincubarse las CMN durante tres días, se elimina esta estimulación inespecífica. Al finalizar la preincubación y activar a las CMN con los estímulos a probar, la producción de la citocina en estudio es, teóricamente, el resultado del estímulo específico. Estos mismo resultados han sido observados por el Dr. Otoniel Martínez-Maza (70) en estudios hechos con IL-6. Nuestros resultados indicaron que la preincubación de las células no

elimina la liberación espontánea del FEC-GM, sino que su producción en algunos individuos fue incluso mayor que cuando las células no fueron preincubadas. Es posible que la regulación de la producción del FEC-GM sea distinta a la de la IL-1 e IL-6, o bien, que exista una producción constitutiva del FEC-GM. Ciertamente, en experimentos posteriores se observó que la producción espontánea del FEC-GM por CMN persiste hasta el 8º día de cultivo (Gráficas 9A, 10A y 10B).

Al analizar los resultados obtenidos en cuanto a la producción del FEC-GM por CMN preincubadas durante 3 días, y CMN sin preincubar, se observó una gran variabilidad en la producción del factor en los diferentes individuos estudiados; razón por la cual no se encontró una diferencia significativa. Sin embargo, estadísticamente no es válido decir que no existe una diferencia significativa, precisamente por esta gran variabilidad entre los diferentes individuos, y además porque el número de sujetos estudiados fue muy pequeño ($n=3$); sin embargo, decidimos llevar a cabo la preincubación de las células ya que observamos una producción total del FEC-GM un poco mayor en comparación con la obtenida por las células sin preincubar; además, en los pacientes la producción específica fue mayor cuando se preincubaron las células.

Al cuantificar el FEC-GM producido por las CMN de un mayor número de sujetos sanos y de pacientes, volvimos a confirmar la gran variabilidad que existe en la producción del factor entre los diferentes individuos. Esta misma variabilidad fue observada por otros investigadores: en el estudio de Moore y cols. (16) puede observarse una variabilidad en la producción del factor por células adherentes y linfocitos T humanos, estimulados in vitro con el anticuerpo monoclonal OKT3; y en el estudio de Takematsu y Tagami (71) se observaron niveles variables de FEC-GM en lesiones psoriáticas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indicaron que la producción del FEC-GM no está alterada en los pacientes con lepra. De esta manera, se demostró que la hipótesis planteada no se cumple; sin embargo, falta demostrar si la respuesta de las células del sistema inmune a este factor es adecuada en los pacientes con lepra lepromatosa. Por otro lado, es posible que la producción de esta citocina se encuentre alterada en las lesiones de piel de los pacientes con lepra, mientras que su producción en el compartimento sanguíneo no sea anormal. Al respecto, Modlin y cols. (72-74) estudiaron la producción de ciertas citocinas por células de las lesiones de pacientes con lepra, mediante la técnica de

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estos estudios mostraron la presencia de ARN mensajero de citocinas producidas principalmente por macrófagos, tales como la Interleucina-1 beta (IL-1 beta), el Factor de Necrosis Tumoral (TNF-alfa), el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (FEC-GM), el Factor de Crecimiento y Transformación (FCT- beta 1) y la IL-6), en las lesiones de piel de los pacientes con lepra tuberculoide, y en mayor cantidad que en los granulomas de los pacientes lepromatosos. Por otro lado, las linfocinas producidas principalmente por la subpoblación celular denominada TH1, (IL-2, IFN-gamma y linfoxina), son abundantes en las lesiones de pacientes con lepra tuberculoide, y virtualmente ausentes en las lesiones lepromatosas. En contraste, el ARN mensajero de las linfocinas producidas principalmente por la subpoblación celular denominada TH2 (IL-4 e IL-10), parece ser más abundante en lesiones lepromatosas que en las tuberculoides. En el presente estudio, no se encontró una disminución en la producción del FEC-GM por las CMN de sangre periférica de los pacientes con lepra lepromatosa. Sin embargo, Modlin y cols. (72-74) encontraron una producción disminuida del factor en las lesiones LL. Esto demuestra que quizás es muy importante el sitio en el que se estudie la producción de esta citocina, ya que el escenario celular es diferentes en la sangre que en las

lesiones (58). Esto puede explicar la diferencia entre el estudio de Modlin y cols., y el nuestro, además que es posible que los macrófagos infectados en las lesiones de los pacientes sean incapaces de producir de manera adecuada el FEC-GM.

Otra observación importante de los resultados, fue que la producción espontánea del FEC-GM en el compartimento sanguíneo tiende a estar elevada en los pacientes con lepra, mientras que la inducida por PHA está disminuída en los pacientes en comparación con los sujetos sanos. Este fenómeno ya había sido descrito anteriormente para la IL-1 por la Dra. Arce (Documento en proceso de publicación), en el cual describe que la producción espontánea de la IL-1 se encuentra elevada en los pacientes con lepra, principalmente en los pacientes con lepra lepromatosa, y que por esta razón, al activarse las células con LPS, o algún otro estímulo o mitógeno, la producción de la IL-1 es menor en estos pacientes. Si se toma en cuenta que la lepra es una enfermedad crónica con varios años de evolución, es posible que el sistema inmune de los pacientes ha estado activado durante mucho tiempo, y que por lo tanto exista una sobreestimulación in vivo de las células de dicho sistema y ya no puedan producir más Factor al añadirles un estímulo in vitro.

