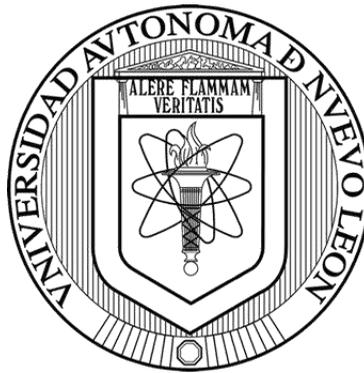


# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO

“DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”

SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



“ANÁLISIS DE VNTR EN PACIENTES FORÁNEOS CON LEPROMATOSA EN EL  
HOSPITAL UNIVERISTARIO DR. JOSE E. GONZÁLEZ”

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

**DRA. ALIM ADRIANA RINCÓN BAHENA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA  
PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

MONTERREY, N.L. MÉXICO

FEBRERO 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**HOSPITAL UNIVERSITARIO**  
**“DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”**  
**SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**



**“ANÁLISIS DE VNTR EN PACIENTES FORÁNEOS CON LEPROMATOSA EN EL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO DR. JOSE E. GONZÁLEZ”**

**PRESENTA**

**DRA. ALIM ADRIANA RINCÓN BAHENA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y  
CITOPATOLOGÍA**

**MONTERREY, N.L. MÉXICO**

**FEBRERO 2017**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
"DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ"  
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



TESIS COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN ANATOMÍA  
PATOLÓGICA

"ANÁLISIS DE VNTR EN PACIENTES FORÁNEOS CON LEPROMATOSA EN EL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO DR. JOSE E. GONZÁLEZ"

PRESENTADA POR:

---

DRA. ALIM ADRIANA RINCÓN BAHENA

---

DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA  
DIRECTOR DE TESIS

---

DR. ALVARO BARBOSA QUINTANA  
CO-DIRECTOR DE TESIS

---

DR EN C. IVÁN MARINO MARTINEZ  
CO-INVESTIGADOR

APROBACIÓN DE LA TESIS:



---

DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA  
DIRECTOR DE TESIS



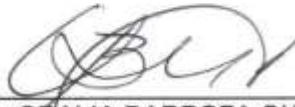
---

DR. ALVARO BARBOZA QUINTANA  
CO-DIRECTOR DE TESIS



---

DRA. NATALIA VILCHES CISNEROS  
COORDINADOR DE ENSEÑANZA



---

DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA  
JEFE DEL SERVICIO



---

DR. FELIPE ARTURO MORALES MARTINEZ  
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"ANÁLISIS DE VNTR EN PACIENTES FORÁNEOS CON LEPROMATOSA EN EL HOSPITAL  
UNIVERSITARIO DR. JOSE E. GONZÁLEZ"**

**PRESENTADA POR:**

**DRA. ALIM ADRIANA RINCÓN BAHENA**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA  
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSE E. GONZÁLEZ", BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA.  
ORALIA BARBOZA QUINATANAY LA CO-DIRECCIÓN DEL DR. ALVARO BARBOSA QUINTANA**



---

**DRA. MED. ORALIA BARBOZA QUINTANA**

**JEFE DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” que me abrió las puertas y me dio los instrumentos para formarme como médico especialista.**

**A la Dra. Med. Oralia Barboza Quintana quien me ofreció la oportunidad de ser parte del servicio de Anatomía patológica y me dio su apoyo.**

**A la Dra. Ivett C. Miranda Maldonado por sus enseñanzas y su confianza, así como su dedicación.**

**A mis profesores por su tiempo y por compartir su conocimiento conmigo.**

**Al Dr. Iván Marino Martínez por asesorarme y apoyarme en la realización y sustento de mi proyecto de tesis.**

**A mis padres por su apoyo y confianza durante todo este tiempo para realizarme como profesionalista.**

**A mi esposo por su apoyo incondicional y paciencia durante cuatro años de residencia.**

**A mis compañeros residentes y amigos que me compartieron su tiempo y amistad.**

*"Hay circunstancias en donde miras hacia atrás y no sabes qué sucedió. Simplemente sabes que, desde que ocurrió, nada volvió a ser igual."*

*George Bucay*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
EPIDEMIOLOGÍA .....	<b>14</b>
INMUNOLOGÍA DE LA LEPROA .....	<b>16</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>20</b>
<b>ORIGINALIDAD</b> .....	<b>23</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS NULA</b> .....	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS:</b>	
OBJETIVO GENERAL.....	<b>27</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>27</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
DIAGRAMA DE FLUJO DE LA MUESTRA .....	<b>29</b>
<b>DISEÑO</b> .....	<b>30</b>
BUSQUEDA DE PACIENTES Y SELECCIÓN DEL MATERIAL.....	<b>29</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>36</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
<b>REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infecto contagiosa crónica causada por la bacteria *Mycobacterium Leprae*, la cual, afecta piel y nervios periféricos superficiales. Además, en el caso de pacientes con defectos inmunitarios, puede involucrar otros órganos, y en ocasiones convertirse en sistémica<sup>1</sup>.

Es considerada una enfermedad, la cual, si se trata en forma temprana, puede lograrse la curación definitiva; así se disminuye los efectos incapacitantes de la misma; por lo que la OMS inició una campaña de tratamiento gratuito a pacientes afectados.

La eliminación mundial de la lepra como problema de salud pública (prevalencia mundial de menos de 1 caso por 10 000 habitantes) se alcanzó en el año 2000. A lo largo de los últimos 20 años, se ha tratado con el tratamiento multi-medicamentoso a más de 16 millones de pacientes con lepra<sup>1</sup>.

La detección de todos los casos en cada comunidad y el adecuado seguimiento del tratamiento, son los objetivos de la Estrategia mundial para reducir la morbilidad por lepra (2011-2015). En 2016 la OMS presentó una nueva estrategia mundial (2016-2020) que busca reforzar las medidas de control de la enfermedad y evitar la discapacidad, además de estar enfocada en la población infantil.

Esta estrategia hace hincapié en la necesidad de mantener los conocimientos especializados y aumentar el número de personal capacitado para atender esta enfermedad con el fin de mejorar la participación de los afectados en los servicios de atención a la lepra y reducir las deformidades visibles (también llamadas discapacidades

de grado 2), así como la estigmatización relacionada con la enfermedad. La estrategia también aboga un compromiso político renovado y una mejor coordinación entre los asociados, además de destacar la importancia de la investigación y la mejora de la recopilación y análisis de datos.

La lepra fue identificada y cuidadosamente descrita desde las civilizaciones antiguas: China, Egipto y la India. El primer documento escrito data del año 600 a.C<sup>2</sup>.

En la antigüedad los griegos dividían la enfermedad en dos: elefantiasis y Lauce. El año de 1874, Armauer Hansen, natural de Bergen (Noruega), país donde la lepra era epidémica descubrió el bacilo productor de la enfermedad y demostró que la enfermedad era de carácter infeccioso. Finalmente, en 1902 Neisser la clasificó en tres subtipos: tuberosa, cutánea y nerviosa.

En 1922 Roger y Muir hicieron la distinción entre aquellas formas de enfermedad sin bacilos (A) y formas con bacilos (B).<sup>3</sup>

Pero no fue, sino hasta el Congreso Internacional de Lepra efectuado en la Habana (1948) donde se establecieron los dos tipos fundamentales actuales: tipo lepromatoso y tipo tuberculoide.<sup>3,4</sup>

Las clasificaciones actuales contemplan los aspectos inmunológicos, clínicos y bacteriológicos. Los cuales están especificado en la siguiente tabla:

CLASIFICACION	ESPECTRO DE LA LEPRO				
<b>Ridley y jopling</b> Inmunológica (1966)	T	BT	BB	BL	L
<b>Madrid</b> Clínica (1953)	Tuberculoide		Dimorfa	Lepromatosa	
<b>OMS</b> Bacteriológica (1982)	Paucibacilar(PB)			Multiabcilar(MB)	
<b>Indeterminada(I).</b>					

Tabla 1.

