

CONCURSO DE RESIDENTES

PRESENTACION CLINICA Y PRODUCCION DE CITOQUINAS EN LEPRA TUBERCULOIDE Y LEPROMATOSA

*Ochoa, María Teresa; Valderrama, Lilibiana;
Ochoa, Augusto; Zea, Arnold; Escobar, Carlos E.;
Moreno, Luis H.; Falabella, Rafael*

RESUMEN

En la lepra los mecanismos inmunológicos que conducen a una u otra forma de la enfermedad o a la producción de daño nervioso, no han sido definidos. Sin embargo, algunas citoquinas han sido implicadas en el resultado de la respuesta inmune hacia la infección por *M. leprae*.

En este trabajo se estudiaron las características clínicas más importantes de 38 pacientes con lepra activa y su relación con la respuesta inmune *in vitro* hacia un activador de linfocitos T, anti-CD3. La reacción de Mitsuda a la aplicación intradérmica de lepromina mostró una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con lepra tuberculoide (LT) y lepra lepromatosa (LL) ($p=0.001$). Sin embargo, 3/11 pacientes clasificados como LT de acuerdo a la clasificación de Ridley y Jopling no respondieron a la aplicación de lepromina y 1/27 pacientes con LL sí respondió. Los monocitos de sangre periférica de pacientes con LT y LL demostraron respuesta blastogénica hacia anti-CD3. Se detectaron niveles de IL-1 β , IFN- γ , IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivos celulares. La producción endógena de

IL-1 β fue significativamente más alta en pacientes con LL que con LT. La producción de IL-6 en respuesta a anti-CD3 fue observada en una proporción significativamente más alta en pacientes con LL que en pacientes con LT ($p=0.0025$). Esta observación puede tener relación con la hipergamaglobulinemia que caracteriza la forma lepromatosa de la enfermedad. La IL-10, que regula la capacidad microbicida de los macrófagos, fue detectada en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos activados con anti-CD3 en los dos grupos de pacientes pero no en controles sanos. Aunque no se encontraron diferencias en la producción de IFN- γ entre los dos grupos de pacientes, sí se observó una correlación entre el tiempo de tratamiento y la producción de IFN- γ *in vitro* ($p=0.016$).

Los hallazgos anteriores sugieren una alteración de la respuesta inmune mediada por citoquinas que puede contribuir al espectro de la enfermedad y a la respuesta al tratamiento.

Palabras Clave: Lepra, Presentación clínica, Citoquinas.

INTRODUCCION

La Lepra es una enfermedad infecciosa crónica, causada por un bacilo ácido-alcohol resistente, *Mycobacterium leprae*; esta enfermedad presenta un espectro clínico asociado a un espectro de reactividad inmunológica hacia *M. leprae* que permite correlacionar sus manifestaciones clínicas, bacteriológicas e histopatológicas. Así, en un polo de este espectro, la lepra tuberculoide (LT) presenta pocas lesiones de piel, ausencia de bacilos en los tejidos, formación de granulomas y una fuerte respuesta de hipersensibilidad retardada cutánea en respuesta a la aplicación intradérmica de lepromina; mientras que en el otro polo de la enfermedad, la lepra lepromatosa (LL) exhibe un mayor número de lesiones en piel, un mayor número de bacilos en los tejidos, con ausencia de granulomas y abundantes

María Teresa Ochoa, M.D. Residente Dermatología. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Lilibiana Valderrama, Bióloga. Asistente de Investigación. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia.

Augusto Ochoa, M.D. Jefe Laboratorio de Inmunoterapia. National Cancer Institute, Frederick, MD, USA.

Arnold Zea, MSc. Investigador Asociado. National Cancer Institute, Frederick, MD, USA.

Carlos E. Escobar, M.D. Profesor Asociado, Servicio de Dermatología. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Luis H. Moreno, M.D. Jefe Clínica de Lepra. Secretaría Departamental de Salud y Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Rafael Falabella, M.D. Profesor y Jefe, Servicio de Dermatología. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Correspondencia: María Teresa Ochoa. Hospital Universitario del Valle, Servicio Dermatología, Cali, Colombia.