Algunas evidencias indican, que las células endoteliales y los queratinocitos son capaces de producir FEC-GM de una manera constitutiva o espontánea, mientras que los linfocitos requieren de activación para producirlo (7,9,21). En contraste a estos reportes, nuestros resultados mostraron que el FEC-GM fue producido por las CMN de manera espontánea, es decir, sin la estimulación por algún agente. Haworth y cols. (75), también encontraron una producción espontánea del FEC-GM por las células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, al igual que Peschile y cols. (12), en un estudio con astrocitos humanos. Quizás, la detección de la presencia o ausencia del FEC-GM en el sobrenadante de células no estimuladas, pueda explicarse en base al empleo de técnicas con diferente sensibilidad, que cada autor haya utilizado. Otro dato importante en relación a nuestros resultados, es que también se observa una gran variabilidad en la producción del factor, por las células de los diferentes individuos estudiados en el trabajo de C. Haworth y cols. (75).

Debido a que se observó una gran variabilidad en la producción del FEC-GM, en el tiempo óptimo de incubación predeterminado (3 y 5 días), entre los diferentes individuos, se decidió estudiar su cinética de producción en un mayor número de sujetos, para poder determinar si esta variabilidad

era debida a los tiempos de incubación elegidos para cada estímulo, o si era inherente a cada sujeto, e independiente del tiempo de incubación. De nuevo se encontró que cada individuo presenta una cinética de producción diferente, lo cual sugiere, que dicha variabilidad es dependiente de cada individuo y que es difícil establecer un tiempo óptimo de producción del Factor.

Un dato muy importante que debe tomarse en cuenta es que la población de CMN es muy heterogénea, en la cual se puede encontrar, además de las células polimorfonucleares, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B, monocitos y células NK, en diferentes proporciones, por lo que quizás esto pudiera influir en la gran variabilidad que existe entre los diferentes individuos.

Por otro lado, para encontrar una explicación al por qué de la baja producción del factor, inducida con LPS e IL-1, se llevó a cabo el estudio mediante el empleo de placas de cultivo diferentes, para que se pudiera establecer si se requiere un mayor contacto celular. Las células fueron cultivadas en placas con fondo en "U", y se efectuó la cinética de producción del FEC-GM, los resultados se compararon con los obtenidos en las placas de cultivo de fondo

plano. En los tres experimentos realizados no se detectó producción del FEC-GM con ninguno de los estímulos utilizados con ambas placas de cultivo. Debido a estos resultados, no se puede confirmar la necesidad de un contacto celular para la producción del FEC-GM, sin embargo, al no encontrar diferencias es muy probable que no sea este un factor que determine su producción.

La ausencia de producción del FEC-GM en algunos sujetos puede deberse a diversos factores: 1) al estado inmune en el que se encuentren al momento de obtenerse las CMN; 2) a la presencia de algún inhibidor del gene que codifica para el FEC-GM (8,9); 3) a la producción de citocinas que sean capaces de suprimir la producción del FEC-GM, como podría ser el caso de la IL-4 ó la IL-10 (76-78); o bién, 4) a que el FEC-GM regule su misma producción. Este efecto autócrino ya ha sido reportado para otras citocinas, entre estas la IL-6 (36), así como el TNF-alfa y el FCT-beta (37).

Debido a que el LPS y la IL-1r no indujeron una producción elevada del FEC-GM como era de esperarse, se decidió hacer un estudio dosis-respuesta, para confirmar si la dosis empleada de IL-1r y LPS fue la adecuada. Los resultados obtenidos mostraron, que la dosis óptima de cada estímulo y el

tiempo de incubación fue diferente para cada individuo. No se puede afirmar que las diferentes dosis de LPS e IL-1 α utilizadas no sean óptimas, ya que es posible que el FEC-GM sea sintetizado y no se libere al medio de cultivo; o bien, que sea secretado al medio pero las mismas células lo utilicen, ya que se ha reportado recientemente que el FEC-GM estimula la expresión de su receptor (79). Otro factor que debe considerarse, es que el LPS induce la producción de IL-10, y la IL-10 a su vez inhibe la producción del FEC-GM (78), por esta razón, quizás el FEC-GM no se produjo en dosis elevadas al utilizarse LPS.

En un trabajo reciente (80), llevado a cabo con monocitos/macrófagos derivados de sangre periférica, infectados con el virus de inmunodeficiencia humana Tipo 1 (HIV-1), se estudió la producción de citocinas, entre éstas el FEC-GM. En este trabajo, no se observó una producción elevada del FEC-GM, cuando se estimularon las células con LPS, pero sí con una combinación de LPS e IFN-gamma.