(O., 2013) (Rada E, 2009)

Dentro de la clasificación clínica se pueden definir los siguientes grupos:

- Tuberculoide Tuberculoide: Placa eritematosa bien delimitada donde la infiltración puede gradualmente disminuir de la periferia al centro. Es seca, con alopecia y a veces escamosa. Los pacientes tienen anestesia marcada, excepto en la cara donde la pérdida de la sensibilidad puede estar ausente o ser muy difícil de detectar. Las lesiones son escasas y frecuentemente únicas. Usualmente el nervio periférico engrosado es palpable en la vecindad o adyacente a la lesión.
- Tuberculoide Borderline: Las lesiones pueden ser máculas o placas del numerosas, con tamaño pequeño, mal definidas, y mayor afectación nerviosa. Presenta anestesia.
- Borderline Borderline: Las lesiones son intermedias en número y tamaño. Es una lesión intermedia entre las lesiones tuberculoide y lepromatosa. bien delimitadas y difusas.

- Lepromatosa Borderline: Las lesiones son numerosas. El paciente puede presentar maculas, pápulas, manchas y nódulos. Las lesiones son anestésicas, algunas son extensas y asimétricas. El engrosamiento del nervio es evidente.
- Lepra Lepromatosa: Las lesiones tempranas son máculas o pápulas, múltiples con distribución bilateral y simétrica, eritematosas y difusas. No son anestésicas ni anhidróticas. Posteriormente aparece edema de pies y piernas. Se desarrolla la facie leonina, puede haber ulceración nasal, queratitis, iritis, cambios óseos en manos y pies, daño testicular, esterilidad, impotencia y ginecomastia. Sin embargo, nunca se establece una fase neurítica pura.
- Indeterminada: Condición macular con placas y nódulos escasos, usualmente hipocrómica.<sup>3,4</sup>

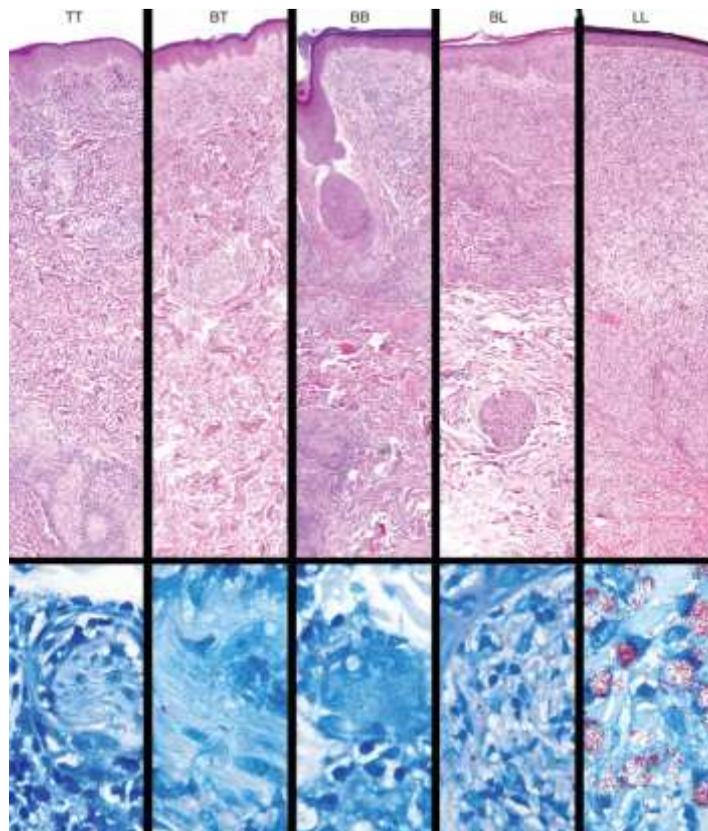
En la descripción histológica, la cual está basada principalmente en la clasificación clínica, se observa lo siguiente:

- Lepra Lepromatosa: Denso infiltrado dérmico profundo separado de la epidermis por una banda de piel sana con destrucción de los anexos cutáneos. La celularidad está compuesta por macrófagos vacuolados (células de Virchow) que contienen grandes cantidades de bacilos.
- Lepra Borderline: La característica esencial es la presencia de células epiteloideas difusamente esparcidas en el granuloma y no focalizadas por zonas o halos de linfocitos. Se pueden observar un gran espectro de cambios histológicos entre ambos polos del espectro.

- Lepra Indeterminada: La histología muestra un patrón inespecífico en ausencia de reacción granulomatosa, observándose a nivel de la dermis la
- presencia de un infiltrado linfoide perivascular presentándose como una dermatitis crónica. La característica histológica más evidente es la infiltración de la pared de los nervios periféricos por la respuesta linfoide. Los bacilos están ausentes o son muy escasos.<sup>4</sup>

Las biopsias de estas lesiones revelan una inflamación de tipo granulomatosa y bacilos ácido-alcohol resistentes en el tejido. A diferencia de la tuberculosis, la necrosis caseosa es poco frecuente en los granulomas de lepra.

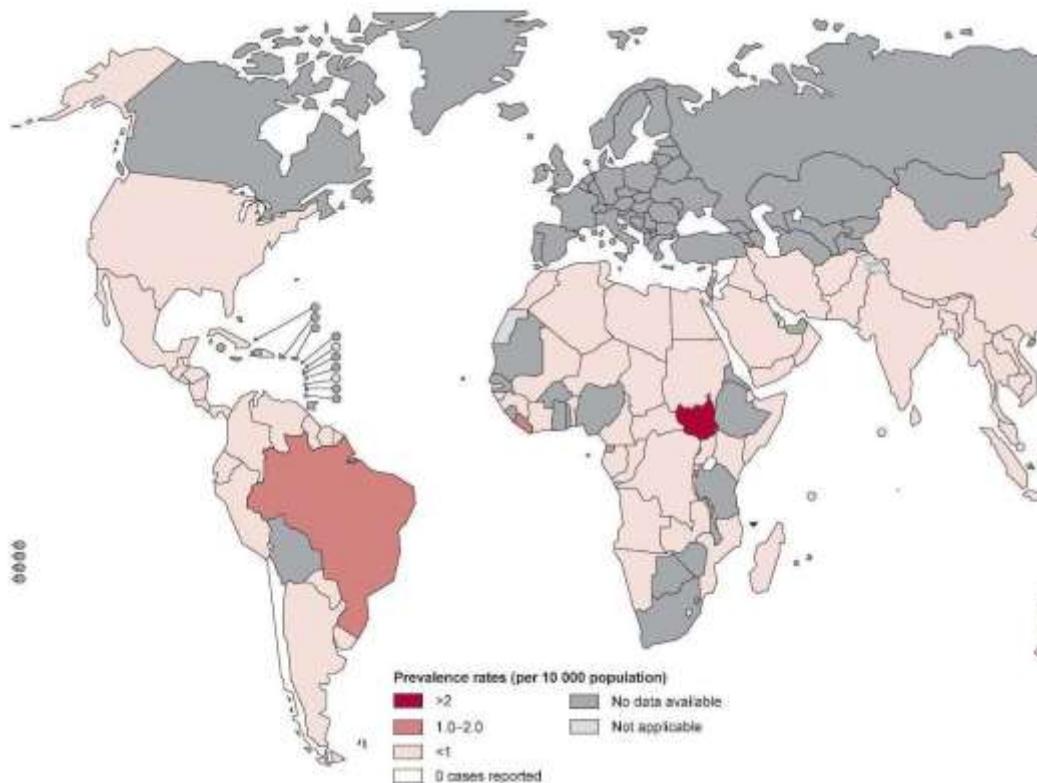
Fig 1. (Scollard,2006)



## Epidemiología

En el último estudio epidemiológico de la OMS se identificó una prevalencia en el mundo para el 2013 de un total de 215 656 casos nuevos, correspondiendo a América 43, 370 casos.<sup>5</sup>

