



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN DERMATOLOGÍA Y SIFILOGRAFÍA
INSTITUTO DE BIOMEDICINA-HOSPITAL VARGAS DE CARACAS

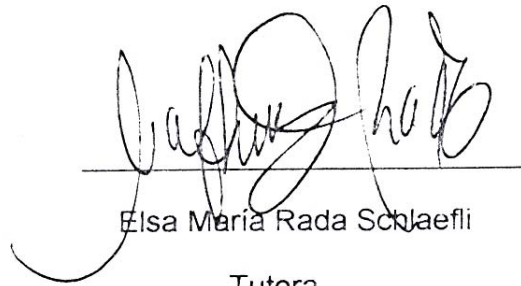
**ESTUDIO CLÍNICO Y SEROLÓGICO EN PACIENTES CON ERITEMA NODOSO
LEPROSO (ENL).**

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al título de Especialista en
Dermatología y Sifilografía

Tutor: Elsa Rada

Ricardo Sandoval Angulo

Caracas, diciembre 2012

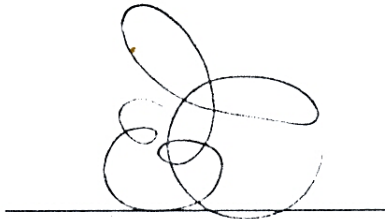


Elsa María Rada Schlaefli
Tutora



Dr. Ricardo Pérez- Alfonzo

Director del Postgrado de Dermatología y Sifilografía



Dra. Elsy Cavallera

Coordinadora del Postgrado de Dermatología y Sifilografía

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MÉTODOS	13
RESULTADOS	17
DISCUSION	20
REFERENCIAS	27
ANEXOS	33

ESTUDIO CLÍNICO Y SEROLÓGICO EN PACIENTES CON ERITEMA NODOSO LEPROSO (ENL).

Ricardo Sandoval Angulo, C.I 12.918.463. Sexo: masculino, E-mail: richisando20@hotmail.com. Telf: 04143781968. Dirección: Instituto de Biomedicina Caracas. Curso de Especialización Dermatología y Sifilografía
Tutor: **Elsa Rada**, C.I.3.667.234. Sexo: femenino, E-mail: elsa.rada@gmail.com. Telf: 0416-6253663. Dirección: Instituto de Biomedicina-Hospital Vargas Caracas. Especialista Biólogo, PhD Inmunoparasitología

RESUMEN

El eritema nodoso leproso es un evento inflamatorio agudo en el curso crónico de la lepra. Se considera un trastorno inmunológico y una causa importante de morbilidad y discapacidad. **Objetivo:** Evaluar las características clínicas y serológica frente a la proteína LID-1 de *Mycobacterium leprae* en pacientes con ENL. **Método:** Se realizó un estudio de tipo caso y controles de las características clínicas y resultado serológico de los pacientes con diagnóstico de enfermedad de Hansen con ENL La población total fue de 47 pacientes, 32 con ENL, 15 sin ENL. Todos los pacientes fueron adultos, el 50% tenían edades entre 18-30 años con predominio del sexo masculino **Resultados:** En los pacientes con ENL la forma clínica lepromatosa fue la más predominante 62,5%, seguido en un 25,0% la forma BL-LL. El 59,4% presentaron lesiones nodulares localizadas principalmente en miembros superiores e inferiores, el 56,3% presentaron síntomas sistémico: fiebre, escalofrío, artralgias El 93,7% tenían índice bacteriano mayor de dos cruces y el 25% de los pacientes debutaron con ENL al momento del diagnóstico. Se comparó los niveles de anticuerpos IgG frente a LID-1 antes y después del tratamiento, encontrándose una variación promedio de 0.0751 con una $p=0,63$. **Conclusiones:** Estudio serológico frente a LID-1 en pacientes con ENL reportó que no hubo diferencia significativa durante el tiempo de tratamiento.

PALABRAS CLAVES: Enfermedad de Hansen, ENL, perfil clínico, serología, proteína LID-1.

ABSTRACT

CLINICAL AND SEROLOGICAL STUDY IN PATIENTS WITH ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM (ENL).

Erythema nodosum leprosum (ENL) is an acute inflammatory event during the chronic course of leprosy. It is considered an immunological event and an important cause of morbidity and disability. **Objective:** Evaluate the clinical and serological characteristics towards *Mycobacterium leprae* LID-1 protein in ENL patients. **Method:** A case-control type of study of the clinical characteristics and serological results of patients diagnosed with Hansen's disease undergoing an ENL episode was done. The total population was 47 patients, 32 with ENL

and 15 without ENL. All patients were adults, 50% had ages between 18-30 years, and there was predominance of the male sex. **Results:** In ENL patients, the predominant clinical form was lepromatous leprosy (62.5%), followed by the BL-LL form (25.0%). Fifty nine point 4 percent had nodular lesions mainly localized on upper and lower limbs; 56.3% presented systemic symptoms: fever, chills, arthralgias; 93.7% had bacterial indexes over 2+, and 25% debuted with ENL at the moment of diagnosis. IgG antibody levels against LID-1 were compared before and after treatment, showing a mean variation of 0.0751 with $p = 0.63$. **Conclusions:** A serologic study of antibodies against LID-1 in ENL patients showed that there was no significant difference during the treatment period.