Es importante tener en cuenta, que en las CMN existe un porcentaje relativamente bajo de monocitos (aproximadamente una relación 1:3 de monocitos:linfocitos), y como el LPS actúa principalmente sobre monocitos, quizás la producción baja del FEC-GM esté relacionada con el número bajo de monocitos en las

CMN. Es posible que la producción de FEC-GM inducida por PHA sea alta en la CMN, en vista de que la estimulación con PHA resulta en un mayor número de células T en el cultivo debido a su efecto proliferativo, y esto resulta en una mayor producción de FEC-GM; mientras que la IL-1 no induce directamente la proliferación de células y su efecto es principalmente sobre monocitos y células T. Es probable que la baja producción del FEC-GM inducida con IL-1 pueda asociarse también a un número bajo de células y no a una estimulación inadecuada.

Debido a la gran variabilidad en cuanto a la producción del Factor, también se decidió determinar si esta variabilidad podría presentarse dentro de un mismo individuo. Al efectuarse el estudio de la producción del FEC-GM en un mismo individuo, de nuevo, se observó una gran variabilidad en su producción, es decir, que en cada fecha en que se determinó, los resultados fueron distintos. Estos resultados sugieren que la producción del FEC-GM depende del estado inmunológico del sujeto en el momento en que se toma la muestra de sangre para obtener las CMN, ya que en algunas ocasiones es elevada, y en otras es muy baja o no se produce. Esto muestra que las citocinas, en este caso el FEC-GM, son moléculas muy variables en cuanto a su concentración en un organismo, ya que su

producción está regulada por un gran número de mecanismos, los cuales dependen en gran parte del estado inmune del organismo en cuestión. Por esta razón, no es posible que se establezcan valores normales de producción para citocinas.

Los datos que existen hasta el momento sobre el FEC-GM en relación con lepra, son muy pocos para poder explicar su papel en la inmunopatogenia de esta enfermedad. Consideramos que es importante continuar con el estudio, ya que esta citocina, como ya se ha demostrado, tiene efectos muy importantes sobre las funciones de los macrófagos y estas células son de mucha importancia en la infección con el patógeno intracelular Mycobacterium leprae, el cual invade a dichas células sin que se logre su destrucción.

Aún queda mucho por entender a cerca de la lepra, pero hasta ahora todo parece indicar que el defecto inmunológico en los pacientes con lepra lepromatosa no se debe a una deficiencia en la producción de citocinas, por lo que conviene analizar todos los resultados que se tienen hasta el momento en los diferentes estudios inmunológicos acerca de dicha enfermedad, y quizás tomar un nuevo camino para las futuras investigaciones.

Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual se menciona el posible papel de las linfoquinas producidas por la subpoblación celular denominada TH1, en el desarrollo de inmunidad protectora hacia Mycobacterium leprae (81). Quizás el estudio de la función de las subpoblaciones celulares denominadas TH1 y TH2, así como la producción de citocinas por estas células, abra nuevas posibilidades para comprender la inmunopatogenia de esta enfermedad (82).

CONCLUSIONES:

Al hacer un análisis de los resultados obtenidos en esta investigación, podemos concluir lo siguiente:

1) Al parecer, no existe diferencia significativa en la producción espontánea del FEC-GM, entre sujetos sanos y pacientes con lepra.

2) Nuestros resultados no mostraron una diferencia significativa en la producción del FEC-GM, inducida con LPS, IL-1r y Ag de M. leprae, entre sujetos sanos y pacientes con lepra.

3) Los resultados indicaron una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0.01$), en la producción total del FEC-GM inducida con PHA, en los pacientes con lepra lepromatosa, en comparación a los sujetos sanos.

4) Se observó una diferencia significativa en la producción específica del FEC-GM, inducida con PHA, al comparar a los pacientes con lepra lepromatosa ($p \leq 0.01$) y a los pacientes con lepra tuberculoide ($p = 0.05$), con los sujetos sanos.

5) No se observó diferencia significativa en la producción del FEC-GM, tanto espontánea, como inducida, entre lepromatosos y tuberculoides.

6) La cinética de producción del FEC-GM, fue diferente para cada individuo estudiado.

7) No se encontró una dosis óptima de LPS e IL-1r para la inducción del FEC-GM, ya que para cada individuo estudiado se obtuvieron resultados diferentes.

8) Se observó una gran variabilidad en la producción del FEC-GM intraindividuo, ya que al realizar la cinética de producción del Factor por las CMN de un mismo individuo, obtenidas en diferentes fechas, se obtuvieron resultados diferentes.

9) Al probar placas de cultivo de fondo plano o de fondo en "U", se obtuvieron los mismos resultados.

10) En base a estos resultados concluimos que nuestra hipótesis no se cumple, ya que el FEC-GM no se encontró disminuido en los pacientes con lepra lepromatosa, en comparación a los pacientes con lepra tuberculoide y sujetos sanos.