Fig 2. (WHO, 2015)



Los países endémicos son: Angola, Bangladesh, Brasil, República Popular de China, República Democrática del Congo, Etiopía, India, Indonesia, Madagascar, Mozambique, Myanmar, Nepal, Nigeria, Filipinas, Sudán del Sur, Sri Lanka, Sudán y la República Unida de Tanzania, los cuales reúnen el 96% de los casos.<sup>5</sup>

En México, la prevalencia para el 2013 fue de 453 casos y la incidencia fue de 175 casos.<sup>6</sup>

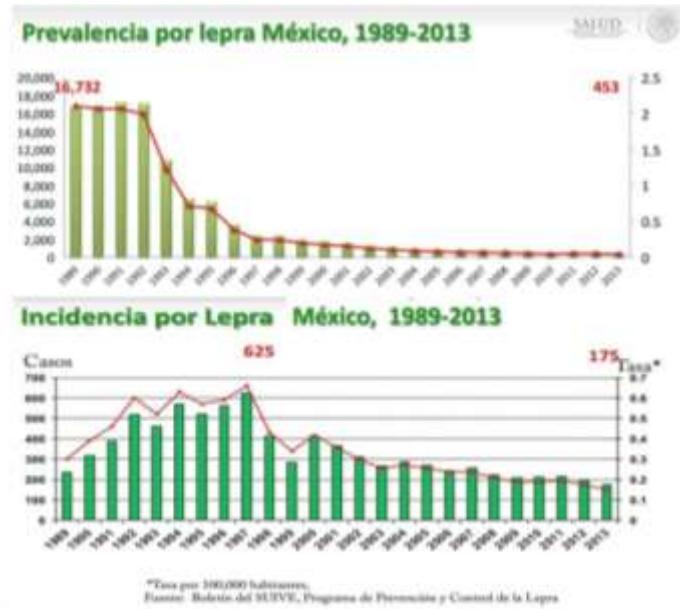


Fig. 3

En Nuevo León, para el año 2011 la prevalencia fue de 50 casos, mientras que en el estado de Guerre, la prevalencia, aunque menor, no se encontró registrada de forma confiable por la Secretaría de Salud del Estado, por lo que la información utilizada en el presente trabajo corresponde a artículos publicados y reportes anecdóticos.<sup>7</sup>



Fig. 4

## Inmunología de la Lepra

En relación a la población general, el 80% de las personas en general, es resistente a la enfermedad. Del 20% restante, el 16 al 18% son definidos como reactores lentos o grupo tuberculoide, y el 2 al 4% constituye el grupo de anérgicos o grupo lepromatoso.

El conocimiento de la inmunidad innata es indispensable, ya que, ésta constituye la primera línea de defensa que opera en la fase temprana de la infección y depende la eficiencia de los mecanismos existentes en el hospedero. Estos mecanismos son capaces de dar una respuesta rápida pero inespecífica a los microorganismos.

La inmunidad innata se encuentra fundamentada principalmente en la respuesta inflamatoria, seguida de la activación de ciertas vías del complemento y la fagocitosis. La inflamación es estimulada por productos bacterianos como polisacáridos, carbohidratos y peptidoglicanos; activando posteriormente a los macrófagos, los cuales secretan factor de necrosis tumoral, interleucina 1 y quimiocinas que inducen la infiltración leucocitaria en los focos de infección.

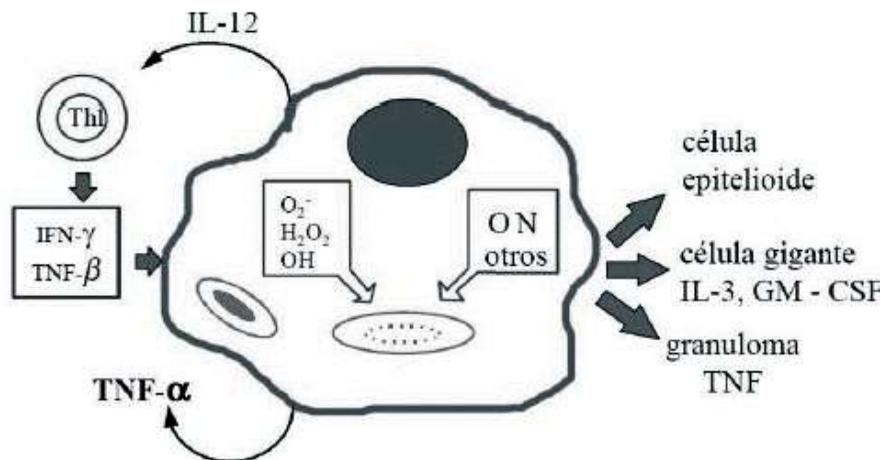
La activación permite la neutralización, la opsonización, estimulación de fagocitosis y la formación del complejo de ataque a la membrana (Figura 4). Además los productos liberados del complemento participan en las respuestas inflamatorias reclutando y activando leucocitos.<sup>4</sup>

Las células dendríticas juegan un importante rol en la respuesta inmune innata frente *M. Leprae*, en la piel y otras superficies epiteliales como la mucosa nasal. Algunos

investigadores reportan una disminución en la expresión de las moléculas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad I y II.<sup>4</sup>

También se han identificado patrones moleculares asociados a patógenos, como los peptidoglucanos, ácidos lipoteicoicos, endotoxinas, lipopolisacáridos de bacterias gram negativas, glicanos, RNA de doble cadena y ADN bacteriano que son moléculas expresadas con mucha frecuencia por los patógenos microbianos que no se encuentran en las células del hospedador y que son utilizadas en el reconocimiento de patrones ya que se expresan en su superficie, entre los cuales se encuentra el Receptor Lectina tipo C la cual facilita la fagocitosis de los microorganismos y se expresa principalmente en las células de estirpe mieloide.<sup>4</sup>

Fig. 5 (Rada E, 2009)



En contraposición de la inmunidad innata y sus mecanismos de defensa, existen otros que también son estimulados tras la exposición de agentes infecciosos, pero que son mucho más evolucionados, específicos y autolimitados. Su capacidad e intensidad defensiva aumenta después de la exposición repetida a un microorganismo, es decir,

ofrecen al individuo inmunidad protectora, ya que posee memoria. Este tipo de respuesta constituye el sistema inmune adaptativo, el cual a su vez se divide en inmunidad celular, en la que participan los linfocitos T e inmunidad humoral en la que participan los anticuerpos.<sup>4</sup>

Inmunidad mediada por células: el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T es un evento indispensable para el desarrollo de la respuesta inmune específica. La falta de respuesta en pacientes con lepra lepromatosa es específica para los antígenos de *M. Leprae*. Actualmente, está en estudio la búsqueda de antígenos microbacterianos específicos que permitan hacer un diagnóstico temprano de las formas resistentes de la lepra (paucibacilares), como se realiza en las formas multibacilares que frecuentemente presentan altos niveles de anticuerpos contra el GLP-1.

