



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

INMUNOTINCION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS E  
INTERLEUCINA-6 EN BIOPSIA DE PIEL Y EN SANGRE

TRABAJO RECEPCIONAL

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A:

GERMAN BERNAL FERNANDEZ

ASESOR: DR. JESUS FIDEL SALAZAR GONZALEZ



SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

MARZO 1994

T  
QR1  
.L4  
B4  
C.1



1080076908



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

INMUNOTINCION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS E  
INTERLEUCINA-6 EN BIOPSIA DE PIEL Y EN SANGRE

TRABAJO RECEPCIONAL

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A :

GERMAN BERNAL FERNANDEZ

ASESOR: DR. JESUS FIDEL SALAZAR GONZALEZ



SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

MARZO 1994

T  
QR 87  
7  
B4



Lee no para confundir y refutar, ni para confiar y dar por hecho, ni para saber hablar y disertar, sino para reflexionar y considerar.

Francis Bacon (1561-1626).

...Permíteme servir descubriendo tus secretos.

Gracias Señor.

A mis padres:

**IGNACIO BERNAL GONZALEZ**

**MA. DE JESUS FERNANDEZ DE BERNAL**

Ningun agradecimiento es suficiente para compensar sus desvelos y sacrificios con que se lograron mis estudios profesionales

Con todo mi amor y eterna gratitud.

**JUAN MANUEL:**

El tiempo vuela y se nos acabó, este trabajo es para ti, recíbelo donde quiera que estes.

**A mis hermanos:**

Con cariño, agradecimiento y respeto.

**Al DR. JESUS FIDEL SALAZAR GONZALEZ**

Asesor de esta tesis con respeto y gratitud por sus enseñanzas, su ayuda y su inmejorable amistad.

"GRACIAS AMIGO"

A mis maestros y muy en especial a:

**DR. FELIX DE LOS SANTOS ELIZONDO (q.e.p.d.)**

**I.Q. JOSE DE JESUS GONZALEZ ARELLANO (q.e.p.d.)**

Siempre tendrán un lugar en mi corazón

A mis compañeros de estudio.

A mis "co-workers"

Gracias por su participación en este trabajo que también es de ustedes. De manera muy especial para Ana Cristina Cubillas Tejeda y Lourdes del Valle por brindarme siempre todo su apoyo. A Nely Fuentes Ahumada por su generosa cooperación.

Al DR. RITO GARCIA AGUAYO por su inapreciable cooperación.

A todas las personas que mediante la donación de su sangre y/o biopsia hicieron posible la realización de este trabajo y en especial a todos los pacientes que participaron con la esperanza de recuperar su salud.

Para ti Flaca...

Con el amor de siempre.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABC-	Complejo Avidina-Biotina-Enzima	5'-NT	5'-Nucleotidasa
Ac	Anticuerpo	LPS	Lipopolisacárido
Ag	Antígeno	MPW	Mitógeno de Pokeweed
AcMo	Anticuerpo monoclonal	NK	Células asesinas naturales
ADN	Acido desoxiribonucleico	PHA	Fitohemaglutinina
BSF	Buffer Salino de fosfatos	PMA	Ester de forbol
ARNm	Acido ribonucleico mensajero	PMN	Células polimorfonucleares
CD	Grupo de diferenciación	RCP	Reacción en cadena de polimerasa
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad	RCT	Receptor de células T
CMN	Células mononucleares	RIL-2	Receptor de interleucina 2
CMV	Citomegalovirus	RxM	Reacción de Mitsuda
Con A	Concanavalina A	SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
CPA	Células presentadoras de antígeno	Tc/s	Células T citotóxicas/supresoras
ENL	Eritema nodoso leproso	Th1	Células T de ayuda tipo 1
Ig	Inmunoglobulina	Th2	Células T de ayuda tipo 2
IgG	Inmunoglobulina G	TNF- $\beta$	Factor de Necrosis Tumoral- $\beta$
IL-2	Interleucina-2	TT	Lepra tuberculoide
IFN- $\gamma$	Interferón- $\gamma$	VEB	Virus de Epstein-Barr
kDa	Kilodaltones	VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
LIE	Linfocitos intra-epiteliales		
LL	Lepra lepromatosa		

# INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	
Organización del sistema inmune	2
Inmunidad innata	2
Inmunidad adoptiva o específica	3
Marcadores de superficie	4
Tabla 1	5
Linfocitos T	8
Linfocitos B	10
Células presentadoras de Ag	10
Citocinas	11
CD28 y CD73	12
Subpoblaciones celulares en algunas enfermedades	13
Interleucina-6	14
<b>Objetivos</b>	16
<b>Justificación</b>	16
<b>Material y Métodos</b>	
Pacientes e individuos sanos	17
Aislamiento de las CMN de la sangre periférica	17
Obtención de preparaciones de citocentrífuga	17
Cortes finos de biopsias en microtomo/criostato	18
Tinción sencilla de inmunoperoxidasa	18
Inmunotinción de 2 colores	19
Análisis estadístico	20
<b>Resultados</b>	
Estandarización de la técnica de inmunotinción sencilla y doble	21
Tabla 2	21
Figura 1	22
Figura 2	23
Figura 3	24
Figura 4	26

Estandarización de la evaluación microscópica	28
Tabla 3	29
Figura 5	31
Cuantificación de células CD4+, CD8+, CD28+ y CD73+ y células dobles positivas CD4+CD28+, CD4+CD73+, CD8+CD28+ y CD8+CD73+ en sujetos sanos	32
Figura 6	33
Figura 7	34
Inmunotinción de CD28 y CD73 en células T en las lesiones de piel de pacientes con lepra	35
Tabla 4	36
Inmunotinción sencilla de IL-6 en lesiones de piel	37
Inmunotinción doble de las células IL6+	37
Figura 8	38
Figura 9	39
Figura 10	40
Discusión	41
Conclusiones	46
Bibliografía	47
Apéndice	49

## RESUMEN

El uso de técnicas que permitan comprender la relación entre un parásito y el huésped es fundamental. En lepra, el tipo de respuesta inmune del huésped determina la forma clínica de la enfermedad. En este trabajo se implementaron técnicas de inmunotinción sencilla y doble para analizar las subpoblaciones celulares y la producción de IL-6. Se estandarizaron las condiciones para analizar las células T CD4+ y CD8+, así como la expresión de CD28 y CD73 sobre estas 2 subpoblaciones en la sangre periférica y en lesiones de piel de pacientes con lepra. También se estudió la producción *in situ* de IL-6 y el fenotipo de las células productoras. Los resultados de inmunotinción en sangre periférica no presentan diferencias significativas con los valores reportados en la literatura por citometría de flujo, con excepción de la subpoblación CD4+CD28+ (74.9% vs. 98.9%,  $p < 0.025$ ). Por otro lado, la inmunotinción con anti-IL6 en lesiones de piel de los pacientes con lepra demostró que la IL-6 es producida *in situ* a lo largo del espectro clínico de la lepra. Además, los granulomas de la lepra lepromatosa (LL) exhibieron un número substancial de células IL6+ ( $44.8 \pm 21.5$  %), mientras que los granulomas de la lepra tuberculoide (TT) poseen un número significativamente menor de células IL6+ ( $12.8 \pm 10.5$ ) en comparación a los LL ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de células IL6+ en reacciones de Mitsuda es muy similar al encontrado en los granulomas TT. Por otro lado, el eritema nodoso leproso (ENL) tuvo un mayor número de células IL6+ ( $71.2 \pm 24.2$ %), si bien esta diferencia no fué significativa en comparación a las lesiones LL inactivas. La inmunotinción doble en los granulomas indica que tanto células T CD4+ como CD8+ y monocitos CD14+ contribuyen en la producción *in situ* de IL-6. Sin embargo, el número de células CD8+IL6+ parece ser mayor en las lesiones LL ( $21.2 \pm 5.3$  %) en comparación a las lesiones TT ( $3.1 \pm 1.6$  %). Este estudio indica que la inmunotinción sencilla y doble es útil en la caracterización de subpoblaciones celulares en diversos tejidos. Las posibles reacciones cruzadas de la doble inmunotinción pueden eliminarse y determinarse por la introducción de controles negativos. Las diferencias numéricas que existen entre nuestros resultados y aquellos reportados en la literatura reflejan diferencias en la metodología empleada y a factores de error propias de la técnica.

# ***INTRODUCCION***

## ORGANIZACION DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune de los vertebrados consiste de una serie de órganos y tejidos distribuidos por todo el cuerpo. Las células del sistema inmune, los leucocitos, circulan a través de los vasos sanguíneos y vasos linfáticos y algunos residen en los órganos linfoides periféricos, tal como el bazo, ganglios linfáticos, amígdalas, sinusoides, placas de Peyer de la mucosa intestinal, etc. Los leucocitos constituyen una familia heterogénea de células e incluyen los linfocitos T y B, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos; cada uno de ellos emplea estrategias distintas en la eliminación de sustancias y microorganismos extraños. La inmunidad o resistencia a microorganismos está mediada por los mecanismos de inmunidad innata o no específica y los mecanismos de inmunidad adoptiva o específica. La inmunidad innata incluyen aquellos mecanismos de defensa de primera línea con los que los microorganismos se enfrenta en forma inmediata, tal como fagocitosis, actividad de asesinas naturales (NK), lisis mediada por complemento, secreción de proteínas de fase aguda, producción de interferones y citocinas, etc (1).

## INMUNIDAD INNATA

Los fagocitos se dividen en dos tipos básicos: monocitos y granulocitos polimorfonucleares, ambos tienen la capacidad de endocitar cuerpos extraños y destruirlos intracelularmente por mecanismos oxidativos y no-oxidativos. Los monocitos circulantes en sangre pueden salir de los vasos sanguíneos y residir en tejidos donde se diferencian en macrófagos con capacidad de inducir respuestas inflamatorias e inmunes. Los granulocitos se diferencian en células cebadas residentes en diversos tejidos. Las células NK o asesinas naturales pueden lisar células tumorales y células propias anormales. Su función de lisis es natural y espontánea y constituye un mecanismo importante en el control del crecimiento de tumores. La Inmunidad innata está presente desde el nacimiento del individuo, mientras que la inmunidad adoptiva se adquiere a través de la maduración del sistema inmune y se basa en el reconocimiento de antígeno (Ag) a través de receptores específicos localizados sobre la membrana de los linfocitos B y los linfocitos T (1).

## **INMUNIDAD ADOPTIVA O ESPECIFICA**

Cuando un microorganismo logra evadir los mecanismos de inmunidad inespecífica, se enfrenta con mecanismos altamente específicos y complejos que requieren de una serie de interacciones celulares y secreción de mediadores. Su desarrollo requiere de una serie de etapas, iniciadas por el proceso de fagocitosis del microorganismo por el macrófago, el cual los destruye intracelularmente y procesa el Ag para subsecuentemente presentarlo en forma de péptidos en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La presentación del Ag a los receptores en linfocitos junto con la presentación o secreción de moléculas accesorias coestimulantes inducen la activación de los linfocitos T y B. La activación de un linfocito puede culminar en la expresión de diversas funciones efectoras o de regulación o bien puede resultar en un estado de anergia o tolerancia. La respuesta inmune adoptiva se clasifica en Inmunidad Celular, la cual es mediada por los linfocitos T, mientras que la Inmunidad Humoral es mediada por los linfocitos B cuya función es la secreción de anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) (1). Estas respuestas inmunes son Ag-específicas y poseen las siguientes características:

**a) Inducibilidad.** La respuesta inmune adoptiva es inducida por la presencia de Ag en el organismo. La inmunidad específica contra un virus aparece en un individuo cuando éste es infectado por dicho virus y el sistema inmune tiene oportunidad de reconocer los Ag's que forman parte de su estructura. Solamente la exposición a dicho virus generará inmunidad específica hacia él.

**b) Especificidad.** El sistema inmune es capaz de reconocer millones de Ag's distintos a través de clonas distintas de linfocitos, en las que cada clona expresa un receptor de Ag distinto al presente en cada otra. Esto requiere de juego de genes diversos para la región variable del receptor de Ag y rearrreglados por cada clona. Esto proporciona la base molecular que la respuesta inmune sea altamente específica.

**c) Regulación.** La respuesta inmune esta finamente regulada en cuanto al tipo y magnitud de la respuesta, de tal forma que bajo condiciones normales, no existen respuestas inmunes excesivas que perjudiquen los tejidos. Esta homeostasis es proporcionada por linfocitos que proporcionan

señales positivas tal como la función de ayuda y señales negativas tal como la función de supresión de las respuestas inmunes.

**d) Memoria.** Después de una interacción primaria con el Ag, algunas clonas de linfocitos que han sido sensibilizadas por el Ag son capaces de responder en exposiciones subsecuentes al mismo Ag, pero en una forma más rápida y vigorosa (respuesta inmune secundaria o anamnésica). Estas células T y B se denominan células de memoria y son responsables de la resistencia o inmunidad contra un agente infeccioso.

La caracterización detallada de los distintos tipos de leucocitos y subclases de linfocitos ha sido posible mediante el análisis de marcadores de superficie que identifican subpoblaciones con funciones distintivas. A continuación se describe la clasificación moderna de las células del sistema inmune en base al empleo de anticuerpos monoclonales (AcMo) que identifican antígenos de superficie.

## MARCADORES DE SUPERFICIE

A lo largo de la diferenciación celular y en etapas terminales de maduración, los linfocitos expresan sobre su membrana plasmática múltiples glicoproteínas que sirven de "marca" para distinguir ciertas etapas de diferenciación o activación celular, así como para distinguir subpoblaciones celulares con funciones únicas. Estos marcadores constituyen así, características propias de linajes celulares y se emplean para distinguir subpoblaciones particulares en una mezcla heterogénea de células (2). La inmensa mayoría de estos marcadores son identificados mediante AcMo's específicos que reconocen la molécula de superficie. La aparición de una multitud de marcadores de superficie en los últimos 10 años, ha hecho necesario clasificarlos de una manera ordenada para facilitar su estudio. El sistema de clasificación "CD" (cluster of differentiation = grupo de diferenciación) incluye los diversos marcadores enumerados conforme se van descubriendo: CD1, CD2, etc., y se derivan del análisis computarizado de anticuerpos monoclonales dirigido contra antígenos de superficie de leucocitos humanos (2). A continuación se enlistan los distintos marcadores CD hasta ahora descritos, su peso molecular, distribución celular y su función:

**Tabla 1.**  
**Algunas características de los antígenos CD de superficie de células humanas.**

Ag	PM	DISTRIBUCION	IDENTIDAD/FUNCION
CD1a	49	Timocitos y células de Langerhans	
CD1b	45	Timocitos	
CD1c	43	Timocitos	
CD2	50	Células T	Receptor de eritrocitos de carnero
CD3	20-26	Células T	Parte del complejo de RCT
CD4	60	Células T de ayuda y subpobl. de monocitos	Reconocimiento inmune restringido por clase II del CMH
CD5	67	Células T y subpobl. B	
CD6	120	Células T	
CD7	40	Células T	Receptor Fc de IgM ?
CD8	32	Células T citotóxicas y supresoras	Reconocimiento inmune restringido por clase I del CMH
CD9	24	Células pre-B, monocitos y plaquetas	
CD10	100	Células pre-B	
CD11a	180	leucocitos	Cadena $\alpha$ del LFA-1 (molécula de adhesión)
CD11b	160	Monocitos y granulocitos	Cadena $\alpha$ del receptor del complemento CR3
CD11c	150	Monocitos y granulocitos	Cadena $\alpha$ del p150,95 (receptor de complemento, molécula de adhesión)
CDw12		Monocitos y PMN	
CD13	150	Granulocitos y monocitos	
CD14	55	Monocitos, (granulocitos)	
CD15	50-180	Granulocitos y monocitos	Hapteno carbohidrato
CD16	50-60	Granulocitos, (macrófagos)	Receptor Fc de baja afinidad
CD17		Granulocitos, monocitos, plaquetas	

