

Incremento de óxido nítrico en el suero y sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes con la enfermedad de Hansen en estado reaccional tipo II.

Elsa Rada¹, Miguel Marzal¹, Nacarid Aranzazu² y Jacinto Convit³.

¹Laboratorio de Leprología y Patología Experimental, ²Sección Clínica, ³Instituto de Biomedicina, Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

Palabras clave: Óxido nítrico, eritema nodoso lepromatoso, inflamación.

Resumen. El término "reacción" es usado en lepra para describir síntomas y signos de inflamación aguda. En la forma multibacilar de la enfermedad se producen reacciones tipo II, es decir, eritema nodoso lepromatoso (ENL). El óxido nítrico (ON) podría jugar un papel en la respuesta del huésped, donde la producción elevada de ON estaría involucrada en cuadros inflamatorios agudos. En este trabajo se evalúa la producción de ON en suero y en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares (CMN). El ON fue medido indirectamente por el método de Griess. En suero, el 52% de los pacientes con ENL (15/29) presentó niveles de nitritos/nitratos mayores de 30 μM ; así, 8/15 presentaron una concentración de $36,38 \pm 5,71 \mu\text{M}$; 1/15 de $70,5 \mu\text{M}$ y 6/15 mayor de $100\mu\text{M}$ ($205,97 \pm 5 \mu\text{M}$). En concordancia con estos resultados, se encontró que sólo los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de los pacientes con ENL colectados a las 120 horas de incubación presentaron niveles significativamente elevados de nitritos/nitratos ($10 \mu\text{M} \pm 6,53$), en comparación con los sobrenadantes de los polos estables de la enfermedad, lepra lepromatosa y lepra tuberculoide, cuyos valores fueron $2,52 \mu\text{M} \pm 1,18$ y $2,69 \mu\text{M} \pm 1,07$, respectivamente. Los resultados muestran niveles relativamente incrementados de nitritos/nitratos en el grupo de pacientes con estado reaccional tipo II (ENL), lo cual sugiere la participación de la iNOS en este grupo.

Increase in nitric oxide concentrations in serum and mononuclear cell cultures from patients with Type II reaction state of Hansen's disease.

Invest Clin 2002; 44(2): 129-136

Key words: Nitric oxide, *erythema nodosum leprosum*, inflammation

Abstract. The word "reaction" is used in leprosy to describe signs and symptoms of acute inflammation. Type II reactions, including *erythema nodosum leprosum* (ENL) occur in the multibacillary forms of Hansen's disease. Nitric oxide (NO) could play a role in the response of the host, where a high NO production would be involved in acute inflammatory processes. In this paper we evaluate NO production in serum and in the supernatants of mononuclear cell cultures (MNCC), measured indirectly by Griess' method. The results obtained in serum showed that 52% of patients with ENL (15/29) had a production over 30 μM , distributed as follows: 8/15 had a mean concentration of $36.38 \pm 75.71 \mu\text{M}$; 1/15, 70.5 μM and 6/15 had a mean concentration greater than 100 μM ($205.97 \pm 5 \mu\text{M}$). Forty eight percent presented nitrite and nitrate levels lower than 30 μM (18.93 ± 6.15). Only supernatants of mononuclear cell cultures from ENL patients collected at 120 hours of incubation presented NO production levels higher than 10 $\mu\text{M} \pm 6.53$, as compared with the supernatants from the stable polar forms of the disease (lepromatous leprosy and tuberculoid leprosy), where values were 2.52 $\mu\text{M} \pm 1.18$ and 2.69 $\mu\text{M} \pm 1.07$, respectively. These preliminary results show a different metabolic activity in the group of patients with Type II reaction state (ENL).

Recibido: 20-05-02. Aceptado: 08-04-2003.

INTRODUCCIÓN

La lepra sigue siendo un problema de salud pública en muchas partes del mundo. Esta enfermedad presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas e histopatológicas, las cuales son un reflejo de la respuesta inmunológica del individuo ante la bacteria invasora, *Mycobacterium leprae*. En una región del espectro, hay una ausencia de respuesta inmune celular frente al agente causal, la cual es específica para el *M. leprae* y no hacia otras micobacterias (1). La progresión de la enfermedad es lenta e indolente, pero en algunos casos hay cambios en el estado inmunológico del individuo desarrollando episodios agudos representados

por los estados reaccionales que pueden ser de tipo I y de tipo II (2-4). El eritema nodoso lepromatoso (ENL), el más frecuente de las reacciones de tipo II, se presenta en pacientes con lepra lepromatosa (LL) y ocasionalmente con lepra lepromatosa borderline (BL) debido a la formación de complejos inmune, como respuesta de anticuerpos al glicolípido fenólico (GLP-I) y otros antígenos presentes en el bacilo (5). Estas reacciones pueden presentarse antes, durante o post-tratamiento y deben ser diferenciadas de recaídas.