Desde el punto de vista inmunológico en la respuesta inmune celular, se observa una disminución que se expresa con intensidad variable en las diferentes formas clínicas de la enfermedad, en un espectro que va desde la lepra lepromatosa, en el cual, hay una ausencia total de inmunidad mediada por células hasta la lepra tuberculoides, donde están presentes los fenómenos de inmunidad celular cuyo efecto es moderado.<sup>2,3</sup>

Población de linfocitos T: la relación T CD4/CD8 es de 1.9 a 1 en lesiones de pacientes tuberculoides donde las poblaciones de linfocitos T CD4 se encuentran en la periferia. En contraste, en las lesiones de pacientes de lepromatosos la relación CD4+/CD8+ se distribuye dentro de la lesión.<sup>3</sup>

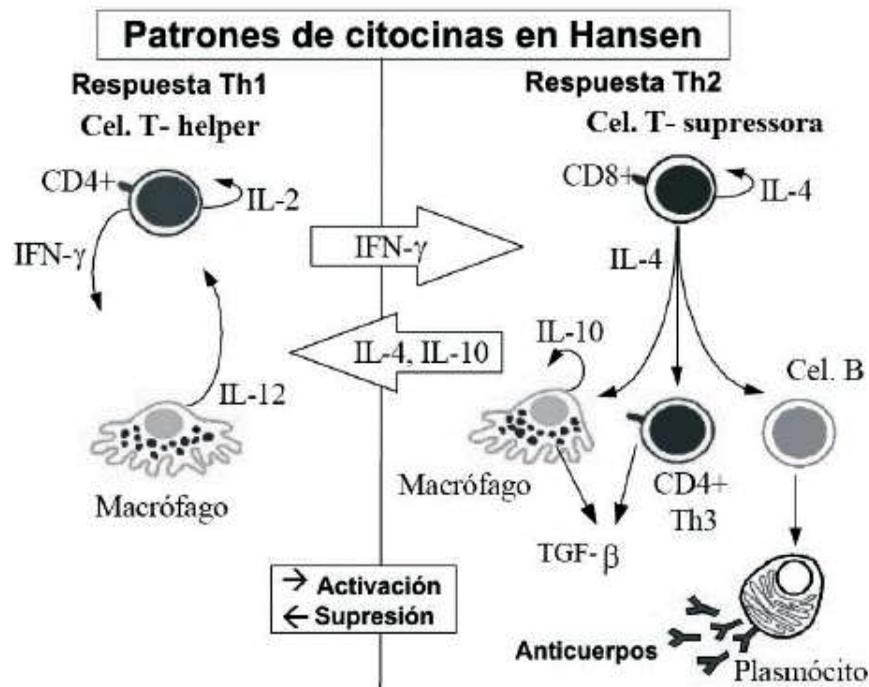
Macrófagos: los mecanismos de defensa frente a bacterias intracelulares requieren la participación de macrófagos, células Natural Killer y diversas poblaciones de linfocitos T.

El macrófago es una de las primeras células en captar a *M. leprae* y en ausencia de un mecanismo efectivo de inmunidad celular los bacilos se multiplican dentro de las células macrófágicas.

Citocinas en lepra: el paradigma TH1/TH2 se ha postulado para intentar explicar resistencia o susceptibilidad frente a patógenos intracelulares. Se basa en los patrones de producción de citosinas en diversos estados infecciosos. Los linfocitos T que producen interleucina 2 e interferón, IL-7, IL-12, IL15, IL18, asociados con la respuesta tipo TH1, aumenta la inmunidad mediada por células. Los linfocitos T que producen IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, respuesta TH2 aumentan la respuesta humoral.

Las subpoblaciones celulares TH1 y TH2 provienen de un precursor común, los linfocitos TH0, estas células no están diferenciadas.<sup>2</sup>

Fig. 6  
(Rada E, 2009)



Los estados reaccionales pueden ocurrir antes, durante e incluso después del tratamiento cuando el paciente es considerado curado bacteriológicamente. Las reacciones en la enfermedad de Hansen pueden ser definidas como manifestaciones clínicas, las cuales son resultado de alteraciones en el balance inmunológico debido a la interacción entre el sistema inmune del hospedero y del agente infectante. Estas reacciones agudas afectan principalmente piel y nervios y son la primera causa de morbilidad e incapacidad, principalmente por alteraciones en las funciones de los nervios periféricos.

### **Antecedentes**

El estudio de la transmisión de la lepra es difícil de realizar, aún con motivo de investigación, ya que *Mycobacterium leprae*, no es cultivable en medios artificiales. Esto ha retrasado el entendimiento de las rutas de transmisión y el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas.<sup>8</sup>

El genoma de *M. Leprae* codifica para más de 1,604 proteínas, de las cuales, las más importantes forman parte de la membrana plasmática como ácidos micólicos, poliprenil fosfatos, peptidoglicano, unidad ligadora a arabinogalactano, PGL1.

Tiene mutaciones puntuales que le han conferido resistencia al tratamiento, además de polimorfismos genéticos, a partir de los cuales se han realizado estudios con fines epidemiológicos, en búsqueda de patrones de transmisión.

Se han desarrollado 4 sistemas individuales de PCR para la identificación de las secuencias de *M. Leprae* encontrando una asociación entre el tamaño de las secuencias y la variabilidad de la cepa del *M. Leprae*.<sup>9, 10</sup>

Tabla. 2

Investigadores	Polimorfismos Genéticos
Williams y Cois; 2000, Nepal <sup>1</sup>	TA, GAA, AC, AT
Maeda y Cois; 2001, Japón <sup>2</sup>	Folp1, gryA, rpoB
Groathose y cols; 2004, Colorado-Korea <sup>3</sup>	C20, (TA)18, (AT)17, (CG)6, (AC)9, (GTA)9, (AGA)20
Truman y Cois; 2004, Brasil <sup>4</sup>	GAA, AT17, TA18, GTA, C16G8
Martinez y Cois; 2006, Brasil <sup>5</sup>	fbpA, fbpB, fbpC
Weng; 2007, China <sup>6</sup>	(AC)9, (GTA)9, (AT)17, (TA)18, (GAA)21
Mont y cols; 2008, Malí <sup>7</sup>	(GTA)9, (AT)4, AT(15), (AT)17
Torres y cols; 2009, Colombia <sup>8</sup>	GAA, AT17, TA8, GTA9
Kimura y cols; 2009, Filipina <sup>9</sup>	(AC)8b, (GTA)9, (GGT)5, (AT)17, rpoT, (AC)9, (AT)15, (AC)8A, (TA)18, (GAA)21
Matsuoka, 2009, Japón <sup>10</sup>	rpoT

Tabla 3.

(Supply, 2000)

1	(AC)8b	VIC-GCCCACTTACTCAACCAAC	454	CCTATAAGGGCACTCAGTCA	614	390
	(GTA)9	NED-AGCCTTAGTGGGCAGATG	426	TCCGCTGTGCGGCCGTA	488	307
	(GGT)5	6FAM-GCAGCGGTGTAAACAGCATAGC	484	TGTCTGCTTTCGAAACGGTC	435	242
	(AT)17	PET-TCTTCAACATGCTGGACA	421	GTACAGCGGCTGATCGAA	400	181
	6-3' (gpf)	VIC-ATGCGGAACGGGACTGGAGTTGA	480	TGGTCTGTAGGTTGGTGGAGA	585	91
2	21-1	6FAM-GAATCTGACCTTTCGGAAATG	568	CGATGCAGCTTCTACGG	487	312
	(AC)9	NED-AGCGCCCTTGTTCGATAGA	439	GACTGGATGTGGCACCCC	435	236
	(AT)15	PET-CAATATGGGGTTGGCGCTTCTG	462	CCGCTGGCTCGATGGCTGGATC	486	188
	(AC)8a	VIC-GTGTACCGCGGAACCAAGCA	455	CCATCTGTGGTACTACTGA	515	124
3	27-5	6FAM-ATTGAGCAGATGGCCGGTC	428	AGCAGTCCGCACGCGCTT	478	327
	6-7	VIC-GCCATGCTTGTCCGGTTCATC	415	CGGAGGAGGTGGGTACGGT	461	268
	(TA)18	NED-CGTCCGTCCTGTGTAGGC	439	GAGTGGCAACATGGAAGTT	410	230
	(GAA)21	PET-CTACAGGGGGCACTTAGCTC	421	GGACTAAACATCCCGTTTT	404	201
4	18-8	PET-GCCCGTCTATCCGATCAA	425	GCAAGATCAGCACGCAAT	418	188
	12-5	VIC-CTGGTCCACTTGGGTACGAC	451	GGAGAAGGAGGCGCAATACA	414	289
	23-1	6FAM-CGGAAGCCCTGGAGGAG	431	CGCTTAAATCCGCTCC	560	143
	(TA)19	PET-TAGATCAAAAGCAATGCA	480	TGATAATCACGTGTTCCGC	480	185