11) Aún falta demostrar si la respuesta de las células del sistema inmune a este Factor, se encuentra alterada en los pacientes con lepra lepromatosa, y por esta razón los macrófagos de estos pacientes son incapaces de destruir al bacilo.

REFLEXION:

El ideal de los investigadores en el campo de la salud, es hacer algo por remediar el daño que causa cualquier enfermedad a una persona, y quizás muchas veces al no conseguirlo, nos sentimos frustrados.

Muchas veces, aunque el ideal sea remediar el dolor de las personas, nos volvemos insensibles, y nos olvidamos que podemos ayudar a los enfermos de otra manera... En el caso de los pacientes con lepra:

* Podemos ayudar a dar información sobre la enfermedad, para que toda la gente la conozca y sepa la manera en que se transmite y las medidas que se deben tomar.

* Se puede enseñar el verdadero nombre de la enfermedad, y ayudar a quitar la impresión que se tiene sobre las personas que la padecen, ya que no es " Ni castigo divino, ni mal hereditario".

* Debemos vigilar para que se lleve a cabo el programa de la OMS y la SSA, el cual incluye la terapia gratuita, el reporte de nuevos casos, y la vigilancia de los casos ya registrados.

Todo esto logrará la incorporación a la sociedad, de las personas que padecen esta enfermedad, y de este modo podremos aliviar un poco su dolor, aunque con nuestra investigación aún no lo logremos, pero sin perder las esperanzas de que algún día podremos hacer algo para evitar que una enfermedad como la lepra, ataque a las personas.

RESUMEN:

El FEC-GM estimula las funciones del metabolismo oxidativo, así como la capacidad bactericida de monocitos maduros, pero su papel en los mecanismos inmunes contra la lepra, aún no se conoce. En el presente trabajo se estudió la producción del FEC-GM, por las células mononucleares (CMN) de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes con lepra. Las CMN fueron cultivadas en medio (control), antígeno sonicado de Mycobacterium leprae, fitohemaglutinina (PHA), lipopolisacárido (LPS) o Interleucina-1 beta (IL-1). El FEC-GM fue cuantificado en los sobrenadantes del cultivo por un ELISA (Genzyme). Se compararon los resultados obtenidos con CMN sin preincubar y CMN preincubadas, y no se encontraron diferencias en los cultivos estimulados durante 3 días con LPS e IL-1, y durante 5 días con PHA y el Ag. Se encontró una gran variabilidad entre los diferentes individuos estudiados, y aún en un mismo sujeto estudiado en diferentes días. Algunos individuos no respondieron a LPS, IL-1 o el Ag. Los pacientes con lepra lepromatosa (n=15) mostraron una disminución significativa ($p < 0.01$), en la producción específica del FEC-GM inducida con PHA, así mismo los pacientes con lepra tuberculoide (n=5), mostraron una disminución ($p = 0.05$), cuando se compararon a los sujetos sanos (n=10). La producción

espontánea del Factor, tiende a estar elevada en los pacientes en comparación a los sujetos sanos, si bien este aumento no es significativo. No se observaron diferencias en la producción del FEC-GM, inducida con los diferentes estimulantes, entre los pacientes lepromatosos y los tuberculoides. Con estos resultados concluimos que nuestra hipótesis no se cumple, ya que los pacientes lepromatosos no muestran una disminución en la producción del FEC-GM en comparación a los pacientes tuberculoides. Sin embargo en trabajos recientes, se demuestra una disminución de este factor en las lesiones de los pacientes con lepra lepromatosa en comparación a las lesiones de los pacientes con lepra tuberculoides. Esto demuestra que el sitio en el que se determine la producción del factor, es de mucha importancia. Aún falta mucho por aclarar en cuanto al papel del FEC-GM en la inmunopatogenia de la lepra, por lo que conviene continuar con el estudio.

BIBLIOGRAFIA:

1) F. R. Balkwill and F. Burke; The Cytokine Network. *Immunology Today*. 10(9):299-304 1989.

2) Janice L. Gabrilove; Introduction and Overview of Hematopoietic Growth Factors. *Seminars in Hematology*. 26(2):1-4 1989.

3) Jerome E. Groopman; Colony-Stimulating Factors: Present Status and Future Applications. *Seminars in Hematology*. 25(3):30-37 1988.

4) David G. Nathan, M.D, Colin A. Sieff, M.D.; The Biological Activities and uses of Recombinant Granulocyte-Macrophage and Multi-Colony Stimulating Factors. *Progress in Hematology*, Vol. XV:1-18 1987.

5) Eric M. Bonnem and George Morstyn; Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Current Status and Future Development. *Seminars in Oncology*, 15(5):46-51 1988.

6) Christian Ruef and David Coleman; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: Pleiotropic Cytokine with Potential Clinical Usefulness. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(1):41-62 1990.

7) Rodney L. Monroy, Thomas A. Davis and Thomas J. MacVittie; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: More than a Hemopoietin. *Clin. Immunol and Immunopath*. 54:333-346 1990.