El óxido nítrico (ON) puede jugar un papel importante en la respuesta inmune del huésped, donde la producción elevada de ON estaría involucrada en cuadros infla-

matorios agudos. Muchos datos sobre desórdenes con reacciones pro-inflamatorias Th1 involucran a macrófagos activados y neutrófilos, señalando una actividad destructiva por la expresión de la enzima sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), contribuyendo así al daño tisular local (6). Aún cuando escasos trabajos han demostrado una alta producción de óxido nítrico en células humanas *in vitro*, macrófagos activados indudablemente juegan un papel importante en la resistencia del huésped a infecciones bacteriales. La iNOS es la enzima responsable de la síntesis sostenida y elevada de ON por macrófagos activados. El ON podría jugar un papel microbicida que ha sido poco investigado en Hansen. El ON es altamente inestable y se transforma en nitritos/nitratos.

Como una primera etapa de estudio, en este trabajo se midieron los metabolitos de óxido nítrico (nitritos/nitratos) en suero y en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares en pacientes con la enfermedad de Hansen, incluyendo aquellos que presentan estado reaccional tipo II, ENL.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes

Los pacientes estudiados procedían de la Sección Clínica del Instituto de Biomedicina, en Caracas, Venezuela. Para clasificar la forma de la enfermedad de acuerdo a la escala Ridley-Jopling (7), se usaron criterios clínicos, bacteriológicos e histopatológicos. Se evaluaron 84 personas, de las cuales 56 fueron pacientes distribuidos en el espectro de la enfermedad: 16 pacientes multibacilares (MB) no reaccionales, 29 pacientes multibacilares reaccionales tipo ENL y 11 pacientes paucibacilares (PB). El resto (28) fueron personas sanas provenientes del Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital, quienes conformaron el grupo control (edad promedio: $35,97 \pm 13,33$

años). Todos los pacientes eran adultos con una edad promedio de $41,48 \pm 14,75$ años, representados por 82% del sexo Masculino y 18% del sexo Femenino. Los pacientes, al momento de la toma de la muestra, no habían sido sometidos a tratamiento.

2. Determinación de nitrito y nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)

Los niveles de nitritos/nitratos fueron medidos en suero y sobrenadantes de cultivos de células mononucleares usando la reacción de Griess (8). Brevemente, 50 μL de reactivo de Griess fueron añadidos a 50 μL de suero, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 570 nm. Los resultados obtenidos fueron referidos a un patrón de nitrito de sodio y expresado en μmolar .

3. Separación de células mononucleares (CMN)

Células mononucleares provenientes de 20 mL de sangre periférica fueron obtenidas mediante centrifugación a 400 g durante 30 minutos, en un gradiente de densidades con Ficoll-Hypaque ($d=1.077$) y luego fueron cultivadas *in vitro* en placas de 96 pozos fondo plano. A cada pozo se añadió 100 μL provenientes de una suspensión celular que contenía 1×10^6 CMN/mL. Los sobrenadantes fueron recolectados a las 24 y 120 horas de cultivo y conservados a -20°C para la posterior determinación de ON. Los pacientes escogidos para el ensayo en cultivo no fueron relacionados con los niveles séricos de ON.

Análisis estadístico

Las muestras fueron analizadas por duplicado para los sueros y en triplicado para los sobrenadantes de cultivo de las células mononucleares. Los resultados fueron expresados como la media de los valores \pm desviación estándar. La comparación de las medias fue analizada mediante la prueba

t-de Student para datos pareados y no pareados, con un nivel de significancia del 95% de confianza.

RESULTADOS

El 52% (15/29) de los pacientes ENL presentaron niveles de ON en el suero $> 30 \mu\text{M}$ en comparación con los niveles de ON de los pacientes MB no reaccionales y PB, quienes presentaron estos niveles en menor proporción, 31% (5/16) y 27% (3/11), respectivamente. En el grupo control sólo el 14,29% presentó valores $> 30 \mu\text{M}$ (Tabla I).