CD18	95	Leucocitos	Cadena $\beta$ del LFA-1, CR3 y p150,95
CD19	95	Células B	
CD20	35	Células B, Células dendríticas	
CD21	140	Células B, Células dendríticas	Receptor CR2 del complemento
CD22	135	Células B	
CD23	45	Células B activadas	Receptor IgE (baja afinidad)
CD24	38-41	Células B, PMN,	
CD25	55	Células T activadas, células B y macrófagos	Receptor de IL-2 (polipéptido de baja afinidad); cadena $\alpha$
CD26	120	Células T	Dipeptidilpeptidasa IV
CD27	55	Células T y plasmáticas	
CD28	44	Subpobl. de células T	
CD29	130	Leucocitos y plaquetas	Integrina $\beta$ 1
CD30	105	Células T y B activadas	
CD31	140	Plaquetas, monocitos, PMN, subpobl. de células T y NK	Glicoproteína IIa'
CDw32	40	Monocitos, granulocitos, plaquetas y células B	Receptor Fc
CD33	67	Precursores de granulocitos y monocitos	
CD34	115	Precursores de granulocitos y monocitos	
CD35	220	Células B, eritrocitos, granulocitos, células dendríticas, T, plasmáticas	Receptor del complemento (CR1)
CD36	90	Plaquetas y monocitos	Glicoproteína IV; receptor de malaria
CD37	40-52	Células B	
CD38	45	Células plasmáticas, células T	
CD39	70-100	Macrófagos y células B	
CD40	50	Células B	
CD41	120,100	Plaquetas	GpIIB/IIIa
CD42A	23	Plaquetas	Gp IX
CD42B	130,25	Plaquetas	GpIb
CD43	95	Leucocitos	Leucosialina
CD44	80-95	Leucocitos	Receptor del ácido hialurónico
CD45	180-220	Leucocitos	Antígeno común de leucocitos (CALLA)

CD45RA	220	Mayoría de células T, B, y NK	Fosfatasa
CD45RB	190-220	Mayoría de células T, B, y NK	Fosfatasa
CD45RO	180	Células T activadas/de memoria	Fosfatasa
CD46	66/56	Leucocitos y plaquetas	Proteína cofactor de membrana
CD47	47-52	Leucocitos y plaquetas	
CD48		Leucocitos	
CD49a-f	170-130	Leucocitos y plaquetas	$\alpha$ -1-6 integrina (6 variantes)
CD50		Leucocitos	
CD51	125/25	Leucocitos y plaquetas	Subunidad $\alpha$ del receptor de fibronectina
CDw52		Leucocitos	
CD53	32-40	Leucocitos	
CD54	90	Linfocitos activados y macrófagos	Ligando del CD11a/18 (ICAM-1)
CD55	70	Leucocitos	Factor de creciente de la aceleración
CD56	135-220	Subpoblaciones de células T y NK	N-CAM
CD57	CHO	Subpoblaciones de células T y NK	
CD58	40-65	Leucocitos	Ligando del CD2 (LFA-3)
CD59	18-20	Leucocitos y plaquetas	
CDw60	CHO	Subpobl. de células T, plaquetas	Gangliósido GD3
CD61	110	Plaquetas	$\beta$ -3 integrina
CD62	140	Plaquetas activadas	GMP-140
CD63	53	Plaquetas activadas	gp ....
CD64	75	Monocitos	Receptor Fc de IgG tipo I
CDw65	CHO	PMN, monocitos	Fucogangliósido
CD66	180-200	PMN	
CD67	100	PMN	
CD68	110	Monocitos/macrófagos	
CD69	34/28	Plaquetas, linfocitos activados	
CDw70		Células T y B activadas	
CD71	95	Células en proliferación	Receptor de transferrina
CD72	42/39	Células B	Ligando del CD5

CD73	69	Células B y subpobl. de células T	Ecto-5'-nucleotidasa
CD74	41/33	Células B y monocitos	Cadena invariable
CDw75	53	Células B y subpobl. de células T	
CD76	85/67	Células B y subpobl. de células T	
CD77	CHO	Células B activadas	Globotriaosilceramida
CDw78		Células B	

## LINFOCITOS T

Las células T deben su nombre a que en su proceso de maduración requieren de una estancia en el timo, un órgano linfoepitelial, en el cual los timocitos adquieren su receptor de Ag y aprenden a discriminar entre lo propio y lo no-propio. Funcionalmente, los linfocitos T pueden clasificarse en células citotóxicas, de ayuda y supresoras (1).

**a) Células T citotóxicas.** Son células con capacidad de lisar células malignas, infectadas por virus o células de trasplante (aloantígenos) a través del reconocimiento específico de Ag en un contacto célula-célula y la polarización y liberación de gránulos que contienen perforinas que inducen daño a la membrana de la célula blanco. Las células citotóxicas expresan CD3 y CD8 y su función está restringida por las moléculas clase I del CMH (3).

**b) Células T de ayuda.** Las células T CD4+ incluyen células con función de ayuda a linfocitos B y a otros miembros de las células T encargados de la inmunidad celular (4). Algunos reportes indican la existencia de células T CD4+ con función citotóxica, inducción de supresión, etc. Estudios recientes con clones de células T clasifican a las células T de ayuda en 2 tipos: Th1 y Th2 (5). Las células Th1 regulan la inmunidad mediada por células, mientras que las células Th2 regulan la producción de Ig's por las células B. Las células Th1 secretan en forma característica IL-2, Interferón- $\gamma$  y Factor de Necrosis Tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, mientras que no secretan las citocinas Th1.

**c) Células T supresoras.** Son células con capacidad de inhibir la proliferación y síntesis de mediadores biológicos (Ig's y citocinas) de otras células. Estas células expresan sobre su

superficie los marcadores CD3 y CD8, además del heterodímero  $\alpha/\beta$  y están restringidas por las moléculas clase II del CMH (6). La activación de células T supresoras es un mecanismo fisiológico que impide la síntesis inagotable de anticuerpos y citocinas que podría provocar daño a tejidos.

Las células T no solamente son heterogéneas en cuanto a sus funciones, sino también en cuanto a la expresión de moléculas de superficie. En este sentido, las células T se clasifican en células T que expresan el receptor tipo 2 para Ag de células T (RCT-2), constituido por el heterodímero  $\alpha/\beta$  y en células T que exhiben el receptor de Ag de células T tipo 1 (RCT-1) formado por el heterodímero  $\gamma/\delta$  (7). Aproximadamente un 95% de las células T de la sangre periférica expresan el RCT-2 y solo un 5% de ellas exhiben el RCT-1. Las células CD3+RCT-1+ no expresan CD4 ni CD8 y circulan en bajo número en la sangre, pero se hospedan preferencialmente en el epitelio superficial de la epidermis y las mucosas y se conocen como linfocitos intra-epiteliales (IEL) (8). La identificación de las células RCT-1+ o RCT-2+ puede realizarse mediante el empleo de AcMo's que reconocen a algunos de los polipéptidos del RCT-1 o RCT-2. Además el RCT se asocia a un complejo CD3 formado por 5 proteínas ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$ ) que sirven de vía de transducción de señales (9). Prácticamente todas las células T presentan el marcador CD3 y pueden identificarse por anticuerpo monoclonal anti-CD3 (2). De manera similar, todas las células T presentan el marcador CD2, el cual constituye el receptor para los eritrocitos de carnero y funciona como una vía de transducción de señales.

Las células T con RCT-2 se clasifican en células CD4+ y células CD8+: Las células CD4+ poseen función de ayuda (Th), mientras que las células CD8+ exhiben función citotóxica/supresora (Tc/s) (1). Las células T CD4+ reconocen los antígenos en asociación con las moléculas clase II del CMH, mientras que las células CD8+ los reconocen en el contexto de las moléculas clase I del CMH (10). Ambas subpoblaciones expresan los marcadores CD2 y CD3. Dentro de las células T CD4+ pueden distinguirse:

**1. Células de ayuda/memoria.** Son células que han sido previamente sensibilizadas por Ag (células de memoria), proliferan *in vitro* en respuesta a Ag soluble y proporcionan ayuda a las células B activadas en la producción de Ig's. Estas células son identificadas por el fenotipo CD4+CD29+ o CD4+CD45RO+ mediante AcMo's específicos (11).

**2. Las células no sensibilizadas por Ag.** Son células que no proliferan en respuesta a Ag soluble y no proporcionan ayuda a células B, y parecen funcionar como inductoras de supresión. Estas células se reconocen por el fenotipo CD4+CD45RA+ (4).

Las células T CD8+ contienen células con función citotóxica, supresora y contrasupresora. Las células CD8+CD28+ poseen función citotóxica, mientras que las células CD8+CD28- ejercen función supresora (12). La reactividad con la lectina *Vicia villosa* identifican a las células CD8+ con función contrasupresora. Las células T CD8+ pueden definirse en subpoblaciones con funciones específicas, tales como las células CD8+CD11b+ reconocen Ag's asociado con el MHC y producen IL-2. Un estudio reciente con ratones indica que las células T CD8+ parecen dividirse también en tipo 1 (citotóxicas) y tipo 2 (supresoras), las primeras son CD45RA+ y no secretan IL-10, mientras que las supresoras son CD45RA- y secretan IL-10 (13). Algunas células CD3+TCR-1+ del epitelio mucoso intersticial también expresan el CD8 y quizá representan una población citotóxica primitiva que opera en los sitios de entrada de microorganismo.

## **LINFOCITOS B**

Los precursores de las células B se encuentran en la Bolsa de Fabricio de las aves y en la médula ósea de los mamíferos adultos. Los linfocitos B poseen Ig's de superficie capaz de reconocer Ag y que una vez activados se diferencian en células plasmáticas productoras de Ac's (1). Estas glicoproteínas están constituidas por 5 clases distintas (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) y poseen actividad de Ac, es decir pueden unirse al Ag que indujo su formación y así lo neutralizan o facilitan su eliminación. La detección de la IgM de superficie con Ac anti- $\mu$  fue por muchos años una técnica para identificar a la mayoría de los linfocitos B (1). Otras moléculas de superficie de las células B incluyen las moléculas clase II del CMH, receptores del complemento, receptores para IgG, así como los marcadores CD19, CD20 y CD22 (2). La expresión de algunos de estos marcadores depende de su etapa de diferenciación o activación.

## **CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO**

Las células presentadoras de antígeno (CPA) son una población heterogénea de leucocitos que incluyen monocitos/macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, etc. (1). La presentación de

Ag no requiere necesariamente que sea una célula fagocítica, pero requiere que exprese sobre su membrana las moléculas del CMH. Algunas células expresan las moléculas del CMH en forma constitutiva, mientras que en otras células su expresión puede inducirse mediante la exposición a citocinas, tales como interferón- $\gamma$  para inducir la expresión de las moléculas clase II o el TNF- $\alpha$  para la expresión de las moléculas clase I. Las CPA's se encuentran principalmente en piel, ganglios linfáticos, bazo y timo. La piel es un órgano inmune, capaz de inducir respuestas inmunes e inflamatorias. En la piel, las CPA están constituidas por las células de Langerhans de la epidermis. Estas células pueden movilizarse y migrar por los vasos linfáticos aferentes hacia la paracorteza de los ganglios linfáticos drenantes y aquí interdigitarse con algunas células T. Esto proporciona un eficiente sistema de presentación de Ag's llevados desde la piel hasta los ganglios linfáticos drenantes. Las CPA's, además de presentar el Ag, exhiben moléculas que funcionan como adhesinas o coestimulantes y son capaces de secretar diversas citocinas (1).

## CITOCINAS

Las citocinas, interleucinas, interferones o factores estimuladores de colonias son polipéptidos glicosilados que se producen durante las reacciones inmunes e inflamatorias y actúan en una forma inespecífica de Ag. Estas moléculas producen efectos biológicos profundos sobre el mismo tipo de células que las produjo (mecanismo autócrino) o sobre células diferentes a las productoras (mecanismo parácrino) a bajas concentraciones y actúan como mediadores bioquímicos para enviar mensajes de activación y regulación en forma local o sistémica (1). Las citocinas actúan sobre las células a nivel de receptores específicos de membrana. Las citocinas pueden actuar sobre el sistema hematopoyético para atraer células al sitio de inflamación, inducir proliferación celular, la expresión de moléculas de superficie y la secreción de mediadores o bien, inhibir la proliferación y función. Por otro lado, las citocinas pueden actuar fuera del sistema hematopoyético para inducir fiebre, secreción de proteínas de fase aguda, angiogénesis, fibrosis, síntesis de proteínas de la matriz intercelular, proteólisis del músculo, catabolismo del hueso, etc. (1). La determinación de la producción de citocinas por células individuales o en tejidos sanos o patológicos puede realizarse mediante el empleo de AcMo's específicos en técnicas de inmunofluorescencia o inmunotinción. Estas metodologías pueden aplicarse a células en suspensión o fijas en algún tejido.

## CD28 y CD73

La molécula CD28 es una glicoproteína homodimérica de 44 kDa unida por puentes disulfuro que pertenece a la superfamilia de genes de las Ig's y exhibe carga por la sialización de la fracción variable (14,15). Las células que la expresan pueden ser identificadas mediante varios anticuerpos monoclonales contra esta molécula que reconocen el mismo epítotope. El CD28 se expresa sobre el 80% de las células T de sangre periférica humana (16), mientras que las células B (CD19+) y células NK (CD16+) no lo expresan. La diferente densidad de expresión del CD28 sobre las células T CD4+ permite clasificarlas en dos subpoblaciones funcionalmente distintas (17). Por otro lado, las células CD8+ son divididas en 2 subpoblaciones CD28+ y CD28- en una proporción aproximadamente similar y con funciones distintivas *in vitro* (8). Algunos estudios indican que las células con citotoxicidad restringida por el MHC está contenida dentro de la subpoblación CD8+CD28+ (15) y que las células CD8+CD28- son responsables de la supresión de la producción de Ig's inducida por el mitógeno de Pokeweed (MPW) (18) y en las respuestas inmunes inducidas por aloantígeno (19). Sin embargo, existen reportes contradictorios, ya que las células T CD28- (CD11b+CD8<sup>brillante</sup>+) (12,15) tienen función citotóxica sin activación *in vitro* y de una manera independiente de la molécula B7, el ligando natural de CD28 (20). Por otro lado, existen células CD28+ y CD28- dentro de los linfocitos T con RCT  $\gamma/\delta$  (21), pero el papel del CD28 en esta subclase de células no ha sido determinado. El CD73 es un marcador de superficie celular correspondiente a la enzima ecto-5'-NT) y esta se localiza en la membrana plasmática externa de subpoblaciones de linfocitos T y B (22). Esta enzima cataliza la desfosforilación de ribo- y desoxiribonucleósidos monofosfato purínicos y pirimidínicos a sus correspondientes ribo y desoxiribonucleósidos (23) y su expresión puede determinarse ya sea por ensayos enzimáticos o mediante un AcMo definido como CD73. Aproximadamente el 25% de las células T (24) y el 70% de las B (25) expresan actividad de ecto-5'-NT. De la fracción no-T solo las células B expresan la ecto-5'-NT (26). Esta enzima es considerada como un marcador de maduración de linfocitos T y B ya que las células T periféricas de adulto tienen 10 veces mas actividad de 5'-NT que los timocitos (27) y las células B de sangre periférica de adultos 5 a 6 veces mas que las del cordón umbilical (25,28). Además, las células productoras de Ig's en respuesta al MPW son del fenotipo ecto-5'-NT+ (29) y la síntesis *in vitro* de IgG en respuesta a MPW o al virus de Epstein-Barr (VEB) esta restringida por subpoblaciones de células B ecto-5'-NT+, mientras que la síntesis de IgM se lleva acabo

por las células B ecto-5'-NT-. Dentro de las células T, las células CD8+ poseen una mayor actividad de ecto-5'-nucleotidasa en comparación con las célula CD4+ (24). Las células ecto-5'-NT+ pueden definirse como CD73+ por inmunotinción con al AcMo CD73. De esta manera, las células T CD8+ expresan 2.5 veces mas que las CD4+. Además, el marcador CD11b define una subpoblación celular recíproca al CD73', ya que las células CD73- son CD11b+ y *viceversa*. Las células CD4-CD11b- tienen una actividad alta de ecto-5'-NT y son precursoras de las células T citotóxicas mientras que las células CD4-CD11b+ son ecto-5'-NT- y ejercen función supresora (30). La actividad de ecto-5'-NT esta disminuida en diversas inmunodeficiencias (26,31-33) y el SIDA (34). La actividad disminuida de la ecto-5'-NT en pacientes con hipogammaglobulinemia parece reflejar un estado inmaduro de las células B (35,36), mientras que en otras enfermedades podría reflejar una alteración en la proporción de subpoblaciones de células T. Por ejemplo, en los pacientes con hipogammaglobulinemia, ambas células T CD4+ y CD8+ muestran niveles reducidos de ecto-5'-NT. El hecho de que los pacientes con hipogammaglobulinemia presentan actividad baja de ecto-5'-NT sobre las células T y estas ejerzan una supresión aumentada *in vitro* sugiere que esta enzima sea útil como marcador de subpoblaciones. El número disminuido de células CD73+ correlaciona con una actividad enzimática reducida en pacientes con inmunodeficiencias (24). Los estudios de pacientes con inmunodeficiencia variable común (IVC), así como las de infantes normales recién nacidos indican que sus células B poseen baja actividad de ecto-5'-NT y una una pobre capacidad de sintetizar IgG en respuesta a MPW o VEB (37).

