

EVALUACION DE LA PRODUCCION DE CITOQUINAS EN ENFERMOS DE LEPRO

SUSANA FINK¹, MARTA R. FINIASZ¹, RAUL VALDEZ², SILVIA DE LA BARRERA¹,
MARIA DEL CARMEN SASIAIN¹

¹ Departamento Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina;

² Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de citoquinas por células mononucleares periféricas (CMP) obtenidas de pacientes con lepra, cuando estas células son estimuladas con ConA, PPD o *Mycobacterium leprae*. Medimos IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-6 en sobrenadantes libres de células, por enzimoimmunoensayos. Nuestros resultados no sugieren una clara asociación entre una forma clínica de lepra y un perfil de secreción de citoquinas de tipo Th1 o Th2 en las CMP de los pacientes con lepra.

Palabras clave: lepra, CMP, IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-6

Los antígenos estimulan en el huésped una respuesta inmune predominantemente celular o humoral, tipo Th1 o Th2 respectivamente¹, que puede ser adecuada para proteger contra un agente infeccioso dado². La lepra es la enfermedad causada por el *Mycobacterium leprae*, patógeno intracelular obligado, y abarca un amplio espectro de formas clínicas. En un polo, lepra tuberculoide, aparece una fuerte reacción de hipersensibilidad retardada, característica de las respuestas Th1, útil para eliminar micobacterias. En el otro extremo del espectro clínico, lepra lepromatosa, hay multiplicación de bacilos por la débil respuesta celular, generalmente asociada a un perfil de tipo Th2.

Las citoquinas pueden modular la respuesta inmune, en particular la generación de linfocitos T citotóxicos. Anteriormente, trabajando con células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes con lepra, estudiamos la actividad citotóxica específica contra macrófagos autólogos gatillados con *Mycobacterium leprae*, y describimos diferen-

cias en las distintas formas de la enfermedad³. Se observaba un incremento con IL-6, IFN- γ o la combinación de IL-2 con IL-6, y una disminución con IL-4⁴. Para determinar si este comportamiento de las CMP reflejaba un patrón de secreción de citoquinas particular, evaluamos con enzimoimmunoensayos (ELISA) la presencia de IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-6 en sobrenadantes de CMP cultivadas en presencia de *M. leprae*.

Se estudiaron 9 pacientes lepromatosos (LL), 3 borderline lepromatosos (BL), 1 borderline (BB), 7 tuberculoideos (TT) y 3 borderline tuberculoideos (BT), clasificados según Ridley y Jopling⁵. Se subdividieron en 2 grupos: paucibacilares (PB: TT y BT) (5 mujeres, 5 hombres, 26-71 años) y multibacilares (MB: LL, BL, BB) (5 mujeres, 8 hombres, 18-76 años). También se estudiaron 4 pacientes LL con eritema nudoso leproso (ENL) (varones, 19-55 años) tratados con talidomida. Todos los pacientes estaban libres de otras enfermedades infecciosas y recibían el tratamiento multidroga recomendado por la Organización Mundial de la Salud. Se estudiaron simultáneamente 5 controles normales vacunados con BCG (N)(2 mujeres, 3 hombres, 30-52 años). Se purificaron CMP por centrifugación de sangre heparinizada sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque⁶. Se resuspendieron en medio de cultivo 1640 con-

Recibido: 4-IX-1996

Aceptado: 7-XI-1996

Dirección postal: Dra. Susana Fink, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina

teniendo 15% de suero fetal bovino inactivado por calor (ambos de Gibco Lab, NY, USA) y antibiótico (medio completo). Se estimularon 2×10^6 células/ml con *M. leprae* irradiado ($1,8 \times 10^7$ bacilos/ml, generosamente provistos por el Dr. Rees, Mill Hill, UK, a través del banco IMMYC de la OMS), o PPD (10 ug/ml, Statens Seruminstitut, Dinamarca), antígeno relacionado, o ConA (20ug/ml, SIGMA, MO, USA), durante 48 h o 5 a 7 días, a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂, en tubos Falcon 2063. Los sobrenadantes libres de células fueron divididos en alícuotas y conservados a -70°C hasta ser ensayados para IL-2, IL-4 e IFN- γ . Los monocitos se purificaron por adherencia a plástico durante 2 horas a 37°C. Después de 6 días, se estimularon los macrófagos con antígenos durante 18 h y se recogieron los sobrenadantes para determinar IL-6. Todas las determinaciones de citoquinas se hicieron empleando equipos de ELISA comerciales (Genzyme, Boston, USA) y se ensayaron duplicados de cada muestra. El límite de detección es: 100 pg/ml para IL-2, 45 pg/ml para IL-4, 100 pg/ml para IFN- γ y 18 pg/ml para IL-6, según las indicaciones del fabricante. «0*» significa por debajo del límite de detección, ND: no determinado.

