



**PRODUCCION DE INTERLEUCINA I
POR MACROFAGOS DE PACIENTES CON LEPRO
Y SU PAPEL EN LA INMUNOPATOGENIA
DE LA ENFERMEDAD LEPROMATOSA**

TESIS

**QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

PRESENTA:

M.C. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA

MONTERREY, NUEVO LEON 1989

TD
RC154
.A7
1989
c.1



1080071348

5011

+
RC b
e.2



BIBLIOTECA

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

PRESENTA

M.C. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA



BIBLIOTECA

MONTERREY, N. L., MAYO 1989

TD 4
A7
98



**PRODUCCION DE INTERLEUCINA 1
POR MACROFAGOS DE PACIENTES CON LEPRO
Y SU PAPEL EN LA INMUNOPATOGENIA
DE LA ENFERMEDAD LEPROMATOSA**

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

Presidente: _____

Secretario: _____

1er. Vocal: _____

2o. Vocal: _____

3er. Vocal: _____

DEDICATORIA

A MIS PADRES

**JESUS ARCE MOCTEZUMA
Y
MA. DEL CONSUELO MENDOZA DE ARCE**

**CON TODO MI AMOR POR SER LAS PERSONAS MAS IMPORTANTES
DE MI EXISTENCIA**

A MI HERMANO

**JESUS ARMANDO ARCE MENDOZA
POR SU GRANDEZA DE ESPIRITU**

A TODA MI FAMILIA

**POR QUE SON
RIQUEZA DE MI VIDA**

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR

DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

POR SU VALIOSA ASESORIA SIN LA CUAL NO HUBIERA ALCANZADO MI META

A LOS DOCTORES

JUVENTINO GONZALEZ B. y OLIVERIO WELSH L.

**JEFE Y SUB JEFE DEL DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGIA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO " DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ "**

POR SU ENTUSIASMO Y COLABORACION CON LOS PACIENTES

A LA DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES DE C.

POR SUS SUGERENCIAS, COMENTARIOS Y APOYO INCONDICIONAL

A LA DRA. en MED. NANCY E. FERNANDEZ GARZA

POR SU VALIOSA AYUDA PARA LA ELABORACION DE ESTA TESIS

Y

**A TODO EL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE
INMUNOLOGIA**

INDICE

	Página
I.- RESUMEN -----	1
II.- INTRODUCCION -----	4
III.- HIPOTESIS -----	20
IV.- OBJETIVOS -----	21
V.- MATERIAL Y METODOS -----	22
VI.- RESULTADOS -----	30
VII.- DISCUSION -----	56
VIII.- CONCLUSIONES -----	69
IX.- BIBLIOGRAFIA -----	72
X.- CURRICULUM VITAE -----	85

RESUMEN

Se planteó la hipótesis de que parte de la inmunopatogenia de la lepra lepromatosa se debe a una producción deficiente de Il-1. Para comprobarla se llevó a cabo el estudio de la producción de Il-1 por macrófagos estimulados con LPS de pacientes con lepra lepromatosa y tuberculoide, así como de sujetos sanos. Los resultados obtenidos revelaron que la cantidad de Il-1 Total (Il-1 intracelular + Il-1 extracelular), es igual en los tres grupos de estudio. Sin embargo la Il-1 liberada en forma espontánea es mayor en los pacientes lepromatosos, por lo que al obtener la cantidad de la Il-1 inducida (restando la espontánea), ésta parece estar disminuida. Probablemente ésta es la razón por la cual otros autores han sugerido una deficiencia de Il-1 en esta enfermedad y otras infecciones.

La hipótesis fué rechazada en cuanto a la demostración del defecto en los macrófagos de los pacientes lepromatosos para producir Il-1. Alternativamente se prosiguió a estudiar la causa de la liberación espontánea (secreción) de Il-1 por los macrófagos de estos pacientes. Se estudió la posibilidad de que M. leprae fuera inductora de Il-1. Para comprobarlo se obtuvieron bacilos de M. leprae de lepromas de pacientes, M. tuberculosis aislado de un paciente con tuberculosis pulmonar y la cepa avirulenta H37 Ra de

M. tuberculosis como referencia de una bacteria no patógena.

Los resultados muestran que las tres cepas inducen la producción de Il-1, presentando diferencias en las dosis óptimas de estímulo. M. tuberculosis (virulento y avirulento) es mejor inductor de Il-1 con 10 y 50 bacilos, ya que a 100 bacteria por macrófago declina su efecto estimulante, mientras que con M. leprae, muestra un efecto de dosis respuesta. A mayor número de bacilos mayor producción de Il-1, independientemente de si los macrófagos son de pacientes o de sujetos sanos.

Estos resultados sugieren que la secreción de Il-1 espontánea por los macrófagos de los pacientes lepromatosos, está relacionada con el número de bacilos de M. leprae. La producción de Il-1 con los productos de sonicación de las tres cepas de micobacterias, se mantiene sólo con M. leprae, lo que se correlaciona aún más con la presencia de un componente presente en esta especie bacteriana. Con las cepas de M. tuberculosis disminuye el efecto inductor. Al estudiar la activación de los macrófagos por el glicolípido fenólico (GLP-1) componente exclusivo de M. leprae y de lipoarabinomana (LAM), componente compartido con M. tuberculosis, se observa que ambas moléculas son inductoras de Il-1, tanto en macrófagos de pacientes lepromatosos, como en macrófagos de sujetos sanos. La cantidad de Il-1 es ligeramente mayor con

GLP-1 que con LAM a concentración de 10 μ gr . LAM no varía su efecto inductor a ésta última concentración. Finalmente la producción de IL-1 con 1, 10 50 y 100 μ gr de GLP-1 en macrófagos de pacientes lepromatosos y de sujetos sanos, muestra una respuesta proporcional entre la cantidad de IL-1 que se produce con la dosis estimulante.

Con estos resultados se demuestra que la liberación espontánea de IL-1 por los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, está relacionada con la presencia de los bacilos de M. leprae y específicamente con su componente glicolípido fenólico 1 (GLP-1).

Por lo tanto se propone lo siguiente: Si la Interleucina 1, además de estimular la proliferación de linfocitos tiene otras actividades biológicas como, la de producir fiebre, activar la proliferación de fibroblastos, activar la producción de caquectina, colágena, colagenasa, prostaglandinas etc. la Interleucina 1 secretada en forma aparentemente espontánea en estos pacientes, puede explicar parte de la inmunopatogenia de la enfermedad lepromatosa a través de sus efectos sobre las otras células blanco del organismo.

INTRODUCCION

Los mecanismos de resistencia natural a la infección en el hombre, incluyen barreras de tipo anatómico, factores bioquímicos y elementos celulares fagocíticos polimorfonucleares y mononucleares. El hombre y diferentes especies animales, son susceptibles a infecciones por ciertos microorganismos. La susceptibilidad depende de los requerimientos nutricionales y ecológicos del parásito, y del buen funcionamiento de estos mecanismos de resistencia natural.

Las infecciones por microorganismos intracelulares tienen predilección por los macrófagos donde pueden multiplicarse. Los primeros estudios que demostraron la participación directa de las células mononucleares en este tipo de infecciones fueron los hechos por Suter en 1952 (1) con bacilos de M. tuberculosis. Este investigador postuló diferentes mecanismos de sobrevivencia de los gérmenes intracelulares, que son por un lado los componentes superficiales del parásito, y por otro, factores que inhiben el metabolismo de la célula parasitada. Mackaness (2) encontró en un modelo experimental en ratas que la resistencia a listerias, brucelas y micobacterias, se debe a los macrófagos, los cuales destruyen a estas bacterias intracelulares facultativas. Además que la infección previa en estas ratas con M. tuberculosis, las hacían mas resistentes

a infecciones posteriores. Dannenberg (3) observó que los macrófagos de ratones previamente vacunados con BCG tenían mayor capacidad microbicida contra L. monocitógenes y S. typhimurium. También postuló que los macrófagos pueden activarse o morir en una lesión infecciosa activa, y que esta activación o muerte depende del número de microorganismos infectantes y del estado previo de activación de los macrófagos. Hibbs en 1973 (4) demostró que macrófagos activados in vitro con lipopolisacáridos (LPS), BCG y toxoplasmas, también incrementaban su capacidad citotóxica contra fibroblastos tumorales y su actividad microbicida para toxoplasmas.

La activación de los macrófagos posterior a una infección experimental con bacterias patógenas o BCG se debe a los productos derivados de los linfocitos T, llamados en forma genérica Linfocinas. Esta relación entre los linfocitos y los macrófagos fué observada desde 1969 por Mackaness (5) y Fowles (6). Posteriormente Nathan en 1973 (7) caracterizó las fracciones que contenían los factores activadores de los macrófagos llamados Factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) y Factor activador de macrófagos (MAF).

Pearson (8), Hammond (9) y Whal (10) encontraron que el macrófago activado incorpora 17 veces más glucosa-

En la actualidad se le ha dado más importancia al macrófago en cuanto a su función inductora de la inmunidad adquirida. Friedman y colaboradores (13) en 1963 publicaron por primera vez que las células mononucleares de la sangre periférica ó sus extractos eran importantes para la inducción de la respuesta inmune. En 1964 Adier y colaboradores (14) publicaron que extractos de RNA mensajero de los macrófagos eran las moléculas que en contacto con los antígenos participaban en el mecanismo de aparición de los anticuerpos. Posteriormente Mosier (15) aportó evidencias de la participación directa de las células adherentes en dicho mecanismo y que al parecer se requería del contacto célula-célula para una estimulación adecuada. Al inicio de los 70s se postuló que se requería del macrófago para que éste fagocitara, digiriera y presentara los antígenos a los linfocitos y que alguna señal entre el contacto de las dos células debía provocar la proliferación de la célula estimulada. En 1972 Gery, Gershon y Waskman (16) publicaron que los macrófagos estimulados in vitro con LPS o con fitohemaglutinina (PHA) producían una proteína que poseía la característica de potenciar la proliferación de los linfocitos T y de timocitos de ratón estimulados con mitógenos, a la que denominaron Factor activador de los linfocitos (LAF). Esta molécula fué reportada también posteriormente por Unanue y Kiely (17) a la cual denominaron Proteína mitogénica (MP)

y que poseía las mismas características del LAF. Blyden y Handschumacher estimulando con LPS a leucocitos y monocitos humanos obtenidos de sangre periférica, caracterizaron este factor parcialmente como glicoproteínas de dos rangos de peso molecular, entre 50,000 y 13,000 daltons (18). Varios investigadores publicaron la presencia de este mismo factor en el sobrenadante de diversos cultivos celulares, por ejemplo: de cobayos (Rosenstreich, 1976), de ratón (Gery y Waskman, 1977), de rata (Hoessli, 1977), de mono y de perro (Blyden y Handschumacher, 1977) y de conejo (Ulrich, 1978) (19). En el Comité Internacional de Nomenclatura se propuso el término de Interleucina 1 (I1-1) para esta monocina (20) que fué aceptado por la comunidad científica.

El término de Interleucina 1 agrupa a una familia de glicoproteínas producidas por los monocitos/macrófagos principalmente, que poseen actividades biológicas inmunomoduladoras y proinflamatorias. Los estudios iniciales para caracterizarla fueron hechos en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos de diferentes especies inducidos con E. coli, Silica gel y partículas de Látex. Los pesos moleculares descritos están entre 12 y 17 Kd. y de 50 a 75 Kd. Se han descrito cuando menos dos distintas moléculas de I1-1 humana, denominadas alfa y beta, y se han aislado 2 moléculas de RNAm distintos que codifican para dos proteínas de un

peso molecular de 31 Kd. Estas proteínas de residencia intracelular, posteriormente se procesan y liberan a dos proteínas de un peso molecular de 17.5 Kd. La secuencia de aminoácidos entre ambas es muy parecida, semejanza que también es observada con la molécula precursora de la Il-1 murina que tiene un P.M. de 37 Kd, en la cual existe un 62% de homología con la molécula precursora de la Interleucina 1 alfa humana (21). Se ha estudiado también la cinética de aparición de los precursores de ambas interleucinas por medio de estudios inmunocitoquímicos, detectándolas desde las 2.5 horas de incubación en los monocitos estimulados con LPS, obteniendo un pico máximo de acumulación a las 21 horas (22).

La inducción de la respuesta inmune requiere la participación del macrófago como célula presentadora de los antígenos y como productora de Interleucina 1. El linfocito T reconoce al antígeno a través del contacto de su receptor con el complejo que forman el antígeno y las moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de la membrana del macrófago. Estudios en sistemas murinos han demostrado que la Interleucina 1 semipurificada obtenida de los sobrenadantes de los macrófagos, puede reemplazarlos para inducir la proliferación de los linfocitos activados con mitógenos. La Interleucina 1 directamente no es la responsable de la división celular, sino la acción de la

Interleucina 2 liberada por los linfocitos T cooperadores (23). Esta relación biológica entre ambas interleucinas fué posteriormente apoyada experimentalmente por Smith y colaboradores en 1980 (24).

Muchas otras células además de los macrófagos, producen Interleucina 1 : keratinocitos, células gingivales, células epiteliales, fibroblastos, células mesangiales, astrocitos y células corneales. Así mismo, además de activar la síntesis de DNA y la producción de Interleucina 2 en timocitos y linfocitos T, la Interleucina 1 presenta las siguientes actividades biológicas:

- 1.- Activa a linfocitos B y estimula la producción de inmunoglobulinas T dependientes (25).
- 2.- Estimula la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colagenasa (26).
- 3.- Estimula a los hepatocitos a producir altos niveles de proteínas de fase aguda (27).
- 4.- Estimula a la médula ósea para producir un incremento en la liberación de neutrófilos (28).
- 5.- Estimula la producción del Factor de necrosis tumoral o Caquectina (29).
- 6.- Incrementa la liberación de Prostaglandina E y enzimas proteolíticas por células sinoviales y condrocitos (30).
- 7.- Aumenta la síntesis de colágena (31).

B.- Activa a los osteoclastos (32).

Por todas estas actividades biológicas se considera a las interleucinas alfa y beta, como hormonas que regulan la inflamación y la regeneración tisular. Estas moléculas actúan sobre las células blanco a través de receptores de Il-1 presentes en la membrana plasmática, cuya afinidad y distribución probablemente varíe en cada célula respondora a la acción de la Il-1 (fibroblastos, hepatocitos etc.). La estructura bioquímica del receptor fué publicada por Dower, Gillis y otros investigadores. Es una proteína de un peso molecular aproximado de 80 Kd y que posee la misma especificidad para ambos tipos de interleucinas, y se mencionan dos clases de receptores, unos de alta afinidad y otros de baja afinidad según el sistema celular estudiado (33).

En 1985 Kurt-Jones y colaboradores (34) publicaron la presencia de moléculas de interleucina 1 asociada a la membrana de macrófagos murinos con capacidad de estimular también la proliferación de los timocitos y linfocitos T. Un año después, Weaver y Unanue (35) publicaron que su expresión estaba relacionada con la inducción antigénica específica y con la presencia de factores solubles derivados de linfocitos T.

Parece ser que las células T pueden inducir a los macrófagos a expresar Il-1 de membrana, ya sea por contacto directo célula-célula a través de la unión del receptor de T con el antígeno o a través de la producción de linfocinas .

La información que se tiene actualmente es la siguiente: 1) se han descrito tres sitios de localización de la interleucina 1: intracelular, en la membrana y extracelularmente; 2) se han descrito dos moléculas de RNA mensajeros diferentes que codifican para las proteínas intracelulares precursoras de la Il-1 alfa y la Il-1 beta; 3) se ha caracterizado el receptor para ambas moléculas de Il-1 y que al parecer es el mismo, según los estudios de sus constantes de afinidad, y 4) las sustancias inductoras de su producción hasta ahora mejor estudiadas son lipopolisacáridos (LPS), partículas de sílica, látex, phorbol de miristato acetato (PMA) y bacterias como listeria y BCG.

El método que más se utiliza para medir Il-1, es el propuesto inicialmente por Gery y Waskman (36) que mide la capacidad de la Interleucina 1 de potenciar la proliferación de los timocitos de ratón de la cepas CBA/N o C3H/HeJ, estimulados con fitohemoaglutinina (PHA) o Concanavalina A (ConA). La proliferación se mide por la incorporación al DNA de timidina marcada con tritio y las lecturas se obtienen en cuentas por minuto (CPM). Más recientemente se ha desarro-

llado un método inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales, pero a diferencia del primero, sólo detecta la presencia de la Il-1 pero no su actividad (37).

La respuesta inmune celular se manifiesta por la presencia de linfocitos T sensibilizados productores de linfocinas, y por un incremento en la capacidad microbicida de los macrófagos, lo cual finalmente determina la resolución de la enfermedad infecciosa. Esto sucede sólo si el macrófago presenta al antígeno procesado a los linfocitos T y libera la Interleucina 1 necesaria.

Entre los microorganismos considerados como intracelulares patógenos para el hombre tenemos a las salmonelas, brucelas, listerias, mycoplasmas y micobacterias entre otros. El comportamiento del macrófago al ser parasitado por ellos es muy similar y la resistencia para las reinfecciones depende de una buena respuesta inmune celular. En el caso de M. leprae, agente causal de la lepra o enfermedad de Hansen, la infección se puede manifestar en diferentes formas clínicas que se han relacionado con el comportamiento del sistema inmune del huésped hacia el M. leprae y aún permanecen sin entenderse. La lepra es una enfermedad infectocontagiosa, quizá una de las enfermedades infecciosas más antiguas que azotan a la humanidad. Los mecanismos patogénicos no se conocen totalmente, además la falta de buenas

técnicas de diagnóstico serológico y la falta de vacunas para su prevención, contribuyen a que esta enfermedad, sea de gran interés para muchos investigadores en el mundo.

El M. leprae es un bacilo ácido-alcohol resistentes, de residencia intracelular que parasita a macrófagos y células de Schwann. No se ha encontrado la manera de cultivarlo in vitro por lo que es difícil estudiar sus características bioquímicas, factores de virulencia, de resistencia y su tiempo de generación. El armadillo es la única especie animal que se ha encontrado infectada en forma natural, como si éste fuera el reservorio de la enfermedad en el humano. El período de incubación del bacilo es probablemente de unos 5 años o más, antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas de la enfermedad y su mecanismo exacto de transmisión es aún desconocido. Se acepta la vía respiratoria y el contacto estrecho y prolongado como la forma mas probable de infección. Afecta principalmente piel, mucosas y nervios periféricos, presentando diversas manifestaciones clínicas, algunas de ellas con deformidades tales, que se convierte también en una enfermedad psicológica (38). Las diversas manifestaciones clínicas se correlacionan histológicamente e inmunológicamente, lo que dió base a la clasificación propuesta por Ridley y Jopling en 1966 (39) en dos formas polares: lepra tuberculoide o variedad benigna y lepra lepromatosa o variedad maligna, y entre ellas formas intermedias como la lepra indeterminada,

lepra en el borde tuberculoide, lepra en el borde lepromatoso y lepra dimorfa. En el polo tuberculoide, el paciente desarrolla inmunidad celular específica contra M. leprae que elimina a los bacilos, pero también daña las terminaciones nerviosas concomitantes al tejido infectado. En las lesiones se observa gran infiltración de células mononucleares, células epitelioides, macrófagos y escasos bacilos. En el polo lepromatoso, los pacientes presentan una falta de respuesta inmune celular específica pero un nivel alto de anticuerpos en circulación. En las lesiones el infiltrado inflamatorio consiste principalmente de histiocitos con aspecto espumoso y de forma globosa, probablemente por la acumulación de los lípidos del bacilo, proliferación de fibroblastos, escaso y difuso infiltrado linfocitario y gran cantidad de bacilos dentro de los macrófagos infectados. El M. leprae tiende a invadir el torrente circulatorio dando como resultado una bacteremia continua en los pacientes lepromatosos. La presencia de los antígenos en circulación provoca la formación de complejos inmunes con los anticuerpos producidos y se depositan en los vasos sanguíneos de pequeño calibre y en membranas glomerulares, con gran compromiso del sistema reticuloendotelial, ocasionando una reacción inmunopatológica tipo III clásica, denominada en esta enfermedad, Fenómeno de Lucio o lepra reactiva. La mayoría de los pacientes desarrollan la variedad lepromatosa, y es curioso que generalmente la mayor parte de

la gente que se pone en contacto con el bacilo no desarrolla la enfermedad (40).

La composición química de la pared celular de las bacterias del género *Mycobacterium* es muy característica. Su gran contenido en lípidos tales como glicolípidos fenólicos, lipoarabinomananas, fosfolípidos, ácidos micólicos, gliceroles, ácidos grasos etc.; en polisacáridos como arabinosa, arabinogalactanas, manosa, rhamnosa y otros, les da propiedades inmunológicas peculiares. Algunas de estas sustancias han sido utilizadas como inmunoestimuladoras por su efecto adyuvante. El *M. leprae* comparte muchos de los componentes lipídicos y proteicos con otras micobacterias. Parece ser que el compuesto Glicolípido fenólico tipo 1 (GLP-1) es una molécula exclusiva del *M. leprae* (41), y probablemente algunas proteínas que no están aún completamente identificadas.