Trabajo ganador del Concurso de Residentes XX Congreso Colombiano de Dermatología, Cali, Noviembre 1994

macrófagos vacuolados y además ausencia de hipersensibilidad retardada cutánea en respuesta a la aplicación de lepromina.¹

Concomitante con estas manifestaciones existe daño nervioso periférico que puede variar desde una leve pérdida de la sensibilidad en un área limitada de piel, hasta un severo déficit motor y sensitivo que deja como secuela grados variables de incapacidades físicas, tanto en la LT como en la LL; en la LT el daño nervioso se presenta más rápidamente y puede ser muy destructivo, mientras que en la LL el compromiso nervioso se presenta más tardíamente.⁴

En la lepra los mecanismos inmunológicos que conducen a una u otra forma de la enfermedad y el mecanismo responsable del daño nervioso no han sido definidos;^{3,4} tampoco se conoce el papel de las citoquinas, las cuales son fundamentales para determinar el resultado de la respuesta inmune.⁵ Algunas de ellas de particular interés en la patogénesis de enfermedades producidas por *Micobacterias* son: la IL-1 que actúa sobre los linfocitos T preparándolos para responder a signos subsecuentes y que además los induce a sintetizar y secretar IL-2, la cual juega un importante papel en la expansión clonal de las células T activadas;⁶ el IFN- γ que activa los macrófagos aumentando su actividad microbicida, pero puede interferir con la producción de IL-4 que a su vez induce la proliferación de linfocitos B;⁷ la IL-6 promueve la producción de anticuerpos⁸ y por último la IL-10 puede suprimir la respuesta de células T y la función del macrófago.⁹ Además, información reciente sugiere que las subpoblaciones de linfocitos T secretan patrones definidos de citoquinas que determinan el espectro de varias enfermedades infecciosas, incluyendo la Lepra; así, las células TH1 producen IL-2 e INF- γ , mientras que las células TH2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.^{10, 11, 12}

Este trabajo presenta las características clínicas y el compromiso nervioso de pacientes en los dos polos del espectro de la Lepra (LT y LL) en relación con la respuesta inmune determinada por la capacidad de sus linfocitos para proliferar y producir citoquinas (IL-1, IL-2, IL- τ , IL-4, IL-6 e IL-10) en respuesta a un estímulo policlonal de linfocitos T, anti-CD3.

MATERIALES Y METODOS

A. Pacientes

Se identificaron un total de 38 pacientes con diagnóstico de Lepra, procedentes de la Clínica de Lepra del Hospital Universitario del Valle. Estos pacientes fueron diagnosticados y clasificados de acuerdo con los criterios de Ridley y Jopling basados en parámetros clínicos, histopatológicos y en la respuesta a la Lepromina.¹³ La evaluación clínica permitió determinar el grado de compromiso nervioso según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS):¹⁴

- I. No hay anestesia, ni deformidad o daño visibles.
- II. Anestesia de manos y/o pies.
- III. Deformidad o daño visibles.

Se determinó además si existía o no anestesia en las lesiones de piel y se evaluó el Índice Bacilar (I.B.) antes de iniciar el tratamiento y en el momento del estudio, como indicio de la efectividad de la terapia.

Todos los pacientes estaban recibiendo esquema multidroga (Dapsona, Rifampicina, Clofazimine) al momento del estudio. Fueron excluidos pacientes en estados reaccionales o que recibían terapia inmunosupresiva. Se incluyeron además cinco controles normales, voluntarios sanos. A todos los pacientes y controles normales se les realizó medición en sangre de Proteínas totales y ELISA para Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) y así poder excluir aquellos pacientes que presentaran otra alteración de la inmunidad diferente de la Lepra.

Se obtuvo consentimiento escrito de todos los participantes, de acuerdo con las pautas colombianas e internacionales para investigación que involucre humanos; el protocolo y el consentimiento fueron aprobados por un comité de ética perteneciente a la Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM).

B. Lepromina

La Lepromina fue proporcionada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y contiene *M. lepre* obtenidos de macerado de nódulos de pacientes con LL. Se aplicó 0.1 ml intradérmico en cara interna del brazo; la induración producida fue leída en mm (promedio del diámetro horizontal y vertical de la induración) 21 días después de la aplicación (reacción de Mitsuda).