8) Kenneth Kaushansky; Control of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production in Normal Endothelial Cells by Positive and Negative Regulatory Elements. *J. Immunol*. 143(9):2525-2529, 1989.

9) Stephen D. Nimer, Missie Jo. gates, H. Phillip Koefler and Judith C. Gasson; Multiple Mechanisms Control the Expression of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor by Human Fibroblasts. *J. Immunol* 143(7)2374-2377, 1989.

10) Wolfgang Oster, Albrech Lindemann, Roland Mertelsmann and Friedhelm Hermann; Production of Macrophage-, Granulocyte-, Granulocyte-Macrophage- and Multi-Colony-Stimulating Factors by peripheral Blood Cells. *Eur. J. Immunol.* **19:543-547, 1989.**

11) Simona Zupo, Bice Perussia, Lucia Baldi, Anna Corcione, Mariella Dono, Manlio Ferrarini and Vito Pistoia; Production of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating factor but not IL-3 by Normal and Neoplastic Human B Lymphocytes. *J. Immunol.* **148(5):1423-1430, 1992.**

12) Francesca Aloisi, Alessandra Care, Giovanna Borsellino, Paolo Gallo, Silvia Rosa, Anna Bassani, Andrea Cabibbo, Ugo Testa, Giulio Levi and Cesare Peschle; Production of Hemolymphopoietic Cytokines (IL-6, IL-8, Colony Stimulating Factors) by Normal Human Astrocytes in Response to IL-1 beta and Tumor Necrosis Factor. *J. Immunol.* **149(7):2358-2366, 1992.**

13) T. Bonnefoix, JP Aubry et JJ Sotto; Production de GM-CSF par les lymphocytes T humains purifiés et stimulés par la Con A. *Nouv Rev Fr Hematol* **27:175-181, 1985.**

14) M. Y. Gordon and E. C. Gordon-Smithe; Regulation of Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating Factor Production By Phytohaemagglutinin-Treated Blood Mononuclear Cells. *Leukemia Research.* **6(1):71-79, 1982.**

15) Erich Platzter, Berish Y. Rubin, Li Lu, Karl welte, Hal E. Broxmeyer and Malcolm A. S. Moore; OKT3 Monoclonal Antibody Induces Production of Colony Stimulatin Factor(s) for granulocytes and Macrophages in cultures of Human t Lymphocytes and Adherent Cells. *J. Immunol.* **134(1):265-271, 1985.**

16) C. Cheers, A. M. Haigh, A. Kelso, D. Metcalf, E.R. Stanley and A. M. Young; Production of Colony-Stimulating Factors (CSF) during Infection: Separate Determinations of Macrophage-, Granulocyte-, Granulocyte-Macrophage-, and multi-CSF. *Infection and Immunity* **56(1):247-251 1988.**

17) Donald Metcalf; The Role of the Colony-Stimulating Factors in Resistance to Acute Infections. *Immunol Cell Biol.*, **65 (1) 35-43, 1987.**

18) Gino Hangoc, Douglas A. Williams, J. H. Frederik Falkenburg and Hal E. Broxmeyer; Influence of IL-1 alfa and IL-1 beta on the Survival of Human Bone Marrow Cells Responding to Hematopoietic Colony-Stimulating Factors. *J. Immunol.* **142(12):4329-4334, 1989.**

19) Douglas E. Williams and Hal. E. Broxmeyer; Interleukine-1 alfa Enhances the In vitro Survival of Purified Murine Granulocyte-Macrophage Progenitor Cells in the Absence of Colony-Stimulating Factors. *Blood*, **72(5):1608-1615, 1988.**

20) M. Ronald Schaafsma, J. H. Frederik Falkenburg, Nelleke Duinkerken, Jo Van Damme, Bruce W. Altrock, Roel willemze and Willem E. Fibbe; Interleukine-1 Synergizes with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Granulocytic Formation by Intermediate Production of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blodd.* **74(7):2398-2404, 1989.**

21) Stephen D. Nimer, Judith C. Gasson, John F. DiPersio; The Expression and Target Cell Specificity of Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Year in Immunology* **3:144-151, 1988.**

22) M. Hader, M. Klausmann, K. H. Pplüger, G. Lüben, F. R. Seiler and K. Havemann; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Binding Sites and Oxidative Metabolism in Human Granulocytes. *Blut* **59:486-492, 1989.**

23) S.R. Mc Coll, E. Krump, P:H: Naccache and P. Borgeat; Enhancements of Human Neutrophil leukotriene Synthesis by Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. *Agents and Actions*, **27(3/4):465-468, 1989.**

24) Susan E. Kaufman, John F. DiPersio and Judith C. Gasson; Effects of Human GM-CSF on Neutrophil Degranulation in vitro. *Exp. Hematol.* **17:800-804 1989.**

25) Judith C. Gasson, Richard H. Weisbart, Susan E. Kaufman, Steven C. Clak, Rodney M. Hewik, Gordon G. Wong and David W. Golde; Purified Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: Direct Action on Neutrophils. *Science.* **226:1339-1342, 1984.**

26) Richard H. Weisbart, David W. Golde, Steven C. Clark, Gordon g. Wong and Judith C. Gasson; Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor is a Neutrophil Activator. *Nature* 314:361-363, 1985.