## SUBPOBLACIONES CELULARES EN ALGUNAS ENFERMEDADES

La determinación de subpoblaciones celulares en procesos infecciosos nos permite analizar los mecanismos de resistencia y susceptibilidad y su fisiopatogenia. De esta manera, en el SIDA se observa que las células T CD4+ de sangre periférica disminuyen progresivamente en número, lo cual correlaciona con un deterioro progresivo del sistema inmune (38), mientras que los linfocitos CD8+ están numéricamente normales o incluso aumentados. Sin embargo, existe evidencia de que las células CD8+ tienen un fenotipo alterado en cuanto a expresión de CD73 y otros marcadores (34). Se ha reportado aumentos transitorios de los linfocitos CD8+ en la mononucleosis infecciosa causada por algunos herpesvirus: citomegalovirus (CMV) o VEB (39). La lepra es una enfermedad crónica causada por el patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*

el cual se replica dentro de los macrófagos y las células de Schwann. Existe amplia evidencia que la inmunidad celular juega un papel central en la resistencia contra esta enfermedad (40). La infección con *M. leprae* forma un espectro clínico que se correlaciona con el tipo de respuesta inmune (41). En un polo del espectro clínico, los pacientes LL exhiben múltiples lesiones multibacilares en la piel y una anergia inmune celular *in vivo* e *in vitro* hacia los Ag's de *M. leprae*, lo cual contrasta con una producción alta de Ig's (42,43). En el otro polo del espectro, los pacientes TT presentan pocas lesiones en la piel con pocos bacilos, pero presentan una vigorosa respuesta inmune celular a los Ag's de *M. leprae* (42,43). El análisis inmunohistológico de las lesiones de lepra indican que las células CD4+ predominan en número en comparación con las células CD8+ en los granulomas TT; mientras que las células CD8+ están aumentadas en proporción en los granulomas LL (44). Además, las lesiones TT presentan un predominio de células CD4+CD29+ y exhiben un mayor número de células CD8+CD28+ (citotóxicas) que CD8+CD28- (45). Por otro lado, las lesiones LL presentan un mayor número de células CD8+CD28- (supresoras) que de CD8+CD28+ (45). La generación de clonas CD3+,CD8+ con RCT  $\alpha/\beta$  derivadas de lesiones LL indican que estas ejercen función supresora *in vitro* a Ag's de *M. leprae* sobre clonas CD4+ con restricción a moléculas clase II del CMH (6). En contraste, las clonas CD4+ derivadas de lesiones TT proliferan *in vitro* en respuesta a *M. leprae* (6,46).

## INTERLEUCINA-6 (IL-6)

Esta glicoproteína induce y regula las respuestas inmunes, de fase aguda, hematopoyesis etc. (47,48). Inicialmente fue conocida como interferón- $\beta$ 2 (IFN- $\beta$ 2) (49), factor 2 estimulador de células B ((BSF-2) (50), proteína de 26 Kda (51), factor de crecimiento de hibridoma/plasmacitoma (HPGF o IL-HP1) (52), factor estimulante de hepatocito (HSF) (53) e inductor de granulocitos y monocitos tipo 2 (MGI-2) (54), demostrándose posteriormente que se trataba de la misma molécula (55). La IL-6 es una citocina pleiotrópica producida por una variedad de células y que actúa sobre un amplio rango de tejidos. La IL-6 esta involucrada en la inducción de la diferenciación de células B, la inducción de la expresión de IL-2 y el receptor de IL-2 (IL-2R) sobre células T, proliferación y diferenciación de células T, incremento en la actividad NK, inducción de proteínas de fase aguda en el hepatocito, induce el crecimiento de células de mieloma/plasmacitoma/hibridoma, inhibición del crecimiento de ciertas líneas

celulares leucémicas de mieloma e inducción de su diferenciación a macrófagos, aumento de la formación de colonias multipotenciales inducidas por IL-3 e inducción de la maduración de megacariocitos a un factor trombopoyético, inducción del crecimiento de células mesangiales, inducción de la diferenciación neural de células PC12 e inducción del crecimiento de queratinocitos (47,48,56). La observación de la producción anormal de IL-6 se ha relacionado con la patogénesis de varias enfermedades; por ejemplo: activación policlonal de células B con producción de auto-anticuerpos en pacientes con mixoma cardíaco (57), enfermedades autoinmunes, neoplasia de células plasmáticas y glomerulonefritis (46,58,59).

## OBJETIVOS

Estandarizar y emplear técnicas de inmunotinción enzimática que permitan la identificación de poblaciones y subpoblaciones celulares en base a marcadores de superficie, así como productos solubles (interleucinas) de las células que regulan el sistema inmune e identificar las células que los producen.

Evaluar las técnicas de inmunotinción en el estudio de la inmunopatología de la lepra por medio de la caracterización y enumeración de subpoblaciones celulares en sangre periférica y en lesiones de piel.

## JUSTIFICACION

Este trabajo esta diseñado para identificar subpoblaciones celulares y proteínas de secreción de algunas células del sistema inmune de una manera específica, sensible, confiable y relativamente baja en su costo. Esta metodología es nueva en esta Facultad y su estandarización permitirá aumentar la capacidad de investigación en el área de Inmunología y en otras áreas donde su aplicación resulte conveniente. El desarrollo de estas técnicas puede llevarse a cabo en un laboratorio estándar sin necesidad de contar con una gran infraestructura y equipo costoso y sin tener que contar con personal técnico altamente especializado.

***MATERIAL***  
***Y***  
***METODOS***

**Pacientes e individuos sanos.** El diagnóstico de lepra se hizo de acuerdo a la clasificación de Ridley & Joplin (40) y los pacientes fueron vistos en la Clínica A de la Secretaría de Salud de León, Gto. por el Dr. Rito García Aguayo. Para los estudios de biopsia se incluyeron 8 pacientes con lepra lepromatosa (LL), 3 con lepra tuberculoide (TT), 4 con eritema nodoso leproso (ENL) y 3 individuos sanos con reacción de Mitsuda. Para los estudios de sangre periférica se incluyeron 2 pacientes LL, 2 TT y 18 individuos sanos. La reacción de Mitsuda se indujo mediante la inoculación intradérmica de lepromina derivada de armadillo, (0.1 ml de una suspensión de  $40 \times 10^6$  bacilos/ml) y se tomó la biopsia a los 21 días. Esta reacción se consideró positiva cuando la induración fue no menor de 5 mm de diámetro. La biopsia de piel se obtuvo limpiando con una torunda con alcohol el área de la lesión y por la inoculación de 0.5 a 1 ml de xilocaína al 2% (Astra Chemicals, S.A.) como anestésico local. Inmediatamente se tomó la biopsia haciendo girar un biopsiador desechable de 5 mm de diámetro (Acuderm Inc., Lawderle, Florida). El fragmento de piel así obtenido se congeló dentro de un criovial en un tanque de nitrógeno líquido ( $-180^\circ \text{C}$ ). Para los estudios de sangre periférica se obtuvo un volumen de 10/20 ml por punción venosa en jeringas con heparina (10-20 U/ml) y procesada inmediatamente en las 4 h subsecuentes a su obtención.

**Aislamiento de las células mononucleares (CMN) de sangre periférica.** Las CMN se obtuvieron mediante una dilución 1:2 de la sangre completa con buffer salino de fosfatos (BSF) y una centrifugación en gradientes de Histopaque (SIGMA Chemicals, Co., St. Louis, Missouri) en tubos cónicos de poliestireno de 15 ml (Falcon, Becton Dickinson, New Jersey). La sangre diluida (7-10 ml) se estratificó con 3 ml de Histopaque y se centrifugó a 1,300 rpm durante 30 minutos. Al final de la centrifugación, se colectaron las células de la interfase Histopaque-plasma con ayuda de una pipeta Pasteur y se lavaron con BSF (1,500 rpm x 15 min). Se repitieron los lavados 2 veces mas con BSF a 1,300 rpm x 10 min). Después del ultimo lavado, el paquete de células se resuspendieron en BSF suplementado con 2% de suero bovino fetal y se ajusto la concentración a  $10 \times 10^6$ /ml después de una cuenta en hematocitómetro de las células diluidas en solución de azul tripán al 2%.

**Obtención de preparaciones de citocentrífuga.** Se colocaron de 15 a 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión de células ( $10 \times 10^6$ /ml) en la parte central de portaobjetos, los cuales se centrifugaron a  $< 1,000$  rpm durante 40 s. Las células adheridas al vidrio se guardaron en portalaminillas de plástico

selladas con papel aluminio con etiqueta y se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio.

**Cortes finos de biopsias en microtomo/criostato.** El criostato/microtomo debe estar a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  con la cuchilla adentro (la temperatura óptima varia de acuerdo al tejido a examinar). Después la biopsia se extrae del tanque de nitrógeno líquido y se coloca sobre la platina del criostato en la cual previamente se ha colocado unas gotas de agua destilada, una vez congelada, se añade mas agua destilada sobre el tejido a fin de cubrirlo completamente y formar un cubo de hielo. El ángulo del tejido con la navaja debe ser aproximadamente de  $15^{\circ}$ ; un mayor o menor ángulo resulta en cortes enrollados. A continuación se procede a realizar los cortes accionando la manija hasta acercarse al bloque del tejido congelado. Conforme la navaja alcanza el tejido aparecen los cortes delgados de piel. Debe ponerse atención al espesor de las secciones y este se debe fijar a  $4\ \mu\text{m}$ . Se colocan de 4 a 5 cortes por laminilla, las cuales deben estar limpias (con alcohol). Las laminillas se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$  en portalaminillas de plástico recubiertas de papel aluminio y debidamente etiquetadas hasta su análisis.

**Tinción sencilla de inmunoperoxidasa.** Se hicieron cortes congelados de  $4\ \mu$  de grosor de las biopsias de piel en un microtomo/criostato (Tissue-Tek). Las secciones de tejido o las preparaciones de citocentrífuga fueron descongeladas y secadas totalmente al aire, enseguida se fijaron en acetona fría por 6 a 10 min. Después de permitir la evaporación de la acetona por secado al aire, se rehidrataron en BSF durante 10 min., y se bloquearon sitios inespecíficos de unión mediante una incubación en suero bloqueador (suero normal de caballo) por 30 min. A continuación se realizó la inmunotinción con anticuerpos monoclonales específicos contra distintos antígenos de superficie y anti-IL-6 de acuerdo a una técnica previamente descrita (44,45). Los anticuerpos primarios (IgG de ratón) incluyeron el anti- CD4, CD8, CD28 y CD73 y en algunos experimentos se incluyeron anti- CD14 y CD19. Las laminillas se incubaron durante 1 h con las diluciones de los AcMo's que se indican en la sección de resultados. Después de lavarse con BSF, las células positivas para cada marcador se revelaron con el sistema avidina/biotina (kit Elite ABC Vectastain, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Cal.). Para esto, se incubó por 30 min. con anticuerpo biotinilado de caballo anti-IgG de ratón (se recomienda que el suero bloqueador sea de la especie animal del anticuerpo biotinilado). Después de lavarse una vez mas, se añadió el complejo preformado de avidina-biotina-peroxidasa y se incubó por 30 min. Enseguida se lavaron las laminillas con BSF y se añadió el

substrato de la peroxidasa: peróxido de hidrógeno y 3-aminoetilcarbazol (AEC) disuelto en formamida y se incubó a temperatura ambiente por 2-4 min. Esta reacción enzimática produce un precipitado de color rojo en las células positivas para el anticuerpo primario utilizado. El control negativo incluye todos los reactivos de inmunoperoxidasa excepto el anticuerpo primario. Después de lavar las laminillas con agua de la llave, se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, lo cual hizo evidentes las células negativas. Esta tinción actúa a nivel del ADN obteniéndose una célula azul en su núcleo y transparente en su citoplasma en el caso de que fuera negativa, mientras que una célula positiva se observa de color rojo en el citoplasma con núcleo azul. Para una mejor apreciación de las células se utilizó un medio de montaje gelatina-glicerina obteniéndose una mejor resolución de los campos. El porcentaje de células positivas se determinó mediante el análisis al microscopio por dos observadores independientes y se evaluaron alrededor de 1,000 células en distintos campos.

**Inmunotinción de 2 colores.** La inmunotinción doble es una modificación de la tinción sencilla del kit ABC de peroxidasa, seguida por el desarrollo de un 2º color mediante el uso del kit de avidina-biotina-glucosa oxidasa o el de avidina-biotina-fosfatasa alcalina (Vectastain kit, Vector Laboratories, Burlingame, Cal.). El sistema de avidina-biotina-glucosa oxidasa emplea como substrato el nitroazul de tetrazolio y resulta en la formación de un precipitado de color violeta. Por otro lado, el uso del sistema de avidina-biotina-fosfatasa alcalina resulta en la formación de un producto insoluble de color azul claro. La inmunotinción para IL-6 en las lesiones de piel se realizó con el sistema peroxidasa (rojo). Después de lavar las laminillas, se añadió suero bloqueador por 10 min. de nuevo y después se añadió una dilución óptima de los anticuerpos contra CD4, CD8, o CD14 y se incubó por 1 h. Después de lavarse, las células fueron secuencialmente incubadas por 30 min. con anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón. Después las células fueron incubadas con el complejo avidina-biotina-fosfatasa alcalina. Las células IL-6+ fueron de color rojo, mientras que las células positivas para los Ag's CD tuvieron color azul claro en su citoplasma. Las células dobles positivas manifestaron ambos colores. En algunos experimentos, las células IL-6 positivas fueron reveladas mediante el sistema avidina-biotina-glucosa oxidasa y los antígenos CD se hicieron evidentes con el sistema de peroxidasa. En este caso, las células dobles positivas poseen los colores violeta y rojo en forma simultánea. Las laminillas de inmunotinción doble no se contratiñeron y el porcentaje de células dobles positivas se relacionaron tanto al número total de CMN, como al número de células

positivas al 1<sup>er</sup> marcador. En las preparaciones de citocentrífuga, los antígenos CD4 y CD8 fueron revelados con el sistema ABC de inmunoperoxidasa seguido de inmunotinción del CD28 o CD73 con el sistema ABC de fosfatasa alcalina. Las células dobles positivas exhibieron ambos colores (rojo y azul claro) y debido a que no se contratiñeron, su porcentaje se relacionó al número total de células que poseen color rojo (CD4+ o CD8+). Los controles negativos de la inmunotinción doble incluyeron una laminilla con todos los reactivos excepto el primero y segundo anticuerpo primario y esto siempre resultó en ausencia de color para las dos enzimas empleadas. El segundo control es importante para descartar una posible reacción cruzada entre los reactivos de la 2a tinción con los reactivos de la 1a tinción. Este control incluye la adición de todos los reactivos de la 1a y 2a reacción, con excepción del anticuerpo primario que define al 2<sup>o</sup> Ag. En este caso, se observó desarrollo de color para el 1<sup>er</sup> Ag y después de añadir todos los reactivos del 2<sup>o</sup> Ag con excepción del anticuerpo primario, resultó en una ausencia de color para el 2<sup>o</sup> Ag. Esto es importante debido a que los 2 Ac's primarios son del isotipo IgG de ratón y los 2 anticuerpos biotinilados están dirigidos contra IgG de ratón. La ausencia de desarrollo de color para el 2<sup>o</sup> Ag descarta una reactividad cruzada del 2<sup>o</sup> Ac biotinilado con el 1<sup>er</sup> Ac primario. Es decir, este control resultó únicamente en células con color para la primera reacción y negativas para el segundo color. En el caso de la inmunotinción doble no se utilizó contratinción ya que los valores que se desea obtener son los de las células que presentan el marcador hacia el que va dirigido el Ac primario y aquellas que manifiestan de manera simultánea tanto la molécula a la que va dirigido el Ac primario como la otra molécula a la que va dirigido el Ac primario de la segunda tinción. Por lo tanto, las células son lo bastante evidentes al expresar uno o dos colores.

**Análisis estadístico.** Se calculó la media y la Desviación Estándar (D.E.) para cada grupo. A fin de determinar si las diferencias entre los grupos estudiados tienen significancia estadística, se empleó la prueba t de Student.

# ***RESULTADOS***

## A. Estandarización de la técnica de inmunotinción sencilla y doble.

Como primer paso, determinamos la dilución óptima de varios anticuerpos monoclonales para realizar técnicas de inmunotinción en secciones de piel y en CMN de sangre periférica. En la Tabla 2 se enlistan los anticuerpos empleados, el isotipo y la dilución que dió los mejores resultados empleando el sistema ABC de peroxidasa (Ver Material y Métodos).