C. Preparación de Linfocitos de sangre periférica

De la sangre total se separaron los linfocitos totales por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden); la concentración de linfocitos fue ajustada a 2×10^6 células/ml y fueron suspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N.Y.) suplementado con suero humano AB inactivado, al 10% (Whittaker, Walkersville, MD) y antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 μ g/ml: Gibco, Grand Island, N.Y.). Las células fueron cultivadas en placas estériles de 12 pozos por triplicado (Corning, N.Y.). Fueron adicionados anticuerpos monoclonales anti-CD3 (OKT3, Ortho, NJ), 30 ng/ml, como inductores de linfocitos T; las placas fueron incubadas a 37°C, en atmósfera humidificada con CO₂ 5%, durante 48 y 96 horas, cuando se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -70°C.

D. Proliferación de Linfocitos

Después de retirar el sobrenadante de las 48 horas, se reemplazó con medio de cultivo fresco RPMI 1640 y se realizaron subcultivos de los linfocitos (4×10^5 /pozo) utilizando microplacas de 96 pozos (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). Se realizaron las pruebas por triplicado y se agregaron 50 μ l de Timidina tritizada (Dupont NEN, Boston, NS) por pozo, para una concentración final de 1 μ Ci por pozo. Se incubó durante 12 horas y posteriormente los cultivos fueron cosechados en cosechadora automática en papel de fibra de vidrio (Whatman, Labsales, Hillsboro, OR) que luego fueron evaluados en contador de centelleo para rayos β (Beckman

Instruments CA). Los resultados son expresados como cuentas por minuto netas (cpm): cpm de cultivos estimulados - cpm de cultivos no estimulados. Para efectos de análisis estadístico las cpm netas se transformaron a logaritmo para normalizar la distribución de los datos.¹⁵

E. Medición de Citoquinas

Se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para medir las siguientes citoquinas: IL-1 (Cistron, Pine Brook, NJ), IL-2 (Dupont Company, Wilmington, DE), IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-6 e IL-10 (Biosource International, Camarillo, CA) y para IFN-γ se utilizó Radioinmunoanálisis (Centocar IFN-γ-RIA, Malvern, PN).

F. Análisis Estadístico

Todos los datos fueron analizados usando un Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS). Las relaciones entre variables cualitativas fueron estudiadas utilizando el Test chi-cuadrado y el promedio de los datos fue analizado por medio de la T-students y por análisis de varianza de una y dos vías. También se utilizó análisis de regresión lineal, para determinar la correlación entre la respuesta inmune y el tiempo de tratamiento.

RESULTADOS

A. Clínicos

De acuerdo con la clasificación de Ridley y Jopling,¹³ de los 38 pacientes estudiados 11 presentaban LT y 27 LL; no hubo diferencias significativas con relación al sexo y edad, pero sí al tiempo de tratamiento (p=0.01) (Tabla 1).

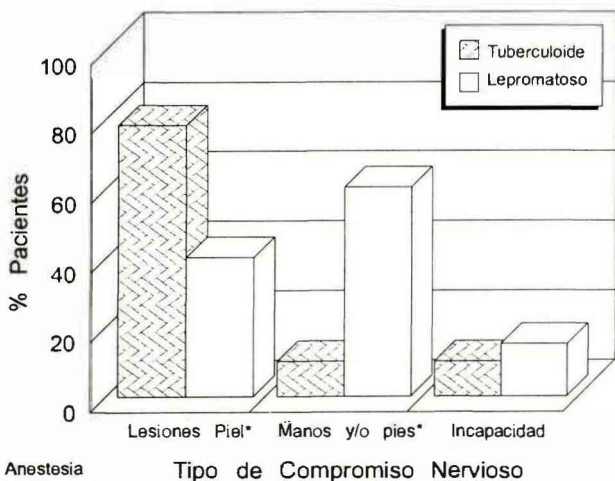


Fig. No. 1. Relación entre el tipo de lepra y la extensión del compromiso nervioso. Los pacientes con lepra lepromatosa presentaron mayor compromiso de nervios periféricos (anestesia de manos y/o pies) que los pacientes con lepra tuberculoide

Tabla 1. Correlación entre tipo de lepra, sexo, edad y tiempo de tratamiento en 38 pacientes con enfermedad de Hansen.