El GLP-1, está formado por un trisacárido unido por un grupo fenólico a una cadena de Pthiocerol (29 carbonos) y ácidos micocéricos (42). El doctor Mehra y colaboradores (43), estudiaron la participación del GLP-1 en la estimulación de los linfocitos T supresores en los pacientes lepromatosos. Encontraron que sí había actividad supresora demostrada in vitro, en un cultivo con mononucleares de sangre periférica, estimulados con Concanavalina A, y que

ésta actividad supresora no ocurría cuando se eliminaba el trisacárido terminal o se bloqueaba con anticuerpos monoclonales. Estos resultados sugirieron que los pacientes con lepra lepromatosa tenían linfocitos T supresores específicos contra el GLP-1 y más aún, que el epítope responsable era el trisacárido terminal. Esto podría explicar en parte la presencia de linfocitos CD8 (supresores) observados en cortes histológicos de las lesiones de los pacientes lepromatosos (41,44).

Otros autores han tratado de explicar la inmunosupresión en base a una disminución en el número de linfocitos T cooperadores y a una deficiencia en la producción de Interleucina 2. En 1983 Haregewoin (45) publicó que las células mononucleares de los pacientes lepromatosos no producían Il-2 después de la exposición al M. leprae in vitro, pero que con la adición de esta linfocina al medio, las células respondían al estímulo y proliferaban. Otros investigadores buscaron la presencia de la Interleucina 2 y de células con receptores para Il-2, en cortes histológicos de las lesiones de los pacientes. Observaron que en las lesiones de los pacientes lepromatosos, había una deficiencia de la producción de Il-2 in situ, un número variable de células con receptores y ausencia de linfocitos portadores del fenotipo CD4 (46, 47). Sin embargo Kaplan (48) publicó que aún cuando se eliminan las células T supresoras con anticuerpos

OKT8 y se adicione al cultivo Interleucina 2, solo se incrementa una respuesta inmune preexistente a otros antígenos, pero la respuesta a M. leprae no se manifiesta, por lo que concluyó que el daño está en los eventos eferentes de la respuesta inmune al M. leprae que no permiten la sensibilización inicial.

La función del macrófago es la que ultimamente ha llamado la atención como un posible mecanismo que pudiera en parte explicar la inmunosupresión. En 1977 Stobo (49) publicó que los macrófagos de pacientes con diversas infecciones fúngicas producían un factor soluble supresor (MS) que era capaz de inhibir la proliferación de los linfocitos T normales estimulados con mitógenos. Bullock y Gershon (50) un año después reportaron la presencia de factores supresores derivados de los macrófagos de ratones C3H/Anf infectados con M. lepraesurius, actividad que se potencializaba conforme progresaba la infección y se correlacionaba con la aparición de una segunda subpoblación de células supresoras con características de linfocitos T. Años más tarde, Salgame (51) obtuvo un factor supresor al lisar macrófagos de pacientes con lepra lepromatosa, que suprimía la respuesta de los linfocitos a los antígenos a los cuales respondían previamente. Este factor es estable al calor y no dializable y puede inhibir tanto a células respondedoras a lepromina, como a estímulos mitogénicos con PHA Y ConA.

También se ha sugerido una falla en la producción de Interleucina 1 como responsable de la supresión, como ha sido reportado por Watson y colaboradores (52) en 13 pacientes lepromatosos, 5 tuberculoides y 2 indeterminados. Por lo tanto es posible que la falla en la producción de citocinas, sea en parte responsable de la deficiente proliferación de los linfocitos T, y con ello se permita la persistencia intracelular de los bacilos.

Es indudable que las evidencias aportadas por los investigadores no explican satisfactoriamente el fenómeno de inmunosupresión específica y de la inmunopatogenia, presentada por los pacientes con lepra lepromatosa, razón por la cual nos avocamos a estudiar la producción de Interleucina 1 de los macrófagos de los pacientes con lepra y explicar su función en la patogenia de la enfermedad.

HIPOTESIS

LA FALTA DE RESPUESTA INMUNE CELULAR EN PACIENTES CON LEPROMA ATRIBUIDA A LOS LINFOCITOS T SUPRESORES, NO EXPLICA SATISFACTORIAMENTE EL MECANISMO DE LESION TISULAR. SABEMOS QUE LA PARTICIPACION DEL MACROFAGO ES FUNDAMENTAL PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNE, POR LO QUE POSTULAMOS EN EL PRESENTE TRABAJO QUE PARTE DEL MECANISMO INMUNOPATOGENICO SE DEBE A UNA DEFICIENTE PRODUCCION DE INTERLEUCINA 1 (IL-1) POR LOS MACROFAGOS DE ESTOS PACIENTES.

OBJETIVOS

- 1.- ESTUDIAR LA PRODUCCION DE INTERLEUCINA 1 EXTRACELULAR E INTRACELULAR INDUCIDA CON LIPOPOLISACARIDO (LPS) EN LOS MACROFAGOS DE LOS PACIENTES CON LEPROMATOSA Y TUBERCULOIDE.
- 2.- DETERMINAR SI LA PRODUCCION DEFICIENTE DE INTERLEUCINA 1 POR LOS MACROFAGOS DE LOS PACIENTES CON LEPROMATOSA ES YA UNA CONDICION NATURAL DEL HUESPED O EL RESULTADO DE LA INFECCION.
- 3.- ESTUDIAR LA PRESENCIA DE FACTORES EXTRA CROMOSOMICOS EN LOS BACILOS DE *M. LEPRAE*, COMO POSIBLES DETERMINANTES DE LA ALTERACION DE LA FUNCION DE LOS MACROFAGOS DE LOS PACIENTES LEPROMATOSOS .
- 4.- ESTUDIAR LA PRODUCCION DE INTERLEUCINA 1 INDUCIDA CON PRODUCTOS DE SONICACION DE *M. LEPRAE* Y DE *M. TUBERCULOSIS* EN LOS MACROFAGOS DE LOS PACIENTES LEPROMATOSOS.

MATERIAL Y METODOS

I.- OBTENCION DE MONONUCLEARES DE SANGRE VENOSA

PERIFERICA DE LOS PACIENTES Y SUJETOS SANOS.

Se obtuvieron 20 ml. de sangre venosa periférica con 100 Unidades de heparina los cuales se diluyeron con 20 ml. de Sol. de Hank's. Después se colocaron sin mezclarse 10ml. de la sangre diluida sobre 4 ml. de una mezcla de Ficoll Hypaque (densidad de 1.077) según la técnica de Boyum (52). Después de centrifugar a 400 g por 30 min se colectaron los mononucleares y se lavaron. Las células se resuspendieron en 3 ml. de Medio RPMI 1640 con Glutamina 200 mM y con 100 U/ml. de Penicilina G y 100 ng./ml. de Estreptomicina. Se ajustaron a 2×10^6 de células por mililitro.

II.- INDUCCION DE LA PRODUCCION DE INTERLEUCINA 1.

Para estudiar la producción de la Il-1 se utilizaron diferentes estímulos:

- 1.- 0.1 ml. de Lipopolisacárido de E. coli 011:B4 de una concentración de 1 mg./ml.
- 2.- Diferentes dosis de M. leprae, M. tuberculosis virulenta y la cepa de M. tuberculosis avirulenta H37-Ra.:
10 bacterias por macrófago.

50 bacterias por macrófago.

100 bacterias por macrófago.

3.- Productos de sonicación bacteriana de las tres cepas anteriores.

4.- Fracciones purificadas : Glicolípido fenólico I (GLP-I) y Lipoarabinomanna (LAM).

OBTENCION DE LA INTERLEUCINA 1 EXTRACELULAR E INTRACELULAR

Se pusieron 2 ml. de la suspensión de mononucleares ajustada a 2×10^6 /ml. en tubos de 13x100 y se les agregó el inductor. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 20 hs.

El sobrenadante (Il-1 extracelular) se obtuvo por centrifugación, el paquete celular se lavó 2 veces con medio de cultivo RPMI 1640 y las células se resuspendieron en 1 ml del mismo medio. Posteriormente se rompieron por congelación y descongelación en hielo seco con acetona, se centrifugaron a 3500 RPM y se filtraron a través de un filtro de 0.22 μ . El sobrenadante que fué etiquetado como Interleucina 1 intracelular.

ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE INTERLEUCINA 1

Se utilizó el bioensayo original de Gery y Waskman (36) de la proliferación de timocitos de ratón de la cepa CBA/N (cepa original de National Health Institute), estimu-

lados con 10 μ l de fitohemoaglutinina (PHA 100 μ gr) por cada ml de suspensión celular. Se utilizaron timos de ratones CBA/N de 8-12 semanas de nacidos para hacer la suspensión celular. Los ratones se mataron por dislocación cervical y los timos se homogenizaron en una malla de acero estéril dentro de una placa de Petri con solución de Hank's. Se lavaron 2 veces, se contaron y se ajustó la población celular a 15 millones de cel./ml en medio RPMI 1640 con 5% de suero de ternera fetal (FCS). Se agregaron 10 μ l de PHA por ml. de suspensión celular y se llevó un control de timocito sin PHA. Un volumen de 0.1 ml de las células se cultivaron en placas de microcultivo de 96 pozos con fondo plano (Falcon 3072 Oxnard, Calif.).

Los sobrenadantes de las muestras problemas y testigos que contienen la II-1 intra o extracelular, espontánea o inducida con LPS etc. se diluyeron con medio RPMI con 5% de FCS quedando 1:5, 1:20, 1:80 y 1:160. De cada una de éstas diluciones se agregaron 100 μ l. a cada cultivo de timocitos por triplicado. Se incubaron a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂ y humedad relativa del 95%. Después de 2 días se agregaron 10 nl. de timidina tritiada (1mCi/ml) a cada cultivo y la incubación continuó 24 hs. adicionales. Al final del cultivo de 72 hs, los cultivos se transfirieron a filtros de lana de vidrio con una microcosechadora semi-automática (Mini Mash II). A cada muestra se agregaron

5ml. de líquido de centelleo y la timidina incorporada se midió en un contador de centelleo marca Pakcard. Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (CPM).

La proliferación es directamente proporcional a la incorporación de timidina tritiada y por consiguiente a la radioactividad medida en cuentas por minuto (CPM).

III.- INDUCCION DE INTERLEUCINA I CON M. LEPRAE Y M. TUBERCULOSIS.

1.- Para Mycobacterium leprae:

La suspensión bacteriana de M. leprae se obtuvo de lepromas de pacientes de la consulta de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José eleuterio González" de la Facultad de Medicina. Los nodulos se debridaron y se homogenizaron. El material se transfirió a tubos de centrifuga para sedimentar los restos celulares y por centrifugación diferencial se obtuvieron los bacilos en los sobrenadantes. Parte de la suspensión con bacilos vivos se utilizó para el estudio de la búsqueda de plásmidos, en cambio para el estudio de la producción de Il-1, la suspensión fué autoclaveada. También se obtuvo lepromina de bacilos cultivados en armadillo proporcionados por el Dr. Fausto Quezada de la

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN de la Cd. de México.

2.- Para *Mycobacterium tuberculosis* virulento :

Se utilizaron varias cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes. Parte de la suspensión bacteriana fué autoclavada para el estudio de la producción de IL-1, y otra parte con los bacilos vivos se usó para la búsqueda de Plásmidos.

3.- Para *Mycobacterium tuberculosis* avirulento (H37Ra):

Se usó la cepa H37-Ra de *M. tuberculosis* que son bacterias muertas obtenidas de fuentes comerciales (Difco, Mich. USA)

La estandarización bacteriana se hizo por turbidimetría, utilizando el Nefelómetro de MacFarland (54) para obtener una suspensión inicial de 400×10^6 bacterias/ml.

No. DE BACTERIAS-----	DILUCION -----	EN 0.1 ml.
400×10^6 /ml.	1:8 = 50×10^6 /ml.-----	5×10^6 /ml.
400×10^6 /ml.	1:1.6 = 250×10^6 /ml.-----	25×10^6 /ml.
400×10^6 /ml.	0.125 ml. -----	50×10^6 /ml.

Se calcula que en 1×10^6 de mononucleares (MN) obtenidos con Ficoll-Hypaque hay un promedio de 125,000 monocitos, por lo que en 4×10^6 /ml. hay 500,000 células. Por lo tanto, al estimular 2 ml. de la suspensión de MN con 0.1 ml. de

las bacterias estandarizada, se tienen 10, 50 y 100 bacterias por macrófago.

IV.- METODOLOGIA PARA LA DEMOSTRACION DE PLASMIDOS.

Se utilizaron los métodos de Crawford (55), Mizuguchi (56) y Mayers (57) para M. tuberculosis y M. intracellulare y la tecnica de Miniprep para otras especies bacterianas utilizadas como control. Se establecieron modificaciones a los metodos para M. leprae ya que no se encontró en la literatura ningún reporte al respecto.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Muestras de los extractos de lepromas con los bacilos de M. leprae vivos, bacilos de cultivos primarios de M. tuberculosis vivos y de la cepa avirulenta H37-Ra se centrifugaron a 12,000 RPM en tubos Eppendorf.
- 2.- Se descartó el sobrenadante y las pastillas fueron congeladas a -20°C durante toda la noche.
- 3.- Las pastillas se resuspendieron en 250 μl de lisozima (2mg./ml) y se incubaron a 0°C por 30 min y posteriormente a 37°C por 90 minutos.
- 4.- Se añadieron 250 μl de solución alcalina de SDS al 10%, se agitaron en Vortex y se incubaron a 37°C por 30 minutos.

- 5.- Se añadieron 150. μ l. de solución alcalina de potasio 3M o de Perclorato de Sodio 5M para des-proteinizar.
- 6.- Se mezclaron por inversión y se incubaron 60 min a 0° C. Posteriormente se centrifugaron por 15 min a 12,000 RPM y se recolectaron los sobrenadantes
- 7.- A los sobrenadantes se añadió 200 μ l de fenol saturado y 200 μ l de cloroformo. Se agitaron en Vortex por 1 min, se centrifugaron 1 min y se recolectaron 400 μ l de la fase superior.
- 8.- Se añadió 1 ml de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente se centrifugó durante 3 min a 12,000 RPM y se descartó el sobrenadante por aspiración.
- 9.- El precipitado se disolvió con 100 μ l de acetato de sodio 0.1M y se repitió la precepitación con etanol. (Pasos 8 y 9)
- 10.- Se lavaron los precipitados con 1 ml de etanol al 70% y las pastilla del precipitado se secaron en una centrifuga al vacío.
- 11.- Los precipitados secos se disolvieron con 18 μ l de Sol. de Tris-EDTA 10mM y se añadió 2 μ l de RNAasa (1mg/ml). Se incubaron a 37° C por 30 min.
- 12.- Se prepararon las muestras para su corrimiento en geles de agarosa al 0.8% .

13.- Preparación de las muestras :

3 μ l de Tris-EDTA

2 μ l de las muestras

1 μ l de jugo azul 6X

14.- Las placas de agar se corrieron a 40 y 100 Voltz durante 1 hora y se tiñeron con bromuro de etidio durante 15 min.

15.- Las bandas de DNA del plásmido se vieron en una fuente de luz UV.

Se utilizaron los siguientes vectores plasmídicos como controles: pBR 322, pUC 18, pBSVE y pNPL-4. Todos ellos insertados en E. coli .

NUMERO DE PACIENTES EN EL ESTUDIO

Se estudiaron un total de 16 pacientes con el diagnóstico de lepra tuberculoides, 35 pacientes con lepra lepromatosa y 51 sujetos sanos . Los pacientes no estaban bajo tratamiento.

RESULTADOS

Resultados de la producción de Interleucina 1 por los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, lepra tuberculoide y de sujetos sanos utilizando como estímulo lipopolisacárido de E. coli 011:84 (LPS).

Se estudiaron 22 pacientes con lepra lepromatosa, 8 con lepra tuberculoide y 25 individuos clínicamente sanos. Los pacientes no estaban bajo tratamiento.

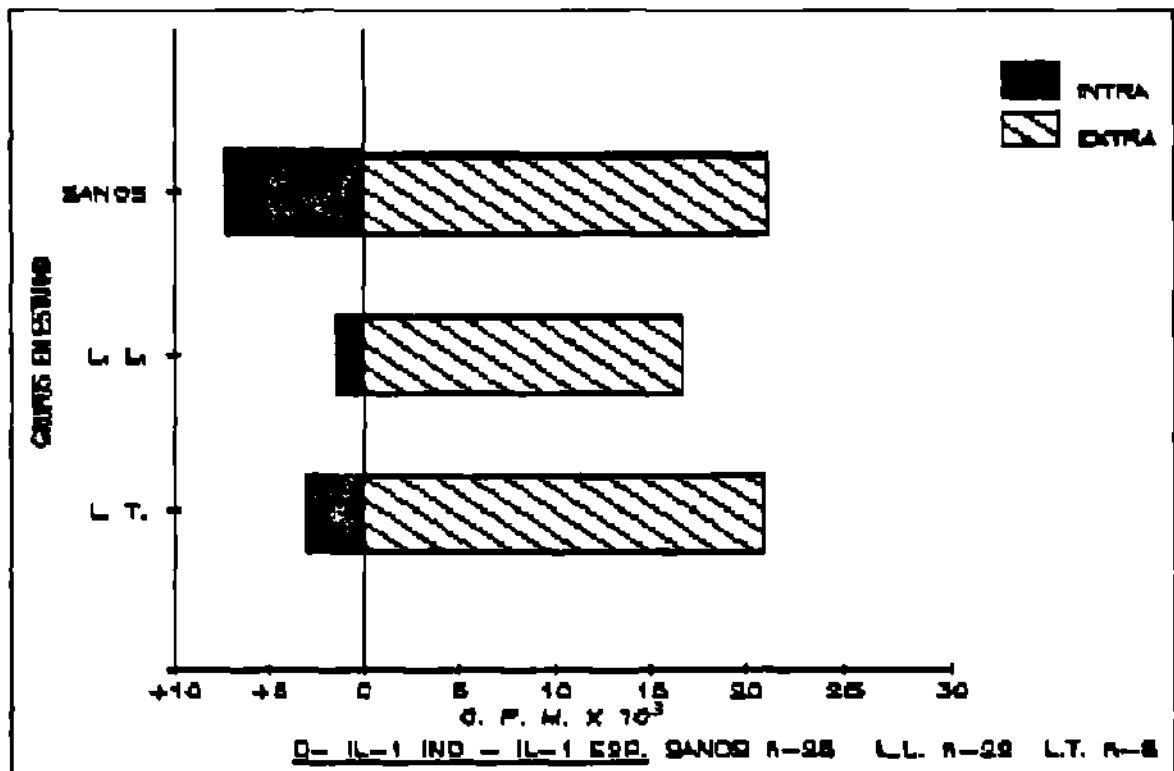
Las gráficas muestran los valores promedio en cuentas por minuto (CPM) de las diferencias (Deltas) de $^{11}\text{-I}$, obtenidas con la fórmula siguiente :

$$\text{DELTAS} = \text{CPM de } ^{11}\text{-I Inducida} - \text{CPM de } ^{11}\text{-I Espontánea}$$

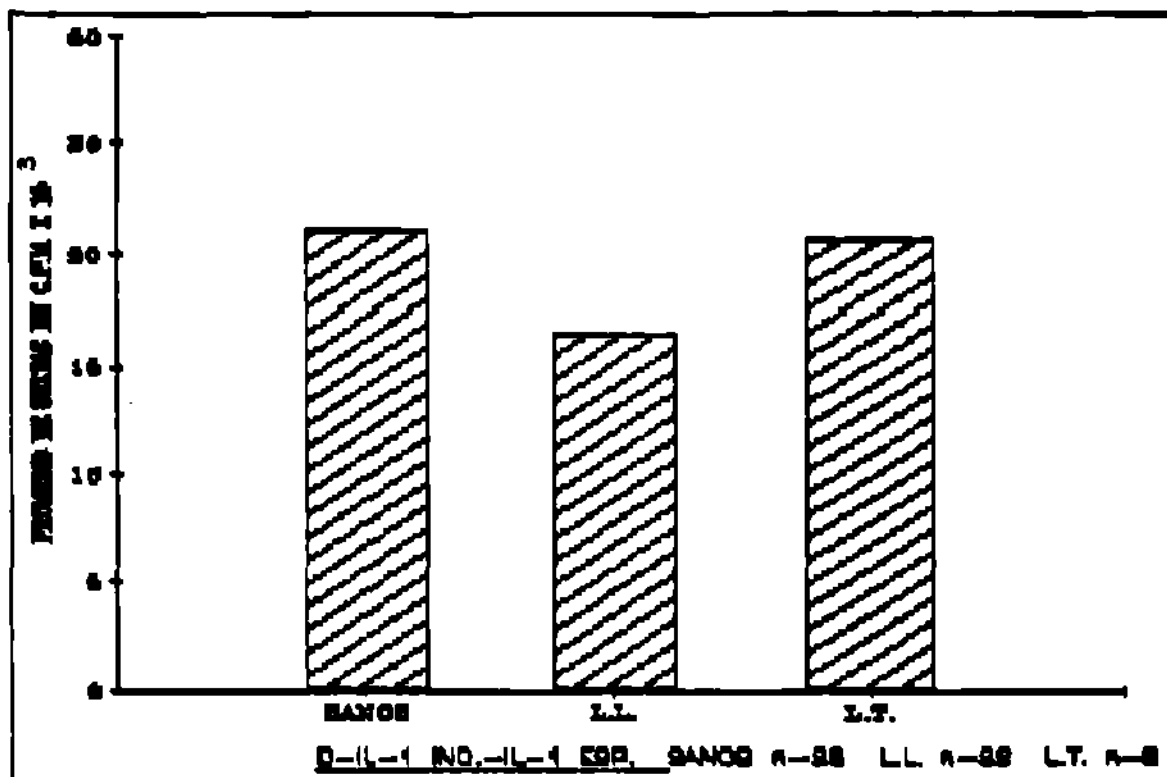
En la gráfica 1 se comparan los valores promedio de las Delta de la $^{11}\text{-I}$ intracelular y extracelular entre los tres grupos de estudio.