Los sobrenadantes de cultivo de CMP de 48 h presentaron niveles no detectables de IL-2, IL-4 e IFN- γ cuando se estimuló con PPD y *M. leprae*, tanto en los pacientes PB como en los MB, excepto en un paciente TT y un paciente LL cuyas células produjeron IFN- γ al ser estimuladas con *M. leprae* (Tabla 1). Cuando se estimuló con ConA, se observó producción de IL-2, pero no de IL-4 y de IFN- γ , salvo en un paciente LL en el que se detectó IFN- γ y en otro LL en el que se encontró IL-4 en la muestra sin estímulo. La cantidad de IL-2 producida por los pacientes MB en respuesta a la ConA era mayor que la generada por los PB en la mayoría de los casos (Tabla 1). Las CMP de 2 pacientes LL evaluados durante ENL mostraron secreción de IFN- γ . La que tenía mayor concentración de IFN- γ también contenía IL-2 y la otra contenía IL-4 (Tabla 1). No observamos diferencias en la producción de IL-6 por células control y estimuladas (Tabla 2). En un paciente TT y en 2 LL hubo un aumento con PPD, mientras que en un BT la secreción fue mayor en los macrófagos control que en los estimulados con *M. leprae*. En 2 de los pacientes MB estudiados había menor producción de IL-6, y en 2 LL mayor,

TABLA 1.— Producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ por CMP de pacientes con lepra

a)		IL-2 (pg/ml)			
	Pacientes	C	ConA	PPD	<i>M.lep</i>
PB	3-TT	0*	0*	0*	0*
	5-TT	0*	ND	0*	0*
	6-TT	ND	1213	ND	ND
	8-BT	0*	3566	ND	0*
	10-BT	0*	1716	ND	0*
	11-BT	0*	1644	0*	0*
MB	4-LL	0*	3330	ND	0*
	7-LL	0*	3244	ND	0*
	8-LL	0*	3467	0*	0*
	9-LL	0*	1966	ND	0*
	10-BL	0*	3426	181	0*
ENL	1-LL-ENL	0*	0*	0*	0*
	2-LL-ENL	0*	670	ND	0*
C	2-N	0*	1985	120	0*

b)		IL-4 (pg/ml)			
	Pacientes	C	ConA	PPD	<i>M.lep</i>
PB	1-TT	0*	ND	0*	0*
	5-TT	0*	ND	0*	0*
	8-BT	0*	0*	ND	0*
	10-BT	0*	0*	ND	0*
	11-BT	0*	0*	0*	0*
MB	1-LL	0*	ND	0*	0*
	4-LL	0*	0*	ND	0*
	8-LL	0*	0*	0*	0*
	9-LL	150	0*	ND	0*
ENL	1-LL-ENL	ND	195	0*	0*
	2-LL-ENL	0*	0*	ND	0*
C	1-N	0*	210	0*	ND

c)		IFN- γ (pg/ml)			
	Pacientes	C	ConA	PPD	<i>M.lep</i>
PB	1-TT	0*	ND	0*	360
	5-TT	0*	ND	0*	0*
	8-BT	0*	0*	0*	0*
	11-BT	0*	0*	0*	0*
MB	1-LL	0*	ND	0*	360
	4-LL	0*	0*	ND	0*
	7-LL	ND	180	ND	ND
	8-LL	0*	0*	0*	0*
	9-LL	0*	ND	ND	0*
ENL	1-LL-ENL	ND	440	0*	0*
	2-LL-ENL	0*	2800	0*	0*
C	1-N	0*	1750	0*	ND
	4-N	0*	ND	0*	0*
	5-N	ND	880	ND	ND