Tipo de Lepra	Sexo Femenino		Sexo Masculino		Edad (x)	Tiempo de Tratamiento
	No.	%	No.	%	x ± DS	x ± DS
Tuberculoide (n=11)	8	73	3	27	45 ± 17.4	3.6 ± 2.7
Lepromatosa (n=27)	12	44	15	56	38 ± 14.2	12.2 ± 8

x: Promedio aritmético
 DS: Desviación Estándar
¹ Comparación de promedios. Prueba de student: p=0.001

En cuanto al compromiso nervioso, y según la clasificación de la OMS, el 9% de los pacientes con LT y el 60% de los pacientes con LL presentaron anestesia de manos y/o pies (p=0.009). En el momento del examen solo un paciente (9%) con LT y 3 (11%) con LL presentaban algún tipo de incapacidad; no manifestaron ningún tipo de compromiso nervioso 4 (16%) pacientes Lepromatosos y 2 (22%) Tuberculoides. Presentaron anestesia de las lesiones de piel, 73% de los pacientes con LT y el 40% de los pacientes con LL (Fig. 1).

B. Lepromina

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el promedio de induración en la reacción de Mitsuda entre los pacientes con LT y LL (p=0.001). El 73% de los pacientes con LT y el 4% de los pacientes con LL presentaron una reacción cutánea positiva a la aplicación de Lepromina (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación entre tipo de lepra y lepromina en 38 pacientes.

Tipo de Lepra	Induración ^a (mm)	Positiva ¹		Negativa ²	
	x ± DS	No.	%	No.	%
Tuberculoide (n=11)	8.0 ± 5.4	8	73	3	27
Lepromatosa (n=27)	0.3 ± 1.3	1	4	26	96

¹ Positiva > 5 mm
² Negativa < 5 mm
^a Comparación de promedios. Prueba de Student: p=0.001
 x: Promedio aritmético
 DS: Desviación Estándar

C. Laboratorio

Ningún paciente presentó disminución de las proteínas totales; tampoco se encontraron pacientes reactivos para HIV.

D. Índice Bacilar (IB)

Al momento de realizar el estudio, de los 23 pacientes Lepromatosos evaluados, no habían presentado cambios en el IB 10 pacientes, disminuyó en 11 y aumentó en 2 de los sujetos evaluados.

E. Linfotransformación

La respuesta linfoproliferativa al estímulo con anti-CD3 fue similar en los dos grupos de pacientes; para los Tuberculoideos el promedio geométrico (X_g) fue 159 cpm y para los Lepromatosos el X_g fue 244 cpm.

F. Citoquinas

Se encontraron resultados similares al analizar el promedio de citoquinas tanto a las 48 horas como a las 96 horas (datos no presentados); por lo tanto para el análisis frente a otras variables se utilizaron los hallazgos obtenidos con los sobrenadantes de las 48 horas.

IL-1, IL-6, IL-10 e IFN- γ fueron detectados en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica, tanto en pacientes como en controles normales. Fueron observados niveles significativamente más altos de esas citoquinas en respuesta a la estimulación con anti-CD3 (p). IL-2 e IL-4 no fueron detectadas.

Fue evidente la producción endógena de IL-1 β en cultivos, tanto en pacientes con LT como en pacientes con LL; el promedio fue significativamente más alto para pacientes con LL que para pacientes con LT (p=0.01). La estimulación con anti-CD3 resultó en un aumento significativo en la producción de IL-1 β en los dos grupos de pacientes y en los controles normales (Fig. 2).

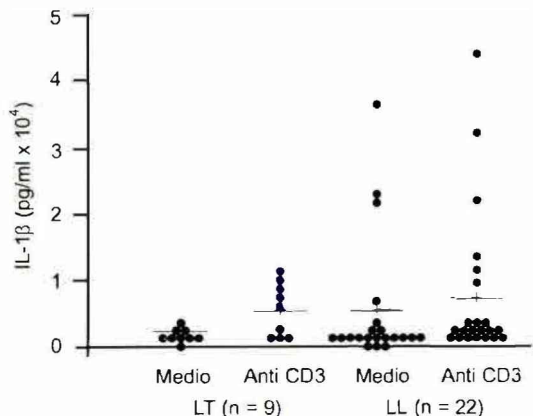


Fig. No. 2. Producción de IL-1 β en sobrenadantes de linfocitos de pacientes con lepra tuberculoide y lepromatosa, cultivados en presencia y ausencia de anti-CD3.

No se observaron diferencias entre pacientes con LT y LL en la producción de IFN- γ (Fig. 3). Sin embargo el tiempo de tratamiento se correlaciona directamente con la producción de IFN- γ en sobrenadantes de linfocitos T estimulados (p=0.01) (Fig. 4). El 36% y el 56% de los pacientes con LL y LT, respectivamente, produjeron IFN- γ en ausencia de estimulación exógena *in vitro*.