**TABLA 2.**  
**Anticuerpos monoclonales empleados en inmunotinción**

Ag.	Ac. Mo.	Isotipo	dilución biopsias	dilución CMN	Célula identificada
CD4	Leu 3a+b	IgG1	1:75	1:25	T ayuda
CD8	Leu 2a	IgG1	1:75	1:100	T supresor/citotóxico
CD14	LeuM3	IgG2b	1:100	1:100	monocitos/macrófagos
CD28	9.3	IgG2a	1:500	1:100	Subpoblación
CD73	7G2	IgG	1:500	1:100	Subpoblación
IL-6	BSF2-166	IgG1	40-80 µg/ml	N.D.	- - -

N.D. = no determinado

En la figura 1 se esquematiza el proceso de inmunotinción sencilla que utiliza el sistema ABC-peroxidasa para la detección de células CD4+, CD8+, CD28+, CD73+ e IL-6+ en CMN y en lesiones de piel. En la figura 2 y 3 se esquematiza la inmunotinción doble que emplea el sistema ABC-peroxidasa y ABC-fosfatasa alcalina (o ABC-glucosa oxidasa), así como el control negativo necesario para descartar la posible reacción cruzada entre los reactivos de la 1ª y 2ª

# INMUNOTINCION SENCILLA

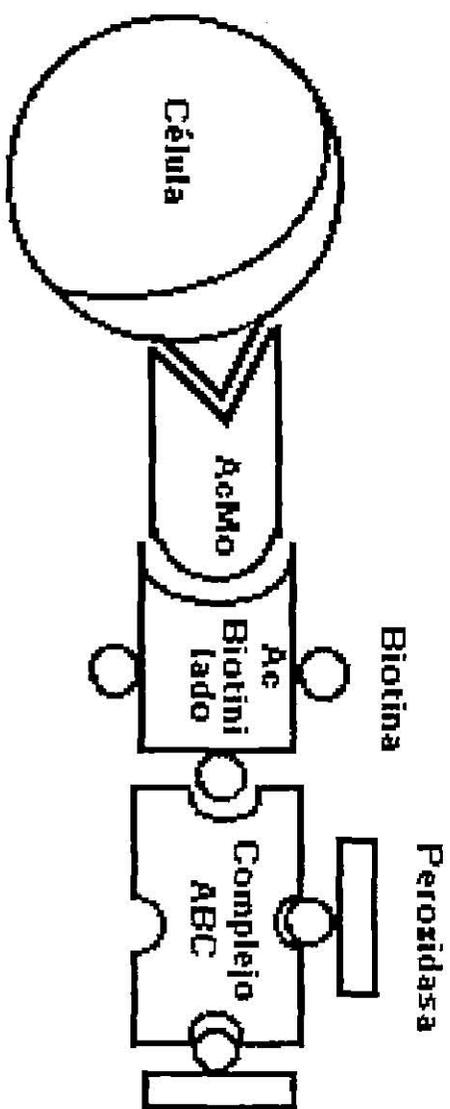
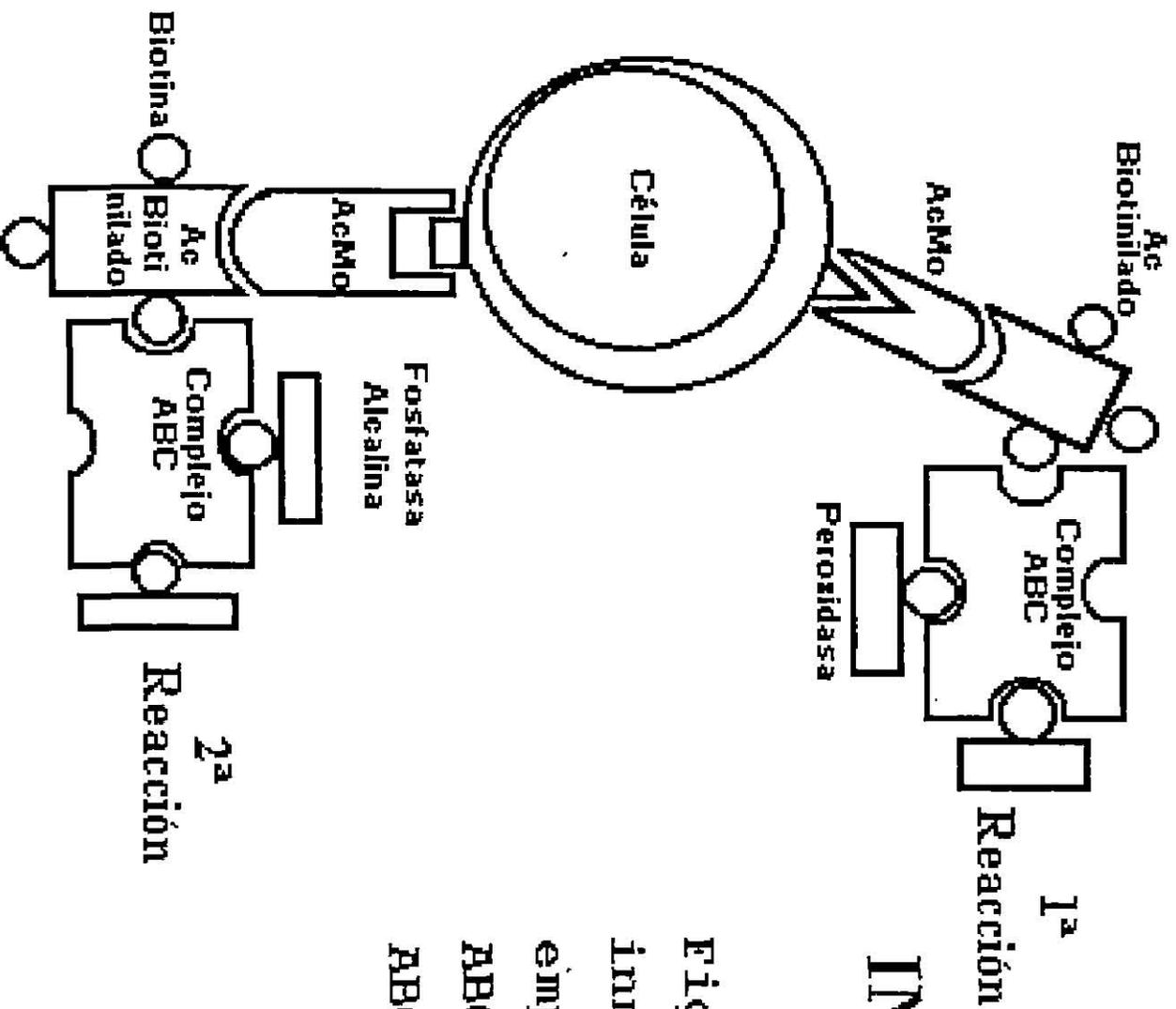


Figura 1. Esquema de la inmunotinción sencilla para la detección de subpoblaciones celulares e interleucina-6.



## INMUNOTINCION DOBLE

Figura 2. Esquema de la  
 inmunotinción doble que  
 emplea los sistemas  
 ABC-peroxidasa y  
 ABC-fosfatasa alcalina

# CONTROL NEGATIVO PARA LA INMUNOTINCION DOBLE

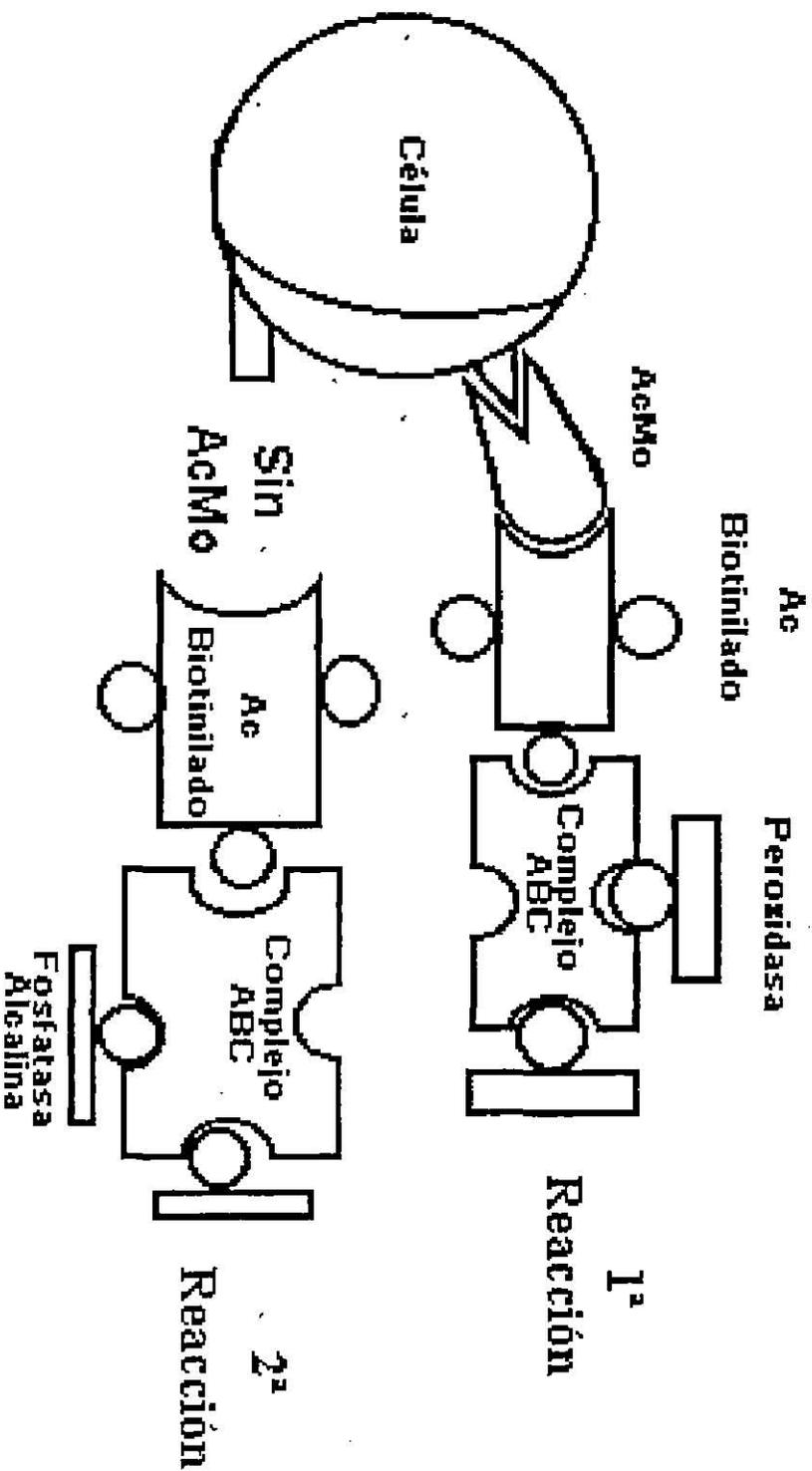
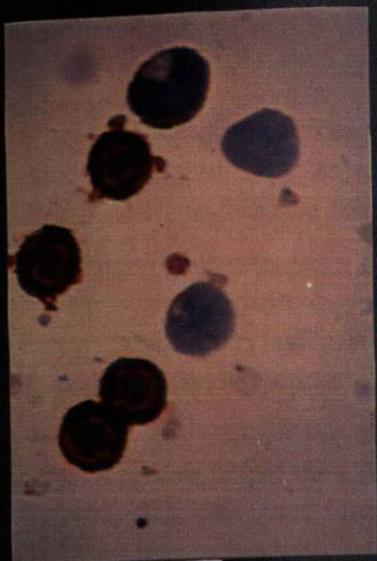


Figura 3. Esquema del control negativo que descarta la posible reacción cruzada entre los reactivos de la 1ª y 2ª inmunotinción.

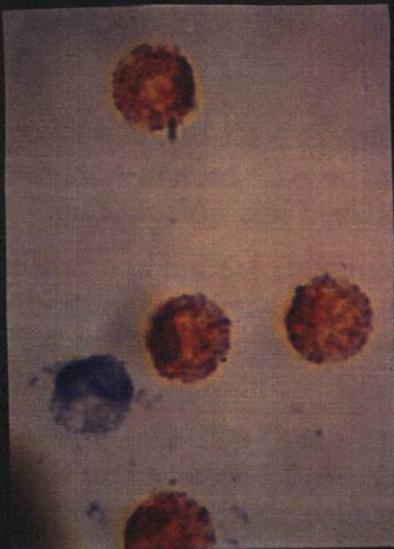
inmunotinción. En la figura 4A se puede observar el patrón típico de la inmunotinción sencilla de células CD4+ en CMN de un paciente TT. En la Figura 4B se observa la inmunotinción doble para CD4 y CD8 donde se observan 3 células sencillas CD4+ y una célula sencilla CD8+ y ausencia de células dobles positivas; esta laminilla sirve como un control adicional para descartar la reacción cruzada entre los 2 sistemas. En contraste, en la Fig. 4C se muestran 2 células dobles positivas CD4+CD28+ en forma simultánea y 3 células sencillas CD28+ de color azul. La inmunotinción doble fue mucho mas difícil de estandarizar que la sencilla, por ser una técnica más compleja. Además, la inmunotinción de las biopsias de piel representó una mayor dificultad en comparación a la de las CMN. Sin embargo, la tinción inespecífica de fondo (background) que en algunas ocasiones puede desarrollarse en la colágena de la piel pudo eliminarse optimizandose la concentración del Ac primario, por un lavado extensivo después de la incubación del anticuerpo (Ac) primario (este es el mas importantes para eliminar tinción inespecífica) y en ajustar rigurosamente el tiempo de exposición al sustrato. Un exceso de Ac. monoclonal primario o un lavado ineficiente del mismo puede en muchas ocasiones explicar el desarrollo de tinción inespecífica. Igualmente, los tiempos prolongados con el sustrato resultan en tinción inespecífica.

La Fig 4D muestra un control negativo de inmunotinción sencilla en una lesión TT contrateñida con Hematoxilina de Mayer destacándose células negativas con núcleo azul y una colágena sin color de fondo. Las Figs 4E y 4F representan el patrón típico de tinción para células sencillas CD4+ y CD8+, respectivamente, en una lesión TT. Cabe destacar la mayor proporción de células CD4+ distribuidas al azar a lo largo del granuloma, en comparación a las células CD8+, las cuales parecen limitarse a la periferia del granuloma TT. Estos hallazgos confirman lo reportado por Modlin y cols (44). A fin de probar que la 2ª tinción es específica y que no es el resultado de una reacción cruzada del 2º anticuerpo biotinilado con el 1º Ac primario o del complejo ABC-fosfatasa alcalina con el Ac biotinilado de la 1ª reacción, se incluyó el control (esquemático en la Fig. 3) y que se ilustra en la Fig. 4G. En este control cabe destacar la presencia de células sencillas rojas CD4+ y la ausencia de color azul de la 2ª tinción con fosfatasa alcalina. Las Figs. 4H y 4I representan un ejemplo de tinción doble para células CD4+CD28+ y CD4+CD73+, respectivamente en una lesión TT. En estas figuras puede observarse la presencia de células dobles positivas con un color más oscuro y de células sencillas rojas o azules. En el análisis por el microscopio, se contaron las células en cada campo de una