Se puede observar que los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa producen aparentemente menor cantidad de $^{11}\text{-I}$ al ser estimulados con LPS comparada con la producida por los macrófagos de los sujetos sanos, y de los pacientes con lepra tuberculoide. Las graficas 2 y 3 muestran

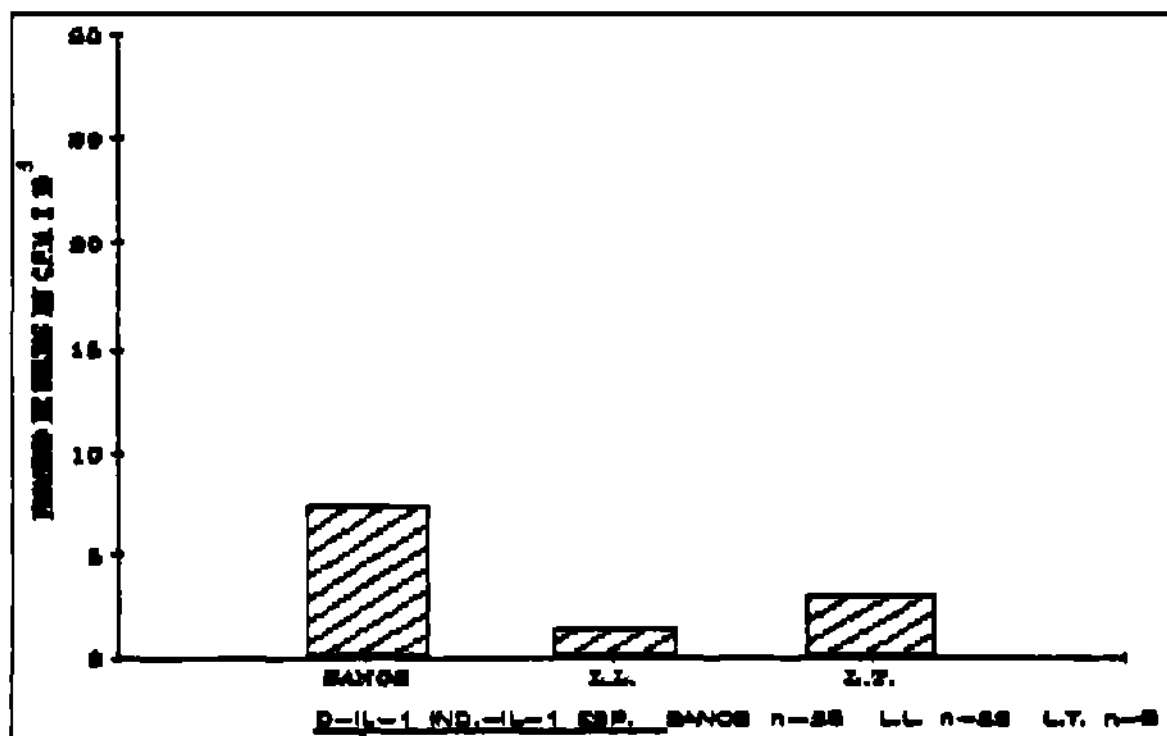
por separado las concentraciones de Il-1 extracelular y de la Il-1 intracelular. Al aplicar la prueba de t para analizar los resultados, se encontró que no había diferencia significativa en las concentraciones Il-1 extracelular entre los tres grupos de estudio. Si hay diferencia significativa para la Il-1 intracelular entre los pacientes lepromatosos y los sujetos sanos, pero no con los pacientes tuberculoideos.



GRAFICA 1.- Producción intracelular y extracelular de Il-1 obtenida de macrófagos de sujetos sanos, pacientes lepromatosos (L.L.) y tuberculoideos (L.T.).

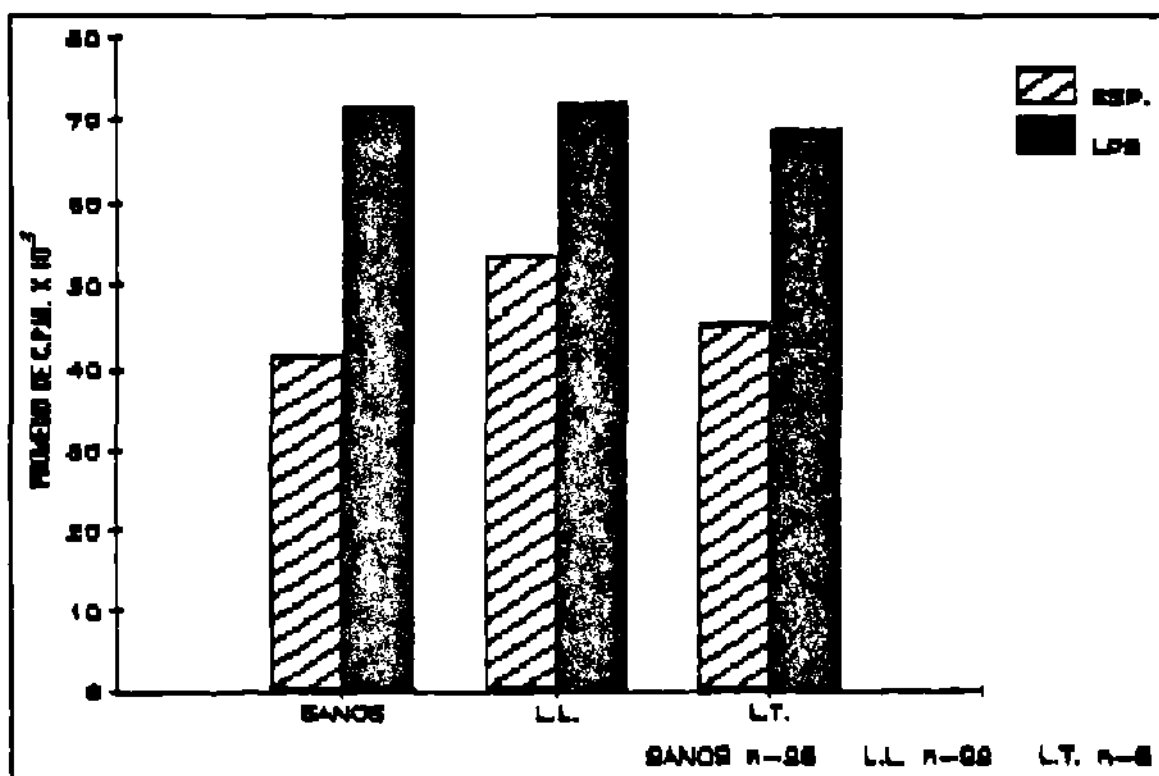


GRAFICA 2.- Comparación de la IL-1 extracelular entre los tres grupos en estudio. Los valores están expresados en C.P.M. La diferencia entre sanos y pacientes L.L. no es estadísticamente significativa ($p > 0.5$).



GRAFICA 3.- Comparación de la IL-1 intracelular entre los tres grupos de estudio. La diferencia entre sanos y L.L. sí es estadísticamente significativa ($p = 0.02$).

La gráfica 4 muestra la producción total de Il-1, es decir, la suma de las concentraciones de Il-1 extracelular más intracelular, tanto de la interleucina 1 liberada en forma espontánea, como la inducida con LPS. Se graficaron los promedios de las CPM de cada grupo en estudio. Como se ve en la gráfica no hay diferencia en la concentración de Il-1 inducida con LPS entre los tres grupos en estudio. En cambio, hay mayor cantidad de Il-1 espontánea en los pacientes lepromatosos que en los sujetos sanos.



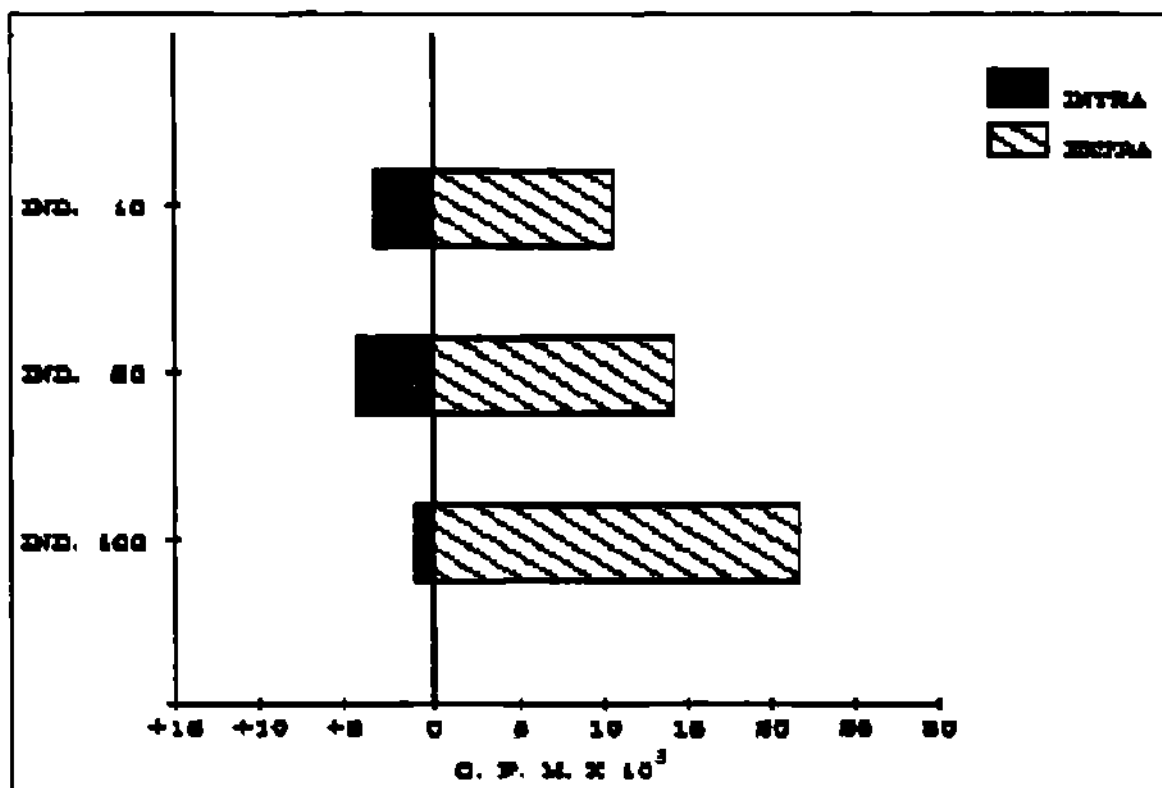
GRAFICA 4.- Comparación de la producción total de Il-1 (intracelular + extracelular) espontánea e inducida con LPS.

En resumen, no existe diferencia en la producción total de $11-1$ entre los lepromatosos y sanos, a pesar de la disminución aparente mostrada en las gráficas 1,2 y 3. Sin embargo, la liberación espontánea de $11-1$ por los macrófagos de los pacientes lepromatosos es mayor que en los sujetos sanos, como se demostró en la gráfica 4. Esta es la razón por la cual las Deltas son menores en los lepromatosos.

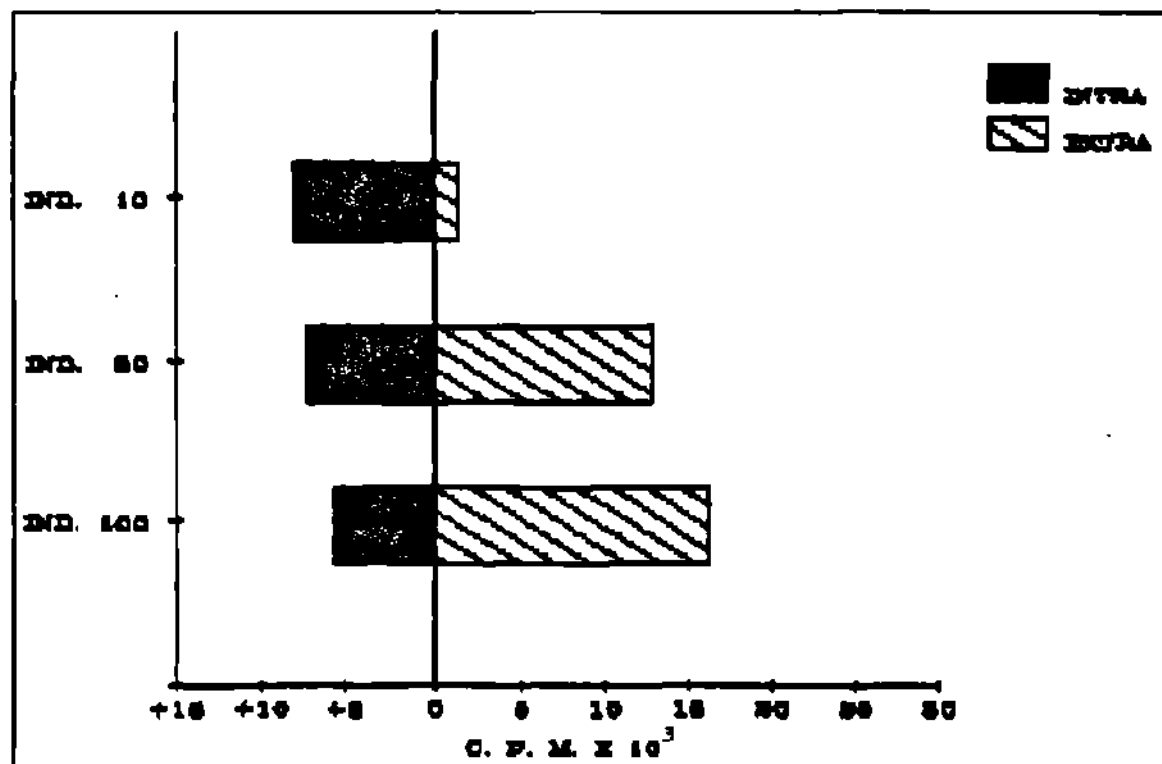
¿ Es ésta una condición innata del huésped, o está relacionada con la presencia y número de bacilos de M. leprae dentro del macrófago infectado ?

Para responder a esta pregunta, se llevó a cabo el estudio del comportamiento de los macrófagos en cuanto a la producción de $11-1$ con los bacilos de M. leprae comparándolo con otra micobacteria patógena como M. tuberculosis aislada de un paciente, y con una micobacteria no patógena, la cepa avirulenta H37-Ra de M. tuberculosis.

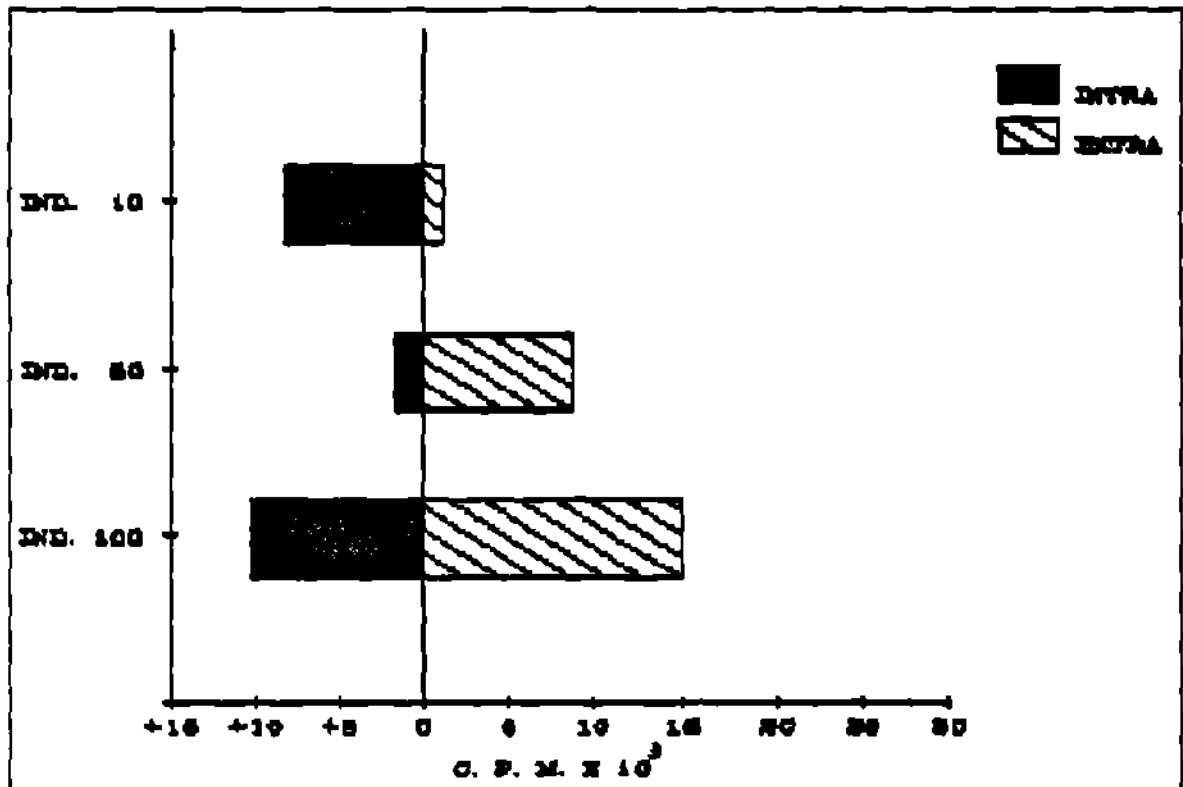
En las Gráficas 5,6 y 7 se presentan los resultados de la estimulación de los macrófagos con 10, 50 y 100 bacterias por macrófago de *Mycobacterium leprae* en los tres grupos en estudio.



GRAFICA 5.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de sujetos sanos estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de M. leprae.



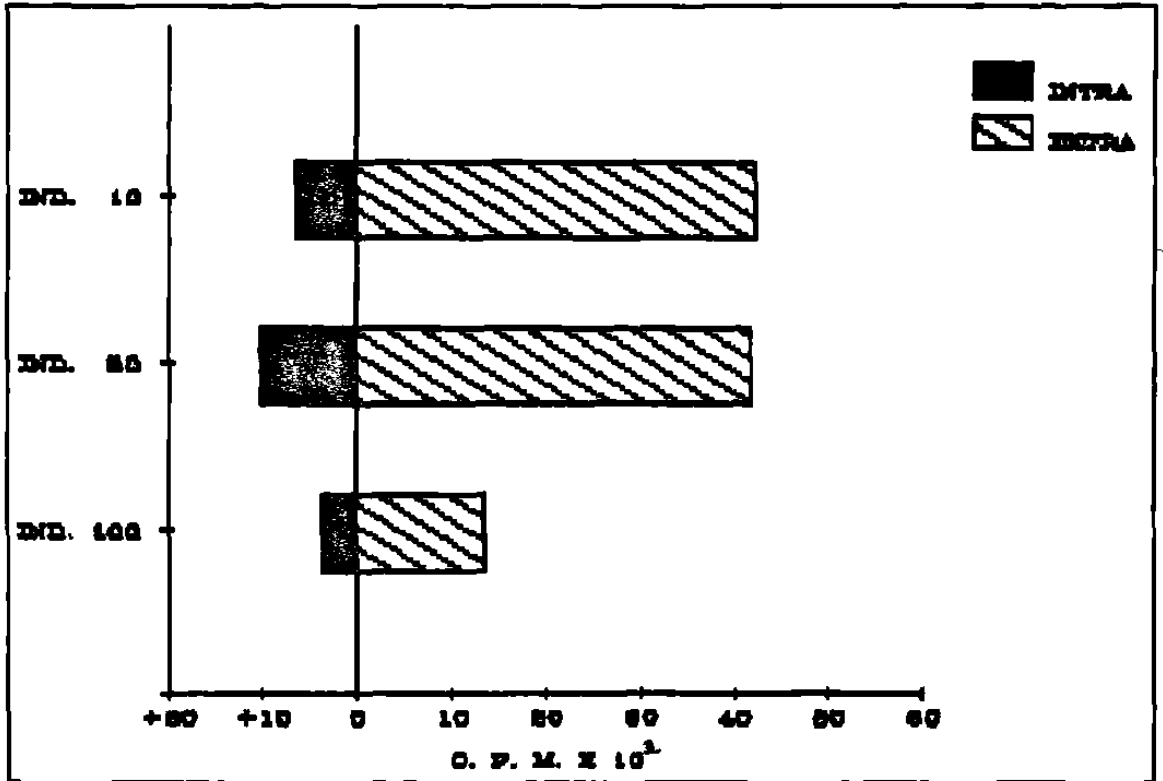
GRAFICA 6.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de pacientes lepromatosos estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de M. leprae.