Sólo se detectó IL-6 en sobrenadantes de cultivos estimulados con anti-CD3. Los cultivos celulares de pacientes con LL en respuesta hacia anti-CD3 produjeron IL-6 en una proporción significativamente más alta (95%) que los pacientes con LT

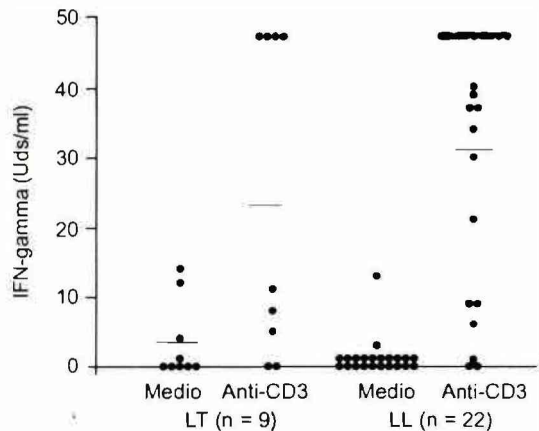


Fig. No. 3. Producción de Interferón- γ por linfocitos de pacientes con lepra tuberculoide y lepromatosa, en presencia y ausencia de anti-CD3.

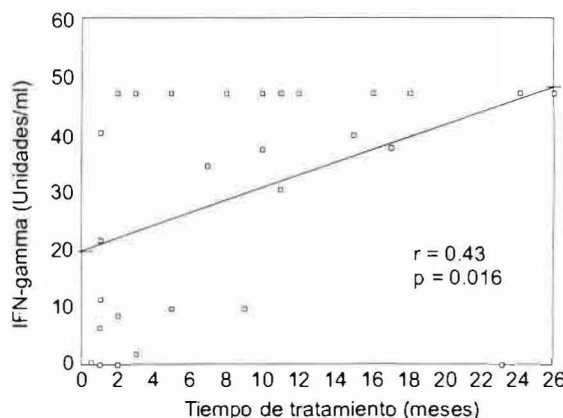


Fig. No. 4. Análisis de regresión lineal de la relación entre el tiempo de tratamiento con terapia multidroga y producción de Interferón-gamma en respuesta a la activación de linfocitos T con anti-CD3.

(33%). Por la dispersión de los valores observados entre los pocos pacientes con LT que respondieron, no hubo diferencias en el promedio de producción de IL-6, entre los dos grupos de pacientes (Fig. 5).

Se encontró IL-10 en los cultivos de linfocitos estimulados con anti-CD3 en una proporción similar en pacientes con LT (75%)

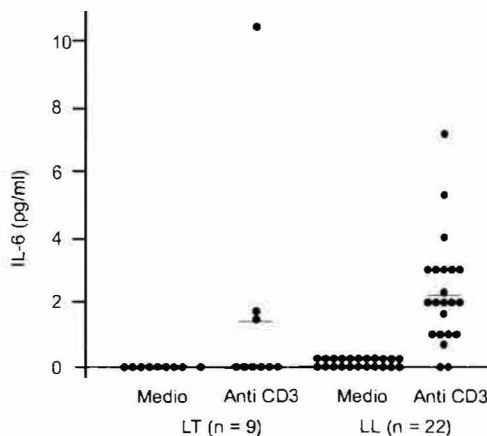


Fig. No. 5. Comparación entre pacientes con lepra tuberculoide y lepromatosa con respecto a la producción de IL-6 *in vitro*.

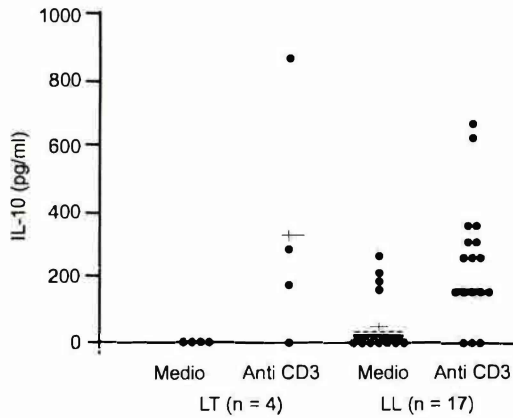


Fig. No. 6. Producción de IL-10 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de pacientes con lepra tuberculoides y lepromatosa, cultivados en presencia y ausencia de anti-CD3.

y con LL (82%). El promedio de IL-10 no fue significativamente diferente entre los dos grupos de pacientes estudiados. La producción endógena de IL-10 fue detectada en los sobrenadantes de monocitos no estimulados en el 23% de los pacientes con LL.