Células mononucleares (CMN) fueron cultivadas *in vitro* durante 24 y 120 horas. CMN de todos los grupos estudiados presentaron niveles más bajos de NO_2^- a las 24 horas que a las 120 horas. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de NO_2^- en los cultivos de CMN a las 24 horas de todos los grupos, pero presentaron valores de ON más bajos ($p < 0,05$), que los cultivos de 120 horas, excepto en el grupo PB ($p > 0,1$). A las 120 horas de cultivo,

sólo el grupo con ENL presentó niveles de producción de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ mayores a los observados en las CMN de los polos estables de la enfermedad MB y PB y en el grupo control ($p < 0,05$) (Tabla II).

DISCUSIÓN

La producción de intermediarios nitrogenados por macrófagos es esencial para la defensa del huésped, particularmente para ejercer acciones bactericidas y tumoricidas. El óxido nítrico es una molécula inestable encontrada en los sistemas biológicos y es rápidamente convertida en nitritos y nitratos. Hay evidencias de producción de nitrato endógeno, especialmente en respuesta a estímulos inflamatorios donde la producción de nitrato *in vitro* podría estar inducida por los macrófagos murchados en presencia de lipopolisacárido (9, 10).

Macrófagos activados pueden convertir la L-arginina a NO_2^- en presencia de la enzima iNOS, con el desarrollo de una actividad citotóxica contra células tumorales (11) y

TABLA I
CONCENTRACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (μM) SÉRICO EN PACIENTES
CON LA ENFERMEDAD DE HANSEN

Pacientes	Concentración de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$	
	$> 30 \mu\text{M}$	$< 30 \mu\text{M}$
ENL n=29	$36,8 \pm 5,71^*$ (8/15) 70,5 (1/15) $205,97 \pm 5,0$ (6/15) (15/29)	$18,93 \pm 6,15$ (14/29)
MB n= 16	$35,67 \pm 5,69$ (5/16)	$15,2 \pm 3,1$ (11/16)
PB n= 11	$36,07 \pm 4,72$ (2/11) 117,8 (1/11) (3/11)	$15,27 \pm 7,79$ (8/11)
Controles n= 28	$66,70 \pm 11,41$ (4/28)	$8,16 \pm 6,26$ 24/28)

* Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

TABLA II
 PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO
 EN SOBRENADANTES DE CULTIVO
 DE CÉLULAS MONONUCLEARES
 A DIFERENTES HORAS DE INCUBACIÓN

Pacientes	Concentración de NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (µM)	
	24 horas ¹	120 horas ²
ENL	2,28*	10,93
n=5	± 0,79	± 6,53
MB	1,14	2,52
n=8	± 1,20	± 1,18
PB	1,84	2,69
n=6	± 0,9	± 1,07
Controles	1,27	3,67
n=5	± 0,76	± 1,98

*Resultados son expresados como media ± desviación estándar. ¹Concentración de NO₂⁻/CMN/24 horas de cultivo. ²Concentración de NO₂⁻/CMN /120 horas de cultivo.

frente a infecciones bacteriales (12,13). Hay pocos trabajos donde reportan que macrófagos humanos sean capaces de expresar iNOS y presentar actividad enzimática. No sólo se ha encontrado actividad de ON en procesos infecciosos como VIH, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, malaria e infecciones del tracto respiratorio y urinario, también se ha observado en una diversidad de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónica (6). El gen iNOS de humanos presenta un promotor altamente complejo, desconociéndose los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de ON.

En la literatura existen muchos datos de desórdenes humanos con predominante reacción proinflamatoria Th1 que involucra a macrófagos y neutrófilos activados, con una actividad destructiva por parte de ON contribuyendo a daño tisular local.

Aunque la estimación de los niveles de nitritos/nitratos por el método de Greiss en suero está sujeta a variación por diversos

factores inespecíficos como: dieta, presencia de proteínas séricas, hábito de fumar, presencia de lípidos (14,15) y a pesar de que en nuestras condiciones experimentales tales factores pudiesen estar presentes, el valor promedio de los niveles de NO₂⁻/NO₃⁻ de todos los sujetos controles fue de 25,1 ± 3,59 µM, valor que está en el rango reportado por otros investigadores (16). Basados en este valor y considerando las limitaciones experimentales y la posible sobreestimación de los niveles de nitritos/nitratos en nuestras mediciones, se tomó el valor de 30 µM como punto de referencia.