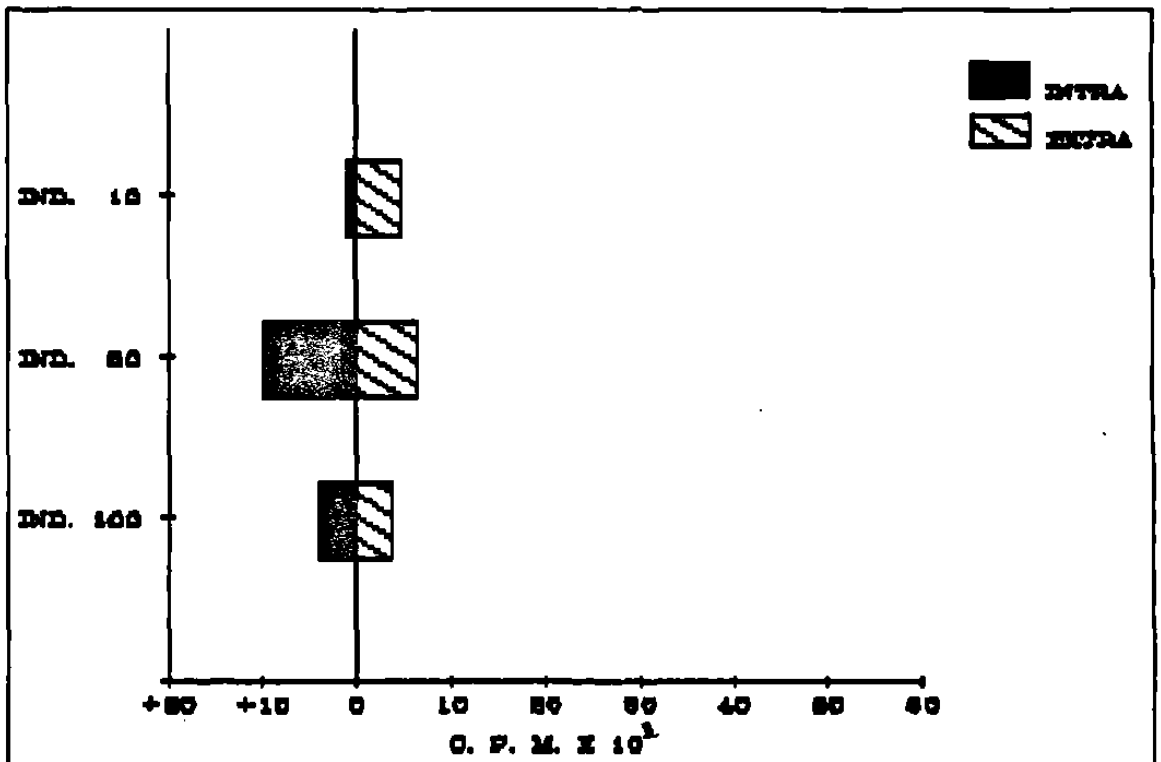
GRAFICA 7.- Produccion intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de pacientes tuberculoides estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de M. leprae.

Como se puede observar, los macrófagos de los tres grupos en estudio presentáron un efecto de dosis respuesta. A un mayor número de bacterias utilizadas como estímulo, mayor producción de IL-1. Este efecto no fué observado cuando los macrófagos fueron estimulados con la cepa virulenta y la avirulenta de M. tuberculosis.

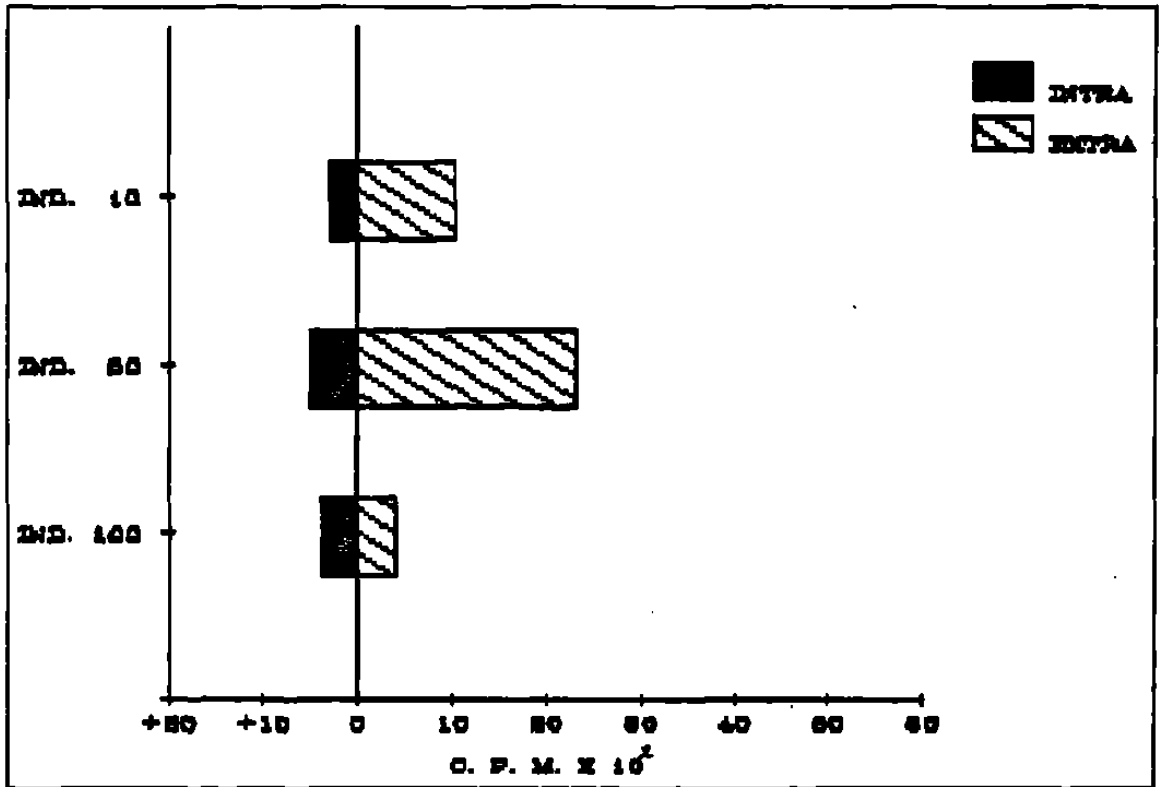
Con la cepa virulenta de M. tuberculosis (graficas 8,9 y 10), las dosis de 10 y 50 bacterias por macrófago fuéron mejores inductores de IL-1 en los tres grupos en estudio. Con 100 bacterias por macrófago el efecto disminuyó.



GRAFICA 8.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de sujetos sanos estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de M. tuberculosis.

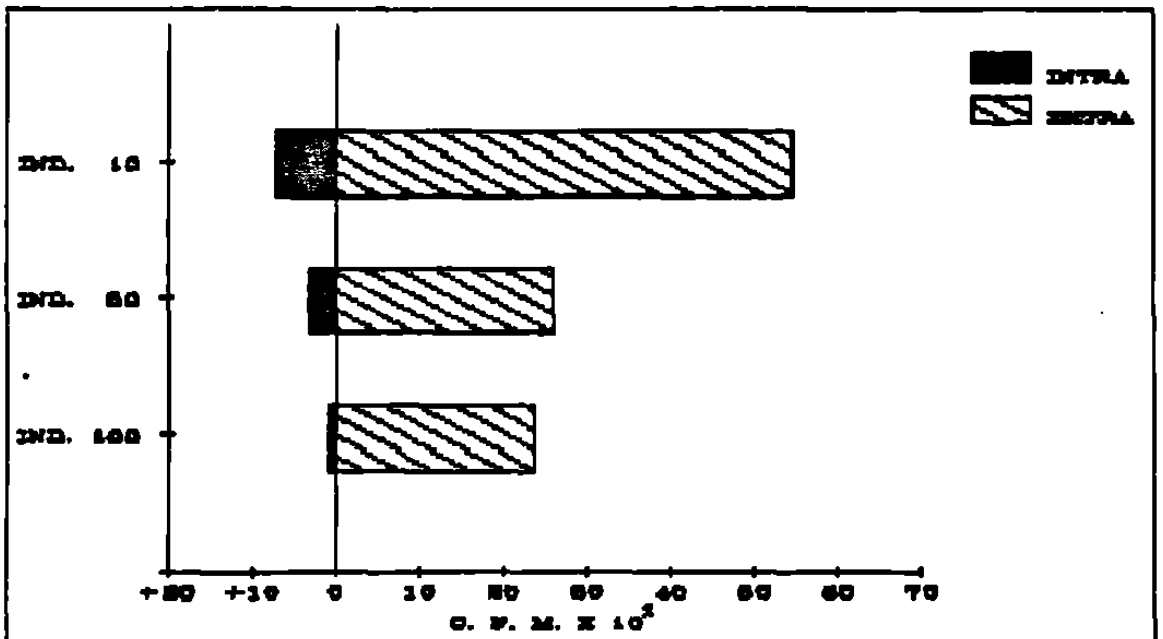


GRAFICA 9.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de pacientes lepromatosos estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de M. tuberculosis.

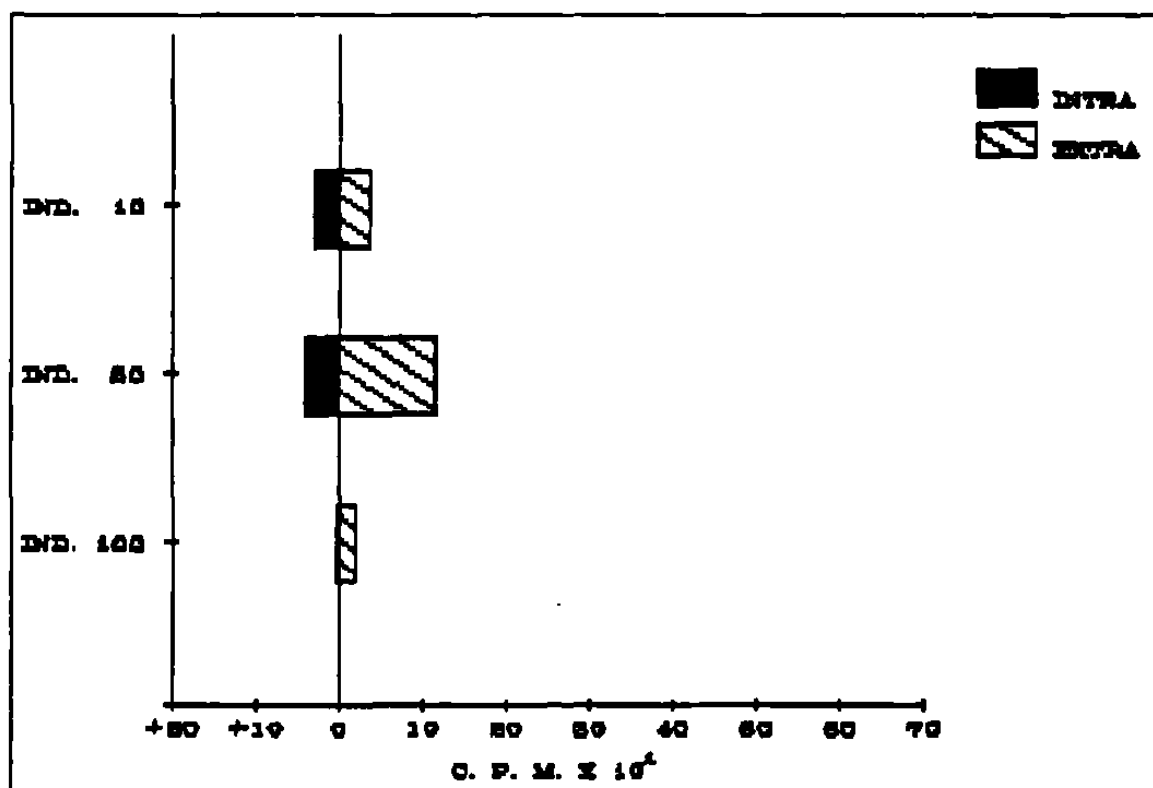


GRAFICA 10.- Producción intracelular y extracelular de 11-1 obtenida de macrófagos de pacientes tuberculoides estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de M. tuberculosis.

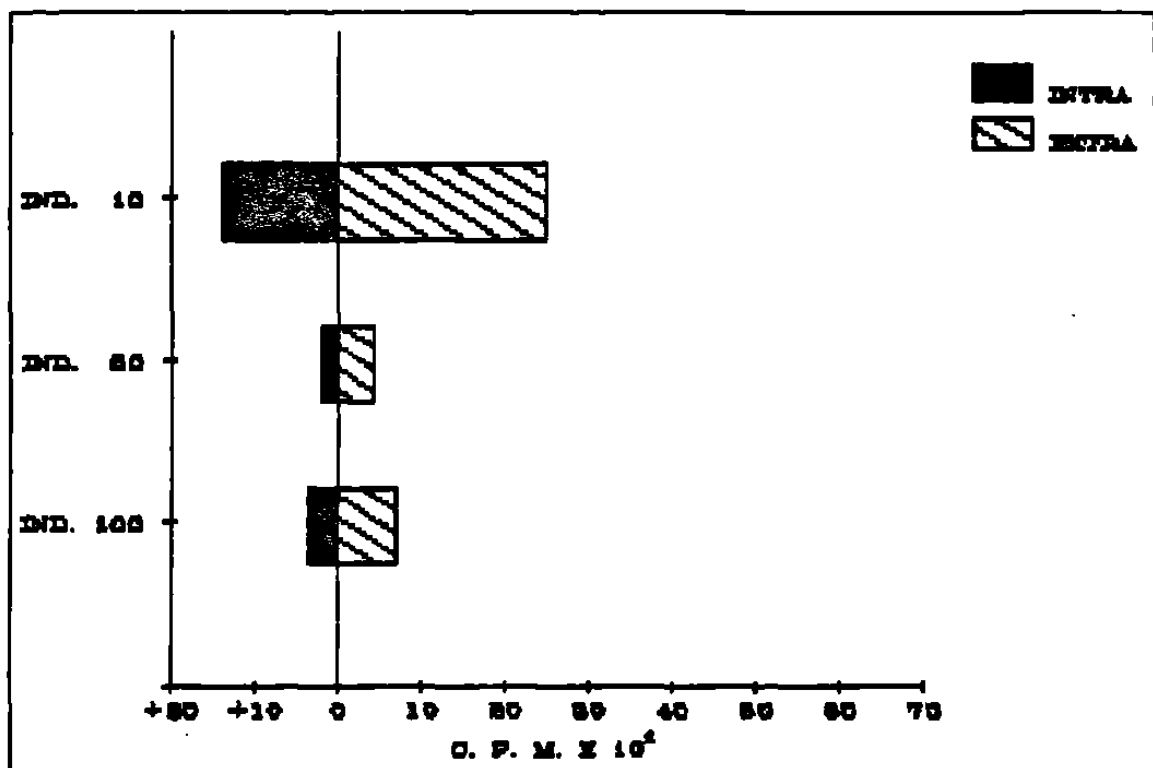
En las gráficas 11, 12 y 13 están los resultados con la cepa avirulenta H37-Ra..



GRAFICA 11.- Producción intracelular y extracelular de 11-1 obtenida de macrófagos de sujetos sanos estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de la cepa avirulenta H37-Ra.



GRAFICA 12.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de pacientes lepromatosos estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de la cepa avirulenta H37-Ra.



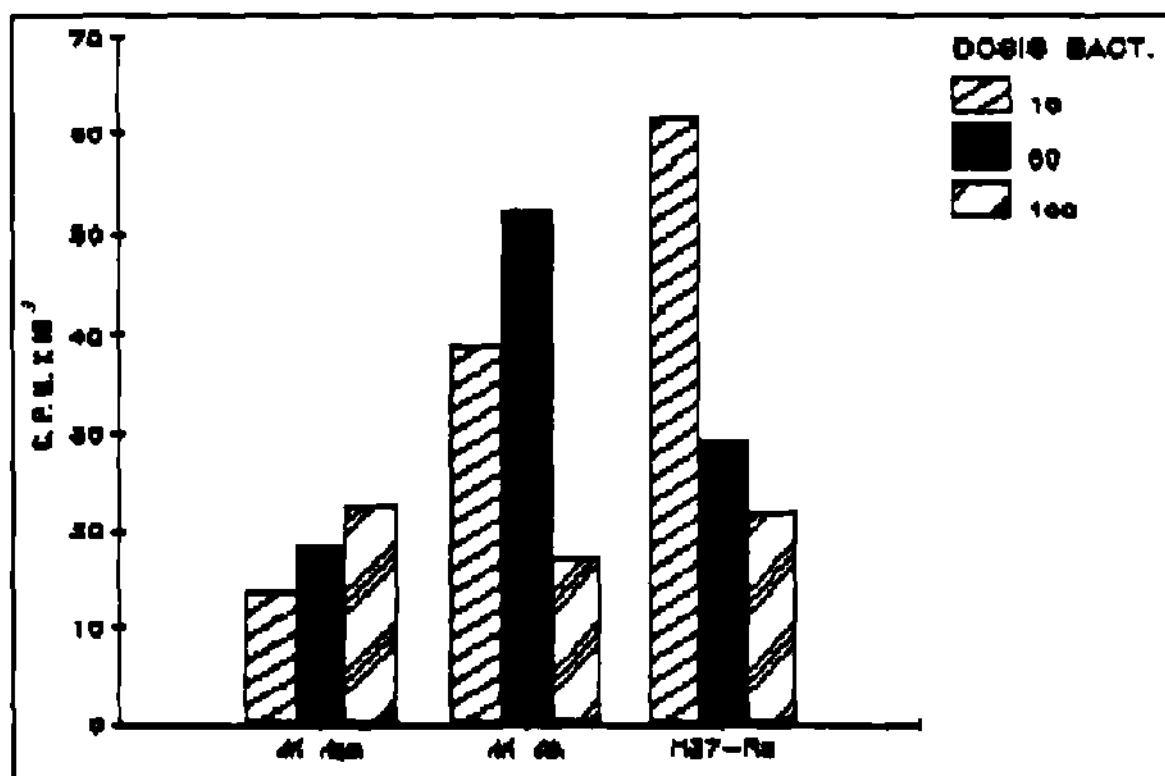
GRAFICA 13.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 obtenida de macrófagos de pacientes tuberculoides estimulados con 10, 50 y 100 bacterias de la cepa avirulenta H37-Ra.

La dosis de 10 bacterias por macrófago resultó ser la óptima para estimular a los macrófagos los pacientes tuberculoideos y de los sujetos sanos. Se observó una tendencia inversamente proporcional en los macrófagos a producir menos Il-1 al incrementar el número de bacterias. En los macrófagos de los pacientes lepromatosos, la dosis de 50 bacterias fué la que produjo el efecto máximo de producción de Il-1, y al igual que los otros dos grupos, a 100 bacterias por macrófago, hubo una disminución en su producción. En la gráfica 14 se presentan los valores de Il-1 espontánea producida por los macrófagos de los tres grupos en el estudio con las diferentes dosis bacterianas.



GRAFICA 14.- Concentraciones totales de Il-1 espontánea producida por los macrófagos de sujetos sanos, pacientes tuberculoideos (L.T.) y lepromatosos (L.L.).

Se puede observar la $II-1$ espontánea aumentada en el grupo de los pacientes lepromatosos. Para mostrar la relación entre las capacidades inductoras de $II-1$ de las tres cepas de micobacterias y la dosis estimulante, se muestra en la gráfica 15 los resultados obtenidos con macrófagos de sujetos sanos (no activados).



GRAFICA 15.- Comparación de la producción de $II-1$ total con las diferentes dosis bacterianas de *M. leprae*, *M. tuberculosis* y H37-Ra en macrófagos de sujetos sanos.

Estos resultados sugerían que el incremento en la liberación espontánea de II-1 observado con los macrófagos de los pacientes lepromatosos, estaba más relacionado con el M. leprae en cuanto a su efecto de dosis respuesta, que con M. tuberculosis virulento o avirulento. Cabe señalar sin embargo, que M. tuberculosis virulento y avirulento fueron mejores inductores de II-1.

Este efecto de dosis respuesta de II-1 con las diferentes micobacterias sólo se observó con M. leprae, independientemente si los macrófagos eran de sujetos sanos, de lepromatosos o tuberculoides. Esto sugiere que se trata de una característica de M. leprae y no de M. tuberculosis ni del huésped.