No se observó relación entre la reacción a la aplicación de lepromina (reacción de Mitsuda) y la producción de citoquinas en respuesta a la estimulación de linfocitos-T con anti-CD3.

DISCUSION

Han sido descritas múltiples clasificaciones para establecer los tipos de Lepra; en este trabajo utilizamos la de Ridley y Jopling,¹³ que desde 1962 fue establecida como una clasificación inmunológica con propósitos de investigación. La respuesta a la Lepromina hace parte de estos criterios; sin embargo en este trabajo se encontraron 3 pacientes con LT sin respuesta cutánea a la aplicación de Lepromina, lo que sugiere que puede pertenecer a otro grupo o que está virando hacia una forma Lepromatosa; por lo anterior, con el propósito de simplificar la clasificación, la OMS, basada en el IB¹⁴ estableció dos grupos únicamente: Paucibacilar y Multibacilar, lo que permite eliminar grupos intermedios de difícil clasificación. Es posible que utilizando los criterios señalados por la OMS se detecten diferencias en el comportamiento de la respuesta inmune, no evidentes en agrupaciones basadas en la clasificación de Ridley y Jopling.

El mecanismo responsable del daño nervioso producido en los pacientes con Lepra no está claro; en los pacientes con LT parece ser la consecuencia de la respuesta inmune que destruye el nervio y donde las citoquinas tienen un importante papel, mientras que en la LL los bacilos invaden el tejido nervioso que más tarde es reemplazado por fibrosis.² En este estudio se encontró que los pacientes con LL presentaron anestesia de manos y/o pies más frecuentemente que los pacientes con LT, lo que demuestra un mayor compromiso de nervios periféricos en los pacientes lepromatosos. No hubo diferencias significativas en la producción de citoquinas de acuerdo con el compromiso nervioso. Los estados reaccionales asociados a esta enfermedad han sido señalados como los principales responsables del daño nervioso. Observaciones *in situ* han demos-

trado que las reacciones de reversa asociadas con un incremento en la inmunidad mediada por células presentan un patrón de producción de citoquinas correspondientes a las células TH1 (IL2, INF- γ). En contraste, el eritema nudoso leproso, asociado a una reacción por complejos inmunes, se caracteriza por presentar un patrón de células TH2 (IL4, IL-6, IL10).⁴

Los pacientes con lepra presentan una inmunidad mediada por células normal que les permite responder a una variedad de antígenos diferentes de las de la lepra; existen sin embargo algunos reportes que demuestran una supresión no específica de las células T hacia mitógenos y antígenos diferentes al *M. leprae*.¹⁶ Otros señalan que no hay una profunda supresión en ninguno de los dos polos del espectro de la lepra en respuesta a estímulos inespecíficos.¹⁷

En este trabajo se encontró que tanto los pacientes con LT como con LL, responden con la producción de citoquinas al estímulo del receptor T mediante anti-CD3, al igual que los controles sanos. Sin embargo, la respuesta de linfotransformación fue marginal, explicado probablemente por las bajas dosis de estímulo (anti-CD3) utilizadas.

La IL-1 β es esencial para la amplificación de la respuesta inmune. Así Makonkawkeyoon et al,¹⁸ demostraron que pacientes con LL estimulados con lipopolisacáridos (LPS), producían niveles más bajos de IL-1 que los pacientes con LT; Watson, et al,¹⁹ reportaron que 4/6 pacientes con LT y ninguno con LL producían espontáneamente IL-1 y que al ser estimulados con algunas lectinas todos los pacientes (8/8) con LT y 8/13 con LL producían IL-1. En este trabajo se encontró que sin estímulo antigénico en el 89% y el 86% de los pacientes con LT y LL respectivamente, se detectaron niveles de IL-1 β y que todos al ser estimulados con anti-CD3 producen sin estímulo mayor cantidad de IL-1 β que los pacientes con LT. Lo anterior sugiere que en pacientes con Lepra la IL-1 puede estar activada sistémicamente *in vivo*; hallazgos similares han sido encontrados en pacientes con Sarcoidosis y se ha señalado a la IL-1 como un factor importante en la producción de alveolitis.¹⁹