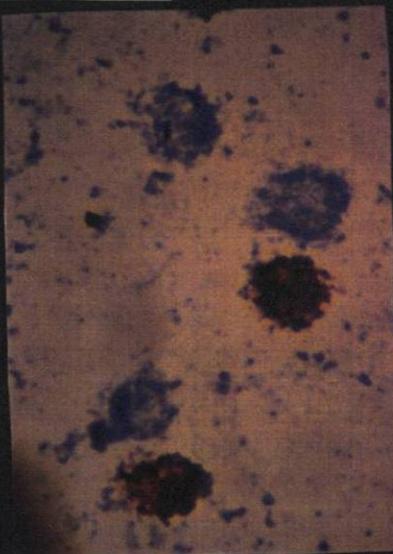
**FIGURA 4**



**A**



**B**



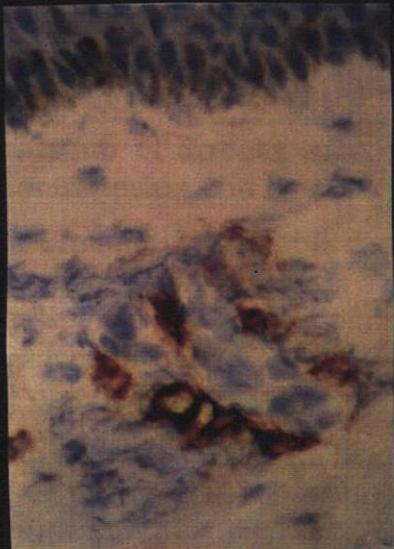
**C**



**D**



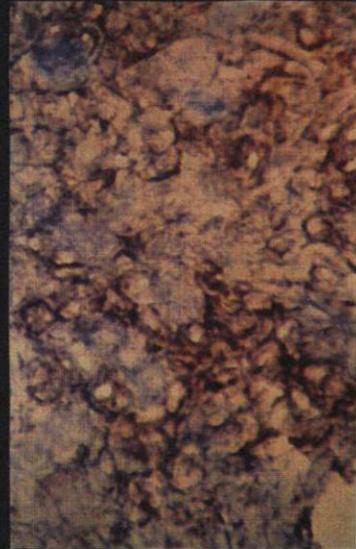
**E**



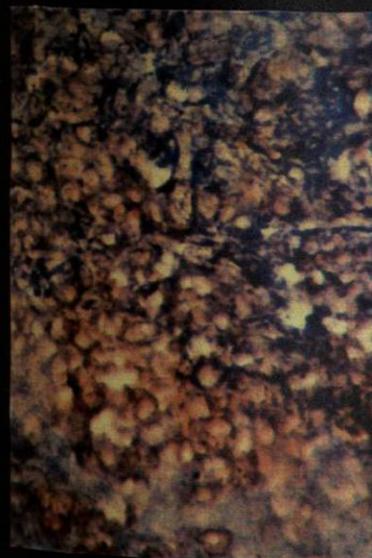
**F**



**G**



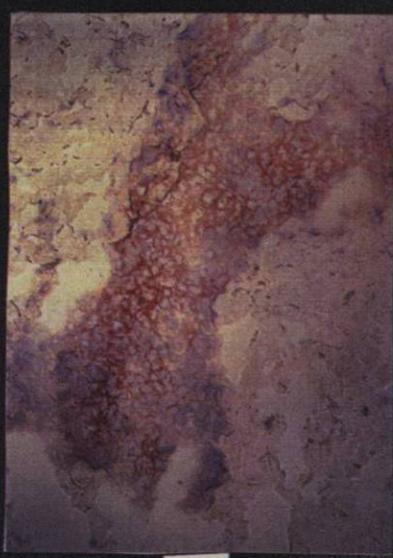
**H**



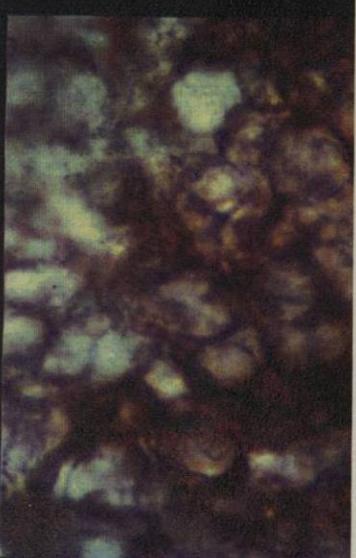
**I**



**J**



**K**



**L**

**Fig 4A.** Inmunotinción sencilla con anti-CD4 (immunoperoxidasa) en una preparación de CMN de un paciente TT. Se observan 4 células CD4+ fuertemente teñidas de color rojo y 3 células negativas con núcleo azul. Contratinción con hematoxilina de Mayer; objetivo 100x.

**Fig 4B.** Inmunotinción doble con anti-CD4 (immunoperoxidasa) y anti-CD8 (fosfatasa alcalina) en una preparación de CMN de un paciente TT. Las 4 células CD4+ exhiben precipitado de color rojo y la célula CD8+ de color azul. No aparecen células dobles positivas. Sin contratinción; objetivo 100x.

**Fig 4C.** Inmunotinción doble con anti-CD4 (immunoperoxidasa) y anti-CD28 (fosfatasa alcalina) de una preparación de CMN de un paciente TT. Se observan 2 células CD4+CD28+ con ambos colores y 3 células CD4-CD28+ sencillas de color azul. Sin contratinción; objetivo 100x.

**Fig 4D.** Control negativo de una lesión de piel TT. Se añadieron todos los reactivos de immunoperoxidasa excepto el AcMo. Contratinción con hematoxilina de Mayer; objetivo 40x.

**Fig 4E.** Inmunotinción sencilla con anti-CD4 (immunoperoxidasa) de una lesión de piel de un paciente TT. Se aprecia la gran cantidad de células CD4+ que infiltran la dermis y están distribuidas a lo largo del granuloma. Contratinción con hematoxilina de Mayer; objetivo 40x.

**Fig 4F.** Inmunotinción sencilla con anti-CD8 (immunoperoxidasa) de una lesión de piel de un paciente TT. Se puede distinguir el arreglo que tienen las células CD8+ distribuidas en la periferia del granuloma. Contratinción con hematoxilina de Mayer; objetivo 40x.

**Fig 4G.** Control negativo de inmunotinción doble con anti-CD4 (immunoperoxidasa) y sin AcMo primario para la segunda inmunotinción (fosfatasa alcalina) en una lesión de piel de un paciente TT. Se observan numerosas células CD4+ con citoplasma rojo y no es evidente el color azul. Este control negativo se esquematiza en la Fig 3 y descarta la posibilidad de una reacción cruzada. Sin contratinción; objetivo 40x.

**Fig 4H.** Inmunotinción doble con anti-CD4 (immunoperoxidasa) y anti-CD28 (fosfatasa alcalina) en un granuloma de piel de un paciente TT. Pueden observarse células CD4+ sencillas en color rojo, células CD28+ sencillas en color azul y células CD4+CD28+ con los 2 colores. Sin contratinción; objetivo 40x.

**Fig 4I.** Inmunotinción doble con anti-CD4 (immunoperoxidasa) y anti-CD73 (fosfatasa alcalina) en un granuloma TT. Se observan células CD4+ sencillas rojas, células CD73+ sencillas azules y células CD4+CD73+ con los 2 colores. Sin contratinción; objetivo 40x.

**Fig 4J.** Tinción de Ziehl Neelsen en una lesión de piel LL. Se observan numerosos bacilos de color rojo intenso dentro de los macrófagos demostrando la forma multibacilar de la enfermedad.

**Fig 4K.** Inmunotinción sencilla con anti-IL6 (Immunoperoxidasa) en un granuloma de piel de un paciente LL sin tratamiento. Se observa el gran número de células IL6+ de color rojo distribuidas a lo largo del granuloma. Contratinción con hematoxilina de Mayer; objetivo 40x.

**Fig 4L.** Inmunotinción doble con anti-CD8 (immunoperoxidasa) y anti-IL6 (glucosa oxidasa) en una lesión de piel de un paciente LL sin tratamiento. Se observan diversas células con ambos colores. Sin contratinción; objetivo 100x.

por una mediante el objetivo de inmersión (100x), tanto en las tinciones sencillas como en las dobles en las preparaciones de CMN de sangre periférica y en las de biopsia de piel. Fue posible evaluar las CMN con tinción sencilla con el objetivo de 40x. La evaluación se realizó por 2 personas, una de las cuales no sabía el marcador bajo estudio, posteriormente se compararon los valores que variaron alrededor de un 10% en las CMN. Se evaluaron de 500 a 1,000 células por laminilla, tanto en células de sangre periférica como en biopsias de piel. La dificultad para evaluar laminillas de biopsias fue significativamente mas grande que la de CMN de sangre periférica debido a la conformación y organización de los granulomas formados en la dermis. Para esto, se seleccionaron secciones de tejido que no presentaran dobleces y se evaluaron áreas con una buena infiltración de células que no estuvieran en la orilla del tejido, ya que estas tienden a presentar tinción inespecífica.

## **B. Estandarización de la evaluación microscópica.**

A fin de determinar la reproducibilidad y exactitud del método se procedió a analizar la variabilidad en el porcentaje de células positivas en campos diferentes bajo el objetivo de 100x y la variación subjetiva que puede haber entre 2 personas. La variabilidad existente de campo a campo al momento de su evaluación resulto no ser muy grande, aunque si aumenta cuando se trata de biopsia de piel. Como se muestra en la Tabla 3, la variación de campo a campo encontrada en células de sangre periférica es de 0 a 15%; mientras que en las de biopsia de piel los valores oscilan desde un 1% hasta 50% o hasta más en ocasiones aisladas; generalmente la variación de campo a campo osciló de un 10 a un 30%. Esto probablemente refleja la heterogeneidad del infiltrado celular en la dermis.

**Tabla 3.****Variabilidad en la evaluación de la inmunotinción en lesiones de piel.****A. Porcentaje de células CD4+ en una lesión LL.****Observador 1**

Campo	células evaluadas	células positivas	% CD4+	% variabilidad (*)
1	330	29	8.8	23
2	513	58	11.3	2
3	280	43	15.3	32
Total:	1,123	130	11.5	0
media ± D.E.			11.5 ± 3.2	19 ± 15.3

**Observador 2**

1	227	37	16.2	5
2	292	60	20.5	19
3	292	43	14.7	14
Total:	811	140	17.2	0
media ± D.E.			17.1 ± 3.0	13 ± 6.7

**B. Porcentaje de células CD8+ en una lesión LL.****Observador 1**

Campo	células evaluadas	células positivas	% CD8+	% variabilidad
1	353	89	25.2	5
2	269	59	21.9	18
3	532	93	17.4	35
4	364	90	24.7	7
5	683	257	37.5	40
Total:	2,201	588	26.7	0
media ± D.E.			25.3 ± 7.4	21 ± 15.9

**Observador 2**

Campo	células evaluadas	células positivas	% CD8+	% variabilidad
1	215	61	28.3	5
2	200	60	30.0	0
3	116	38	32.7	9
Total:	531	159	29.9	0
media ± D.E.			30.3 ± 2.2	4.6 ± 4.5

### C. Porcentaje de células CD73+ en una lesión LL.

#### Observador 1

Campo	células evaluadas	células positivas	% CD73+	% variabilidad
1	211	26	12	38
2	242	57	23	19
3	82	23	28	45
4	74	13	17	12
5	94	20	21	9
6	76	15	19	12
7	74	11	15	22
Total:	853	165	19.3	0
media ± D.E.			19.2 ± 5.3	22.4 ± 13.9

#### Observador 2

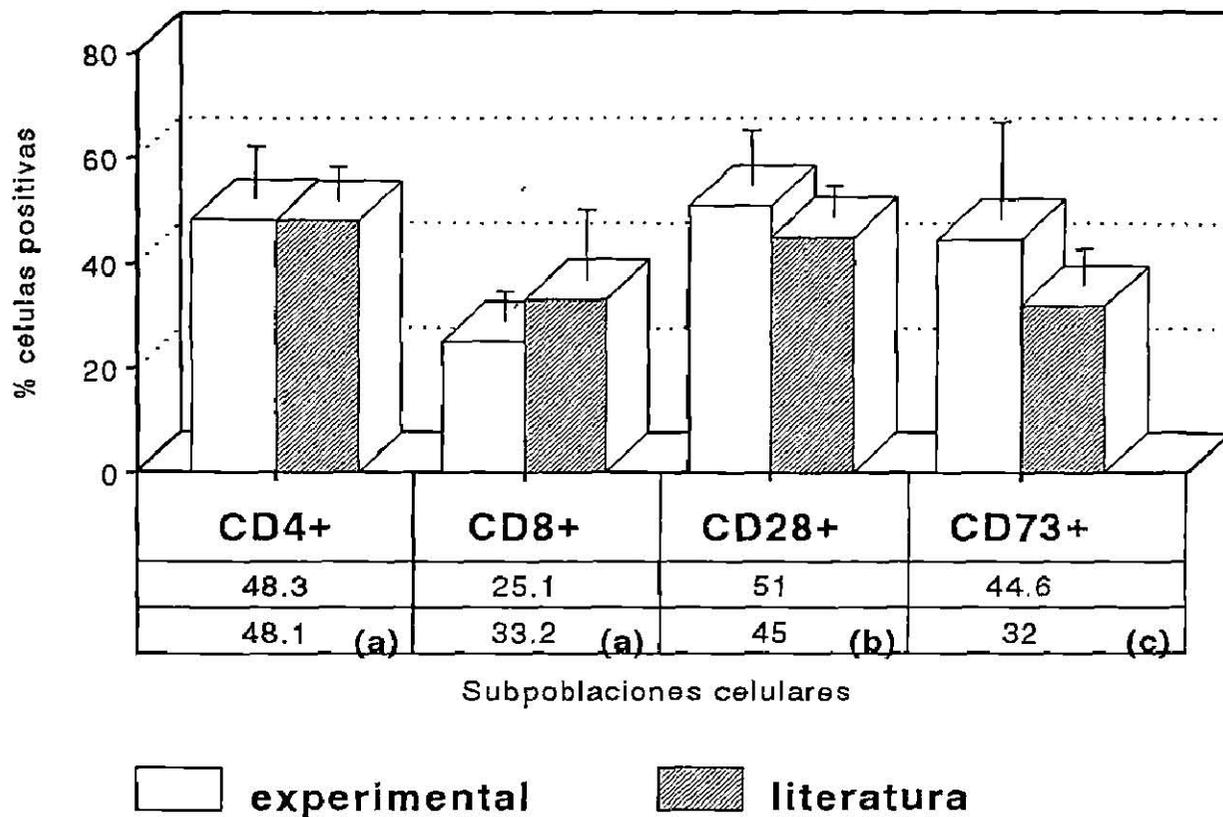
Campo	células evaluadas	células positivas	% CD73+	% variabilidad
1	382	59	15.4	10
2	350	94	26.8	56
3	368	43	11.7	31
4	419	64	15.2	11
Total:	1,519	260	17.1	0
media ± D.E.			17.2 ± 6.5	27 ± 21.6

### D. Porcentaje de células CD28+ en una lesión LL.

#### Observador 1

Campo	células evaluadas	células positivas	% CD28+	% variabilidad
1	117	15	12.8	18
2	208	40	19.2	22
3	204	23	11.2	28
4	186	22	11.8	25
5	245	51	20.8	32
Total:	960	151	15.7	0
media ± D.E.			15.1 ± 4.5	25 ± 5.3

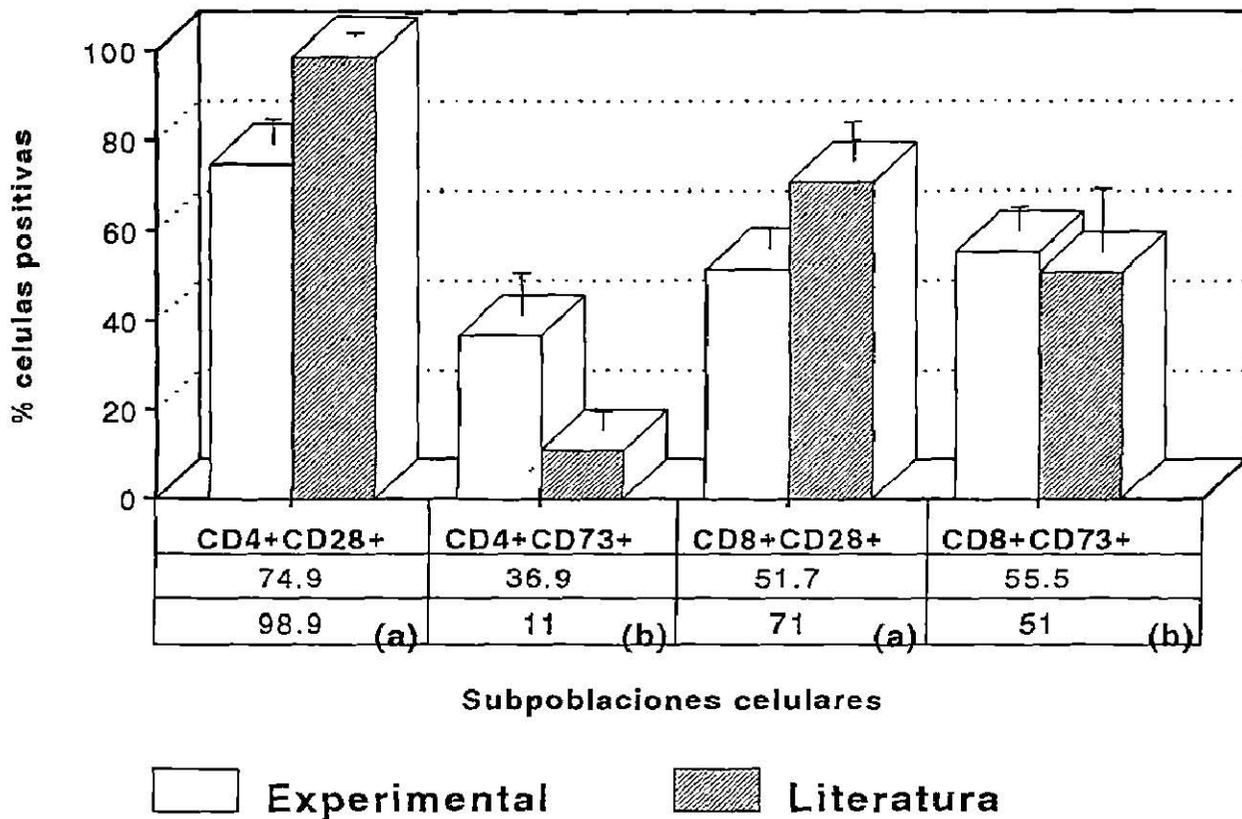
(\*) Los resultados se expresan como el número de CMN totales evaluadas y células positivas por campo, al igual que como el porcentaje de células positivas por campo y por 2 individuos independientes. La variabilidad se refiere al porcentaje de la diferencia del campo en observación con respecto al valor promedio de la suma de todos los campos.