Key words: Hansen's disease, ENL, clinic, serology, LID-1 protein.

INTRODUCCION

La lepra es una enfermedad granulomatosa crónica, infectocontagiosa, no hereditaria, endémica en muchos países, causada por el *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) la cual afecta preferencialmente la piel, sistema nervioso periférico y tracto respiratorio superior ^(1,2). El *M. leprae* fue descubierto en Noruega en 1873 por el Dr. Gerhard Armauer Hansen y en su honor se llama bacilo de Hansen ⁽³⁾.

La palabra lepra proviene del griego (lepros) que quiere decir escamoso; es un padecimiento endémico aún en algunos países en el mundo, afecta a más de un millón de personas en África, Asia y América ⁽⁴⁾. Es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad, existen testimonios de su existencia en la India en el libro Susruta Shamita, 600 años A.C y en la China en libros de medicina 500 años A.C. En el siglo XII y XIII la enfermedad se extiende rápidamente por toda Europa, en el siglo XVI llega al continente Americano con los conquistadores provenientes de Europa ^(5,6).

La lepra es una enfermedad, con un periodo de incubación variable, generalmente ocurre entre cinco y nueve años. Es un ejemplo clásico de una infección, cuyas manifestaciones corresponden, a la respuesta inmune del huésped ante el microorganismo invasor, expresada por un amplio espectro de características clínicas, histológicas e inmunológicas ^(1,7,8).

El diagnóstico de la lepra se basa fundamentalmente en las manifestaciones clínicas, la escasez de síntomas de la enfermedad tempranamente puede contribuir a un diagnóstico erróneo o al infra diagnóstico. El diagnóstico precoz permite un tratamiento oportuno de la lepra, el cual es importante para reducir las fuentes de transmisión y para prevenir la progresión de la enfermedad, evitando de esta manera discapacidades y secuelas importantes. Ninguna prueba de laboratorio está disponible para diagnosticar la enfermedad asintomática o para predecir la progresión de la enfermedad entre los individuos expuestos. En general los resultados de estudios serológicos realizados con varias proteínas recombinantes de *M. leprae* reflejan altos niveles de anticuerpos en la lepra lepromatosa y niveles bajos en la tuberculoide ⁽⁹⁾.

Planteamiento y delimitación del problema

Las micobacterias producen una amplia gama de moléculas que participan en diversos puntos de la enfermedad (adherencia, neutralización, penetración, multiplicación, etc.) favoreciendo la invasión dentro de la célula huésped, preferencialmente dentro de la célula fagocítica. Actualmente hay una serie de proteínas micobacterianas bien caracterizadas, purificadas y secuenciadas desde el punto de vista bioquímico. Los antígenos proteicos micobacterianos que modulan la respuesta inmune son objeto de interés para el desarrollo de vacunas y para el diagnóstico, así como también para el conocimiento de su papel en la patología de la enfermedad ⁽¹⁰⁾.

Aunque el glicolípido fenólico (GLP-I) es uno de los mayores componentes y más estudiados de *M. leprae*, su valor como uso para pruebas diagnóstico es limitado. Se conoce que el GLP-I posee entre un 65 -75% de especificidad, debido a la reactividad cruzada que presenta frente a otras micobacterias; por lo tanto el papel de las proteínas micobacterianas y su interrelación con el sistema inmunológico presenta importantes implicaciones en la comprensión de la enfermedad ⁽⁹⁾.

Recientemente, la proteína de fusión LID-1, que comprenden las proteínas ML0405 y ML2331 ha sido construida por el instituto de investigación de enfermedades infecciosas (IDRI), Seattle Washington- Estados Unidos , la cuál junto con el GLP-I puede ser utilizada para el diagnóstico serológico de los pacientes con lepra ⁽¹¹⁾.

Importancia y justificación

La detección temprana de la lepra reviste gran importancia ya que reduciría la transmisión de la infección. Además, las reacciones tipo 2 en la enfermedad de Hansen (ENL), son una modalidad clínica de presentación aguda o subaguda, de orden local o general, expresión de un fenómeno inmunológico que ocurre en el curso evolutivo de la enfermedad. Estos fenómenos causan una significativa morbilidad en pacientes con lepra lepromatosa, en donde el uso de marcadores serológicos para identificar pacientes MB con un alto riesgo para desarrollar ENL podría ser de un gran valor clínico y predictivo.