La producción de IL-2 e IL-4 fue evaluada a las 48 horas y al parecer su producción es consumida rápidamente durante las primeras 24 horas, por lo cual no se detectaron niveles ni en los pacientes ni en los controles normales. También la dosis baja del estímulo utilizado (anti-CD3) y la baja sensibilidad del inmunoensayo para estas citoquinas comparado con PCR para ARN mensajero, pueden explicar este resultado.

El IFN- γ es un importante activador de macrófagos.⁷ Kaplan, et al, demostraron que pacientes con LL producían niveles bajos de IFN- γ en respuesta a antígenos de Mycobacterias como *M. leprae* y BCG, mientras que producían niveles altos en respuesta a activadores inespecíficos como el mitógeno Concanavalina-A (20). En este estudio no se encontraron diferencias en la producción de IFN- γ en pacientes tuberculoides y lepromatosos en respuesta al estímulo de los receptores de linfocitos T. Sin embargo se encontró que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, aumenta la producción de IFN- γ como un marcador de la respuesta al tratamiento en estos pacientes, además de otros índices como el IB y el índice morfológico.²

En este estudio se encontró que ni en los pacientes (LT y LL) ni en los controles normales no estimulados, había niveles de IL-6, mientras que al ser estimulados los linfocitos T, el 91% de los pacientes con LL y sólo el 33% de los pacientes con LT producían IL-6. En relación al papel de la IL-6 se ha demostrado que promueve la producción de anticuerpos y que el bloqueo de esta IL previene la hipergamaglobulinemia asociada con malaria cerebral.²¹ La producción de IL-6 por pacientes con LL podría contribuir a la hipergamaglobulinemia que caracteriza este grupo.

La IL-10 ha sido señalada como un factor supresor de la respuesta de células T y de la función del macrófago,⁷ Sieling et al en un estudio reciente, donde utilizó *M. leprae* como antígeno, no encontró diferencias en la producción de IL-10 entre los pacientes con LT, LL y los controles.²² En este estudio se pudo observar que el 87% de los pacientes con LL, y el 75% de los pacientes con LT al ser estimulados con anti-CD3 presentaban niveles detectables de IL-10, sin embargo no se indujo IL-10 en ninguno de los controles estudiados. Alteraciones en la regulación del macrófago, hospedero celular del *M. leprae* en pacientes con lepra, podrían ser mediados por IL-10.

Utilizando PCR se han realizado observaciones *in situ*, en lesiones de pacientes con LT y LL, de los patrones de citoquinas asociados con las subpoblaciones de linfocitos T. Se encontró que en los pacientes tuberculoides predomina la producción de IL-2 e IFN- γ , mientras que en los pacientes lepromatosos hay mayor producción de IL-4, IL-5 e IL-10; lo anterior refleja las subpoblaciones de linfocitos T, TH1 asociada con la forma resistente (LT) y TH2 asociada con la forma susceptible (LL) de la enfermedad.¹⁰

Aunque es de gran importancia observar el comportamiento de estas citoquinas en respuesta a un estímulo específico como *M. leprae*, los hallazgos anteriores nos permiten sugerir que los pacientes con lepra, en cualquiera de los dos polos del espectro de la enfermedad, son capaces de responder a un estímulo policlonal de linfocitos T. Los patrones de respuesta mediados por citoquinas observados en células de sangre periférica de pacientes con lepra, proveen indicios de perturbaciones en la regulación de la respuesta inmune a nivel sistémico que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