27) J. M. Wang, S. Colella, P. Allavena and A. Mantovani; Chemotactic activity of human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Immunology* 60:439-444, 1987.

28) Richard H. Weisbart, MD, and David W. Golde, MD.; Physiology of Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating Factors in Host Defense. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 3(3):401-409, 1989.

29) Albrecht Lindemann, Detlev Riedel, Wolfgang Oster, H. W. Loems Ziegler-Heitbrock, Roland Mertelsmann, and Friedhelm Hermann; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Induces Cytokines Secretion by Human Polymorpho nuclear Leukocytes. *J. Clin Invest*. 83:1308-1312, 1989.

30) Gayle Cocita Baldwin, Norman D. fuller, Robert L. Roberts, David D. Ho, and David W. Golde; Granulocyte-, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors Anhances Neutrophil Cytotoxicity Toward HIV-Infected Cells. *Blood*. 74(5):1673-1677, 1989.

31) Klaus Geissler, Maureen Harrington, Carolyn Srivastava, Tomm Leemhuis, Guido Tricot and Hal E. Broxmeyer; Effects of recombinant Human Colony Stimulating factors (CSF) (Granulocyte-Macrophage CSF, Granulocyte CSF, and CSF-1) on Human Monocyte/Macrophage Differentiation. *J. Immunol*. 143(1):140-146, 1989.

32) David L. Coleman, Jeffrey A. chodakewitz, Ann H. Bartiss and John W. Mellors; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Enhances Selective effector Functions of tissue-Derived Macrophages. *Blood*, 72(2):573-578, 1988.

33) Ben D., M. Chen, Carl R. Clark and Ta-hsu Chou; Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Stimulates Monocytes and Tissue Macrophage Proliferation and Enhances their Responsiveness to Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood*, 71(4):997-1002, 1988.

34) W. Oster, A. Lindemann, R. Mertelsmann and F. Herrmann; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor (CSF) and Multilineage CSF Recruit Human Monocytes to Express Granulocyte CSF. *Blood*. 73(1):64-67, 1989.

35) Prue H. Hart, Genevieve A. Whitty, Diana S. Piccoli and John A. Hamilton; Synergistic Activation of Human Monocytes by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor and IFN-gamma. *J. Immunol* 141(5):1516-1521, 1988.

36) Daniele Caracciolo, Steven C. Clark and Giovanni Rovera; Human Interleukin-6 Supports Granulocytic Differentiation of Hematopoietic Progenitor Cells and Acts Synergistically With GM-CSF. *Blood*, 73(3):666-670, 1989.

37) André Herbelin, Francois Machavoine, Elke Schneider, Martine Papiernik and Michel Dy; IL-7 is Requisite for IL-1-Induced Thymocyte Proliferation. *J. Immunol* 148(1):99-105, 1992.

38) Antonio Celada and Richard A. Maki; Transforming Growth Factor-beta Enhances the M-CSF and GM-CSF-Stimulated Proliferation of Macrophages. *J. Immunol*, 148(4):1102-1105, 1992.

39) Philip J. Morrissey, Linda Bressler, Linda S. Park, Alan Alpert and Steven Gillis; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Augments the Primary Antibody response by Enhancing the Function of Antigen-Presenting Cells. *J. Immunol* 139(4):1113-1119, 1987.

40) Hans-Georg Fischer, Stefanie Frosch, Konrad Reske and Angelika B. Reske-Kunz; Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Activates Macrophages Derived From Bone Marrow Cultures to Synthesize MHC Class II Molecules and to Augment Antigen Presentation Function. *J. Immunol*. 141(11):3882-3888, 1988.

41) Emanuela Handman and Antony W. Burgess; Stimulation by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor of Leishmania tropica Killing by Macrophages. *J. Immunol* 122(3):1134-1137, 1979.

42) Steven g. Reed, Carl F. Nathan, Deanna L. Pihl, Paul Rodricks, Kurt Shanebeck, Paul J. Conlon and Kenneth H. Grabstein; Recombinant Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Activates Macrophage to Inhibit Trypanosoma cruzi and Release Hydrogen Peroxide. *J. Exp. Med.* **166:1734-1746, 1987.**

43) Weishui Y. Weiser, Anthony Van Niel, Steven c. Clark, John R. David and Heinz G. Remold; Recombinant Human granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Activates Intracellular Killing of Leishmania donovani by Human Monocyte-Derived Macrophages. *J. Exp. Med.* **166:1436-1446, 1987.**

44) John L. Ho, Steven G. reed, Elizabeth A. Wick and Michael Giordano; Granulocyte-Macrophage and Macrophage Colony-Stimulating factors Activate Intramacrophage Killing of Leishmania mexicana amazonensis . *J. of. Infec. Dis.* **162:224-230, 1990.**