Antecedentes

La progresión de la enfermedad es lenta e indolente, pero en algunos casos hay cambios en el estado inmunológico, desarrollando los estados reaccionales⁽¹²⁾. Estos fenómenos reaccionales son respuestas inmunológicas de hipersensibilidad, que se manifiestan con signos y síntomas de inflamación aguda en los sitios afectados por la enfermedad⁽¹³⁾.

El episodio reaccional puede aparecer antes, durante o después del tratamiento y puede condicionar importantes complicaciones o conducir a severas secuelas⁽¹⁴⁾. Se clasifican en: tipo 1 asociada a hipersensibilidad mediada por células y en tipo 2 asociado a modificaciones de la respuesta humoral manifestada por inmunocomplejos⁽¹⁵⁾. La reacción tipo 1 cursa con inflamación aguda en piel, nervios periféricos asociada a la activación de mecanismos de hipersensibilidad tardía contra antígenos de *M. leprae*, y puede ser menos en el espectro en formas más benignas como BB, BT⁽¹⁶⁾. Su aparición es más común en formas dimorfas de la enfermedad, puede afectar entre un 8%-67% de los pacientes con lepra y entre los factores de riesgo asociados se encuentran: género femenino, infecciones virales y compromiso extenso de piel y nervios. La reacción tipo 2 dentro de las cuales uno de los más frecuente es el eritema nodoso leproso (ENL), el cual ocurre en aproximadamente el 25-30% de los casos de lepra, sobre todo en la forma multibacilar, ocurre de forma espontánea o se desencadena por infecciones intercurrentes, la anemia, el estrés, la pubertad, el embarazo, la cirugía, y el uso de medicamentos como los antibióticos, la vitamina A, vacunas. Se caracteriza por lesiones eritematosas, dolorosas, de tamaño variable, incluidas pápulas y nódulos, localizadas en distintas regiones de la piel⁽¹⁷⁾.

El eritema nodoso leproso es un evento inflamatorio agudo en el curso crónico de la lepra. Se considera un trastorno inmunológico y una causa importante de morbilidad y discapacidad⁽¹⁸⁾. Es importante señalar que el conocimiento y secuenciación del genoma micobacteriano, ha dado nuevas directrices para la búsqueda y síntesis de proteína, que nos permitan desarrollar nuevas alternativas para realizar un diagnóstico temprano, dando un tratamiento oportuno y de esta manera reducir la transmisión de la enfermedad. A pesar que hasta los momentos no se ha podido

cultivar in vitro el *Mycobacterium leprae*, hay aspectos de mucho interés que hay que seguir estudiando, entre ellas las reacciones tipo 1 y 2 en lepra y los eventos responsables de su aparición en algunos pacientes. Por otra parte también es un aspecto de suma importancia el estudio de los mecanismos involucrados en el daño a nivel de nervios y de esta manera lograr prevenir las discapacidades ⁽¹⁹⁾.

Uno de los grandes propósitos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) era eliminar la lepra para el año 2000 basado en los avances importantes en el tratamiento antituberculoso en la década de 1980. Pero a pesar de la drástica disminución de la prevalencia observada en la mayoría de los países endémicos en la última década, la detección de nuevos casos se ha mantenido alto. Teniendo en cuenta que la enfermedad no ha sido eliminada, el desarrollo de herramientas de diagnóstico aplicables en trabajo de campo se considera una prioridad de investigación de extrema urgencia ⁽²⁰⁾.

El GLP-I es un antígeno inmunodominante de la cubierta del *Mycobacterium leprae*. La detección de anticuerpos anti GLP-I sigue siendo la prueba más evaluada en lepra, sin embargo se ve limitado su valor diagnóstico en pacientes PB, ya que estos tienen índice bacteriano bajo o indetectable y estos se caracterizan por su respuesta celular, en lugar de la respuesta humoral. Por otra parte, en las áreas endémicas una proporción significativa de los individuos sanos pueden presentar positividad frente al glicolípido ⁽⁹⁾.

Cho SN y col demostraron que la evaluación de serología con el GLP-I puede ser útil para la vigilancia, seguimiento y eficacia del tratamiento con poliquimioterapia ⁽²¹⁾.

Teniendo en cuenta que el diagnóstico serológico basado en el reconocimiento de anticuerpos frente al GLP-I no es capaz de identificar a los individuos con índice bacteriano bajo (IB). Una estrategia que podría mejorar esta situación es la búsqueda de antígenos altamente específicos que se pueden combinar con GLP-I para mejorar la sensibilidad del diagnóstico.