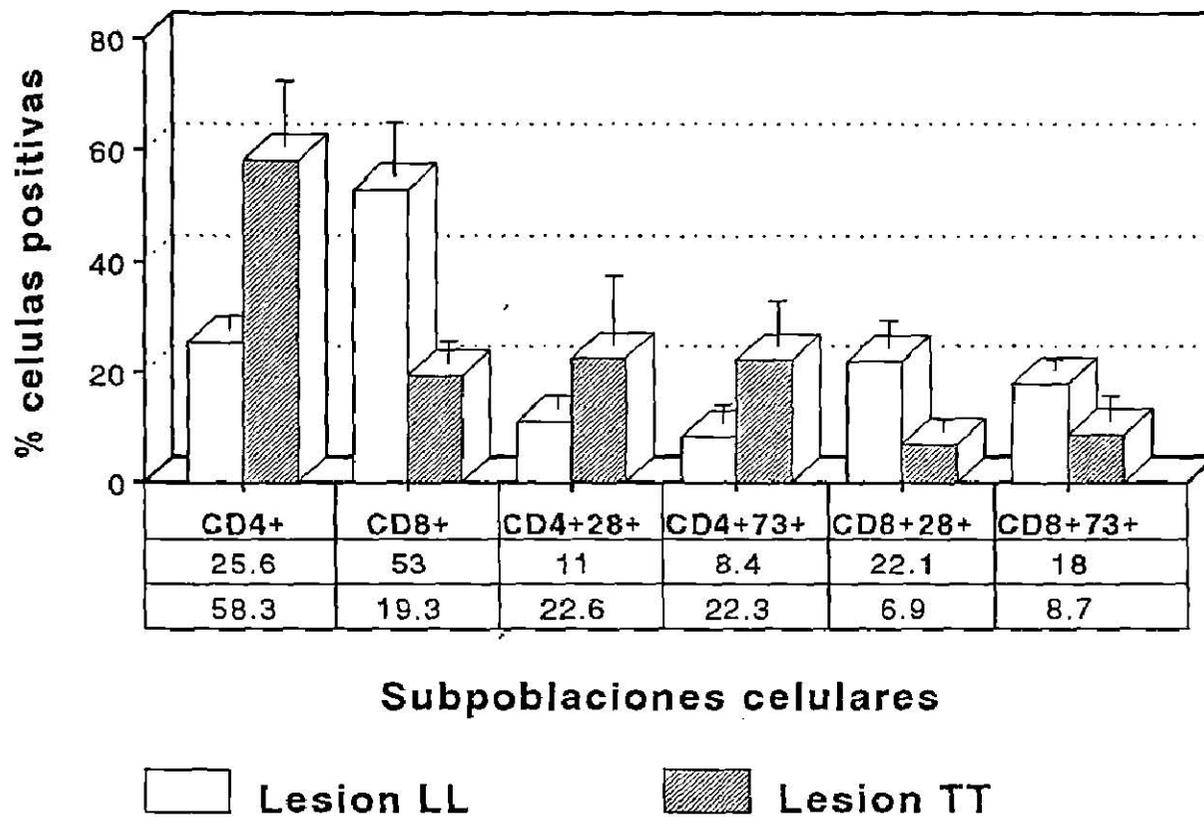
**Figura 5. Subpoblaciones celulares en individuos sanos.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. de los porcentajes de células positivas en una suspensión de CMN por inmunotinción sencilla en 12 individuos sanos. Los valores de referencia fueron obtenidos por otros investigadores mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo: (a) Ref. 44; (b) Ref. 12; (c) Ref. 29.

### **C. Cuantificación de células CD4+, CD8+, CD28+ y CD73+ y células dobles positivas CD4+CD28+, CD4+CD73+, CD8+CD28+ y CD8+CD73+ en sujetos sanos.**

En la Figura 5 se muestran los porcentajes de las subpoblaciones celulares analizadas en los individuos sanos y se comparan con los porcentajes reportados en la literatura para la expresión de CD28 y CD73 sobre linfocitos CD4+ y CD8+ empleando citometría de flujo. El porcentaje de células positivas para CD4, CD8, CD28 y CD73 obtenido por inmunoperoxidasa fué muy similar a los valores reportados en la literatura y no se observaron diferencias estadísticas significativas para cada subpoblación. El número de células CD73+ fué ligeramente mayor que los porcentajes reportados por Thompson y cols (29,66), quien utilizó el mismo AcMo y citometría de flujo, si bién nuestros datos estan realizados sobre CMN totales, mientras que los reportados en la literatura se basan sobre las células CD3+ y se excluyen células B y otras poblaciones celulares. Los datos de inmunotinción doble en los individuos sanos indican que aproximadamente 2/3 partes de las células T CD4+ coexpresan la molécula CD28 y poco mas de 1/3 exhiben el CD73. Por otro lado, dentro de las células CD8+ tanto el CD28 como el CD73 se expresan en proporciones similares, es decir aproximadamente en la mitad de las células CD8+. La Fig 6 muestra los resultados de inmunotinción doble y se comparan a los porcentajes reportados en la literatura por citometría de flujo. Nuestros valores sobre el porcentaje de células CD4+ que expresan CD28 ( $74.9 \pm 5.5 \%$ , n=12) son significativamente diferentes ( $p < 0.025$ ) al porcentaje reportado por otros investigadores ( $98.9 \pm 0.88$ , n=7) mediante citometría de flujo. Por otro lado, nuestro resultado sobre el porcentaje de células CD4+ que expresan CD73 ( $36.9 \pm 9.4 \%$ , n=12) no es estadísticamente diferente al valor reportado por otros investigadores ( $11 \pm 4 \%$ , n=10). De manera similar, no se encontraron diferencias estadísticas en los valores reportados sobre células CD8 que expresan CD28 o CD73 en comparación a lo reportado por otros investigadores.



**Figura 6. Expresión de CD28 y CD73 sobre células CD4+ y CD8+ en sujetos sanos.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. de los porcentajes de células que expresan el marcador CD28 o CD73 en cada una de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ o CD8+ mediante inmunotinción doble en 12 individuos sanos. Los valores de referencia fueron obtenidos por otros investigadores mediante citometría de flujo: (a) Ref. 72; (b) Ref. 66.



**Figura 7. Subpoblaciones celulares en lesiones de piel de pacientes con lepra.**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. del porcentaje de células mononucleares totales que expresan los marcadores respectivos que se indican. Resultados derivados de lesiones de piel de 3 pacientes LL y 3 con TT mediante inmunotinción sencilla y doble.

#### **D. Inmunotinción de CD28 y CD73 en células T en las lesiones de piel de pacientes con lepra.**

A continuación, se realizó inmunotinción sencilla y doble en lesiones de piel de pacientes con lepra. En la Fig 4J se muestra una biopsia de un granuloma LL teñida con la técnica de Ziehl Neelsen que ilustra la forma multibacilar de la enfermedad. Se observan un gran número de micobacterias intracitoplásmicas teñidas de color rojo intenso y núcleos de color azul claro de los macrófagos y otras células que infiltran la lesión. Los pacientes LL presentaron una gran cantidad de bacilos en las lesiones; en contraste, los pacientes TT presentaron una carga bacilar pequeña (forma paucibacilar) resultando muy difícil la demostración de micobacterias en la lesión. La inmunotinción de células CD4+ y CD8+ en 3 pacientes con LL y 3 con TT confirmaron los hallazgos reportados previamente por Modlin y cols (44). En la Fig 7 podemos observar que las lesiones LL se caracterizan por un predominio numérico de células CD8+ en comparación a las células CD4+; mientras que en las lesiones TT, además de presentar un granuloma organizado (Fig 4E y 4F) se caracterizan por un mayor número de células CD4+ que CD8+. Esta distribución preferencial de células CD4+ y CD8+ en las lesiones TT y LL, respectivamente se reflejan también en los porcentajes de células que expresan CD28 y CD73. Es decir, el número de células CD4+CD28+ y CD4+CD73+ es mayor en la lesión TT en comparación a la lesión LL; mientras que las células CD8+CD28+ y CD8+CD73+ están aumentadas en número en el granuloma LL en comparación al TT. A fin de analizar si existe alguna expresión diferencial de CD28 y CD73 sobre las células CD4+ o CD8+ que infiltran las lesiones, los resultados se expresaron en porcentaje de células CD4+ o CD8+. La Fig 8 muestra que la expresión de CD28 y CD73 específica sobre células CD4+ y CD8+ no es significativamente diferente entre las lesiones LL y TT. Las lesiones LL presentaron un ligero aumento en el número de células CD8+CD73+ en comparación a las lesiones TT, si bien esta diferencia no fué estadísticamente significativa. Además, los valores encontrados en las lesiones no es diferente a lo encontrado en las CMN de sangre periférica de los pacientes LL.

**TABLA 4:**  
**ANALISIS DE MARCADORES DE LINFOCITOS EN CÉLULAS**  
**MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE SUJETOS SANOS**

	CD4	CD8	CD4 CD28	CD4 %	CD4 CD73	CD4 %	CD8 CD28	CD8 %	CD8 CD73	CD8 %
1)	45.0	20.0	36.0	80.0	11.7	26.0	10.8	54.0	10.8	54.0
2)	33.0	15.0	24.1	73.0	13.5	41.0	8.1	54.0	7.5	50.0
3)	59.0	25.0	42.0	71.0	19.5	33.0	13.5	54.0	12.0	48.0
4)	63.0	28.0	39.7	63.0	12.6	20.0	13.2	47.0	14.6	52.0
5)	46.0	29.0	35.0	76.0	22.1	48.0	14.0	48.0	24.6	63.0
6)	64.0	21.0	47.4	74.0	24.3	38.0	9.2	44.0	11.3	54.0
7)	55.0	29.0	38.0	69.0	20.4	37.0	13.6	47.0	16.5	57.0
8)	45.0	16.0	34.2	76.0	18.0	39.0	8.0	50.0	10.1	63.0
9)	39.0	30.0	31.2	80.0	11.0	28.0	18.3	61.0	19.2	64.0
10)	37.0	33.0	28.0	75.0	17.0	46.0	17.2	52.0	17.2	52.0
11)	51.0	26.0	40.0	78.0	22.5	50.0	14.3	55.0	13.5	52.0
12)	43.0	30.0	36.1	84.0	ND	ND	16.5	55.0	17.1	57.0
media	48.3	25.1	35.9	74.9	17.5	36.9	13.0	51.7	14.5	55.5
D.E.	10.1	5.8	6.2	5.5	4.7	9.4	3.4	4.7	4.6	5.5
E.E.	2.9	1.6	1.8	1.6	1.4	2.8	0.9	1.3	1.3	1.5

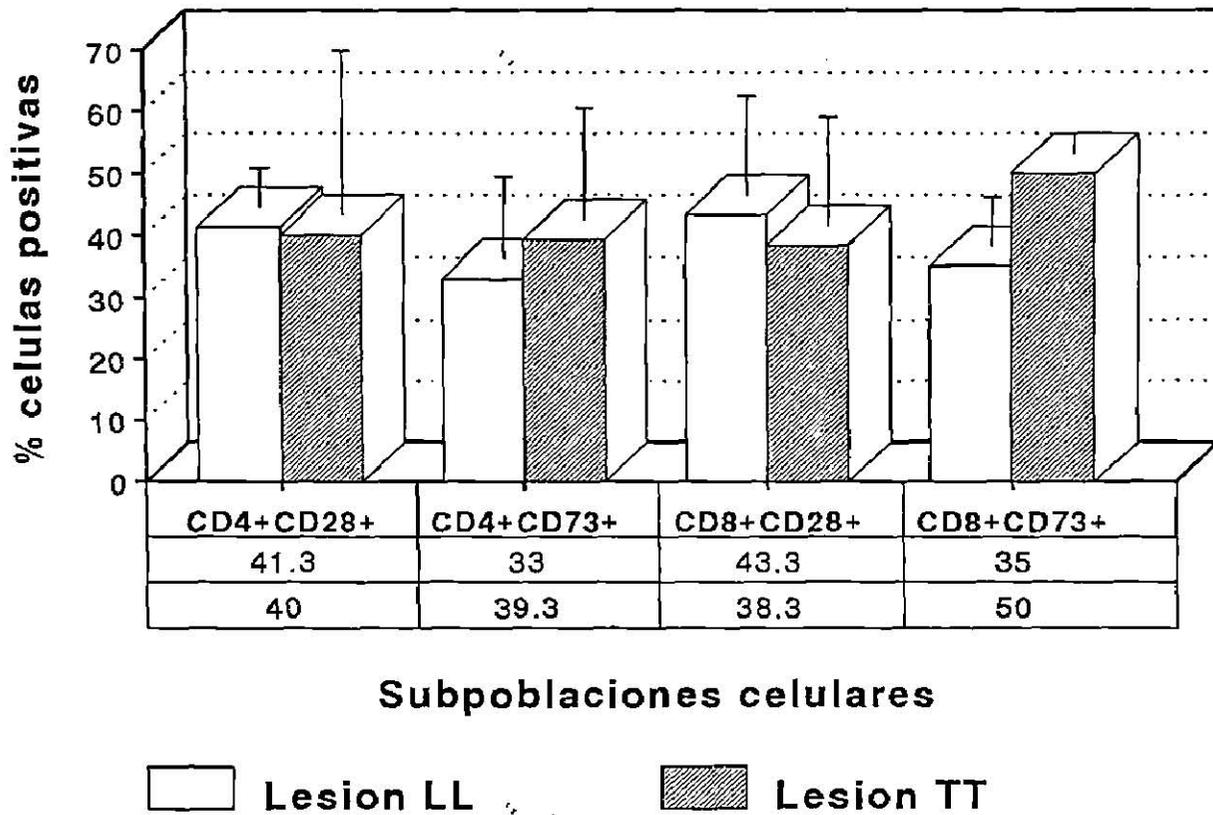
Las CMN fueron analizadas por inmunotinción sencilla y doble como se indica en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentajes de células positivas para cada marcador o par de marcadores. En la inmunotinción doble, la primera columna denota el % de células positivas de la población total de CMN; mientras que la segunda columna denota el porcentaje de células que expresan el 2º marcador (CD28 o CD73) dentro de la subpoblación de células T (CD4+ o CD8+). N.D. denota no determinado. E.E. denota el error estándar de la media.