45) Min wang, Herman Friedman and Julie Y. Djeu; Enhancement of Human Monocyte Function Against Candida albicans by the Colony-Stimulating Factors (CSF): IL-3, Granulocyte-Macrophage-CSF, and Macrophage-CSF. *J. Immuno.* **143(2):671-677, 1989.**

46) Phillip D. Smith, Cindy L. Lamerson, Steven M. Banks, Sarbjit S. Saini, Larry M. Wahl, Richard A. Calderone, and Sharon M. Wahl; Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Augments Human Monocyte Fungicidal Activity for Candida albicans. *J. Infec. Dis.* **161:999-1005, 1990.**

47) Federico Bussolino, Ji Ming Wang, Paola Defilippi, F. Turrini, Fiorella Sanavio, C.-J. S. Edgell, Massimo Aglietta, Paolo Arese and Alberto Mantovani; Granulocyte- and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, **337(2):471-473, 1989.**

48) Federico Bussolino, J. Ming Wang, Franco Turrini, Daniela Alessi, Dario Ghigo, Costanzo Costammagna, Giampiero Pescarmona, Alberto Mantovani and Amalia Bosia; Stimulstion of Na/H Exchanger in Human Endotelial and Activated by Granulocyte- and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The J. Bio. Chem.* **264(31):18284-18287, 1989.**

49) William P. Peters; The Effect of Recombinant Human Colony-Stimulating Factors on Hematopoietic Reconstitution Following Autologous Bone Marrow Transplantation. **Seminars in Hematology** 26(2):18-23, 1989.

50) John A. Glaspy and David W. Golde; Clinical Applications of Myeloid Growth Factors. **Seminars in Hematology**, 26(2):14-17, 1989.

51) George Morstyn, Graham J. Lieschke, William Sheridan, Judy Layton, Jonathan Cebon and Richard M. Fox; Clinical Experience With Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **Seminair in Hematology**, 26(2):9-13, 1989.

52) William L. Mc. Guire, Janice Gabrilove, Malcolm A.S. Moore and John Rinehart; Colony-Stimulating Factors, a panel discussion. **Breast Cancer Research and Treatment** 14:193-200, 1989.

53) Jerome E. Groopman; Status of Colony Stimulating Factors in Cancer and AIDS. **Seminars in Oncology**, 17(1):31-37, 1990.

54) Barry R. Bloom; Learning From Leprosy: A Perspective on Immunology and the Third world. **J. Immunol.** 137(1), 1986.

55) Secretaría de Salud, Dirección General de Medicina Preventiva; Programa Nacional de Control de Lepra. **Manual de Procedimientos para el Control de Lepra, México D.F., Abril 1990.**

56) Ridley DD y Joplin WH.; Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **Int. Lepr.** 34: 255, 1966.

57) Mehra V. Convit J., Rubinstein A y Bloom BR.; Activated Suppressor T cells in Leprosy. **J. Immunol** 129:1946, 1985.

58) Modlin Rl, Melancon-Kaplan J, Young SM. Pirmez C.; Learning from lesions : Patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc. Natl Acad Sci USA** 85:1213, 1988.

59) Gilla Kaplan and Zanvil A. Cohn; Leprosy and cell-mediated immunity. **Current Opinion in Immunology**, 3:91-96, 1991.

60) V. Ramesh, R. S. Misra, and Uma Saxena; Multidrug Therapy in Multibacillary Leprosy; Experience in an Urban Leprosy Center. *Int. J. of Leprosy*, 60(1):13-17, 1992.

61) Marijke Becx-Bleumink and Debrezion Berhe; Occurrence of Reactions, Their Diagnosis and Management in Leprosy Patients Treated with Multidrug Therapy; Experience in the Leprosy Control Program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *Int. J. of Leprosy*, 60(2):173-184, 1992.

62) Noordeen, S.K.; Leprosy Control Through Multidrug Therapy (MDT). *Bull. WHO* 69:263-269, 1991.

63) Carrazana Hernández, G.B. and Castaño Hernández, S.T.; Adverse, Nonsevere Side Effects in Leprosy Patients Implementing Multidrug Therapy. *Rev. Leprol. Fontilles*, 18:145-151, 1991.

64) Coleman, M.D. and Tingle, M.D.; Use of a Metabolic Inhibitor to Reduce Dapsone-dependent Haematological Toxicity. *Drug Dev. Res.* 25:1-16, 1992.

65) Cohn, Z.A. and Kaplan G.; Hansen's Disease, Cell-Mediated Immunity, and Recombinant Lymphokines. *J. Infec. Dis.*, 163:1195-1200, 1991.

66) Carl Nathan, Kathleen Squires, William Griffo, William Levis, Matthew Varhese, C. K. Job, Ali R. Nustrat, Stephen Sherwin, Samuel Rappoport, Elizabeth Sancehz, Rocherl A. Burkhardt and Gilla Kaplan, Widespread Intradermal Accumulation of Mononuclear Leukocytes in Lepromatous Leprosy Patients Treated Systemically with Recombinant Interferon gamma. *J. Exp. Med.* 172:1509-1512, 1990.