Los niveles de NO₂⁻/NO₃⁻ de los pacientes MB fueron de 33,9 ± 12,16 µM, ligeramente superior al valor de referencia. Los pacientes PB presentaron niveles de 28,83 ± 9,68 µM, mientras que en los pacientes ENL se encontraron niveles de 63,73 ± 15,30 µM, los cuales resultaron mayores que el valor de referencia con una diferencia significativa con respecto al control de p < 0,05.

En el grupo de personas evaluadas, incluyendo 56 pacientes del espectro de la enfermedad y 28 individuos sanos, se encontró una fuerte correlación entre altos niveles de metabolitos de ON en suero y la presencia del estado reaccional tipo ENL. Cincuenta y dos por ciento de los pacientes ENL presentaron valores de ON > 30 µM en comparación con 31% de los pacientes lepromatosos, 27% de los pacientes tuberculoides y 14% de controles sanos. En estudios previos, realizados en este laboratorio fueron reportados niveles de nitrito en suero, tanto en pacientes MB y PB. En los pacientes MB se evidenció una disminución de los niveles de nitritos/nitratos con el tratamiento, la cual estuvo correlacionada con la reducción de la carga bacilar en estos pacientes (17).

En los sobrenadantes provenientes de cultivos de células mononucleares de pacientes ENL se observó un incremento significativo de ON, a las 120 horas de cultivo,

en ausencia de antígeno micobacterial, mientras que en los sobrenadantes de los grupos de pacientes MB, PB y grupo control no se encontraron variaciones. Este resultado, indica que las células mononucleares de los pacientes ENL producen ON en ausencia de proliferación celular. Además permite inferir la prevalencia en la producción de ON en algunos pacientes ENL, aún en ausencia de estimulación antigénica. Se desconocen los mecanismos moleculares responsables de tal efecto.

Trabajos reportados con macrófagos de pacientes con Hansen demuestran que los macrófagos/monocitos de pacientes lepromatosos BL/LL y tuberculoide BT/TT fueron capaces de producir ON en ausencia de estimulación. Sólo los macrófagos de los pacientes BL/LL fueron capaces de producir altos niveles de ON durante el primer día de cultivo y hubo una disminución gradual con el tiempo de cultivo. En cuanto a los macrófagos de personas normales, mostraron niveles muy bajos de liberación de nitrito (16).

Estudios previos reportaron altos niveles de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($1817 \pm 492 \mu\text{M}$) en la orina de pacientes Etíopes que presentaron reacciones de reversión tipo 1 (18). En el presente trabajo, los antígenos utilizados para los ensayos de proliferación celular fueron proteicos, no encontrándose correlación entre la estimulación de los linfocitos y la producción de nitritos y nitratos (dato no mostrado). Esto indica que la producción de ON y proliferación celular bajo alguna circunstancia pueden ser procesos independientes. Probablemente la producción de ON está asociada a la naturaleza bioquímica del antígeno. En tal sentido, sería interesante plantearse estos mismos ensayos utilizando ciertos componentes micobacteriales como el glicolípido fenólico.

A pesar de las limitaciones metodológicas, en este trabajo se detectó un incremento relativo en los niveles de ON, tanto en

suelo como en cultivo, en el grupo reaccional. Es poco probable que tal incremento esté asociado a factores inespecíficos (dieta, hábito tabáquico, proteínas séricas, etc). Los resultados no son consistentes con tal premisa, tanto en el grupo control como los MB y PB, sujetos a los mismos factores, no se observó elevación en los niveles de nitritos/nitratos; la elevación se presenta sólo en el grupo ENL, siendo este resultado corroborado en los sobrenadantes de los cultivos celulares del mismo grupo, donde los factores inespecíficos están minimizados.

La evaluación del ambiente de citoquinas en este grupo reaccional sería importante para poder correlacionar el microambiente celular con la presencia de ciertos activadores (citoquinas) y la producción de ON. Trabajos previos, utilizando métodos inmunocitoquímicos en piel de lesiones de pacientes con lepra y en pacientes que presentaron reacciones de reversión tipo I, encontraron que la expresión iNOS fue mayor en el polo tuberculoide del espectro y se incrementa en los estados reaccionales tipo I. También observaron que $\text{TGF-}\beta$ estuvo presente a lo largo de todo el espectro de lepra encontrándose elevado en el polo lepromatoso (19). Se conoce que el $\text{TGF-}\beta$ inhibe la iNOS inducida por $\text{TNF-}\alpha/\text{INF-}\gamma$ y reacciones tipo 1 tienen muy bajos niveles de $\text{TGF-}\beta$, mucho menos de lo encontrado en resto del espectro (19). Su reducción podría ser un factor importante en la producción de una respuesta inflamatoria no regulada y así contribuir a la promoción de la fibrosis y, como consecuencia, afectar a los nervios periféricos, característica de la patología destructiva de lepra.