TABLA 2.— Producción de IL-6 por macrófagos de pacientes con lepra

Pacientes	C	IL-6 (pg/ml)	
		PPD	<i>M.lep</i>
PB			
2-TT	0*	ND	0*
3-TT	0*	561	0*
4-TT	1883	1792	1775
5-TT	625	ND	819
8-BT	395	ND	312
9-BT	2490	2790	2395
10-BT	403	ND	0*
MB			
2-LL	531	1047	490
3-LL	0*	60	0*
4-LL	1193	0*	1006
5-LL	856	2286	847
6-LL	511	ND	837
7-LL	711	224	1156
8-LL	704	202	601
9-LL	0*	ND	796
10-BL	0*	0*	0*
11-BL	377	369	229
12-BL	596	594	265
13-BB	0*	0*	0*
ENL			
1-LL-ENL	63	134	0*
2-LL-ENL	110	31	116
3-LL-ENL	1458	ND	1200
4-LL-ENL	281	590	423
N			
2-N	60	ND	503
3-N	471	ND	681

en respuesta a la PPD. Cuando se utilizó *M. leprae* se detectó más IL-6 en 2 pacientes LL, y menos en un BL. Sólo en uno de los 4 LL que estudiamos durante ENL, los macrófagos produjeron más IL-6 por estimulación.

También se evaluaron muestras obtenidas a 5 y 7 días en 5 pacientes (2 LL, 2 TT, 1 BT) (datos no mostrados). La producción de IL-2 en el paciente BT aumentó de 1213 pg/ml en el día 2 a 3293 pg/ml en el día 5 con ConA. Se detectó IFN- γ sólo en los sobrenadantes de un paciente TT (100 pg/ml con ConA, 1100 pg/ml con PPD, por debajo del límite de detección con *M. leprae*) a los 5 días. La IL-4 estaba presente en sobrenadantes celulares de un paciente LL a las 48 h (150 pg/ml) con ConA y a los 5 días con los otros estímulos (C: 190 pg/ml, ConA: ND, PPD:

80 pg/ml, *M.lep.*: 280 pg/ml). En el paciente BT todos los estímulos indujeron secreción de IL-4 al día 5 (75 pg/ml en C, 93 pg/ml con ConA, 920 pg/ml con *M.lep.*), mientras que en el paciente TT ya mencionado la producción de IL-4 observada al día 5 (180 pg/ml en la muestra control) aumentaba a 310 pg/ml en las células estimuladas tanto con ConA como con *M. leprae*, siendo mayor la producción de IL-4 con *M. leprae*.

Varios autores asociaron perfiles definidos de secreción de citoquinas con una forma clínica de lepra estudiando los linfocitos recuperados de las lesiones. Yamamura y col^{7,8} correlacionaron un perfil Th1 con la forma resistente de la enfermedad y uno Th2 con la lepra lepromatosa, usando reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) del ARNm que codifica para varias citoquinas. También fue analizada la secreción de estos mediadores biológicos por clones derivados de CMP de estos pacientes⁹. Estableciendo líneas celulares T a partir de CMP, Mutis y col¹⁰ estudiaron el perfil de secreción de citoquinas de linfocitos T reactivos para el *M. leprae*. Encontraron que las micobacterias inducen preferentemente respuestas de tipo Th1 (altos títulos de IFN- γ y IFN- α) en todo el espectro de la lepra, aunque algunos de los clones T podían producir al mismo tiempo IL-4 e IFN- γ (Th0). En un estudio de Launois y col¹¹, todos los antígenos del *M. leprae* probados inducían secreción de IL-6 en cultivos de CMP de pacientes con lepra, a diferencia de los de controles normales. En la tuberculosis humana hay una respuesta Th1 disminuida al *Mycobacterium tuberculosis* que es restaurada por el tratamiento terapéutico, haciendo que el estudio de los pacientes en distintos momentos de evolución pueda dar resultados contradictorios¹². Algo similar podría ocurrir en la infección por *M. leprae*.