67) Gilla Kaplan, N. K. Mathur, C. K. Job, Indira Nath, and Zanvil A. Cohn; Effect of Multiple Interferon gamma injections on the Disposal of Mycobacterium leprae. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86:8073-8077, 1989.

68) Gilla Kaplan, Rolf Kiessling, Sabawork Teklemariam, Gerald Hancock, Giulia Sheftel, C.K. Job, Paul Converse, Tom H. Ottenhoff, Marijke Becx-Bleumink, Martin Dietz, and Zanvil A. Cohn; The Reconstitution of Cell-Mediated Immunity in the Cutaneous Lesions of Lepromatous Leprosy by Recombinant Interleukin 2. *J. Exp. Med.* 169:893-907, 1989.

69) P. Converse, T. H. M. Ottenhoff, Sabba Work teklemariam, G.E. Hancock, M. Dietz, M. Becx-Bleumink, assefa Wondimu, R. Kiessling, Z. A. Cohn and Gilla Kaplan; Intradermal Recombinant Interleikin 2 Enhances Peripheral Blood T-Cell Responses to Mitogen and Antigens in Patients with Lerpomatous Leprosy. *Scand. J. Immunol*, 32:83-91, 1990.

70) Koichi Nakajima, Otoniel Martínez-Maza, Toshio Hirano, Elizabeth C. Breen, Paruang G. Nishanian, Jesus F. Salazar-González, Johan L. Fahey and Tadimitsu Kishimoto; Induction of IL-6 (B Cell Stimulatory Factory Factor-2/IFN-beta₂) Production by HIV. *J. Immunol*. 142(2):531-536, 1989.

71) H. Takematsu, H. Tagami; Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Psoriasis. *Dermatologica*, 181:16-20, 1990.

72) Masahiro Yamamura, Koichi Uyemura, Robert J. Deans, Kenneth Weinberg, Thomas H. Rea and Barry R. Bloom; Defining Protective Responses to Pathogens: Cytokine Profiles in Leprosy Lesions. *Science*, 254:277-279, 1991.

73) Padmini Salgame, John S. Abrams, Carol Clayberger, Harris Goldstein, Jacinto Convit, Robert L. Modlin and Barry R. Bloom; Differing Lymphokine Profiles of Functional Subsets of Human CD4 and CD8 T Cell Clones. *Science*, 254:279-282, 1991.

74) Masahiro Yamamura, Xiao-Hong Wang, Jeffrey D. Ohmen, Koichi Uyemura, Thomas H. Rea, Barry R. Bloom and Robert L. Modlin; Cytokine Patterns of Immunologically Mediated Tissue Damage. *J. Immunol*. 149(4):1470-1475, 1992.

75) Catherine Haworth, Fionula M. Brennan, David Chantry, Martin Turner, Ravinder N. Maini and Marc Feldmann; Expression of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Rheumatoid Arthritis: Regulation by Tumor Necrosis Factor-alfa. *Eur. J. Immuno*. 21:2575-2579, 1991.

76) Ben D. M. Chen, Lyle Sensenbrenner, Kai Fan and Oingyun Run; Murine Recombinant IL-4 is a Bifunctional Regulator of Macrophage Growth Induced by Colony-Stimulating Factors. *J. Immunol*. 148(3):753-759, 1992.

77) Isabelle P. Oswald, Ricardo T. Gazzinelli, Alan Sher, and Stephanie L. James; IL-10 Synergizes with IL-4 and Transforming Growth Factor-beta to Inhibit Macrophage Cytotoxic Activity. *J. Immunol*. 148(11):3578-3583, 1992.

78) Hans Yssel, René de Waal Malefyt, Maria-Grzia Roncarollo, John S. Abrams, Riitta Lahesmaa, Hergen Spits and Jan E. de Vries; IL-10 is Produced by Subsets of Human CD4⁺ T Cell Clones and Peripheral Blood T Cells. *J. Immunol.* **149(7):2378-2384, 1992.**

79) Kai Fan, Oingyun Ruan, Lyle Sensenbrenner and Ben D. M. Chen; Up-Regulation of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Receptors in Murine Peritoneal Exudate Macrophages by Both GM-CSF and IL-3. *J. Immunol.* **149(1):96-102, 1992.**

80) Jean-Michel Molina, Ralf Schindler, Roberta Ferriani, Mamoru Sakaguchi, Edouard Vannier, Charles A. Dinarello, and E. Gropman; Production of Cytokines by Peripheral Blood Monocytes/Macrophages Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *J. Inf. Dis.* **161:888-893, 1990.**

81) K. Barry Walker, Robert Butler, and M. Josephs Colston; Role of TH1 Lymphocytes in the Development or Protective Immunity against Mycobacterium leprae. *J. Immunol.* **148(6):1885-1889, 1992.**

82) Sergio Romagnani; Induction of TH1 y TH2 Responses: a Key Role for the "Natural" Immune Response?. *Immunol. Today.* **13(10):379-380, 1992.**