## E. Inmunotinción sencilla de IL-6 en lesiones de piel.

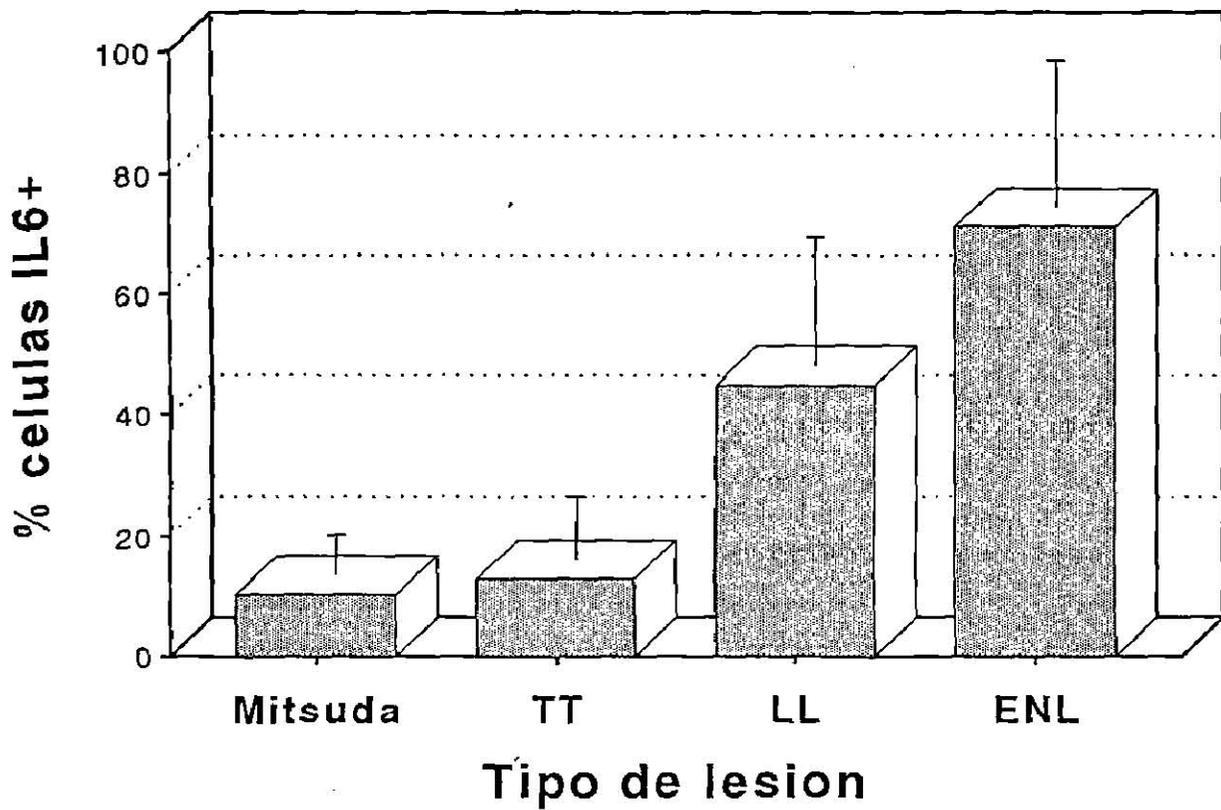
La inmunotinción sencilla con el AcMo anti-IL6 resultó en un número variable de células IL-6+ en las lesiones de piel a lo largo del espectro clínico de la lepra. Las lesiones LL exhibieron un número substancial de células IL-6+, con valores desde 5 hasta 80%. La inmunotinción fue específica en vista de que la preincubación del Ac. anti-IL-6 con IL-6 recombinante resultó en una inhibición del desarrollo de color en una lesión de piel de lepra lepromatosa. La Fig 9 muestra que las lesiones LL tienen un porcentaje significativamente mayor de células IL-6+ ( $44.8 \pm 21.6$  % células IL-6+ n=8) en comparación a los granulomas TT ( $12.8 \pm 10.5$  % células IL-6+, n=3,  $p < 0.05$ ) y a las RxM ( $10.2 \pm 6.8$  %, n=4,  $p < 0.02$ ), mientras que no hubo diferencia significativa entre las lesiones TT y RxM. En el ENL, la inmunotinción con anti-IL6 resultó en un porcentaje mayor de células IL6+ ( $71.2 \pm 24.2$  %, n=4) en comparación a las lesiones LL, si bien este aumento no fué significativo. La Fig 4K muestra un gran número de células IL-6+ a lo largo de un granuloma LL de un paciente sin tratamiento.

## F. Inmunotinción doble de las células IL6+.

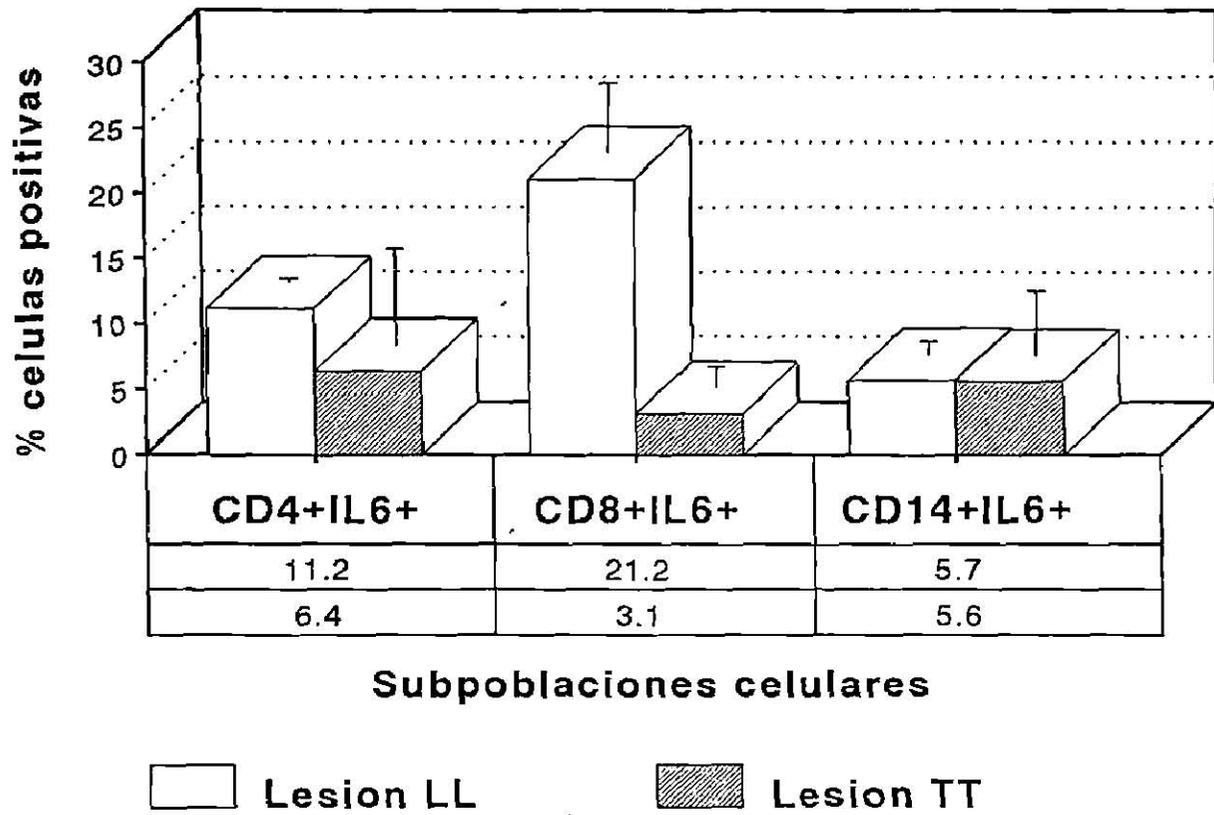
A fin de entender mejor el papel de la IL-6 en la inmunopatología de la lepra, se procedió a determinar el fenotipo de las células productoras de IL-6 en las lesiones de piel de los pacientes. Se procedió a hacer pares de AcMo de anti- IL6/CD4, IL-6/CD8 e IL-6/CD14 en ensayos de inmunotinción doble. En la Fig 10 podemos observar que en las lesiones LL, tanto células CD4+, CD8+ y CD14+ producen IL-6 *in situ*; sin embargo, las células CD8+IL6+ predominan numéricamente sobre las CD4+IL6+ y CD14+IL6+. Por otro lado, en las lesiones TT, las 3 poblaciones analizadas contribuyen en la producción de IL-6 de manera similar y en un porcentaje bajo. Es importante mencionar que la lesión LL presenta aproximadamente 7 veces más células CD8+IL6+ en comparación a la lesión TT ( $21.2 \pm 5.3$  vs  $3.1 \pm 1.6$  %). La Fig 4L muestra la inmunotinción doble de células CD8+IL6+ en un granuloma LL del mismo paciente de la Fig 4K. Los controles negativos de la 1ª y 2ª inmunotinción no desarrollaron color. La omisión del 2º AcMo primario resultó en desarrollo de la 1ª inmunotinción y ausencia de color para la 2ª, lo cual decarta la posibilidad de reacción cruzada.



**Figura 8. Expresión de CD28 y CD73 sobre células T CD4+ y CD8+ en las lesiones de piel de los pacientes con lepra. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. del porcentaje de linfocitos T CD4+ o CD8+ que expresan el marcador CD28 o CD73 mediante inmunotinción doble en lesiones de piel de 3 pacientes LL y 3 con TT.**



**Figura 9. Células productoras de IL-6 a lo largo del espectro clínico de la lepra.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. del porcentaje de células IL6+ en las lesiones de piel mediante inmunotinción sencilla.



**Figura 10. Fenotipo de las células IL6+ en las lesiones LL y TT.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. del porcentaje de células dobles positivas en las lesiones de piel mediante inmunotinción doble.

# ***DISCUSSION***

En este trabajo se estandarizaron técnicas de inmunotinción sencilla y doble y demostrado su aplicación para determinar el número de subpoblaciones celulares y caracterizar los tipos celulares que infiltran las lesiones de piel de pacientes con lepra, al igual que analizar la producción de IL-6 en los granulomas. Nuestros resultados en las CMN de sangre periférica de individuos sanos empleando inmunotinción doble indican que aproximadamente las 3/4 partes de las células T CD4+ exhiben el CD28 ( $74.9 \pm 5.5$  % CD4+CD28+), mientras que alrededor de un 25% son CD28-. Estos resultados contrastan con lo reportado por otros investigadores, que han reportado que alrededor de un 95% de células las células CD4+ con CD28+ y solo un 5% son CD28- (12,15,60). Recientemente, Azuma y cols (20) reportaron que el 100% de las células T CD4+ son CD28+ y no discriminan la densidad de expresión del CD28 dentro de las células CD4+. Todos estos estudios han empleado la citometría de flujo multicolor e indicado que la molécula CD28 se expresa en algunas subpoblaciones de linfocitos T CD3+, mientras que ni células B, ni células NK expresan este homodímero (20).

La inmunotinción sencilla de CD73 en CMN (Fig 5) mostró un porcentaje similar a lo reportado previamente mediante citometría de flujo de 2 colores, si bien es importante resaltar que el valor reportado en la literatura es el correspondiente a la expresión de CD73 sobre células CD3+, mientras que nosotros realizamos el análisis sobre CMN totales. La expresión del CD73 sobre las células CD4+ mostró una media de  $36.9 \pm 9.4$ %, una proporción mayor a la reportada en la literatura ( $11 \pm 4$  %) empleando la citometría de flujo con el mismo AcMo 7G2 empleado en nuestro estudio. Esto podría explicarse debido a que la mayoría ( $>70$ %) de las células B periféricas de individuos adultos expresan CD73 (29,66) y nuestro análisis las incluyen. Al parecer, las células NK no contribuyen directamente en nuestra estimación debido a que estas células carecen de este marcador (66,71). Si bien nuestras condiciones fueron optimizadas en la inmunotinción doble, es posible que con este par de AcMo's exista reacción cruzada entre los 2 sistemas y esto se refleje en una mayor proporción de células CD4+CD73+. Por otro lado, nuestros datos sobre la expresión del CD28 y del CD73 sobre las células CD8+ son muy similares a los reportados por otros autores (12,66). Al respecto, nuestros resultados indican que aproximadamente la mitad de las células CD8+ expresan el CD28 y el CD73:  $51.7 \pm 4.7$ % de células CD8+CD28+ y  $55.5 \pm 5.3$ % de células CD8+CD73+. Esta proporción es muy similar a lo reportado por Azuma y cols. (20) por citometría de 3 colores para células CD3+CD8+CD28+ y lo reportado por Thompson y cols (66) por citometría de 2 colores para

células CD8+CD73+ en sujetos sanos. En el estudio de Azuma y cols (20) se estableció que existen individuos con un número bajo de células T CD8+ CD28-, así como también existen sujetos con cantidades similares de las poblaciones T CD8+CD28+ y CD8+CD28-, sin embargo, en los individuos estudiados por nosotros no encontramos una gran variabilidad. En los estudios de citometría de flujo es posible discriminar a aquellas células NK que expresan el marcador CD8, en base a que el citómetro de flujo permite seleccionar células CD3+ y células teñidas intensamente con anti-CD8, ya que la mayoría de las células NK son CD3- y solo algunas expresan el CD8 en forma débil. Si bien nuestros análisis de inmunotinción no discriminaron entre las células CD8+ fuertemente positivas y las CD8+ debilmente positivas, el valor de la media fue muy similar a lo reportado por Azuma y cols.(20) empleando citometría de flujo. El hecho de que nosotros encontramos un menor número de células CD4+CD28+ y mayor número de células CD4+CD73+ a los porcentajes reportados en la literatura puede deberse a la metodología empleada. Las técnicas de inmunotinción aquí empleadas difieren notablemente de la citometría de flujo, ya que en la primera se emplearon Ac's secundarios biotinilados y otros reactivos (complejo avidina-biotina-enzima), además existe un posible riesgo de reactividad cruzada entre los reactivos y hay una menor sensibilidad y precisión de la inmunotinción con respecto a la citometría de flujo. La comparación de los valores de los trabajos presentados muestran diferencias, las cuales pueden ser explicadas por las características propias de las metodologías utilizadas. Algunos investigadores sugieren que el CD28 clasifica a las células CD4+ en 2 subpoblaciones en CD28<sup>brillantes</sup> y CD28<sup>débiles</sup> con funciones distintivas (17). Es posible que la inmunotinción doble revele solo las células CD4+ con una expresión alta de CD28 y no revele las células CD28<sup>débiles</sup>.

Es importante hacer notar que la citometría de flujo es un método extremadamente sensible que puede detectar cantidades muy pequeñas de un antígeno expresado en un número alto de células en cuestión de segundos y en una forma altamente reproducible, además que no existen o se disminuyen al máximo las tinciones inespecíficas por reactividad cruzada por emplearse AcMo's directamente conjugados al fluorocromo. Nuestros análisis involucran la visualización de células teñidas por reacciones de inmunotinción mediante el microscopio. En este caso, existen diferencias de persona a persona en la percepción de color y aparecen factores que influyen en la discriminación de células dobles positivas, sobre todo cuando la intensidad de uno de los colores es débil, además influye el error producido por cansancio visual en períodos largos de

observación. Si bien, en la inmunotinción doble se incluyeron laminillas control, con las cuales descartamos la posibilidad de reactividad cruzada entre los reactivos de la 1ª y 2ª inmunotinción, es probable que exista un número pequeño de células dobles positivas falsas. Esto se debe a que ambas tinciones emplean anticuerpos monoclonales de la clase IgG de ratón, ambas emplean anticuerpos secundarios de caballo anti-IgG de ratón y ambas emplean un complejo ABC de avidina-biotina-enzima, mientras que la única diferencia entre ambas tinciones es el Ag definido por el Ac primario y la enzima que forma parte del complejo ABC. En términos generales, la inmunotinción doble no resultó ser sencilla de realizar por las razones antes expuestas y su evaluación es un tanto azarosa e imprecisa. Por lo anterior, no podemos igualar la eficiencia de la citometría de flujo, sin embargo, si constatamos la capacidad de nuestra metodología para determinar la expresión de marcadores celulares en cuanto a la valoración del CD28 y CD73 dentro de las subpoblaciones CD4 y CD8.

Nuestros resultados sobre la enumeración de células CD4+ y CD8+ en las lesiones de piel de pacientes con lepra confirman estudios previos (44,45), en los cuales se encontraron un predominio de células CD8+ en las lesiones LL, mientras que las células CD4+ existen en una mayor proporción en las lesiones TT. Nuestros resultados en las lesiones LL mostraron una media de 54% de células CD8+, 28% de células CD4+ y un cociente CD4:CD8 bajo (0.52); mientras que las lesiones TT mostraron un 58% de células CD4+, 20% de células CD8+ y un cociente CD4:CD8 alto (2.9). Al respecto, Modlin y cols (45) encontró que las lesiones LL tienen una media de 42% de células CD8+ y solo un 24% de células CD4+ (cociente CD4:CD8 de 0.6), mientras que las lesiones TT poseen alrededor de un 60% de células CD4+ y un 37% de células CD8+ (cociente CD4:CD8 de 1.7) (44,45). El cociente CD4:CD8 encontrado en las lesiones TT de dicho estudio es similar al encontrado en la sangre periférica de los mismos pacientes. Es importante notar que estos valores fueron obtenidos por inmunotinción al igual que nuestros datos. El cociente CD4:CD8 de nuestros pacientes LL es muy similar al reportado previamente (44); sin embargo, nuestro cociente en las lesiones TT es diferente al reportado. Esto podría deberse al bajo número de pacientes estudiados por nosotros y es necesario incrementar el número de pacientes.