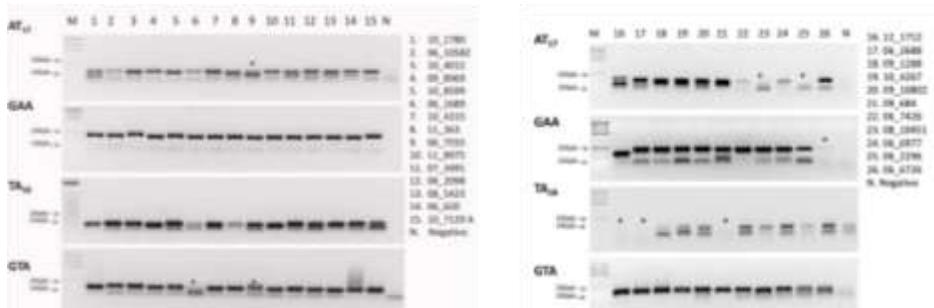
Éstos se han estudiado en todo el mundo en forma epidemiológica y en relación a sus frecuencias encontrándose que, los más comunes son los subtipos 1 (encontrándose en México el GTA y AT17) y el subtipo 3 ( con la secuencia GAA y TA18).<sup>7,8</sup>

En un estudio previo realizado en este hospital, en biopsias de pacientes del norte del país con diagnóstico de Lepra Lepromatosa, se observo que en nuestra población el

Mycobacterium Leprae presentó amplificación para las repeticiones en tándem para las secuencias GAA, AT17, TA18 y GTA. Siendo la secuencia GAA, la más frecuente en las muestras analizadas (26 casos).

**Fig.8**

(Ligia, 2013)



## **Originalidad**

Son pocos los trabajos realizados acerca de las secuencias y polimorfismos genéticos del *Mycobacterium Leprae* sin existir reportes en la población mexicana.

Dado que el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario es un centro de referencia para casos de Lepra es de importancia realizar estudios comparativos estratificando los grupos.

### **Justificación.**

Dado que la lepra ocupa un lugar preponderante en nuestro medio como causa de enfermedad e incapacidad, es de importancia estudiar las codificaciones de genes más frecuentemente observados.

Los métodos de tipificación de las cepas de *M. Leprae* pueden ser de gran ayuda para el conocimiento epidemiológico de este microorganismo, ayudando a identificar fuentes de infección, patrones de transmisión y permitiendo diferenciar entre los eventos de recaída y reinfección.<sup>11</sup>

## **Hipótesis.**

Hi1: La amplificación para las repeticiones en tándem (VTNR) para la secuencia GAA es la mas frecuente observada en pacientes del sur de la República Mexicana.

Hi2: El número variable de repeticiones en tándem (VTNR) para las secuencias GAA, AT17, TA18 y GTA en el Mycobacterium Leprae en los pacientes del sur de la República Mexicana son similares a las observadas en nuestra población.

## **Hipótesis nula.**

Ho1: La amplificación para las repeticiones en tándem (VTNR) para la secuencia GAA no es la más frecuente observada en pacientes del sur de la República Mexicana.

Ho2: El número variable de repeticiones en tándem (VTNR) para las secuencias GAA, AT17, TA18 y GTA en el Mycobacterium Leprae en los pacientes del sur de la República Mexicana no son similares a las observadas en nuestra población.

### **Objetivo general.**

Determinar la frecuencia de las secuencias seleccionadas en la población del sur de la República Mexicana.

### **Objetivos específicos.**

Determinar cuál de las secuencias investigadas corresponde a la más frecuentemente encontrada en la población del sur de la República Mexicana.

Comparar si las secuencias analizadas se presentan en forma similar a nuestra población.

## Material y métodos.

Este trabajo es retrospectivo, comparativo, descriptivo.

El universo de nuestra casuística será determinado como “muestra por accidente” en un período de tiempo de 3 años.

### Cálculo de la muestra

El cálculo de la muestra se realizó utilizando una formula se hizo el cálculo de equivalencia de proporciones con una confianza del 95% y una potencia del 80 % bilateral, aceptando proporciones equivalentes  $\pm 5\%$ .

$$n = \frac{2pq(K)}{\epsilon^2}$$

valor $\epsilon$	0.1
valor k	7.9
valor p	0.99
valor q	0.01

p= Proporción esperada de la variable de interes en grupo

q= 1-p1 (complementario, sujetos que no tienen la variable de estudio)

K= Constante K determinada por valores de  $z\alpha$  y  $z\beta$ .

$\epsilon$ = Amplitud del intervalo aceptable para considerar equivalencia

Se llegó a la conclusión de que se requieren 14 pacientes por grupo para conseguir significancia estadística.

### Diagrama de flujo de la muestra

Se obtuvieron muestras de pacientes originarios del sur del país, los cuales acudieron a consulta dermatológica dentro del sistema de Secretaría de Salud del Estado de Guerrero y fueron biopsiados con sacabocado para su posterior estudio anatomopatológico.

Debido a que el Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología de nuestro hospital es centro de referencia nacional para el estudio de Lepra, las muestras antes descritas fueron enviadas en formol para su procesamiento histológico y diagnóstico oportuno en nuestro hospital. Posteriormente cada bloque de será almacenado para asegurar su adecuada conservación, asegurando así la posibilidad de realizar estudios ulteriores en beneficio del paciente, los cuales son independientes a éste protocolo.

Estas muestras se enviarán al CIDICS (Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud), debido a que éste centro cuenta con el reactivo y personal capacitado para realizar el análisis de VNTR's con PCR de punto final.

Al terminar éste proceso, el material biológico residual será desechado de siguiendo la Norma Oficial Mexicana para el manejo de R.P.B.I. (NOM-087-ECOL-SSA1-2002)

## **Diseño.**

### Criterios de inclusión:

- Diagnostico histológico de lepra lepromatosa por primera vez
- Positividad para tinción de Fitte con presencia de abundantes bacilos
- Disponibilidad de los bloques de parafina
- Adecuada fijación del tejido
- Positividad para PCR confirmatorio.

### Criterios de exclusión:

- Ausencia de bloques de parafina
- Inadecuada fijación del tejido
- Laminillas sin bloques de parafina
- Material insuficiente para realizar estudios de microarreglos.

### Búsqueda de pacientes y selección del material

Se revisaron al microscopio las laminillas disponibles de todos los casos recibidos de pacientes originarios del estado de Guerrero durante los años 2014 y 2015. Se recibieron 18 biopsias de piel provenientes de Guerrero, México, fijadas en formol y embebidas en parafina, en donde se realizaron cortes de microtomo de 5 micras de espesor, para posteriormente ser teñidas con HyE y Fitte Faraco.