SUMMARY

Neither the immunological mechanisms that result in the tuberculoid and lepromatous forms of leprosy nor the pathogenesis of damage to nerves are fully understood. Nevertheless, some cytokines have been implicated in the outcome of the immune response to *M. leprae* infection. In this study the major clinical characteristics of 38 patients with active leprosy were analyzed in relation to the *in vitro* immune response to the lymphocyte activator anti-CD3. The Mitsuda reaction to the intradermal application of lepromin differed significantly between patients with lepromatous (LL) and tuberculoid (TL) forms of disease ($p=0.001$). However, 3/11 patients classified as tuberculoid according to the Ridley-Jopling classification failed to respond to lepromin and 1/27 lepromatous patients responded. Peripheral blood mononuclear cells from both LL

and TL patients displayed blastogenic responses to anti-CD3. IL-1 β , IL-6, IL-10 and IFN- γ were detected in culture supernatants. Endogenous production of IL-1 β was significantly higher for cell cultures from patients with the lepromatous form of disease compared to those with tuberculoid leprosy. IL-6 production in response to anti-CD3 was observed in a significantly higher proportion of LL patients than TL ($p=0.0025$). This observation may have bearing on the hypergamaglobulinemia that characterizes the lepromatous form of leprosy. IL-10, which regulates the microbicidal capacity of macrophages, was detected in culture supernatants of lymphocytes activated with anti-CD3 from both patient groups but not from healthy controls. Although gamma interferon production did not differ in TL and LL, a direct correlation was observed between time of multidrug treatment and IFN production *in vitro* ($p=0.016$). These findings provide evidence suggestive of alterations in the immune responses mediated by cytokines that may contribute to the spectrum of disease and response to treatment.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación CIDEIM y muy especialmente a la Dra. Nancy Saravia por su constante colaboración y apoyo. También al Dr. Bruce Alexander y al Dr. Pablo Tróchez por la traducción del texto del español al inglés.

BIBLIOGRAFIA

1. Bullock WE. Mycobacterium leprae. In: Infectious disease and their etiologic agents. Mandell G, Douglas G, Benett J. New York: Churchill Livingstone. 1990.
2. Hasting R. Leprosy. New York: Churchill Livingstone. 1985.
3. Bloom BR. Learning from Leprosy: A perspective on immunology and the third world. J. Immunol. 1986. 137: 1-X.
4. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. J. Immunol. 1992. 149 (4): 1470-5.
5. Gaylord H, Brennan PJ. Leprosy and the Leprosy bacillus: recent development in characterization of antigens and immunology of the disease. Ann. Rev. Microbiol. 1987. 41: 645-75.
6. O'Garra. Interleukin and the immune system I. The Lancet. 1989. April 29: 943-7.
7. O'Garra. Interleukin and the immune system II. The Lancet. 1989. May 6: 1003-5.
8. Seghal PB. Interleukin 6. Molecular pathophysiology. J. Invest. Dermatol. 1990. 94 (Suppl): 2S-6S.
9. Mosmann TR, Moore KW. The role of Interleukin 10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. Immunoparasitology Today. Special Issue. 1991. A49-53.
10. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in Leprosy Lesions. Science. 254. 1991. 277-79.
11. Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse Leishmaniasis: induction, expansion and effector function. Immunoparasitology Today. Special Issue. 1991 A 58-61.
12. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells. Ann. Rev. Immunol. 1989. 7:145-73.
13. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. Lepr. 1966. 34:255.
14. WHO. Technical report series. No. 768, 1988 (WHO expert committee on Leprosy. Sixth report).
15. Oppenheim JJ, Schecter B. Lymphocyte transformation. In: Manual of Clinical Immunology. Rose NR, Friedman H. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1980. 233-245.
16. Bloom BR, Modlin RL. Lymphocyte transformation. In: Manual of Clinical Immunology. Rose NR, Friedman H. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1980. 233-245.
17. Shinde SR, Chiplunkar SV, Butlin R, et al. Mitogen induced proliferation and cytokine production by lymphocytes from Leprosy patients. Acta Leprológica. 1991. 7 (5): 397-402.
18. Malonkawkeyoon S, Kasinrer W, Supajatura V, et al. Immunological defects in Leprosy patients: IL-2 and IFN- γ production in Leprosy patients. Int. J. Leprosy. 1990. 59 (2): 311-318.
19. Watson S, Bullock W, Nelson K. Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells from Leprosy patients. Infection and Immunity. 1984. 45(3): 787-9.
20. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, et al. Defective Gamma interferon production in Leprosy. Reversal with antigen and Interleukin-2. J. Exp. Med. 1983. 158: 2165-70.
21. Grau GE, Heremans PE, Piguet P. IL-6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anticytokine antibodies and possible role in hypergamaglobulinemia. J. Exp. Med. 1990. 172:1505.
22. Sieling PA, Abrams J, Yamamura M, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in Human infection Leprosy. J. Immunol. 1993. 150 (12): 5501-10.