Un estudio de cohorte en Etiopía reporta que el 27% de los pacientes con lepra presentaron reacciones recurrentes (20). Otro grupo ha estudiado a pacientes BL quienes desarrollaron ENL, seguido de una reacción de reversión 12 meses después (21). Con este conocimiento los pacientes

reaccionales son un grupo complejo de analizar, con una serie de manifestaciones clínicas entre ellas nódulos eritematosos, piroxia, poliartralgia, paniculitis y neuritis.

Este estudio sugiere la existencia de alteraciones en la producción de ON en el grupo reaccional tipo II. Sería interesante incrementar el número de pacientes y hacer estudios con métodos más sensibles y específicos de la expresión y actividad de la enzima iNOS en pacientes con estado reaccional tipo II.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Morella Rodríguez-Ortega por su apoyo incondicional y a la Dra. Marian Ulrich por sus críticas oportunas en la revisión del trabajo.

REFERENCIAS

1. Rada E, Convit J, Ulrich M, Gallinoto ME, Aranzazu N. Immunosuppression and cellular immunity reactions in leprosy patients treated with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. *Int J Lepr* 1997; 55: 646-650.
2. Convit J, Ulrich M. Leprosy: Bacterial, Pathological, Immunological and Immunopathological Aspects. In: T. B. Fitzpatrick, Ed. *Dermatology in General Medicine*. New York: Mc Graw- Hill, Inc; 1989. P 33 – 78.
3. Browne SG. Erythema nodosum in leprosy. *J Chron Dis* 1963; 16: 23-30.
4. Pettit JHS, Waters MFR. The etiology of erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* 1967; 35:1-10.
5. Ulrich M, Smith PG, Sampson C, Zuñiga M, Centeno M, García V, Manrique X, Salgado A, Convit J. IgM antibodies to native phenolic glycolipid I in contacts of leprosy patients in Venezuela: Epidemiological observations and a prospective study of the risk of leprosy. *Int J Lepr* 1991; 59:405-415.
6. Kroncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:147-156.
7. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int J Lepr* 1966; 34:255-273.
8. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
9. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82:7738-7742.
10. Brightbill HD, Llibraty DH, Krutzik SR, Yang R-B, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 1999; 285: 732-735.
11. Hibbs JBJ, Taitor RR, Vaynn Z. Macrophage cytotoxicity: role for L- arginine deaminase and amino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235:473-476.
12. Nosaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 1997; 65:3644-3647.
13. Adams LB, Job CK, Krahenbuhl JL. Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* in mice. *Infect Immun* 2000; 68:5462-5465.
14. Moshage H, Kok B, Huizenga R, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41:892-896
15. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 2002; 105:1155-1157.
16. Khare S, Bhutani LK, Rao DN. Release of nitrogen intermediates from the peripheral blood-derived monocytes/macrophages of leprosy patients stimulated *in vitro* by tuftsin. *Lepr Rev* 1997; 68:16-24.

17. Rada E, Ulrich M, Aranzazu N, Rodríguez V, Centeno M, Gonzalez I, Santaella C, Rodríguez M, Convit J. A follow-up study of multibacillary Hansen´s disease patients treated with multidrug therapy (MDT) or MDT + Immunotherapy (IMT). *Int J Lepr* 1996; 65:320-327.
18. Schon T, Gebre N, Sundqvist T, Habet-mariam HS, Engeda T, Britton S. Increased levels of nitric oxide metabolites in urine from leprosy patients in reversal reaction. *Lepr Rev* 1999; 70:52-55.
19. Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DNJ. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF- β) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 438-442.
20. Saunderson P, Gebre S, Desta K, Byass P, Lockwood DNJ. The pattern of neuritis in the AMFES patients: definitions, incidence, risk factors and outcome. *Lepr Rev* 2000; 71:285-308.
21. Moraes MO, Sampaio EP, Nery JAC, Saraiva BCC, Alvarenga FBF, Sarno EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J Dermatol* 2001; 144:175-181.