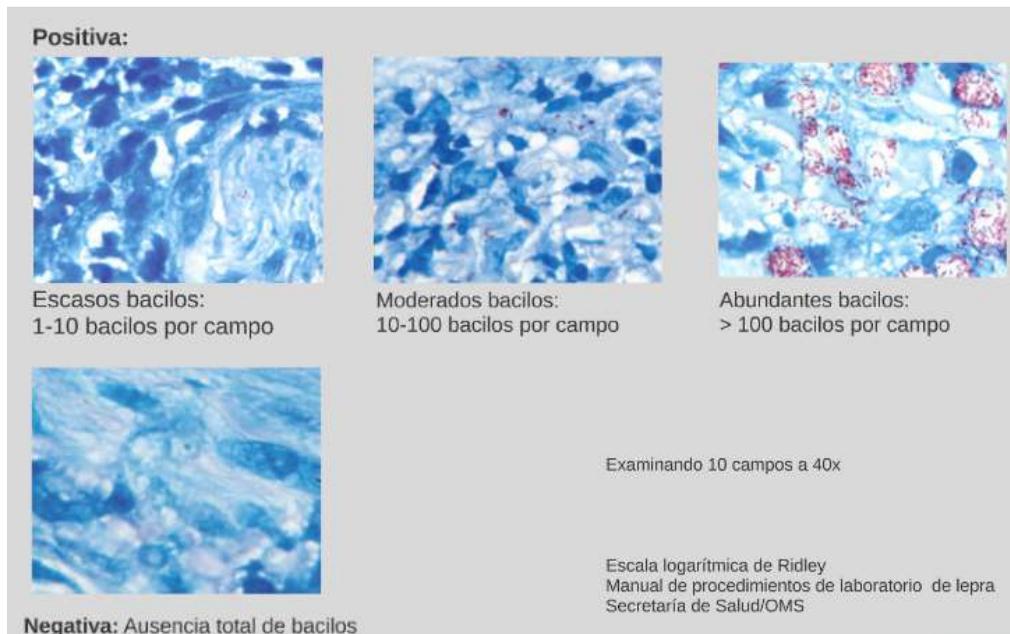
Para cada caso se revisaron secciones con tinción de HyE las cuales se organizaron de acuerdo a la Clasificación de Riedley y Jopling.

- Lepra Lepromatosa
- Lepra Limitrofe Lepromatosa
- Lepra Limitrofe
- Lepra Limitrofe Tuberculoide
- Lepra Tuberculoide
- Lepra Indeterminada

Para cada caso se revisaron secciones con Tinción de Fitte Faraco la cual se clasificó de la siguiente forma (examinando 10 campos a 40x):

- Escasos bacilos: 1-10 bacilos por campo
- Moderados bacilos: 10-100 bacilos por campo
- Abundantes bacilos: > 100 bacilos por campo

- Negativa: Ausencia total de bacilos



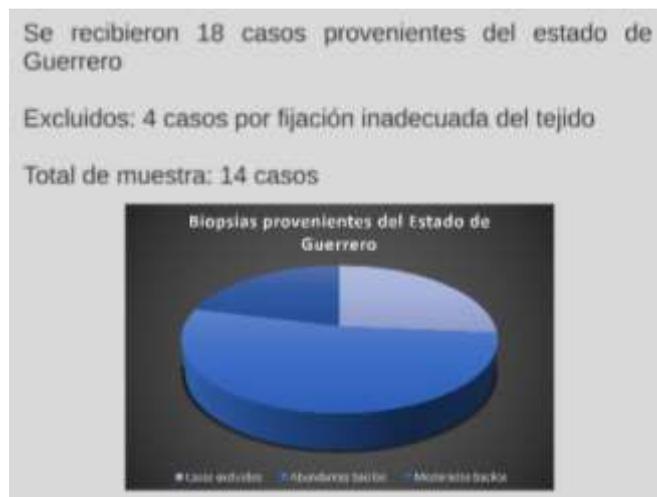
Todos los resultados fueron tabulados en Microsoft Excel 2016 a través de filas ordenadas por el No. de folio del quirúrgico, con columnas de:

- Datos clínicos: sexo, edad, diagnóstico histológico, lugar de nacimiento.
- Tinción de Fitte: Positividad (abundantes, moderados, escasos) o Negatividad
- Presencia o no de amplificación para el tipo de secuencia específica

Se realizó una base de datos con el programa Excel donde se agregaron datos obtenidos de los reportes como hallazgos histopatológicos y cantidad de bacilos.

Se filtraron los casos con material suficiente y adecuada cantidad de bacilos. Los casos seleccionados se buscaron en el almacén de bloques de parafina del servicio de anatomía patológica de hospital universitario de la UANL, se seleccionaron los bloques de parafina de mejor calidad y sin contaminantes (a criterio del patólogo investigador).

Estos bloques se cotejaron con la laminilla teñida con la técnica de Fitte Faraco para ser reevaluados en caso de ser necesario, además de con el reporte original de diagnóstico.

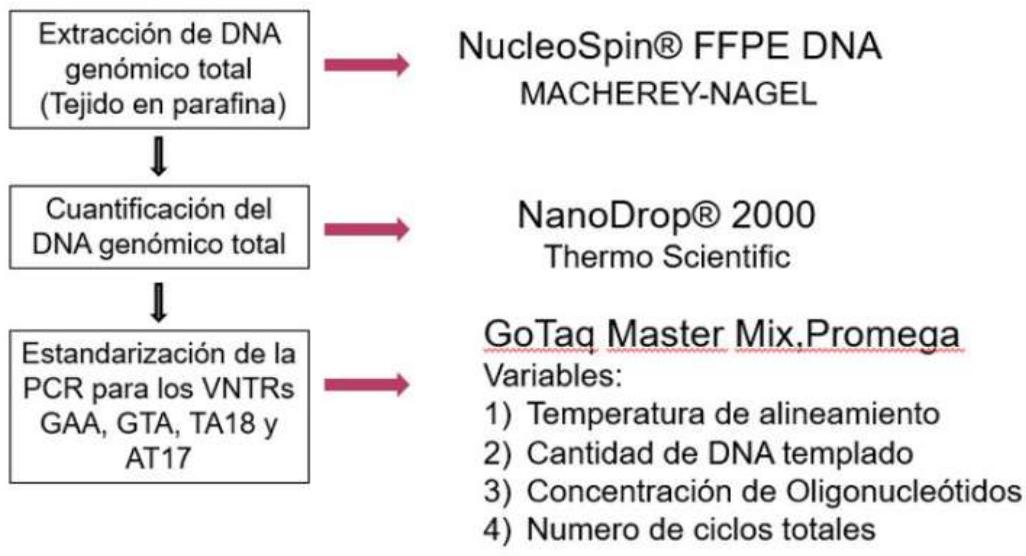


Posteriormente se realizaron entre 4 y 7 secciones de aproximadamente 10 micras al bloque de parafina para la obtención de tejido infeccioso parafinado y se colocó en un tubo de ependorff correctamente identificado con el número del espécimen.

Se seleccionó material representativo para realizar PCR confirmatorio para la identificación de *M. Leprae*

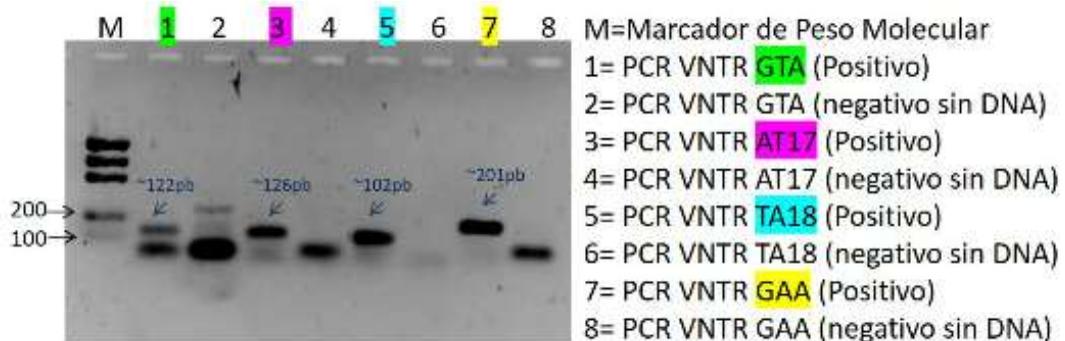
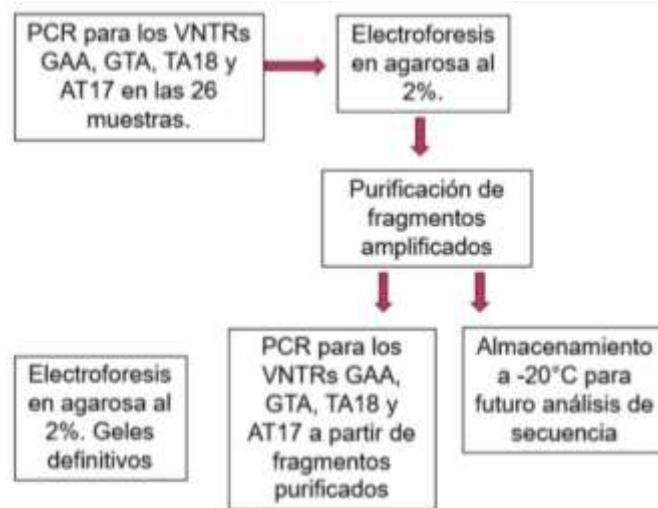
Secuencia	Región cromosómica	Primer sequences
GAA	2785433-2785495	Forward, 5'-CTACAGGGGGCACTTAGCTC Reverse, 5'-GGACCTAAACCATCCCGTTT
AT17	2597735-2597768	Forward, 5'-ACCCGGAATTCCTCCAAG Reverse, 5'-GCCAGAAGCGTCATCTGTTC
TA18	984591-984626	Forward, 5'-CCGCGTTAGCATAGGCAAT Reverse, 5'-AACGGTTAGGTCGAGACCAC
GTA	2583814-2583840	Forward, 5'-CGCAGATGCAACGATCAC Reverse, 5'-AATATGCATGCCGGTGGT