Recientemente, Misra y col¹³ publicaron el perfil de secreción de citoquinas de CMP obtenidas de pacientes con lepra, determinado por RT-PCR y confirmado por ELISA. En este estudio, 40-50% de todos los individuos presentan un perfil mixto, tipo Th0 con presencia simultánea de IL-4 e IFN- γ , independientemente del estímulo empleado y de la clasificación clínica de los pacientes. En 5 de los 8 pacientes LL observaron un perfil tipo Th2 y en 3/5 tuberculoides uno Th1.

Nuestros resultados no sugieren una asociación clara entre la forma clínica de la lepra y un

patrón de secreción de citoquinas de tipo Th1 o Th2 en las CMP de los pacientes con lepra. Parecería haber un retardo en la respuesta a ConA en el grupo PB, mientras que los niveles más elevados observados en los pacientes MB podrían reflejar la activación *in vivo*, o deberse a la presencia en las CMP de más células capaces de responder a la estimulación con ConA. No hemos encontrado un patrón Th0 como el observado por Misra y cols¹³. Sólo en un paciente LL-ENL detectamos secreción simultánea de IL-4 e IFN- γ con ConA, así como en un paciente TT evaluado al día 5. En el paciente BT estudiado al día 5, detectamos IL-4 e IL-2, pero no IFN- γ , el marcador habitual para células Th1, al estimular con *M. leprae*. En otro paciente TT, se observó producción de IFN- γ en respuesta a *M. leprae* al día 2, mientras que en el otro caso LL-ENL se obtuvo IL-2 e IFN- γ con ConA. Esto correspondería al perfil Th1 que Misra encontró en 3 de 5 pacientes TT. Por otro lado, en un paciente LL se observó producción de IL-4, típico de un perfil Th2, pero sólo en la muestra control, tal vez por activación *in vivo* de las células.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos con linfocitos recuperados de las lesiones, tal vez por haber en éstas una retención preferencial de algunas células, dejando una población diferente en circulación periférica. Por otro lado, sería importante analizar el ARN mensajero para citoquinas y la presencia intracelular de citoquinas para completar el estudio.

Agradecimientos: Este trabajo se realizó con subsidios del CONICET y del componente Inmunología de la Lepra (IMMYC) del Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de UNDP/World Bank/OMS. Los autores agradecen a la Dra. María Marta Bracco por su estímulo y la lectura crítica del manuscrito.

Summary

Evaluation of cytokine production in leprosy patients

The aim of the present study was to evaluate the cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of leprosy patients

when the cells were stimulated in culture by ConA, PPD or *M. leprae*. We measured IL-2, IL-4, IFN- γ and IL-6 in cell-free supernatants by enzyme linked immunoassays. Our results do not suggest a clear association of a clinical form of leprosy with either Th1 or Th2 cytokine secretion profile in PBMC of leprosy patients.

Bibliografía

1. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-57.
2. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-46.
3. Sasiain M del C, de la Barrera S, Minnucci F, Valdez R, Bracco MM, Baliña LM. T-cell mediated cytotoxicity against Mycobacterium antigen pulsed autologous macrophages in leprosy patients. *Infect Immun* 1992; 60: 3389-95.
4. Fink S, de la Barrera S, Minnucci F, Valdez R, Baliña LM, Sasiain MC. IFN- γ , IL-6 and IL-4 modulate *M. leprae*- or PPD-specific cytotoxic T cells in leprosy patients. *Scand J Immunol* 1993; 38: 551-8.
5. Ridley DA, Jopling W. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr* 1966; 34: 184-273.
6. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97: 77-89.
7. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992; 149: 1470-5.
8. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, et al. Defining protective responses to infectious pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277-9.
9. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 254: 279-82.
10. Mutis T, Kraakman EM, Cornelisse YE, et al. Analysis of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive T cells. *J Immunol* 1993; 150: 4641-51.
11. Launois P, Vandebussche P, M'Bayame NN, et al. IL-6 production in response to purified mycobacterial heat-shock proteins and to antigen 85 in leprosy. *Cell Immunol* 1993; 148: 283-90.
12. Modlin RL, Nutman TB. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr Op Immunol* 1993; 5: 511-7.
13. Misra N, Murtaza A, Walker B, et al. Cytokine profile of circulating T cells in leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunol* 1995; 86: 97-103.