Se planteó entonces la posibilidad de que existiera un factor extracromosómico en M. leprae que codificara para algún factor de resistencia intracelular relacionado con la producción de II-1.

Para demostrar esta hipótesis se llevó a cabo el objetivo 3. Se buscó la presencia de plásmidos en los bacilos vivos obtenidos de lepromas de pacientes con lepra lepromatosa nodular. Los resultados se muestran en las figuras 1, 2, 3 y 4.

Continuación de Plasmidos...

Figura No. 3

(Método de Crawford)

M. tuberculosis vivo resistente a estreptomicina aislado de un paciente.

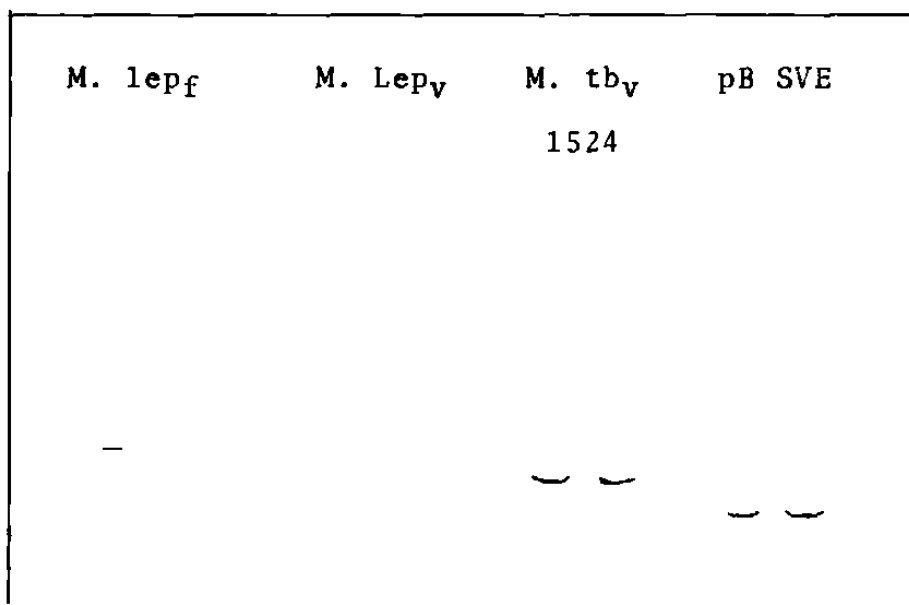
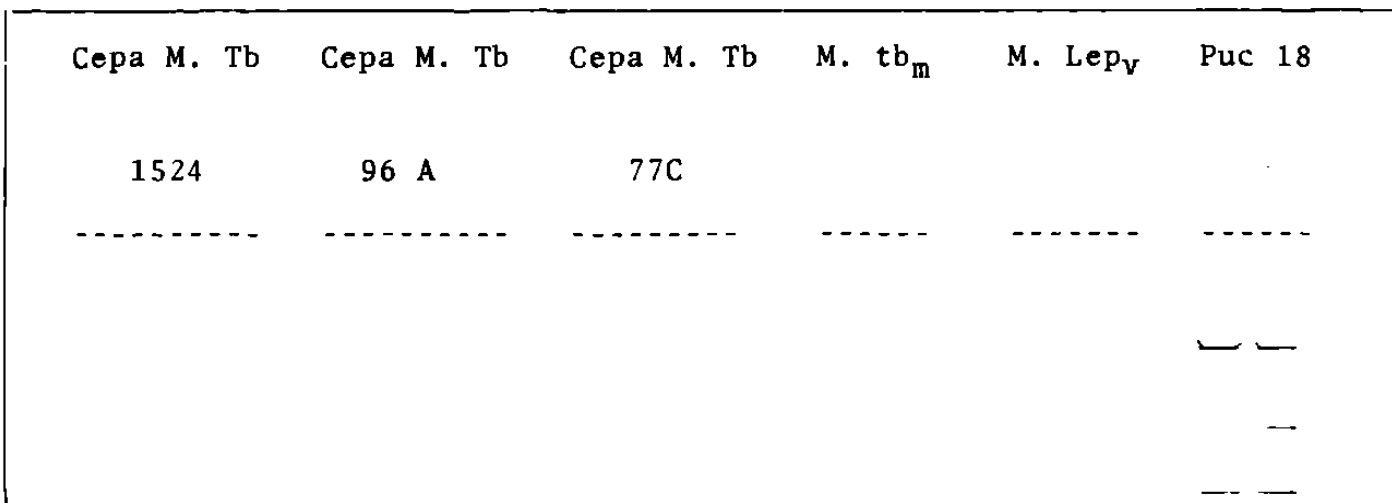


FIGURA No. 4 (Método modificado de Mizuguchi - Crawford)

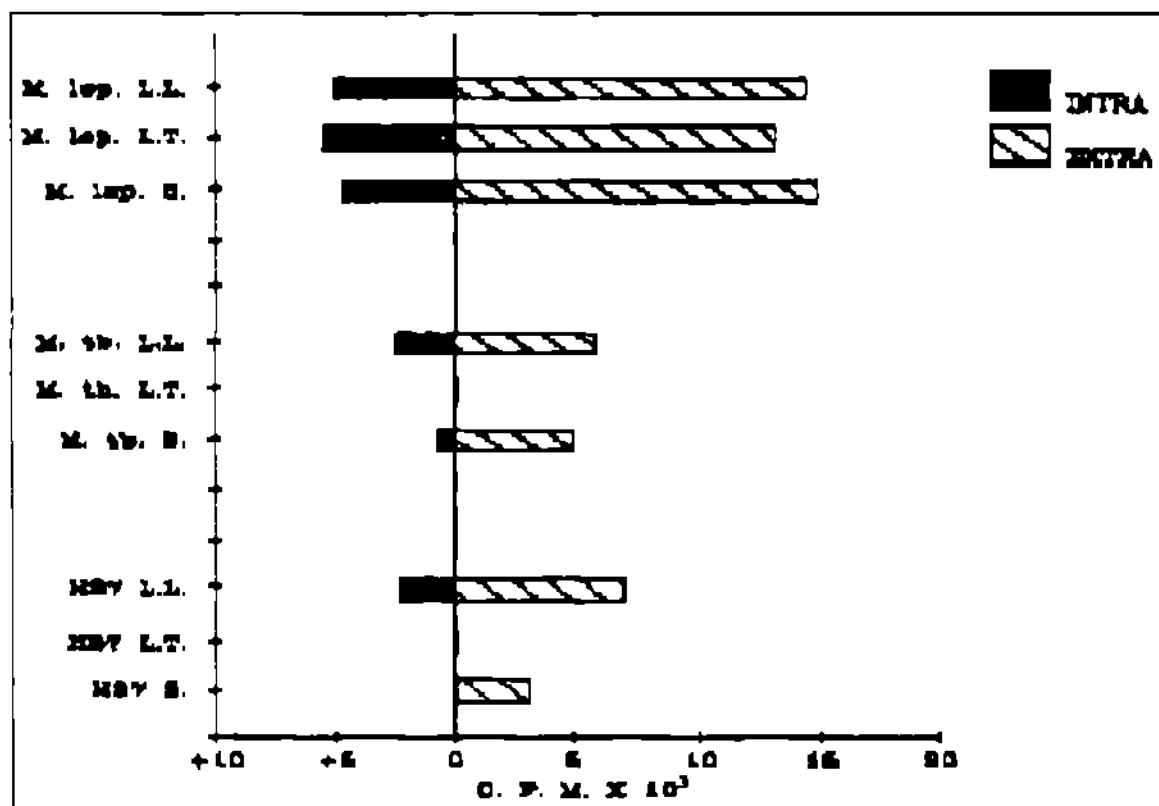


En la figura No.3 se representa el aislamiento de un plasmido de M. tuberculosis, resistente a estreptomicina por este método tampoco se logró poner de manifiesto la presencia de plasmidos en M. leprae vivo. En el experimento No. 4 no se obtuvo un buen aislamiento en ninguna cepa ni del plasmido de control. Las bandas difusas probablemente sean de RNA degradado.

En el canal de las muestras con M. leprae cultivado en armadillo y señalado como M.lep.f., se observó sólo en dos ocasiones una pequeña banda sugerente de un factor extra-cromosómico (figuras 1 y 2). En el primer experimento se utilizaron diferentes marcadores plasmídicos con diferente número de pares de bases nucleotídicas. De la cepa viva 1524B de M. tuberculosis resistente a estreptomycin aislada de un paciente, se logró demostrar la presencia de un plásmido de aproximadamente 6000 pares de bases. En el resto de las bacterias de M. tuberculosis virulentas pero sin resistencia antifimica, en la cepa H37-Ra y en los bacilos vivos de M. leprae, no se logró demostrar la existencia de plásmidos con esta metodología. Por lo tanto, al no poder relacionar la producción II-1 con la presencia de plásmidos en los bacilos, se continuó estudiando la participación de los componentes estructurales bacterianos en la producción de II-1 .

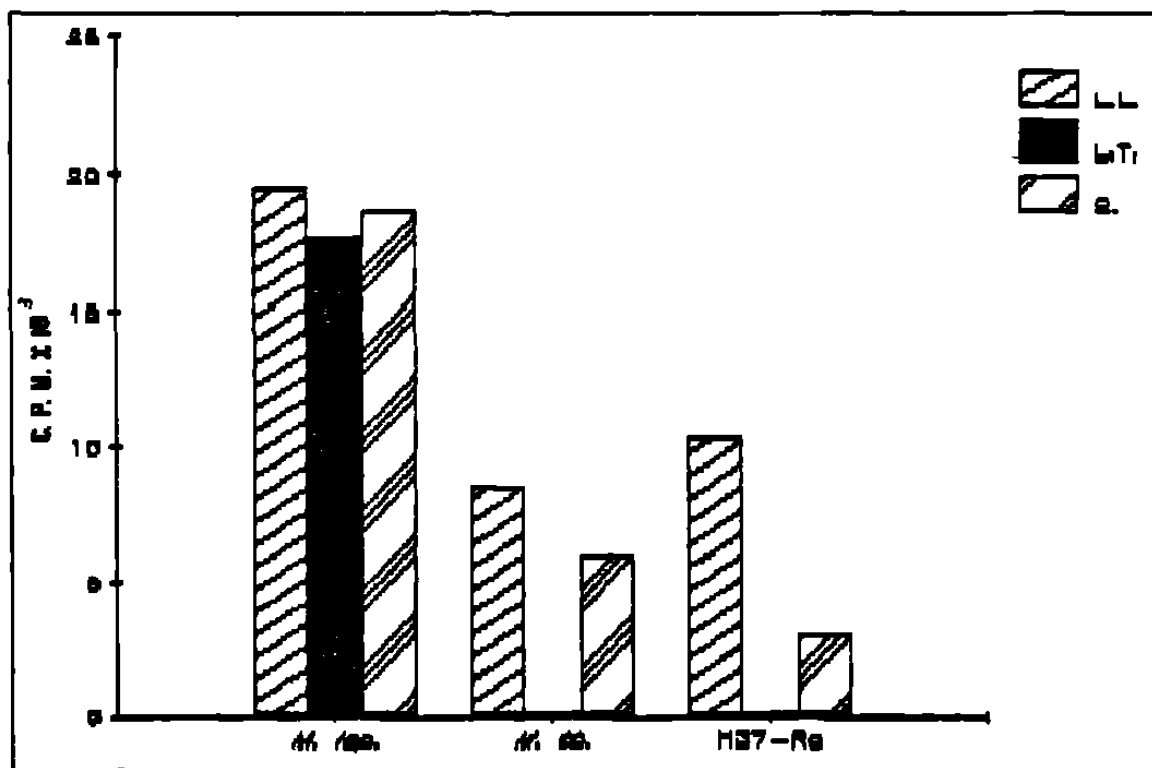
Como se demostró en el experimento con diferentes dosis bacterianas, que la producción de II-1 por los macrófagos de sujetos sanos y de los pacientes lepromatosos y tuberculoideos estaba mas relacionada con el número y la especie de micobacteria, se procedió a estudiar la producción de II-1 con las bacterias fragmentadas por sonicación. Esto nos daría mas información de por qué con M. leprae aparece el efecto de dosis respuesta, efecto no observado con las otras

micobacterias que presentaron mayor capacidad inductora. Si estaba relacionado con la presencia de los bacilos completos en los macrófagos, los efectos obtenidos con 10, 50 y 100 bacterias se perderían. Si era un problema de accesibilidad en M. leprae entonces se incrementaría la producción de II-1 con los sonicados a concentraciones parecidas a las obtenidas con M. tuberculosis virulento y avirulento. Los resultados de este experimento se muestran en la gráfica 16.



GRAFICA 16.- Concentraciones intra y extracelulares de II-1 de pacientes con L.L., L.T. y sanos estimulados con productos de sonicación de M. leprae, M. tuberculosis y H37-Ra.

En forma comparativa en la gráfica 17 se muestran las concentraciones de la Deltas totales de Il-1 (Extracelular + Intracelular) con las tres bacterias en los tres grupos en estudio.



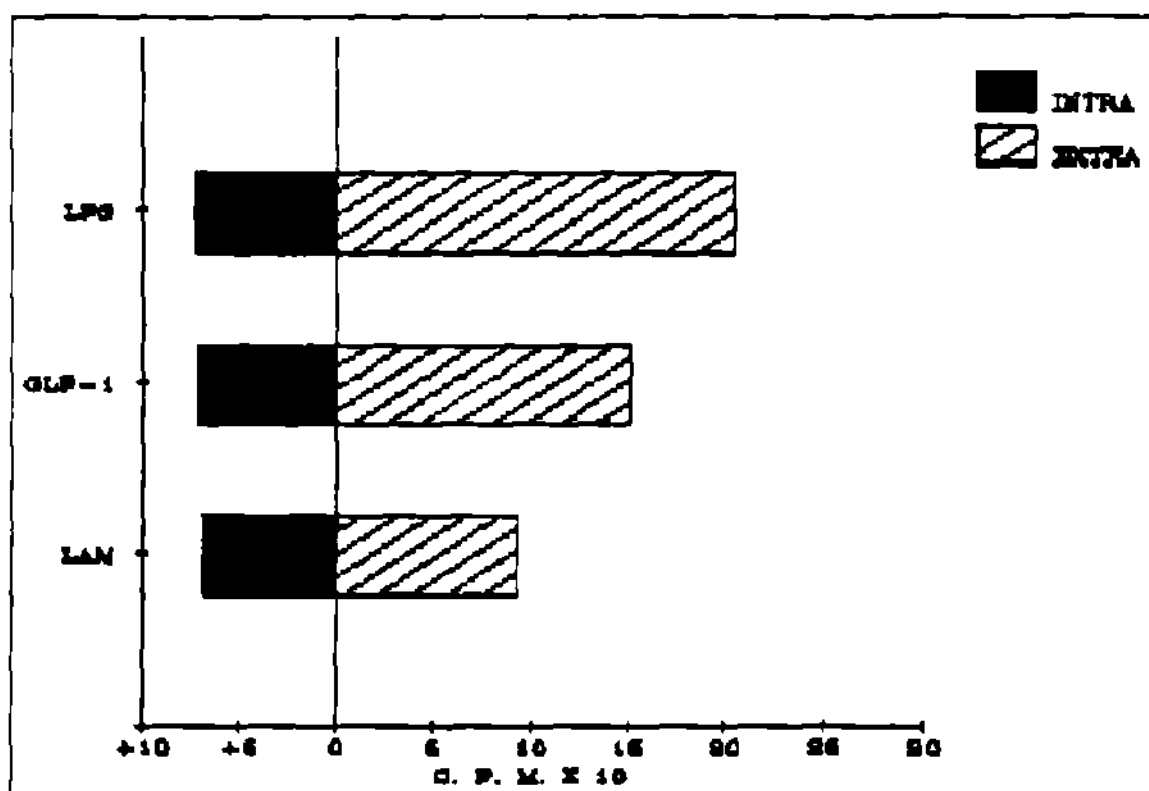
GRAFICA 17.- Comparación de las concentraciones de Il-1 total (extra+intracelular) de macrófagos de L.L., L.T. y sanos estimulados con sonicados de M. lep., M. tb. y H37-Ra.

Como se puede observar, la producción de Il-1 por los macrófagos de los pacientes y sujetos sanos se conservó con M. leprae pero no con M. tuberculosis y la cepa H37-Ra. La proporción en la producción de Il-1 inducida por M. leprae, se mantuvo de manera similar con la obtenida con las bac-

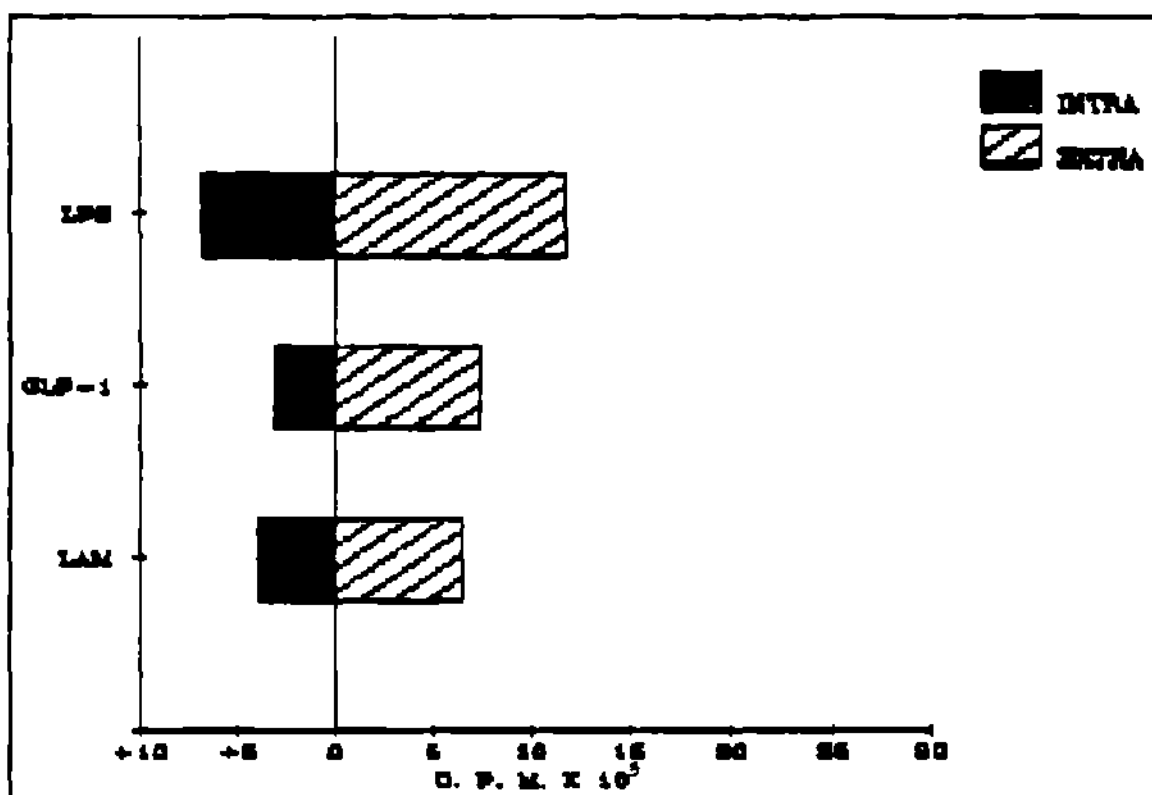
terias completas. El resultado nos demostró que el o los componentes responsables de la inducción de Il-1 por M. leprae, persistían en las fracciones bacterianas, lo cual no sucedió con M. tuberculosis virulento y la cepa H37-Ra avirulenta, y que además no era un problema de accesibilidad del componente inductor. Todo esto hacía suponer que dentro de los factores inductores de Il-1 presentes en todas las micobacterias, debería haber uno en M. leprae que estuviera relacionado con la conservación de la capacidad inductora de esta monocina y su liberación espontánea, y que por lo tanto, fuera un componente estructural diferente.

Con estos resultados se intentó determinar si el factor responsable del incremento proporcional de la producción de Il-1 era exclusivo de M. leprae o compartido con M. tuberculosis pero en proporciones diferentes. Se obtuvieron dos fracciones purificadas de micobacterias, una Lipoarabinomana (LAM) presente en M. leprae y M. tuberculosis, y un Glicolípido Fenólico I (GLP-I), componente exclusivo de M. leprae. Se comparó la capacidad inductora de Il-1 de ambas moléculas con la del Lipopolisacárido (LPS). Si el inductor de Il-1 presente en los bacilos completos de M. leprae y sus sonicados era compartido (LAM), las diferencias observadas en los experimentos anteriores podrían ser producidas por una diferencia en concentración de LAM presente en cada especie de micobacteria. Por el contrario,

si el inductor de la IL-1 espontánea era un componente exclusivo en el *M. leprae* (GLP-1), el efecto en la producción de IL-1 sólo se presentaría con esta molécula. Los resultados son presentados en las gráficas 18 y 19. Los macrófagos de pacientes lepromatosos y de sujetos sanos fueron estimulados con 10 microgramos de LPS, GLP-1 y LAM.