### Proceso de realización de PCR



El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El equipo de lectura y análisis presentara un informe en el que se indiquen los resultados.

## Resultado de la estandarización del PCR



Gel 1.5% agarosa. Partiendo de ~60ng de DNA genómico total, extraído de la muestra 06\_2688. Concentración final de 2pmoles/uL para cada oligonucleótido.

### Programa:

- 1) 95°C por 5 min,
- 2) 95°C por 30 seg,
- 3) 60°C (GTA y TA18) y 55.2°C (GAA y TA17) por 30 seg
- 4) 72°C por 1 min
- 5) Repetir 39 veces desde paso 2)
- 6) 72°C por 3 min
- 7) Fin

## **Análisis estadístico**

No se realizó análisis estadístico, ya que el tamaño total de las biopsias obtenidas fue menor al calculado inicialmente, sin embargo, éste corresponde al total del universo de muestras.

## Resultados

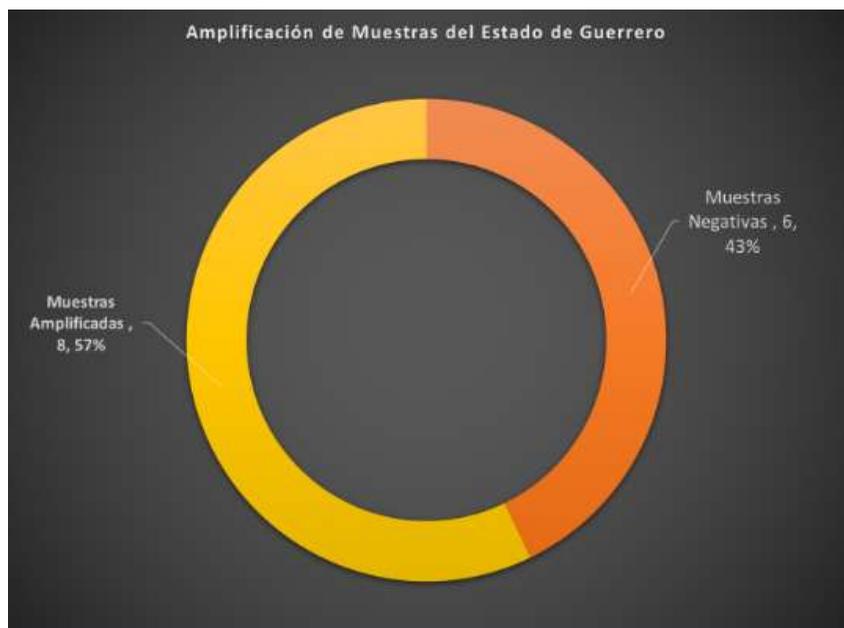
De las muestras obtenidas, después de revisar los datos demográficos, podemos observar que la proporción entre hombres y mujeres afectados por lepra lepromatosa, es similar entre los estados de Nuevo León y Guerrero, lo cual apoya la validez de nuestro estudio, a pesar de que el número de muestra obtenido sea menor al deseado.

Esta proporción fue de 71.47% en hombres y 28.57% en mujeres para el estado de Guerrero, y 64.95% en hombres y 38.14% en mujeres para el estado de Nuevo León

Además, es importante recalcar que ésta proporción es similar a la reportada en la literatura a nivel mundial.

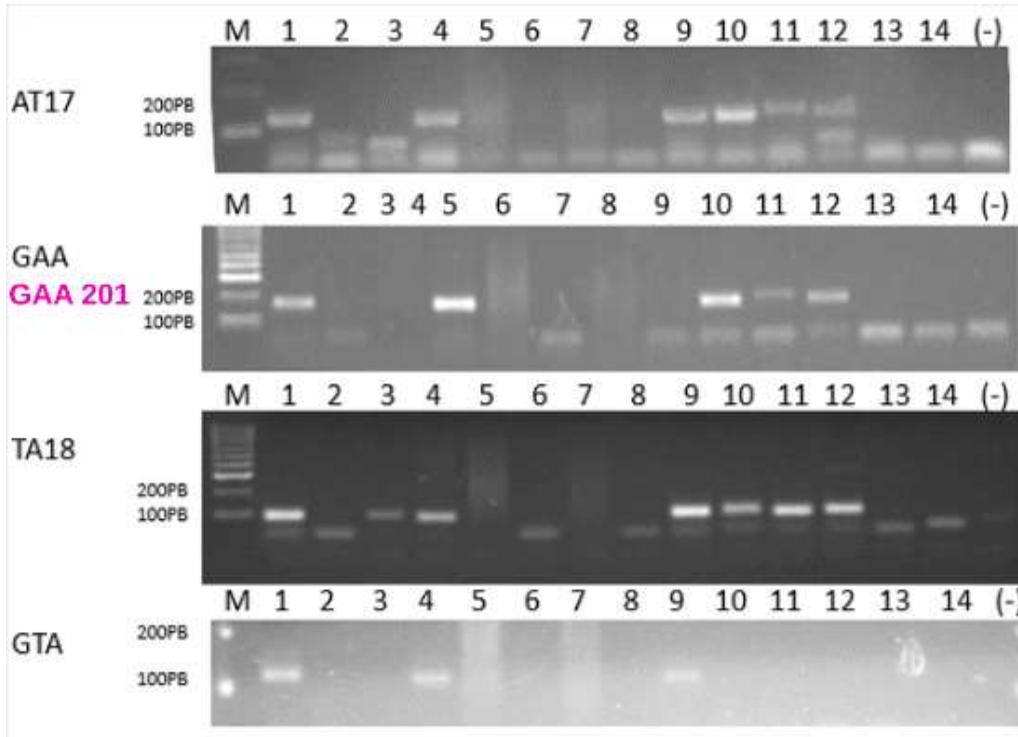


De los 14 casos analizados con PCR, sólo 8 mostraron amplificación para PCR, esto se atribuye a mal manejo inicial de la muestra, así como baja concentración de formol al momento de fijación del tejido y los días de traslado, los cuales contribuyen a la degradación del ADN bacteriano y su falta de expresión durante la realización del PCR. Lo anterior a pesar de usarse el doble de tejido recomendado durante el procedimiento de la técnica.