La inmunotinción sencilla con un AcMo anti-IL6 indica un número substancial de células IL6+ en las lesiones de piel de los pacientes con lepra. Más aun, el número de células IL6+ fue

significativamente mayor en las lesiones LL y en el ENL, en comparación a las lesiones TT y las RxM's en individuos sanos. Actualmente no hay nada definido en cuanto a los mecanismos que operan a nivel celular y molecular que determinan las características de la enfermedad. Se han enfocado esfuerzos para elucidar la actividad de algunas citocinas que son fundamentales en la respuesta inmune en general. La producción de IL-6 en las lesiones de los pacientes con lepra es muy heterogénea y no se tiene un perfil dentro del espectro clínico de la lepra. Al respecto, Yamamura y cols. (61) determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), la presencia de ARNm específico de diversas citocinas, incluyendo la IL-6, en las lesiones piel y encontraron una mayor cantidad ARNm de IL-6 en las lesiones TT, y nada o poca en las lesiones LL. Nuestros resultados de inmunotinción con AcMo anti-IL6 difieren a lo reportado por Yamamura y cols (61). Es importante hacer notar que la inmunotinción detecta la proteína, mientras que la RCP determina el ARNm. La discrepancia con el estudio de Yamamura y cols (61) podría solo explicarse a que si bien existe poco ARNm de IL-6 en la lesión LL, es posible que el proceso de traducción sea muy eficiente y las células expresen una gran cantidad de proteína. Al respecto, Herzyk y cols (62) han encontrado poco ARNm de IL-1 y una gran cantidad de IL-1 $\beta$  secretada por macrófagos humanos estimulado *in vitro* con lipopolisacárido. De manera similar, otros autores han encontrado que la cantidad de proteína no siempre correlaciona con la cantidad de ARNm (67-69). Por ejemplo, Newman y cols (67) encontraron que la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos estimulados *in vitro* con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)/*Mycobacterium avium* está disminuida a las 48 y 72 h, mientras que los niveles de proteína están altos incluso a las 96 h. Estos resultados podrían ser explicados en base a los estudios hechos por Voth y cols. (70), en los que los transcritos de ARNm del TNF aislados de células mononucleares de pacientes con SIDA y estimuladas *in vitro* con lipopolisacárido (LPS) tienen una vida media más larga y una mayor estabilidad. Sin embargo, cada metodología tiene ventajas y desventajas que deben evaluarse de acuerdo al objetivo del estudio. Por otro lado, la técnica de la RCP tiene la ventaja de ser muy sensible ya que es una de las tecnologías más sofisticadas que actualmente se utilizan, mientras que la inmunotinción tiene la desventaja de poseer un grado de error mayor, ya que la sensibilidad es mucho menor y la determinación lleva inherente el error de la observación por el ojo humano. Sin embargo, el análisis por RCP no permite determinar que tipo de células son las productoras de la proteína, ya que se utiliza un homogeneizado en el cual no hay diferencias en cuanto a las células que sintetizan el mensaje, mientras que con nuestro método si determinamos a las células

que sintetizan la proteína y esto es fundamental para la comprensión de la inmunopatología de la lepra.

Nuestros resultados mostraron una producción aún mayor de IL-6 en ENL en comparación a las lesiones LL y TT. Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Yamamura y cols (63), en el cual reportan una cantidad mayor de ARNm de IL-6 en las reacciones ENL en comparación a otras formas clínicas de la lepra y dermorreacciones con lepromina. Si bien, las técnicas de inmunotinción no son tan sensibles como la técnica de la RCP para detectar cantidades pequeñas de ARNm producido en la lesión, sí tienen la gran ventaja de permitir identificar la naturaleza de la(s) célula(s) productora de IL-6. En nuestro estudio, las células T CD8+ fueron las mayores productoras de IL-6 en las biopsias de piel de los pacientes con lepra. Este dato es relevante, ya otra interleucina que se ha estudiado con interés por su importancia funcional en la regulación de la respuesta inmune es la IL-4, y se han encontrado clones de células T de sangre periférica de pacientes LL con fenotipo CD8+ con función supresora (44) que producen IL-4 en respuesta a Ag. Dado que la IL-4 como la IL-6 son parte de las citocinas de tipo 2 (64), así como la hipergammaglobulinemia a nivel sistémico observada en estos pacientes, podemos especular que estas citocinas también están elevadas a este nivel explicando la ya aceptada participación de ellas en la transformación de las células B a células plasmáticas, y que IL-6 también ejerce un papel supresor igual al de IL-4 e IL-10 explicándose un sinergismo que origina la poca expresión de la subpoblación de linfocitos T CD4+ en LL. El hallazgo de que las células CD8+ son las mayores productoras de IL-6 apoya el hecho de que en los pacientes LL se encontró una producción elevada de esta citocina ya que en ellos este es el fenotipo que más presentan en sus lesiones. Las diferencias encontradas en cuanto a la producción elevada de IL-6 en las lesiones de LL en relación a las TT mediante inmunotinción comparadas con RCP indican que la producción de esta citocina es muy heterogénea, puesto que existen pacientes con producción elevada así como disminuida, mientras que en el polo TT la producción es mínima y no obtenemos un porcentaje mayor de 7% que correlaciona con la poca presencia de células CD8+. Se requiere un estudio más profundo en cuanto a la determinación del patrón de producción de IL-6 dentro del espectro clínico de la enfermedad, donde muy recientemente apareció un reporte mencionando que líneas de células T de pacientes LL sintetizan IFN- $\gamma$ , y no o casi nada de IL-4 demostrándose que ésta, no es el único factor de supresión en lepra (65).

## CONCLUSIONES

- \* Se estandarizaron las condiciones óptimas para la identificación de subpoblaciones celulares y productos solubles (interleucina-6) mediante la inmunotinción sencilla y doble.
- \* Se confirmaron los estudios previos realizados por otros investigadores sobre las alteraciones numéricas de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las lesiones de piel de pacientes con LL y TT.
- \* Se amplió el análisis en sangre periférica y en los granulomas de la lepra con respecto a la expresión de CD28 y CD73 y se generaron resultados preliminares.
- \* Nuestros resultados de inmunotinción enzimática son muy similares a los reportados por otros investigadores empleando técnicas más sofisticadas y costosas, tal como la citometría de flujo y no representaron una gran diferencia haciendo confiable esta técnica.
- \* Nuestros resultados sobre la producción *in situ* de IL-6 en los granulomas leproso contrasta con los datos reportados por otros investigadores sobre la expresión de ARNm específico de IL-6 empleando una técnica altamente sofisticada y costosa, tal como la técnica de la RCP. Esta discrepancia puede deberse a la distinta base de las 2 metodologías o a una alteración en los procesos de traducción en los granulomas de la lepra.
- \* La inmunotinción es una metodología confiable y de mucha utilidad, aunque no tiene la sensibilidad de otras metodologías su acceso es más fácil y más económica que la citometría de flujo y la RCP.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Roitt I, J Brostoff y D. Male. En "Immunology". 2ª edición. Gower Medical Publishing (1989)
- 2) Rose N.R. E.C. de Macario, J.L. Fahey, H. Friedman y G.M. Penn (editors). En "Manual of Clinical Laboratory Immunology". 4ª edición. American Society for Microbiology (1992)
- 3) Henkart P.A. *Ann Rev Immunol* 3:31-58 (1985)
- 4) Morimoto C., N.L. Letvin, J.A. Distaso, W.R. Aldrich y S.F. Schlossman. *J Immunol* 134:1508-1515 (1985)
- 5) Mosmann T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond y cols. *J Immunol* 136:2348 (1986)
- 6) Modlin R.L., H. Kato, V. Mehra y cols. *Nature* 322:459 (1986)
- 7) Ferrick D.A., P.S. Ohashi, V. Wallance y cols. *Immunol Today* 10:403-407 (1989)
- 8) Lefrancois F. *Immunol Today* 12:436-438 (1991)
- 9) Koning F. *Immunol Today* 12:100-101 (1991)
- 10) Meuer, S.C., Schlossman S.F. y E.L. Reinherz. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4395 (1982)
- 11) Morimoto C., N.L. Letvin, A.W. Boyd y cols. *J Immunol* 134:3762-3769 (1985)
- 12) Yamada H., P.J. Martin, M.A. Bean y cols. *Eur J Immunol* 15:1164-1168 (1985)
- 13) Inoue T., Y. Asano, S. Matsuoka y cols. *J Immunol* 150:2121 (1993)
- 14) Turka L.A., J.A. Ledbetter, K. Lee, y cols. *J Immunol* 144:1646-1653 (1990)
- 15) Damle N.K., N. Mohagheghpour, J.A., Hansen y E.G. Engleman. *J Immunol* 131:2296-3300 (1983)
- 16) Hansen J.A., P.J. Martin y R.C. Nowinski. *Immunogenetics* 10:247-260 (1980)
- 17) Rotteveel F.T.M., I. Kokkelink, R.A.W. Van Lier y cols. *J Exp Med* 168:1659-1673 (1988)
- 18) Lum, J.G., N. Orcutt-Thordarson, M.C. Seigneuret y J.A. Hansen. *Cell Immunol* 72:122 (1982)
- 19) Damle NK & EG Engleman. *J Exp Med* 158:159 (1983)
- 20) Azuma M, J.H. Phillips & L.L. Lanier. *J Immunol* 150:1147 (1993)
- 21) Testi,R; & LL Lanier. *Eur J Immunol* 19:185-188 (1989)
- 22) Trams E.G. y C.J. Lauter. *Biochem Biophys Acta* 345:180 (1974)
- 23) Naito Y. y J.M. Lowenstein. *Biochemistry* 20:5188 (1985)
- 24) Thompson L.F., A.Saxon, R.D. O'Connor y J.F. Bastian. *J Clin Invest* 71:892 (1983)
- 25) Thompson L.F., J.M. Ruedi, R.D. O'Connor y J.F. Bastian. *J Immunol* 137:2496 (1986)
- 26) Thompson L.F., G.R. Boss, H.L. Spiegelberg y cols. *J Immunol* 123:2473 (1979)
- 27) Edwards N.L., E.W. Gelfand, L. Burk y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3474 (1979)
- 28) Bastian J.F., M. Ruedi, G.A. MacPherson y cols. *J Immunol* 132:1767 (1984)
- 29) Thompson L.F., J.M. Ruedi, M.G. Low y L.T. Clement. *J Immunol* 139:4042-4048 (1987)
- 30) Dianzani U., M. Massaia, A. Pileri y cols. *J Immunol* 137:484 (1986)
- 31) Edwards N.L., D.B. Magilavy, J.T. Cassidy e I.H. Fox. *Science* 201:628 (1978)
- 32) Gelfand E.W., D. MacCurdy, C.P. Rao y A. Cohen. *Blood* 63:1475 (1984)
- 33) Webster A.D.B., M. North, J. Allsop y cols. *Clin Exp Immunol* 31:456 (1978)
- 34) Salazar-Gonzalez J.F., D.J. Moody, J. Giorgi y cols. *J Immunol* 135:1778-1785 (1985)
- 35) Rowe M., G.C. DeGast, T.A.E. Platts-Mills y cols. *Clin Exp Immunol* 39:337 (1988)
- 36) Boss G.R., L.F. Thompson, H.L. Spiegelberg y cols. *Trans Assoc Am Physicians* 91:309 (1979)

- 37) Tompson L.F. y J.M. Ruedi. *J Clin Invest* 82:902-905 (1988)
- 38) Fahey J.L., H. Prince, M. Weaver y cols. *Am J Med* 76:95 (1984)
- 39) De Waele M., C. Thielemans y B.K.G. Van Camp. *N Engl J Med* 304:460 (1981)
- 40) Ridley D.S. y W.H. Joplin. *Int J Lepr* 34:255 (1966)
- 41) Ridley D.S. *Bull WHO* 51:451 (1974)
- 42) Bloom B.R. y V. Mehra. *Immunol Rev* 80:5 (1984)
- 43) Bloom B.R. *J Immunol* 137:i (1986)
- 44) Modlin R.L. F.M. Hofman D.A. Horwitz y cols. *J Immunol* 132:3085 (1984)
- 45) Modlin R.L., J. Melancon-Kaplan, S.M.M. Young y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1213 (1988)
- 46) Hirano T., S. Akira, T. Taga y T. Kishimoto *Immunol Today* 11:443-449 (1990)
- 47) Hirano T. y Y Kishimoto. En "*Manual de Farmacología Experimental*". Vol/I  
"Péptidos Factores de Crecimiento y sus Receptores". pp. 733-665, Springer-Verlag (1990).
- 48) Sehgal P.B., G. Grienger, G. Tosato. *Ann NY Acad Sci* 557:1-583 (1989)
- 49) Weissenbach J., Y. Chernajovsky, M. Zeevi y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7152-7156 (1980)
- 50) Hirano T., K. Yasukawa, H. Harada y cols. *Nature* 324:73-76 (1986)
- 51) Haegeman G., J. Content, G. Volckaert y cols. *Eur J Biochem* 159:625-632 (1986)
- 52) Van Damme J., G. Opdenakker, R.J. Simpson y cols. *J Exp Med* 165:914-919 (1987)
- 53) Gauldie J., C. Richards, D. Harnish y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7251-7255 (1987)
- 54) Shabo Y., J. Lotem, M. Rubinstein y cols. *Blood* 72:2070-2073 (1988)
- 55) Shegal P.B., L.T. May. I. Tamm y J. Vilcek. *Science* 235:731-732 (1987)
- 56) Kishimoto T. y T. Hirano. *Annu Rev Immunol* 6:485-512 (1988)
- 57) Hirano T., T. Taga, K. Yasukawa y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:228-231 (1987)
- 55) Breen E.G., A.R. Rezai, K. Nakajima y cols. *J Immunol* 144:480-484 (1990)
- 59) Miles S.A., A.R. Rezai, J.F. Salazar-Gonzalez y cols. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4063-4072 (1990)
- 60) Freeman G.J., D.B. Lombard, C.D. Gimmi y cols. *J Immunol* 149:3795-3801 (1992)
- 61) Yamamura M., U. Koichi, R.I. Deans y cols. *Science* 254:277-279 (1991)
- 62) Herzyk D.J., J.N. Allen, C.B. Marsh y M. Wewers. *J Immunol* 149:3052-3058 (1992)
- 63) Yamamura M., X-H Wang, J.D. Ohmen y cols. *J Immunol* 149:1470-1475 (1992)
- 64) Street N. y T.R. Mosmann. *FASEB J* 5:171-177 (1991)
- 65) Mutis T., E.M. Kraakman y Y.E. Cornelisse. *J Immunol* 150:4641-4651 (1993)
- 66) Thompson L.F., J.M. Ruedi, A. Glass y cols. *Tissue-Antigens* 35:9-19 (1990)
- 67) Newman G.W., T.G. Kelley, H. Gan y cols. *J Immunol* 151:2261-2272 (1993)
- 68) Cannistra S.A., A. Rambaldi, D.R. Spriggs y cols. *J Clin Invest* 97:1720 (1987)
- 69) Heidenrich S., J.H. Gong, A. Schmidt y cols. *J Immunol* 143:1198 (1989)
- 70) Voth R., S. Rossol, K. Klein y cols. *J Immunol* 144:970 (1990)
- 71) Christensen L.D. y V. Andersen. *Nat Immun* 11:1-6 (1992)
- 72) Alvarado de la Barrera C. Participación de la molécula CD28 en la activación de linfocitos T. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UNAM 1993

## APENDICE

### FORMULA DEL BUFFER SALINO DE FOSFATOS (BSF)

Cloruro de Sodio (NaCl)	8.00 g.
Cloruro de Potasio (KCl)	0.20 g.
Fosfato Dibásico de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.15 g.
Fosfato Monobásico de Potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.20 g.
Agua Destilada	1,000 ml.
Ajustar el pH a 7.4 - 7.6	
Esterilizar en autoclave (15 lb de presión por 20 minutos)	

### PREPARACION DE LA HEMATOXILINA DE MAYER

Hematoxilina	1.0 g.
Agua Destilada	1.0 lt.
Iodato de Sodio	0.2 g.
Sulfato de Aluminio y Potasio (Alumbre)	50.0 g.
Acido Cítrico	1.0 g.
Hidrato de Cloral	50.0 g.

Disolver la hematoxilina en agua agitando suavemente, calentando un poco si es necesario. Añadir el iodato de sodio y después el alumbre. Agite hasta que el alumbre se disuelva, entonces añada el ácido cítrico y finalmente el hidrato de cloral. Al final el color debe ser violeta rojizo y esta solución podrá conservarse por varios meses. La maduración se controla por la concentración de iodato de sodio y el tiempo. Cuando la solución se madura excesivamente (sobremaduración), se requieren tiempos mayores de incubación en las laminillas.

## PREPARACION DEL MEDIO DE MONTAJE

Gelatina	10 g.
Agua Destilada	60 ml.
Glicerina	70 ml.
Fenol Liquido	1 ml.

Adicionar la gelatina en el agua y calentar en baño María hasta disolver, añadir la glicerina y el fenol y continuar en baño María agitando. Preparar varias alícuotas y guardar a temperatura ambiente. Para su uso calentar en baño María hasta su disolución.

## BUFFER DEL SUBSTRATO DE LA FOSFATASA ALCALINA (TRIS 0.1M Ph 8.2)

TRISMA (Acido clorhídrico)	0.708 g.
TRISMA (Base)	0.668 g.
Agua destilada	100 ml.