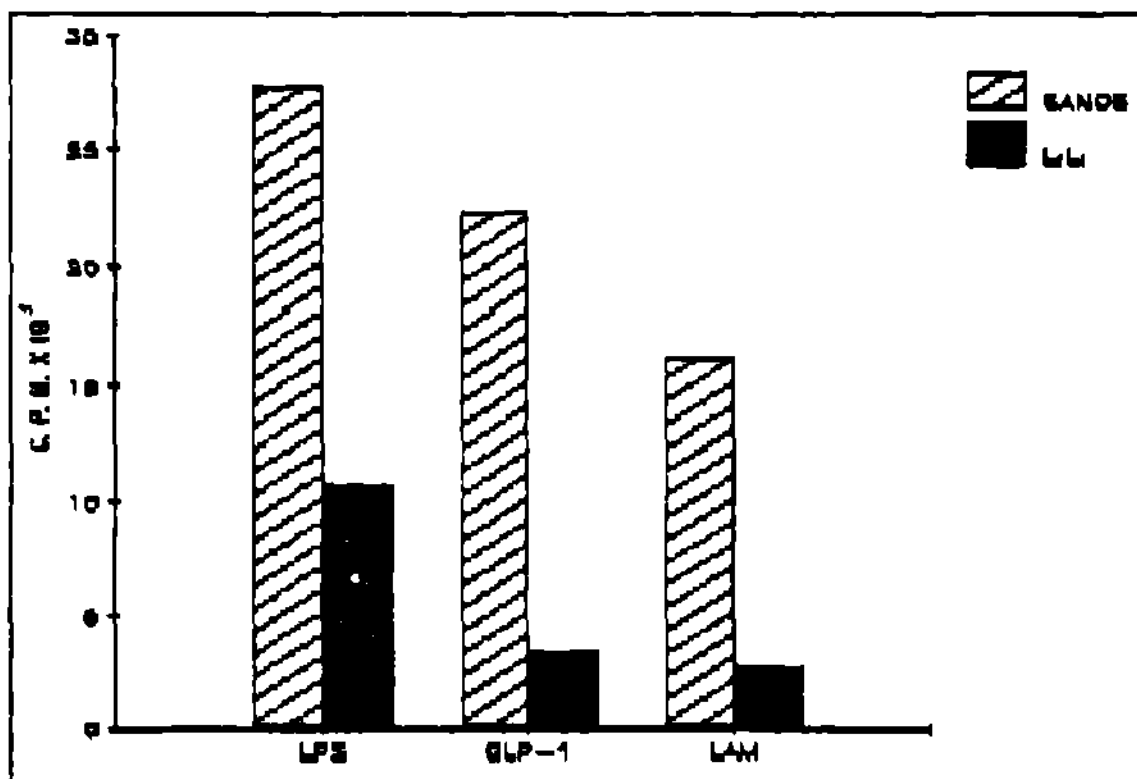


GRAFICA 18.- Concentraciones intracelulares y extracelulares de IL-1 obtenida de macrófagos de sujetos sanos estimulados con 10 μg de LPS, GLP-1 y LAM.



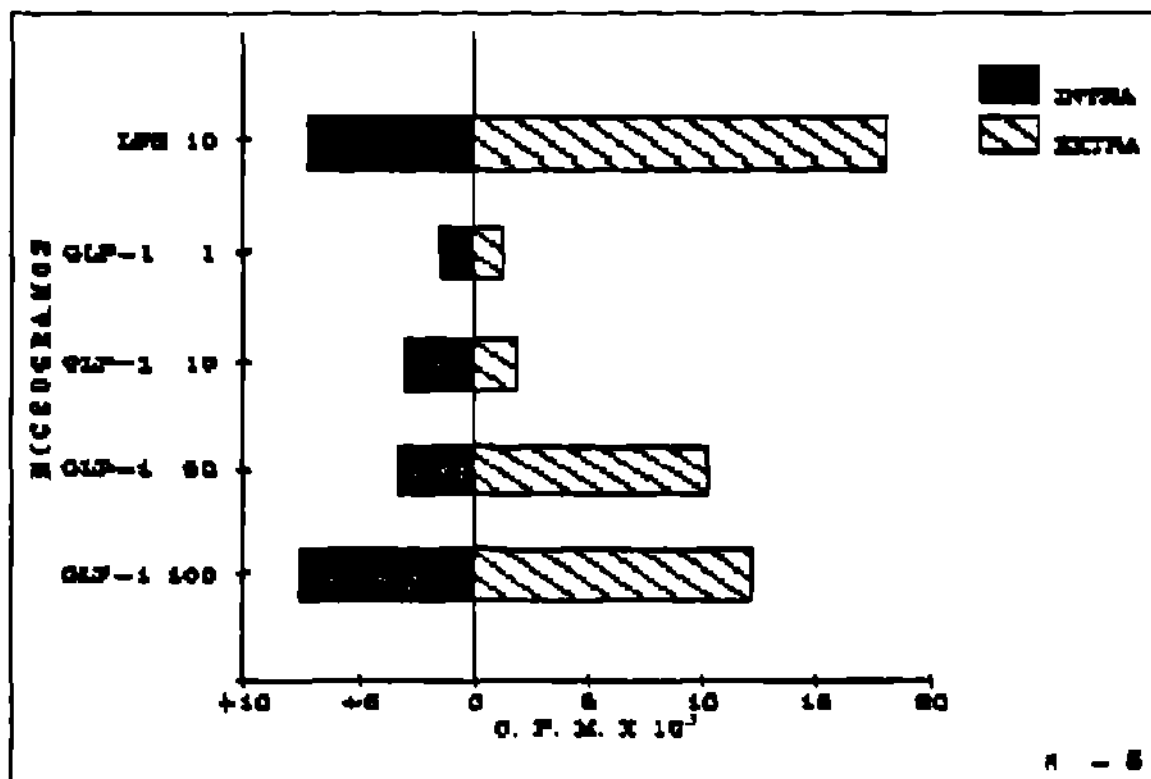
GRAFICA 19.- Concentraciones intracelulares y extracelulares de IL-1 obtenida de pacientes lepromatosos estimulados con 10 µgr de LPS, GLP-1 y LAM.

Como se puede observar, tanto LAM como GLP-1 son inductores de IL-1 a la concentración de 10 µgr., aunque con menor capacidad que LPS. En la gráfica 20 están representadas las concentraciones de las Deltas totales de IL-1 (intracelular + extracelular) en ambos grupos.

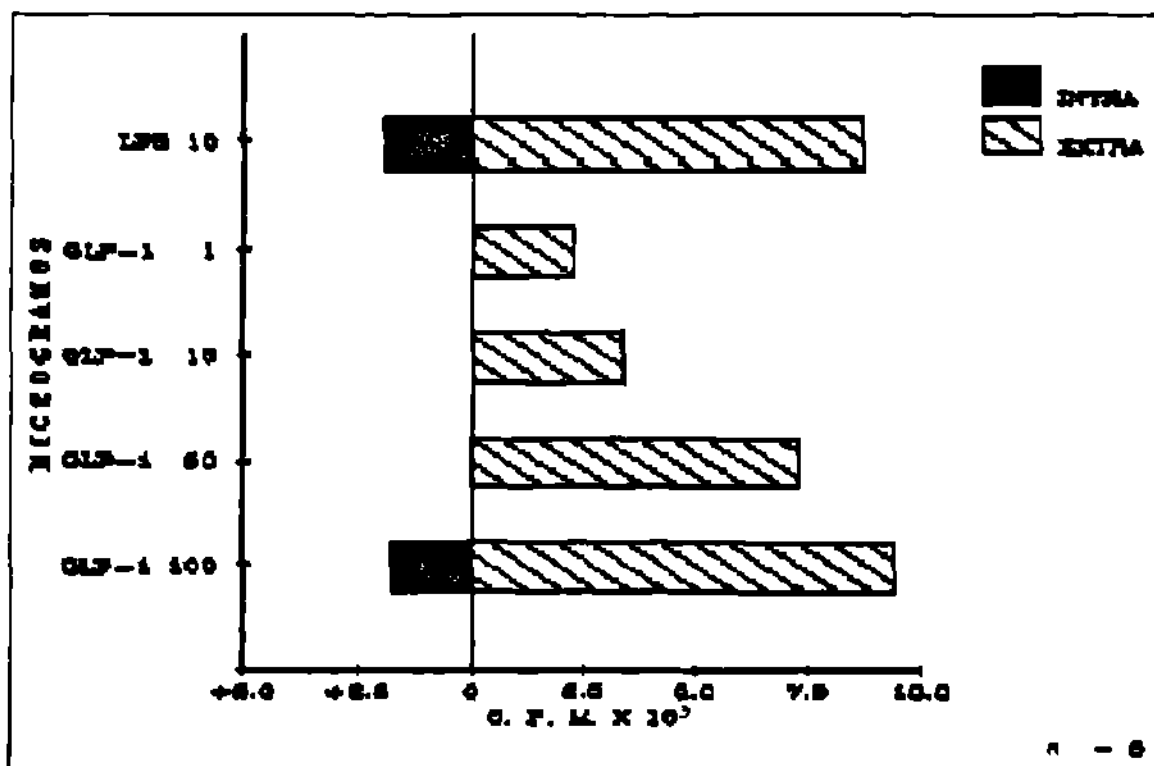


GRAFICA 20.- Comparación de Il-1 total de macrófagos de sujetos sanos y pacientes lepromatosos estimulados con 10 µgr de LPS, GLP-1 y LAM.

En base a estos resultados se llevó a cabo un experimento para determinar si el GLP-1 producía un efecto de dosis respuesta en la producción de Il-1. Los resultados se muestran en las Gráficas 21 y 22. Se obtuvieron macrófagos de 5 pacientes con lepra lepromatosa y 5 sujetos sanos los cuales se estimularon con 1, 10, 50 y 100 microgramos de GLP-1 y se comparó su actividad inductora de Il-1 con la del LPS.

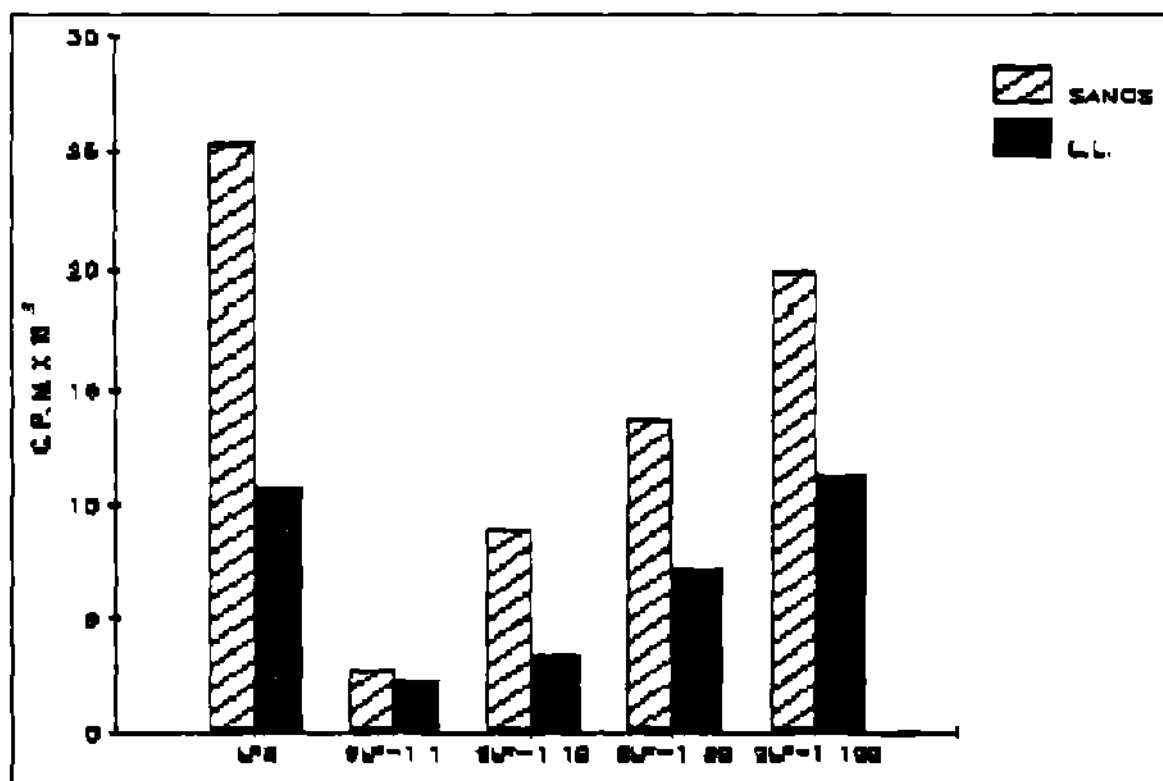


GRAFICA 21.- Producción de IL-1 intracelular y extracelular obtenida de macrófagos de sujetos sanos estimulados con 1, 10, 50 y 100 μ g de GLP-1 y LPS.



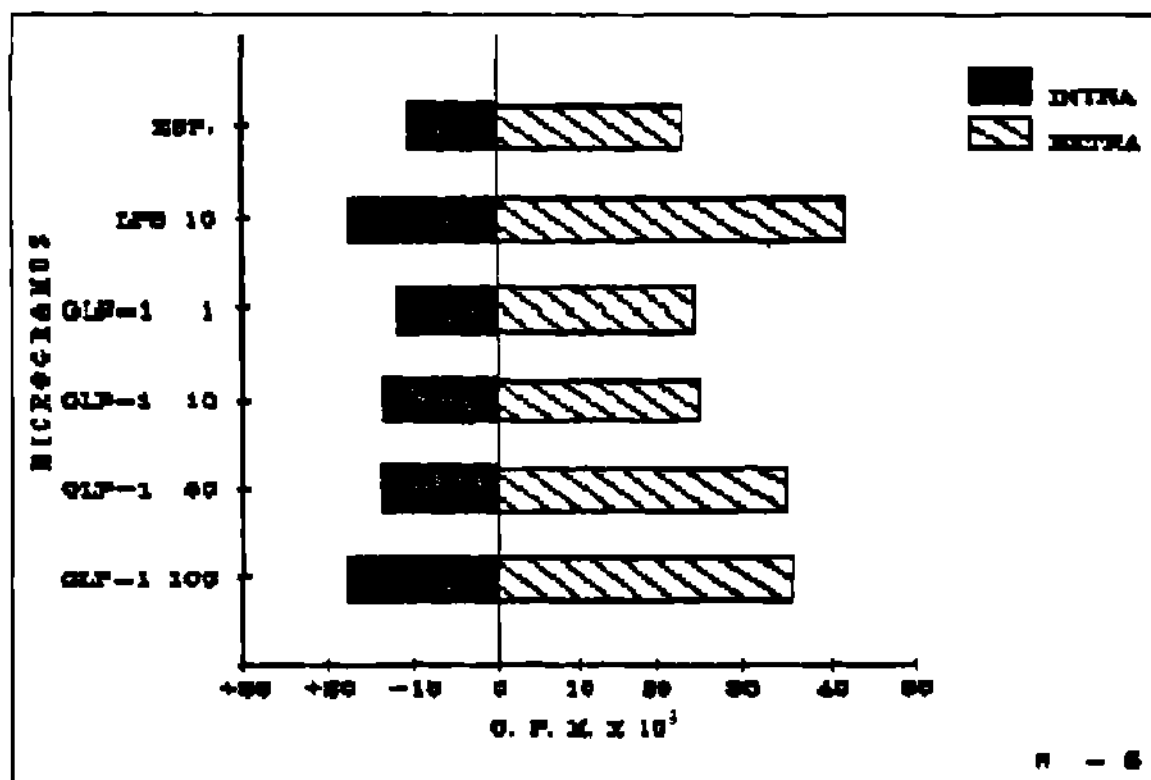
GRAFICA 22.- Producción de IL-1 intracelular y extracelular obtenida de macrófagos de pacientes lepromatosos estimulados con 1, 10, 50 y 100 μ g de GLP-1 y LPS.

Como se puede observar, tanto con las células de los sujetos sanos como con la de los pacientes, se obtuvo un efecto de dosis respuesta en la $Il-1$ extracelular, a mayor dosis de GLP-1, mayor liberación de $Il-1$. Este efecto también se observó con la $Il-1$ intracelular de los macrófagos de los sujetos sanos y no con las macrófagos de los pacientes lepromatosos. En la gráfica 23 se muestran en forma comparativa las Deltas totales de $Il-1$ en los dos grupos.

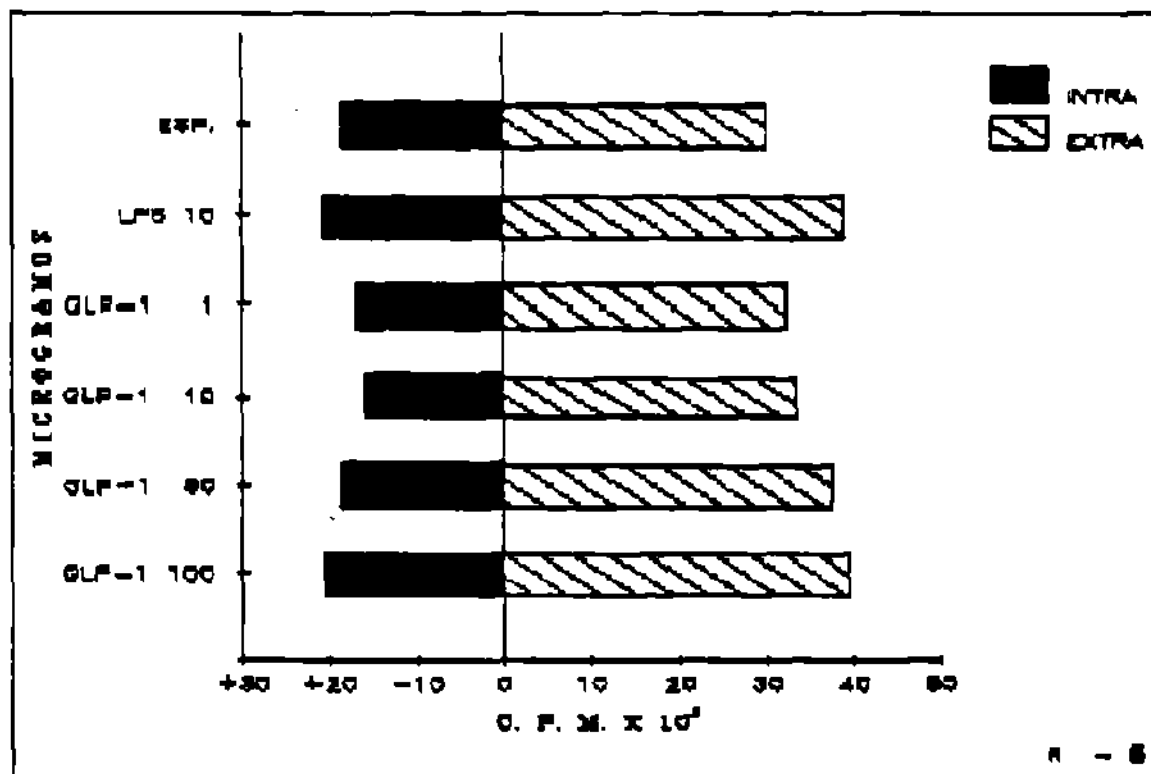


GRAFICA 23.- Comparación de la $Il-1$ total (extracelular + intracelular) obtenida de macrófagos de sujetos sanos y pacientes lepromatosos estimulados con 1, 10, 50 y 100 µg de GLP-1.

En las gráficas 24 y 25 los promedios en C.P.M. de 125 I espontánea e inducida de los macrófagos de los sujetos sanos y de los pacientes con lepra lepromatosa respectivamente.



GRAFICA 24.- Producción intracelular y extracelular de 125 I espontánea e inducida con 1, 10, 50 y 100 μ gr de GLP-1 en macrófagos de sujetos sanos.



GRAFICA 25.- Producción intracelular y extracelular de IL-1 espontánea e inducida con 1, 10, 50 y 100 μ gr de GLP-1 de macrófagos de pacientes lepromatosos.

Los resultados muestran que se produce liberación y síntesis de IL-1 con el GLP-1, tanto de los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, como de los macrófagos de sujetos sanos.

DISCUSION

La participación de los linfocitos T en la inmunopatogenia de la lepra no ha explicado satisfactoriamente la aparición de la inmunosupresión en la variedad clínica lepromatosa. Los estudios sobre la función del macrófago, han aportado evidencias sobre su importancia en la inducción y regulación de la respuesta inmune, por lo que decidimos estudiar su participación en esta enfermedad infecciosa.