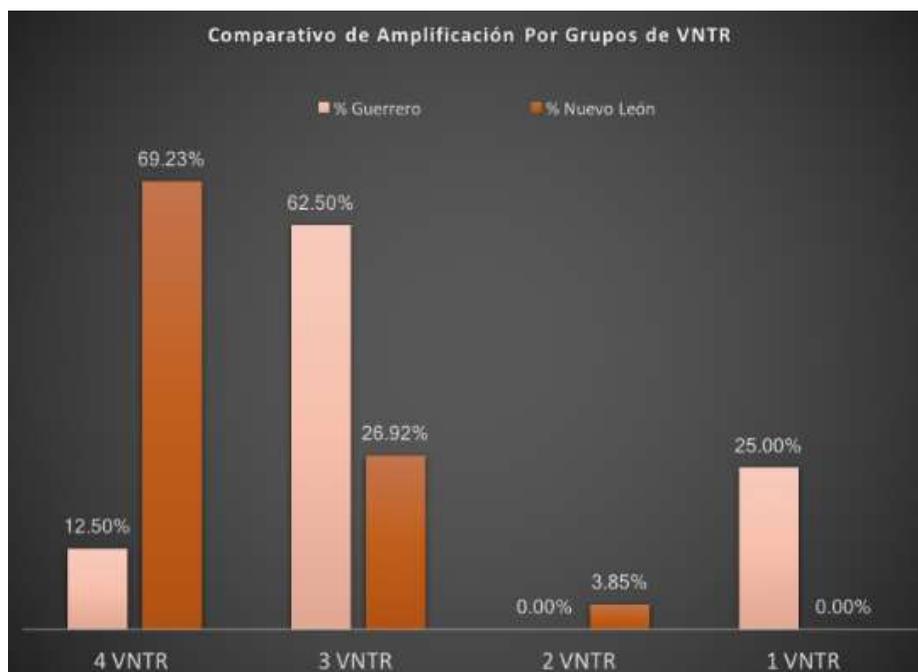
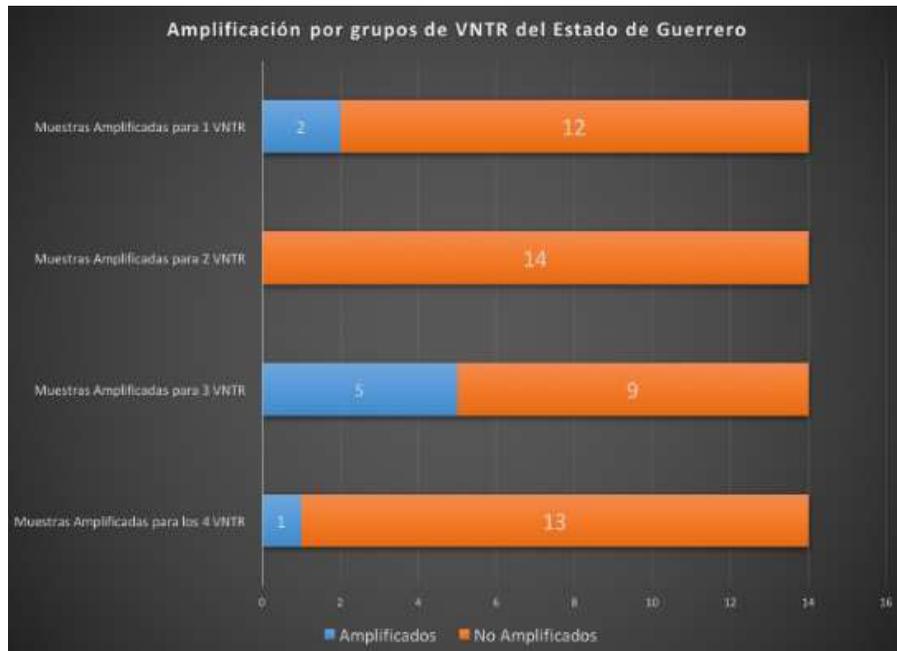
Entre las muestras amplificadas se puede observar que la expresión de GAA que originalmente fue encontrada en las muestras del estudio anterior en este hospital, las cuales fueron estandarizadas en 201 pares de bases, en este caso mostraron una cantidad inferior, fácilmente observable por debajo de las 200 pares de bases.

Sin embargo, éste trabajo no tiene, entre sus alcances, determinar la causa de éste fenómeno. A pesar de ello, las teorías posibles son una alteración ocasionada por el manejo de la muestra o una mutación aun no descrita dentro del ADN bacteriano.

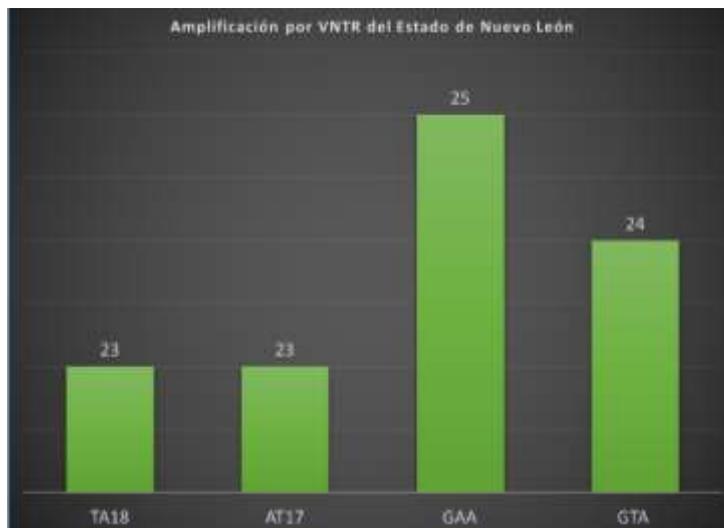


Otro hallazgo interesante fue que, entre las muestras amplificadas, la mayoría amplificó, como mucho en 3 VNTR distintos y sólo 1 para cuatro, mientras que en el trabajo anterior observamos esta amplificación en 5 de éstas.

Mientras que en nuestro estudio se observa una gran diferencia respecto a las que expresaron sólo una amplificación de VNTR. Lo cual implica que quizá se deban buscar otros pleomorfismos dominantes en las muestras del Estado de Guerrero.



Por último se observó que la secuencia más común de VNTR para la población del estado de Guerrero corresponde a TA18, mientras que en el estado de Nuevo León fue la de GAA.



## **Conclusiones.**

La secuencia TA18 es la más frecuente en pacientes del sur de la República Mexicana, a diferencia de GAA, presente en Nuevo León

Los pacientes del sur de la República Mexicana amplifican, en su mayoría, sólo para tres secuencias TA18, AT17 y GAA, a diferencia de las cuatro observadas en Nuevo León

Es necesario secuenciar las muestras para tener el número exacto de repeticiones para cada VNTR con el fin de ver la variabilidad genética de las cepas

Es indispensable continuar estudiando los casos nuevos para mejorar el entendimiento genético de *M. Leprae* y comprender así las rutas de transmisión y diseñar de estrategias preventivas y terapéuticas

## Bibliografía.

1. WHO. (2015). *Fact Sheet Lepra*. mediacentre.
2. (2014). *Boletín del SUIVE, Programa de prevención y control de la Lepra*. México.
3. Centro Nacional de Programas Preventivos y Centro de Enfermedades (CENAPRECE). (2012). *Programa de Lepra*. Ciudad de México.
4. Hunter, S. F. (1982). Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *Journal of Biological Chemistry*, 15072-15078.
5. Javier, L.-A. F. (1998). *Diagnóstico y tratamiento de la lepra*. México: Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública.
6. Ligia, G. C. (2013). Análisis de VNTRs más frecuentes en pacientes con *mycobacterium Leprae* en el hospital Universitario". *Servicio de Anatomía y Citopatología*.
7. O., R. (2013). *Clasificación de la lepra. Resumen bibliográfico*. México.
8. Phetsuksiri, B. R. (2006). A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 319-328.
9. Rada E, A. N. (2009). Respuesta inmunitaria de la enfermedad de Hansen. *Invest Clinica*, 50.
10. sanitarias, C. d. (2011). *Informes trimestrales de lepra*. Nuevo León México: Prevención y control de la lepra.
11. Singh, P. &. (2011). *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future microbiology*, 57-71.
12. Supply, P. M. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*, 762-771.
13. Woods, S. A. (1989). A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS microbiology letters*, 305-309.
14. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, et al: The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:338–381