Se estableció la hipótesis de que la producción (síntesis y secreción) de Interleucina 1 por los macrófagos de los pacientes lepromatosos estaba deficiente, en comparación con la Il-1 producida por los macrófagos de los pacientes tuberculoides que si desarrollan una respuesta inmune celular específica a M. leprae. Esta deficiencia provocaría que los linfocitos T, de los pacientes con lepra lepromatosa, no proliferaran, y por lo tanto no se manifestara la respuesta inmune celular. La infección persistente, la alteración de los macrófago y la ausencia de la respuesta inmune celular, serían las causas de las alteraciones tisulares locales y sistémicas en los pacientes lepromatosos.

Primero estudiamos si la producción de Il-1 de los macrófagos de los pacientes lepromatosos estimulados con

LPS era deficiente, o si era un defecto en su liberación.

Se encontró que los macrófagos de los pacientes lepromatosos estimulados con LPS, producen concentraciones iguales de Il-1 total, que los macrófagos de los sujetos sanos y de los pacientes tuberculoides, y por lo tanto no son deficientes en Il-1. Tanto en los resultados preliminares obtenidos en este laboratorio, como en los resultados reportados por Watzon y colaboradores en 1984 (52), en los cuales encontraron una deficiencia en la producción de Il-1 en el 38.5% de un total de 13 pacientes lepromatosos. A mi juicio presenta su investigación dos errores en su interpretación. Primero: miden sólo la Il-1 extracelular y no toman en cuenta la Il-1 intracelular, por lo que con este dato aislado no se puede concluir que exista una deficiente producción de esta monocina. Y segundo: no tomaron en cuenta que los macrófagos de los pacientes lepromatosos liberan más Il-1 espontánea que los macrófagos de los individuos sanos, y que por lo tanto, al ser estimulados con LPS, la cantidad de Il-1 liberada es proporcionalmente menor que la liberada por una célula sana que no está "agotada". En los experimentos se midieron ambas Il-1, y no se encontró ningún defecto en la síntesis o en la transportación al compartimiento extracelular (secreción). Al contrario, observamos niveles más altos de Il-1 espontánea con los macrófagos de los pacientes lepromatosos que con los de los

sujetos sanos y pacientes tuberculoides (gráfica 4), por lo que al graficar los datos en Diferencias (Deltas) de las CPM obtenidas de la $11-1$ inducida con LPS menos la $11-1$ espontánea, es lógico que los valores de los resultados de los pacientes fueran menores que la de los sujetos sanos, como se observaron en las gráficas 1, 2, y 3. Esto es lo que han reportado Watson en lepra (52), Tsang en Sida (54), Chensue en tuberculosis (55) y Alcocer en la esclerodermia (56). Pero esta deficiencia es sólo aparente, ya que al graficar por separado la $11-1$ Total espontánea y la $11-1$ Total inducida con LPS (intracelular + extracelular) se observó que no había deficiencia en la producción ni en la liberación de $11-1$. Se postula que lo que ocurre es, que los monocitos de los pacientes lepromatosos son activados por la infección del M. leprae, y que la presencia del bacilo o sus productos, inducen la liberación continua y en forma aparentemente espontánea de $11-1$, lo que agota la concentración intracelular (gráfica 3) de reserva de $11-1$ del macrófago, por lo que al ser reestimulado in vitro con LPS no se obtiene la misma concentración extracelular de esta monocina como sucedió con los macrófagos de los sujetos sanos. La cantidad intermedia de $11-1$ observada con los macrófagos de los pacientes tuberculoides, probablemente se debe a que ellos están infectados con diferentes números de bacilos y por lo tanto diferentes grados de activación de sus macrófagos. Esta liberación espontánea de $11-1$ ya había

sido observada en otros procesos infecciosos (57), en enfermedades inflamatorias crónicas como en la sarcoidosis pulmonar (58) y en pacientes traumatizados (59).

De acuerdo a la hipótesis planteada, en la cual se propuso que el defecto en la producción de Il-1 por los macrófagos de los pacientes lepromatosos, contribuye a la inmunopatogenia de la enfermedad, con los resultados obtenidos, fué rechazada. Sin embargo, los siguientes objetivos originalmente planteados, nos ayudaron a encontrar una explicación de la liberación aparentemente espontánea y aumentada de Il-1 por los macrófagos de los pacientes infectados con M. leprae.

Después del resultado inicial no esperado, estudiamos si la infección por el M. leprae era la responsable del efecto o si era una condición innata del huésped. Para contestar esta pregunta se midió la producción de Il-1 con otras micobacterias y con los macrófagos de los tres grupos en estudio. Los resultados mostrados en las gráficas de la 5 a la 13 revelaron que las tres cepas de micobacterias, fueron inductoras de Il-1, tanto con los macrófagos de los pacientes como con los de los sujetos sanos, presentando cada una de ellas, diferentes dosis óptimas de estimulación. Sin embargo, sólo M. leprae produjo el efecto de dosis respuesta.

¿ Cual es su significado e importancia ?

Primero: la presencia de la micobacteria es capaz de inducir la producción de Il-1 en los macrófagos, pero sólo M. leprae mostró que al incrementar el número de bacilos por macrófago se producen mayor secreción de Il-1. Esto podría explicar porqué sucede en los pacientes lepromatosos que son mas bacilíferos que en los pacientes tuberculoides.

Segundo : Los componentes inductores de Il-1 presentes en las micobacterias, determinan que existan diferencias en las dosis estimulantes óptimas que inducen la producción y liberación maxima de Il-1. Al parecer M. leprae, es aparentemente el peor inductor de Il-1, porque es el que produce los niveles mas bajos, aún a 100 bacterias por macrófago, comparándolo con M. tuberculosis. Sin embargo fué el único que presentó linearidad en el efecto de dosis respuesta.

Al sonicar las bacterias para estudiar si aún con el bacilo fraccionado se obtenía la misma respuesta, vimos que se conservó con M. leprae y no con las otras dos micobacterias. Esto reforzó nuestras conclusiones de que los macrófagos de los pacientes lepromatosos y quizá algunos tuberculoides (dependiendo del estadio bacilífero en que se encuentren), aunque estén degradando a la bacteria, continúan liberando Il-1. Este efecto ya no lo conservan las otras dos cepas de M. tuberculosis, las cuales una vez fraccionadas disminuyeron su capacidad inductora de Il-1 en los macrófagos.

Al intentar contestar cuál o cuales serían los componentes del M. leprae involucrados en el efecto de dosis respuesta seleccionamos a la Lipoarabinomannana (LAM) que es compartida con M. tuberculosis y al Glicolípido fenólico 1 (GLP-1), exclusivo de M. leprae. La selección fue hecha en base a la semejanza estructural que guardan con la molécula del LPS, y si ésta, es el inductor prototipo para el estudio de la producción de II-1, el razonamiento lógico fue, que las fracciones involucradas en este efecto, fueran parecidas estructuralmente, como se puede observar en el esquema siguiente.

ESTRUCTURA BIOQUIMICA

LPS

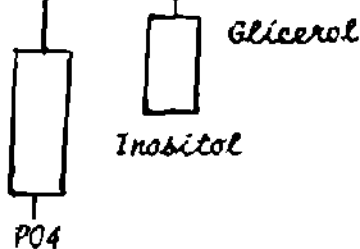
(Heptosa) (Heptosa) (Acido Octulosónico) - (B-hidroximirístico).

GLP-1

(3,6'OMe-Gluc) (OMe-Rham) (OMe-Rham) (Gpo. Fenol) - (Ptiocerol).

ACIDOS MICOSERICOS
LAM

(6'OMe-Mannosa) (Mannosa) (Arabinosa) -- (Octadecanoato).



Nótese el parecido de la estructura lipídica central a la que se unen diferentes carbohidratos terminales tales como O-metil-Glucosas en GLP-1 y O-Metil-Manosa en LAM. Otra razón por la cual se seleccionó al GLP-1, es porque Bloom (42), Modlin (60) y Hunter (61), publicaron que esta molécula estaba relacionada con la activación de los linfocitos T supresores, en los pacientes lepromatosos. También al ser exclusiva del M. leprae se está utilizando como antígeno en las pruebas serológicas para el diagnóstico de lepra, ya que los anticuerpos contra GLP-1, no se encuentran en sujetos sanos ni pacientes con otras micobacteriosis (62 y 63). Encontramos que a la dosis de 10µg , tanto LAM como GLP-1 estimulan a los macrófagos a producir Il-1, siendo mejor inductor el GLP-1. Por lo tanto demostramos que estas fracciones purificadas de M. tuberculosis y M. leprae, son inductoras de Il-1. Finalmente, al probar diferentes dosis de GLP-1, que en teoría representarían las concentraciones intracelulares relacionadas con el incremento del número de bacilos infectantes, logramos demostrar que esta molécula es una fracción responsable en M. leprae, que induce la producción de Il-1 espontánea y le confiere al bacilo la característica de la relación dosis-respuesta. Así, cuando el M. leprae y parasita a los macrófagos, los bacilos completos, sus fragmentos y/o la fracción soluble glicolípida-fenólica, los mantienen activados y liberando

II-1, tanto a los macrófagos parasitados como a los monocitos en circulación.

La búsqueda de plásmidos en M. leprae como posibles responsables del comportamiento del macrófago en cuanto a la producción de II-1, no resultó positiva, ya que no se logró demostrar su presencia. Con ello no podemos concluir que no existan. Se postula ésto porque con las técnicas utilizadas y modificadas para tal efecto, se pudieron evidenciar plásmidos en M. tuberculosis. El razonamiento que nos condujo a pensar en la existencia de este factor extracromosómico fué que, tal vez las diferencias en el comportamiento del sistema inmune del huésped a la infección, entre los pacientes con lepra tuberculoide y lepra lepromatosa, se debieran a diferencias genéticas en los bacilos, que les permitieran su persistencia intracelular y por consiguiente la alteración de los macrófagos. Es probable que las dificultades técnicas y del padecimiento en sí, no proporcionen las condiciones adecuadas para su demostración, porque se requiere de una buena cantidad de bacilos vivos y en fase de crecimiento logarítmico. Esta situación por el momento no es posible, ya que no existe forma de cultivarlo in vitro. Sólo el M. leprae cultivado en armadillo pudiera tener las características de crecimiento. Por otro lado, los pacientes con lepra tuberculoide son poco bacilíferos, por lo que no se podría obtener el número de bacilos suficientes para comparar los resultados.

Con esta información demostramos que:

- 1.- La liberación de $II-1$ estimulada con LPS (estímulo máximo) en los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa está disminuida, pero no es estadísticamente significativa.
- 2.- La liberación espontánea de $II-1$ por los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa es mayor que la producida por las células de los sujetos sanos.
- 3.- Esta liberación espontánea de $II-1$ por los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, parece estar relacionada con el grado de infección por el *M. leprae*.
- 4.- Existe una relación muy directa entre el número de bacilos de *M. leprae* y la producción de $II-1$, efecto no observado con las otras Micobacterias.
- 5.- Esta liberación continua de $II-1$ por el *M. leprae* parece estar más relacionada con la presencia del Glicolípido-fenólico I (GLP-1), componente exclusivo de la bacteria, que con Lipoarabinomanana (LAM), componente compartido con otras Micobacterias.
- 6.- La producción de $II-1$, tanto de los macrófagos de los pacientes lepromatosos como de los sujetos sanos, es directamente proporcional a la concentración del Glicolípido fenólico I (GLP-1).

Con la demostración del incremento en la liberación espontánea de Il-1 por macrófagos de pacientes con lepra lepromatosa, nos planteamos la pregunta de cuál o cuales serían las consecuencias de su liberación. Sabemos que su primera función conocida dentro del sistema inmune, fué la de su capacidad de potenciar la proliferación celular de los linfocitos T estimulados con mitógenos (16). Sin embargo, sus efectos biológicos sobre otras células del organismo nos proponen posibles explicaciones a las alteraciones patológicas de esta enfermedad. Por ejemplo:

- 1.- Los pacientes con lepra lepromatosa reactiva tienen fiebre. Se ha demostrado que la Il-1 es el pirógeno endógeno que estimula el centro termorregulador del hipotálamo. (32)
- 2.- Los pacientes con lepra lepromatosa tienen hiper-gamaglobulinemia. La Il-1 estimula la activación policlonal de los linfocitos B y por ende la producción de niveles elevados de anticuerpos IgG en el suero (25).
- 3.- Los pacientes con lepra lepromatosa reactiva presentan vasculitis por complejos inmunes, que al ser fagocitados por los macrófagos no parasitados liberan más Il-1. Esto es lo que se conoce como fenómeno de Lucio (64).

- 4.- Los pacientes con lepra lepromatosa reactiva presentan un estado de hipermetabolismo. Tanto la Il-1 como los macrófagos activados incrementan la producción de Caquetina - factor de necrosis tumoral (TNF). Los pacientes presentan anorexia y pérdida de peso (29).
- 5.- Las lesiones de los pacientes lepromatosos presentan degradación de la matriz intercelular y acúmulo de fibroblastos. La Il-1 activa a células del tejido conectivo, a células endoteliales y fibroblastos (26,30,32).
- 6.- Las lesiones nodulares de los pacientes lepromatosos presentan macrófagos repletos de bacilos y rodeados de fibroblastos. La Il-1 activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágena (31).
- 7.- Los pacientes con lepra lepromatosa reactiva presentan en su suero proteínas reactantes de fase aguda. La Il-1 incrementa la síntesis de estas proteínas por activación de los hepatocitos (27).
- 8.- Los pacientes con lepra lepromatosa reactiva presentan cefaleas, dolores musculares y artralgias. La Il-1 activa la liberación de prostaglandinas que incrementan la inflamación y tienen efecto antiproliferativo para linfocitos (28,64)

Todo esto apoya la proposición planteada, de que la INTERLEUCINA-1, en parte es responsable de las alteraciones y daño tisular en lepra lepromatosa y por lo tanto explica parte de la INMUNOPATOGENIA. Por otro lado, los datos presentados en esta tesis, demuestran que no existe deficiencia en la producción de II-1 y aclara que la supuesta disminución de II-1 encontrada por otros autores, es sólo aparente.

¿Por qué si hay II-1, macrófagos y antígenos no se despierta la respuesta inmune celular específica? Es probable que la II-1 extracelular intervenga principalmente en las otras funciones biológicas que son relevantes para los procesos de inflamación y cicatrización. Se ha planteado recientemente que la II-1 de membrana es la más importante para la activación de los linfocitos T, así como su localización y distribución intracelular dentro de monocitos y macrófagos (65,66). Esto nos abre otro camino para buscar si existe un defecto en la producción de II-1 de membrana como posible explicación de la ausencia de la respuesta inmune celular o un defecto en la producción del receptor de II-1 (67,68).

Como se sabe, la función de presentación del antígeno es una función relacionada al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), así como también la regulación genética

para la resistencia a patógenos intracelulares (69). Van Eden (70,71), reporta que hay cierta correlación entre el HLA-DR3 y el desarrollo de lepra tuberculoide y HLA-MT1 y lepra lepromatosa. Sin embargo, la relación entre las moléculas de la clase II del CMH y la respuesta inmune no ha sido comprobada ni a través del DR3, aunque se ha postulado la existencia de un determinante en la molécula de la clase II restringido a la supresión específica para M. leprae (Genes Is) (72,73).

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que las aportaciones nuevas en el estudio de la participación del macrófago en la enfermedad lepromatosa, son las siguientes:

- 1.- No existe una deficiencia en la producción (síntesis y liberación) de IL-1 en los pacientes lepromatosos.
- 2.- Los macrófagos de los pacientes con lepra lepromatosa, liberan espontáneamente más IL-1 que los pacientes con lepra tuberculoide.
- 3.- La producción de IL-1 está relacionada directamente con el número de bacilos infectantes de M. leprae.
- 4.- Los compuestos Lipoarabinomananas (LAM) y Glicolípidos fenólicos (GLP-1), componentes estructurales de las micobacterias, son inductores de la producción de IL-1.
- 5.- La producción proporcional de IL-1 está más relacionada con el Glicolípido fenólico I, componente

exclusivo de M. leprae que con Lipoarabinomanas, componente compartido entre las Micobacterias.

- 6.- El conocimiento actual sobre los efectos biológicos de la Il-1 nos ayudan a explicar parte de la inmunopatogenia de la enfermedad.

Con estos resultados surgen nuevas interrogantes que deberán ser estudiadas en este campo :

- 1.- ¿La Il-1 liberada espontáneamente podrá ser detectada en el suero de los pacientes leptomatosos?
- 2.- ¿La presencia de Il-1 espontánea podrá utilizarse como un indicador de la enfermedad infecciosa activa?
- 3.- ¿Las diversas manifestaciones biológicas de la Il-1 dependen de rangos diferentes de afinidad entre los receptores de Il-1 en las células blanco el tipo de Il-1 (alfa y beta) y/o la concentración liberada ?
- 4.- ¿Existe también la liberación de otros factores derivados de los macrófagos activados con función supresora específica ?

- 5.- ¿Es la inmunosupresión desarrollada en éstos pacientes es un defecto de la presentación de antígenos específicos del M. leprae por los macrófagos?.

- 6.- ¿Existe realmente una disfunción del macrófago en la lepra lepromatosa o es un problema de super-activación y deterioro metabólico?

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Suter E. and Ramseler, H.- 1964.- Cellular reactions in infections. Adv. Immunol. 4 : 117-173.
- 2.- Mackaness, G.B.- 1962.- Cellular resistance to infections. J. Exp. Med. 116: 381-405.
- 3.- Dannenberg, A.; Ando, M. and Shima, K.- 1972.- Macrophage accumulation, division, maturation and digestive and microbicidal capacities in tuberculous lesions. J. Immunol. 109 (5): 1109-1121.
- 4.- Hibbs, J.B. - 1973.- Macrophage nonimmunologic recognition: Target related to contact inhibition. Science 5 : 868-870.
- 5.- Mackaness, M.B.- 1969.- The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. J. Exp. Med. 129 : 973-992.
- 6.- Fowles, R.E. ; Fajardo, I. ; Leibowitch, J.L. and David, J.R.- 1973.- The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes. J. Exp. Med. 138 : 952-964.

- 7.- Nathan, C.F. ; Emold. H.G. and David, J.R.- 1973.- Characteritaton of lymphocyte factor which alteres macrophage functions. J. Exp. Med. 137 : 245-289.
- 8.- Pearson, M. and Raffel, S.D.- 1971.- Macrophage digested antigen as inducer of delayed hipersensitivity. J. Exp. Med. 133 : 494-504.
- 9.- Hammond, M. E. and Dvorak, H.- 1972.- Antigen induced stimulation of glucosamine incorporation by guinea pig peritoneal macrophage in delayed hipersensitivity. J. Exp. Med. 136 : 1518-1532.
- 10.- Wahl, S.M.; Wilton, J.M.; Rosenstreich, D.L. and Oppenheim, J.J.- 1975.- The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lymphocytes. J. Immunol. 114 (4) : 1296-1301.
- 11.- Alexander, J. and Smith, C.C.- 1978.- Growth of Mycobacterium lepraemurium in nonstimulated and stimulated mouse peritoneal derivaded and bone marrow derivaded macrophages in vitro. Infect. Immun. 22 (3): 631-636.
- 12.- Fortier, A.H.; Hoover, D.L. and Nacy, C.- 1982.- Intracellular replication of Leishmania tropica in mouse peritoneal macrophages : anastigote infection of

resident cells and inflammatory macrophages. *Infect. Immun.* 38 (3) : 1304-1308.

- 13.- Friedman, A.; Stavitsky, A. and Solomon, J.- 1965.- Induction in vitro of antibodies to phage T2 : Antigens in the RNA extract employed. *Science* 149 : 1106-1107.
- 14.- Adler, F.L.; Fishman, M. and Dray, S.- 1966.- Antibody formation initiated in vitro. *J. Immunol.* 97 (4):554-558.
- 15.- Mosier, D. E.- 1967.- A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 158 : 1573-1576.
- 16.- Gery, I.; Gershon R. and Waskman, B.-1972.- Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J. Exp. Med.* 136 : 143-155.
- 17.- Unanue, E. R. and Kiely, J. M.- 1977.- Synthesis and secretion of a mitogenic protein by macrophages : Description of superinduction phenomenon. *J. Immunol.* 119 (3) : 925-931.

- 18.- Blyden, G. and Handschumacher, R. E.- 1977.- Purification and properties of human lymphocyte activating factor (LAF). *J. Immunol.* 115 (5) : 1631-1638.
- 19.- Oppenheim, J.J.; Mizel, S.B. and Meltzer, M.S.-1979.- IV. Lymphocyte activating factor (LAF). A.-Production of LAF.- *Biology of the lymphokines*. Ed. S. Cohen, E. Pick and S.S. Oppenheim. Acad. Press, Inc. New York.
- 20.- Diamantstein, T.; Handschumacher, R.; Oppenheim, J.; Unanue, E.; Waksman, B. and Wood, D.-1979.- Letter to the editor. Nonspecific "Lymphocyte Activating" factors produced by macrophages. *J. Immunol.* 122 (6):2633.
- 21.- Lachman, L.B. and Metzgar R.S.- 1980.- Characterization of high and low molecular weight lymphocyte activating factor (Interleukin 1) from P388D and J774.1 mouse macrophage cell lines. *J. Reticuloend. Soc.* 27 (6): 621-629.
- 22.- Bayne, E. K.; et al.- 1986.- Immunocytochemical detection of Interleukin 1 within stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 163 : 1267-1280.

- 23.- Gery I.- 1982.- Production and assay of Interleukin-1 (II-1). Isolation, characterization and utilization of T lymphocytes clones. Acad. Press, Inc. New York.
- 24.- Smith, K. Lachman, L. Oppenheim, J. and Favata, M.- 1980.- The functional relationship of the interleukins. J. Exp. Med. 151 : 1551-1556.
- 25.- Lypsky, P.; Thompson, P.; Rosenwasser, L. and Dinarello, C.- 1983.- The role of interleukin 1 in human B cell activation: Inhibition of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leukocytic pyrogen. J. Immunol. 130 (6): 2708-2714.
- 26.- Matsushima, K.; Bano, M. Kidwell, W. and Oppenheim, J.- 1985.- Interleukin 1 increases collagen type IV production by murine mammary epithelial cell. J. Immunol. 134 (2): 904-909.
- 27.- Dinarello C.; Mc Adam, K. and Rosenwasser, L.- 1981.- Acute phase protein inducing the lymphocyte activating properties of human leukocytic pyrogen. Clin. Res. 29: 484..

- 28.- Gery, I. and Lepe-Zuñiga, J.- 1984.- Interleukin 1: Uniqueness of its production and spectrum of activities. Lymphokines Vol.9 Edit. Acad. Press, Inc.p 109.
- 29.- Cerami, A. and Beutler, B.- 1988.- The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. Immunol. Today 9 (1): 28-31.
- 30.- Mizel S.; Dayer, J. Krane, S. and Mergenhagen, S.- 1981.- Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor (Interleukin 1). Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 2474-2480.
- 31.- Wahl, S.; Wahl, L. and Mc Carthy, J.- 1978 - Monocyte mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. J. Immunol. 121 : 942-949.
- 32.- Dinarello, C.- 1984 - Interleukin 1. Rev. Infec. Dis. 6 (1): 51-95.
- 33.- Dower, S. and Urdal D.- 1987.- The interleukin 1 receptor. Immunol. Today 8 (2) : 46-51.
- 34.- Kurt-Jones,; E. Beller, D.; Mizel, B. and Unanue,R.- 1985.- Identification of a membrane-associated inter-

- leukin 1 in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 1204-1208.
- 35.- Weaver, C. and Unanue, E.- 1986.- T cell induction of membrane Il-1 on macrophages. J. Immunol. 137 (12): 3868-3873.
- 36.- Gery, I. and Waksman B.- 1972.- Potentiati^on of the T lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediators. J. Exp. Med. 136 : 143-156.
- 37.- Cameron, P. et al .-1986.- Amino acid sequence analysis of human interleukin 1 (Il-1): evidence for biochemically distinct forms of Il-1. J. Exp. Med. 169:790
- 38.- Reich, C.- 1987.- Leprosy: Cause, transmission and a new theory of pathogenesis. Rev. Infec. Dis. 9 (3):590-594.
- 39.- Ridley, D. and Jopling, W.- 1966.- Classification of leprosy according to immunity. A five-grup system. Int. J. Lepr. 34 : 255-273.
- 40.- Davis, B. et al .- 1978.- Tratado de Microbiologia. 2a Ed. Salvat Editores, México. 1559 pag.

- 41.- Hunter, S.; Fugiwara, T. and Brennan, P.- 1982.- Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of Mycobacterium leprae. J. Biol. Chem. 257 : 15072.
- 42.- Bloom, B.- 1986.- Learning from leprosy: A perspective on the third world. J. Immunol. 137 (1): 1-X.
- 43.- Mehra, V.; Brennan, P.; Convit, J. and Bloom, B.- 1984.- Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique M. leprae glycolipid. Nature 308 : 194-201.
- 44.- Van Voorhis, W. et al .-1982.- The cutaneous infiltrates of leprosy. Cellular characteristic and the predominant T cell phenotypes. N. Engl. J. Med. 307 : 1593-1599.
- 45.- Haregewoin, A. et al .- 1983.- T-cell conditioned media reverse T-cell unresponsiveness in lepromatous leprosy. Nature 303 : 342-344.
- 46.- Modlin, R. et al .- 1984.- In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. J. Immunol. 132 (6) : 3885-3890.

- 47.- Longley, J. et al .- 1985 .- In vivo responses to Mycobacterium leprae: Antigen presentation, Interleukin 2 production, and Immune cells phenotypes in naturally occurring leprosy lesions. Int. J. Lepr. 53 (3) :385-394.
- 48.- Kaplan, G. et al .- 1985.- An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. J. Exp. Med. 162 : 917-929.
- 49.- Stobo, J.- 1977.- Immunosuppression in man: Suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells. J. Immunol. 119 (3) : 918-924.
- 50.- Bullock, W.; Carlson, E. and Gershon, R.- 1978.- The evolution of immunosuppressive cell population in experimental mycobacterial infection. J. Immunol. 120 (5) : 1709-1716.
- 51.- Salgame, P.; Mahadevan, P. and Antia, N.- 1983.- Mechanism of immunosuppression in leprosy: Presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. Infect. Immun. 40 (3) : 1119-1126.

- 52.- Watson, S. et al.- 1984.- Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients. *Infect. Immun.* 45 (3) : 787-789.
- 53.- Horwitz, M.; Levis, W. and Cohn, Z.- 1984.- Defective production of monocyte activating cytokines in lepromatous leprosy. *J. Exp. Med.* 159 : 666-678.
- 54.- Tsang, K.; Donnelly, R.; Galbraith, M. and Fudenberg, H.-1986.- Isoprinosine effects on Interleukin-1 production in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Int. J. Immunopharmac.* 8 (4) : 437-441.
- 55.- Chensue, S.; Davey, M.; Renick, D. and Kunkel, S.- 1986.- Release of Interleukin-1 by peripheral blood mononuclear cells in patients with tuberculosis and active inflammation. *Infect. Immun.* 52 (1) : 341-343.
- 56.- Alcocer, V. J.; Martinez, C. E. and Alarcon, S.D.-1985- Spontaneous production of, and defective response to interleukin by peripheral blood mononuclear cells from patients with scleroderma. *Clin. Exp. Immunol.* 59 : 666-672.

- 57.- Roberts, N.; Prill, A. and Mann, T.- 1986.- Interleukin-1 and Interleukin-1 inhibitor production by human macrophages exposed to Influenza virus or respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 163 : 511-519.
- 58.- Hunninghake, C.W.- 1984.- Release of Interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129 : 569-572.
- 59.- Rodrik, M. et al. - 1986.- Mechanisms of immunosuppression associated with severe nonthermal traumatic injuries in man : Production of interleukin-1 and 2. *J. Clin. Immunol.* 6 (4) :310-318.
- 60.- Modlin, R. et al.- 1986.- Genetically restricted suppressor T cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. (Letter) *Nature* 322 :459-460.
- 61.- Hunter, Sh.; Gaylord, H. and Brennan, P.- 1986.- Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.* 261 (26) : 12345-12351.
- 62.- Young, D. and Buchanan, T.- 1983.- A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *M. leprae*. *Science* 221 :1057-1059.

- 63.- Truman, Richard ; Melvyn J. Morales, Edwards J. Shannon, and Robert C. Hastings.- Evaluation of monitoring antibodies to PGL-1 in armadillos experimentally infected with M. leprae. Int. J. Lepr. 54 (4):556-559.
- 64.- Alan A. Aderem, William A. Scott, and Zanvil A. Cohn.- 1986.- Evidence for sequential signals in the induction of the arachidonic acid cascade in macrophages. J. Exp. Med. 163 : 139-154.
- 65.- Conlon, Paul et al .-1987.- Localization of Human mononuclear cell interleukin 1. J. Immunol. 139 (1) 98-102.
- 66.- Mizel, Steven.- 1987.- Interleukin 1 and T-cell activation. Immunol. Today, 8 : 330-332.
- 67.- Dover, Steven and David L. Urdal.- The interleukin-1 receptor.- 1987.- Immunol. Today 8 (2) : 46-49.
- 68.- Shirakawa, Fumihiko; Yoshia Tanaka, Toshiyuki Ota, Hidero Suzuki, Sumiya Eto and Uki Yamashita.- 1987. Expression of interleukin 1 receptors on human peripheral T cell. J. Immunol. 138 (12) : 4243-4248.

- 69.- Skamene, Emil; Philippe, Gros; Forget, Adrien; Kongshavn, P.; Carole St Charles and Taylor, B.- 1982.- Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 297 :506-509.
- 70.- Willem van Eden, González, Nieves; De Vries, R.; Convit and Van Rood J.- 1985.- HLA-linked Control of Predisposition to Lepromatous Leprosy. *J. Infect. Disc.* 151 (1) : 9-14.
- 71.- Marilyn S. Pollack and Robert R. Rich.- 1985.- The HLA complex and the pathogenesis of infectious diseases. *J. Infect. Disc.* 151 (1) : 1-8.
- 72.- De Vries, R.; Van Eden, W.; Ottenhoff, T.- 1985.- HLA Class-II immune response genes and products in leprosy. *Prog. Allergy* 36 :95-113.
- 73.- Ottenhoff, Tom ; Neuteboom, Saskia ; Elferink, Dienne and De Vries, Rene.- 1986.- Molecular localization and polymorphism of HLA Class II restriction determinants defined by Mycobacterium leprae-reactive helper T cell clones from leprosy patients. *J. Exp. Med.* 164 : 1923-1939.

CURRICULUM VITAE

NOMBRE : Alma Yolanda Arce Mendoza

FECHA DE NACIMIENTO: Enero 2 de 1946

LUGAR DE NACIMIENTO: México, D.F.

NOMBRE DEL PADRE: Jesús Arce Moctezuma.

NOMBRE DE LA MADRE: Ma. del Consuelo Mendoza Mendoza.

DOMICILIO ACTUAL: Calle de la Montaña # 107 Col. Cumbres
2o. Sector Monterrey, N.L., México. Teléfono 70 26 77

ESTUDIOS ESCOLARES :

1.- Primaria : " Club de Leones No. 10 ".

Cd. de México D.F. 1953-1959

2.- Secundaria : Secundaria # 5 Prof. Macario Pérez Cázares

1959-1962. Monterrey N.L.

3.- Preparatoria : Preparatoria # 2 U.A.N.L. 1962-1964.

Monterrey N.L.

4.- Profesional :

.- Laboratorista Clínico Biólogo, Facultad de Medicina
U.A.N.L. Monterrey, N.L. 1964-1967.

Examen profesional.- 16 de Mayo de 1968

.- Químico Clínico Biólogo, Facultad de Medicina
U.A.N.L. (Materias Complementarias) 1962-1963.

Examen profesional.- 22 de Marzo de 1983.

GRADOS ACADÉMICOS :

Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica. División de Estudios de Postgrado, Facultad de Medicina U.A.N.L.

Tesis recepcional : Efecto de las tetraciclinas sobre la quimiotaxis leucocitaria de células de individuos sanos y de pacientes con Acné vulgaris.

BECAS OTORGADAS :

Beca otorgada por la Universidad Autónoma de Nuevo León para el Goethe Institute en la República Federal de Alemania.

Beca de Conacyt No. 48041 para estudios de Doctorado en Ciencias.

PRACTICA PROFESIONAL :

a) Laboratorio de diagnóstico de la función inmunológica, Facultad de Medicina, Depto. de Microbiología, U.A.N.L. de 1974-1980.

b) Perito honorario de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Nuevo León, Dirección de Servicios Periciales. 1978-1981.

PRACTICA PROFESIONAL DOCENTE :

- a) Profesor de Microbiología e Inmunología del Depto. de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., Septiembre de 1968 a Enero de 1987.
- b) Profesor del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina U.A.N.L. de Enero 1987 a la fecha.
- c) Profesor titular del Curso de Inmunología Avanzada en Estudios de Post-grado, Facultad de Medicina U.A.N.L. de 1976 a la fecha.
- d) Profesor invitado en los cursos de Inmunología Clínica para médicos residentes del Hospital Universitario " Dr. José Eleuterio González." de 1984 a la fecha.
- e) Profesor de Inmunología Veterinaria en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.N.L., de Octubre de 1976 a Agosto de 1982.
- f) Profesor de Inmunología Oral en la Div. de Estudios Avanzados. Facultad de Odontología, U.A.N.L., de enero de 1980 a la fecha.

TRABAJOS DE INVESTIGACION PUBLICADOS :

Arce, M.A.Y.- 1986.- Efecto de diferentes concentraciones Clorhidrato de Tetraciclina sobre leucocitos PMN-N de individuos sanos.

Boletín de la Asoc. Mex. Prof. Microb. No.3

Arce, M.A.Y.- 1984.- Determinación de IgG, IgA, IgM en Fluido Gingivocrevicular de pacientes con Gingivitis, Periodontitis. Pract. Odont. 5 (6): 35-39.

Arce, M.A.Y.- 1989.- Sida y el riesgo para el Odontólogo. Acta Odontológica (2) Feb. Mty. N.L.

OTRAS PUBLICACIONES :

1. Capítulo de "Inmunopatología en las enfermedades infecciosas". para el libro de Microbiología Médica Editado por la Asociación Mexicana de Microbiología y Parasitología de las escuelas de medicina A.C.

TRABAJOS DE INVESTIGACION NO PUBLICADOS :

1. Arce, M.A.Y. y Welsh Oliverio.- Estudio doble ciego sobre la inhibición de la quimiotaxis leuco-

citaria por las tetraciclinas en pacientes con Acné vulgaris. Memorias del X Congreso Mex. Dermatol. 1981.

2. Arce, M.A.Y., González, B.J.- Defecto quimiotáctico de macrófagos en un paciente con Leishmaniasis anérgica.

Memorias del Congreso Internacional de Infectología. Mérida, Yuc. Nov. 1987.

3. Arce, M.A.Y., Salinas C.M. y Welsh, L. O.- Producción de IL-1 extracelular en pacientes con lepra lepromatosa. Memorias del Congreso Internacional de Infectología. Guadalajara, Jalisco. Nov. 1988.

4. Arce, M.A.Y., Salinas, C.M., González, B.J. y Welsh, L.O.- Producción de Interleucina 1 total por células mononucleares de pacientes con Lepra. Memorias del VI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. Monterrey, N.L. Oct. 1988.

TESIS ASESORADAS :

1. Fagocitosis y Digestión intracelular para *Estafilococcus coagulasa* negativos que infectan a pacientes cateterizados. (obtención del grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica).

MENCIONES OTORGADAS :

1. Primer lugar, con mención honorífica y un centenario con la investigación titulada: ,
Producción de II-1 total por mononucleares de pacientes con lepra. Presentado en el VI Encuentro Regional de Investigación Biomédica en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., Monterrey, N.L. Octubre 1988. (Apoyado por SEP).

PARTICIPACION COMO CONFERENCISTA :

- 1.- XXX Aniversario de la Esc. de L.C.B., Fac. de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L., Fenomenología de las Inmunodeficiencias. 29 de septiembre de 1976.
- 2.- VII Reunión Anual Egresados de Endodoncia. Monterrey, N.L., Respuesta Inmune, Inmunopatología Endodental. 27, 28 y 29 de mayo de 1981.

- 3.- Asociación Mexicana de Microbiología y Parasitología de las Escuelas de Medicina, A.C.- Facultad de Medicina U.A.N.L., Monterrey, N.L. Tópicos Inmunológicos. 3 al 14 de agosto de 1981.

- 4.- X Congreso Mexicano de Dermatología. Zacatecas, Zac., México. Estudios de la quimiotaxis leucocitaria en pacientes con Acné vulgaris tratados con tetraciclinas. 5 al 10 de Octubre de 1981.

- 5.- II Encuentro Regional de la Investigación Científica en el área Biomédica. Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Monterrey, N.L.
 - 1) Evaluación de la quimiotaxis de leucocitos en pacientes con Acné tratados con tetraciclinas.
 - 2) Efecto inhibitorio de la quimiotaxis leucocitaria con diferentes concentraciones de Clorhidrato de tetraciclina.
26, 27 y 28 de Noviembre de 1981.

- 6.- Ciclo de Actualización en Periodoncia. Escuela de Estomatología Universidad de san Luis Potosí, México. Inmunopatología Peridontal. 5 y 6 de diciembre de 1981.
- 7.- Curso de Alergias e Inmunología. Depto. de Alergias del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Síntesis de proteínas e inmunoglobulinas. Auditorio del primer piso. 15 al 17 de febrero de 1982.
- 8.- Programa de educación continua en el área de Odontología Hospitalaria. Departamento Dental del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", U.A.N.L. Inmunología y su relación en la Odontología. Problemas inmunopatológicos endodontales y peridontales. Vacunación en la Caries Dental. 4,8,11 y 25 de marzo de 1983.
- 9.- Curso de Métodos Inmunológicos en el Congreso Nacional de Patólogos en la ciudad de Guadalajara, Jal.- Octubre de 1983.
- 10.- Curso de Diagnóstico inmunoenzimático en la XV Reunión Nacional de Patología Clínica.

Sep. de 1984, Monterrey, N.L.

11.- Presentación del Programa Objetivizado de Inmunología para estudio de microbiología en las escuelas de medicina presentado y aceptado a nivel nacional por la Asociación Mexicana de Microbiología y Parasitología en Escuelas de Medicina A.C.

XLVII Reunión. Chapala Jalisco. Nov. 1986.

12.- Colegio de Químicos Clínicos de Monclova, Coah. A.C. Tema : Respuesta Inmune en Sida. Sep. 1987.

13.- La respuesta inmune en Leishmaniasis y otras infecciones por microorganismos intracelulares. XI Congreso Nacional de Químicos Clínicos, A.C. Oct. 1987. Monterrey, N.L.

14.- Conferencias II Congreso ENDO 88 Asociación de Endodoncia de Guanajuato, A.C. Temas :

- 1) Inmunología Endo-Perio.
- 2) SIDA y Riesgo Profesional.
- 3) Inmunopatología oral.

26,27,28, de Febrero de 1988.

- 15.- Colegio de Odontólogos de Coah. A.C. Tema :
SIDA y Riesgo profesional. Marzo 1988.
Monclova, Coah.
- 16.- Inmunología. Importancia en su inclusión en
la curricula de la licenciatura Médica. En
la LII reunión de la Asociación Mexicana de
Profesores de Microbiología y Parásitología
en las Escuelas de Medicina A.C. U.A.A.
Aguascalientes. Nov. 1988.
- 17 - Conferencista en Jornadas Científicas de
Microbiología, Hematología y Química Clínica.
Tema.- Diagnóstico de Inmunodeficiencias.
Confederación Nacional de Químicos Clínicos
A.C. y Colegio de Profesionales de la Química
Clínica de N.L. Nov. 1988, Monterrey, N.L.
- 18.- Curso sobre actualización en SIDA Colegio de
Profesionista de Tamaulipas A.C. Nov. 1988.
Tampico, Tamps.
- 19.- SIDA y el riesgo para la comunidad. Asocia-
ción de Caballeros de Colón. Enero de 1989.

20.- SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida). Infecciones más frecuente en Cavidad Oral y el Riesgo para el Odontólogo.

Asoc. de Mujeres Odontólogas de N.L. Enero de 1989.

21.- Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el riesgo a la comunidad. Club Palestino Libanes, Monterrey N.L. Abril de 1989.

ASISTENCIA A CURSOS :

1.- Diagnóstico en la Inmunología Clínica por el laboratorio. Depto. de Medios de Diagnóstico Química Hoechst. México D.F. Mayo de 1977.

2.- Curso de adiestramiento para la docencia. Centro Latino Americano de Tecnología Nacional para la Salud. (CLATES). Esc. de Salud Pública, Mty. N.L. Septiembre de 1975

3.- Curso de Determinaciones Clínicas. Colegio de Patólogos Clínicos del Noreste. Mty. N.L. Marzo de 1974.

- 4.- Curso de Microscopía, Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina UANL. Abril de 1975.
- 5.- Curso de Inmunología Avanzada. Sección de Graduados, Esc. Nacional de Ciencias Biológicas, IPN México, D.F. Julio 1981.
- 6.- Curso de Actualización de Inmunodeficiencia Adquirida. Hospital Universitario "José Eleuterio González", Fac. de Medicina UANL. Junio 24-25 de 1987.
- 7.- Estrategias Moleculares en Inmunología. Symposium Internacional de Inmunología. Guadalajara, Jal. Oct. 1987.
- 8.- Seminario para Directores de Tesis de Postgrado. Programa de formación y actualización de Profesores en para estudio. SEP. Cd. Universitaria UANL. Abril y Mayo de 1988.
- 9.- Curso sobre Actualización en Interleucinas. Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. México D.F. Oct. 1988.

MIEMBRO DE LAS ASOCIACIONES :

- 1.- Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología en las Escuelas de Medicina A.C.
- 2.- Colegio Médico de Patólogos Clínicos del Noroeste, A.C.
- 3.- Asociación Mexicana de Inmunología, A.C.
- 4.- Asociación Mexicana de Infectología A.C.