Reece ST y col realizaron un estudio que sugieren que las proteínas ML0405 y ML2331 tienen una gran utilidad en el diagnóstico de lepra, específicamente en los pacientes con lepra lepromatosa y borderline lepromatosa (BL) ⁽²²⁾.

Duthie y col demostraron que las proteínas micobacterianas ML0405 y ML2331 son antígenos del *M.leprae* con un potencial diagnóstico en los pacientes con lepra MB, independiente de la ubicación geográfica. Además conjuntamente con la proteína ML1556 pueden ser utilizadas como marcador serológico en algunos pacientes PB. Estos investigadores plantearon la construcción de una proteína de fusión entre ML0405 y ML2331 llamada (LID-1) el cual puede proporcionar una herramienta de diagnóstico antes de la aparición de signos y síntomas clínicos ⁽¹¹⁾.

En otro estudio realizado por Duthie y col evaluaron muestras de suero de pacientes con lepra en Venezuela y en Brasil donde demostraron la inmunoreactividad contra las proteínas específicas ML0405 , ML2331 y la proteína de fusión LID-1; además demostraron que estas proteínas sirven como seguimiento al tratamiento de lepra y como marcador pronostico de recurrencia ⁽²³⁾.

Posteriormente Duthie MS y col realizaron un diseño racional y evaluación de una proteína quimérica multiepitope con potencial de diagnóstico para lepra, esta proteína la denominaron PALD: Proteína de avance para el diagnóstico de la lepra, el cual incorpora las proteínas ML0405, ML2331, ML2055, ML0411 y ML0091 la cual compararon con LID-1 y concluyen que utilizando una prueba serológica con estos antígenos puede servir como herramienta diagnostico en la lepra y aplicarla dentro de los programas de control para reducir la transmisión, limitar la aparición de la lepra asociadas a discapacidades y deformidades estigmatizantes para luego instaurar un tratamiento oportuno⁽²⁴⁾.

Marco teórico

Desde la antigüedad la lepra ha sido considerada como una enfermedad estigmatizada, sin embargo, su causa permaneció sin identificar hasta finales del siglo XIX. Durante siglos numerosas víctimas sufrieron por su morbilidad y estaban aislados socialmente en todo el mundo. Los individuos afectados fueron separados porque se consideraban "impuros" y tuvieron que vivir en colonias de leprosos, por lo general en condiciones muy pobres. Los médicos creían que la lepra era una enfermedad incurable, altamente contagiosa y hereditaria. En 1873 el médico Noruego Gerhard Hansen Armauer (1841-1912), terminó el mito de la lepra y

descubrió su agente causal, conocido como *Mycobacterium leprae*. El descubrimiento de Hansen fue un gran triunfo en la lucha contra la lepra.

En la década de 1930 se introdujo el primer fármaco eficaz en el tratamiento de lepra dapsona, en 1980 a principios de la terapia multidroga se popularizó debido a la alta eficacia en los casos resistentes ⁽²⁵⁾. El tratamiento de la lepra puede dividirse en tres periodos: El periodo pre-sulfónico, el periodo sulfónico y el periodo antibiótico. Actualmente se dispone de tres medicamentos de primera línea para el tratamiento de la enfermedad de Hansen: Las sulfonas, la clofazimina y la rifampicina. Duración del tratamiento: a) Lepra multibacilar (LL-BL-BB) y LI Mitsuda negativo, tiempo mínimo de tratamiento 24-36 meses. b) Lepra paucibacilar (BT-TT) y LI Mitsuda positivo, tiempo mínimo de tratamiento 12-24 meses ⁽²⁶⁾.

Para el tratamiento de eritema nodoso leproso la droga de elección es la talidomida, el mecanismo de acción no está totalmente establecido, pero se le atribuyen los siguientes efectos: Antagoniza mediadores químicos de la inflamación: 1-inhíbe a los linfocitos T CD4⁺, disminuyendo la proporción de CD4⁺/CD8⁺, controlando la intensidad de la inflamación. 2-Disminuye los niveles de TNF alfa, amortizando el daño tisular. 3-Disminuye la proliferación de inmunoblastos. 4-Inhíbe la quimiotaxis de los polimorfonucleares, disminuyendo el aflujo de estas células al foco inflamatorio. 5-Inhíbe la actividad y fagocitosis del monocito-macrófago, evitando o disminuyendo la salida de enzimas proteolíticas causantes de daño tisular, proteasas, monoquinas y radicales libres derivados del oxígeno. 6-Estabiliza la membrana lisosomal. 7-Prolonga la supervivencia de injertos. Los corticosteroides son también utilizados en ENL, tienen la propiedad de reducir la inflamación en todas sus etapas, incluso en las etapas de cicatrización. Estos compuestos disminuyen la permeabilidad capilar, aumentan la recepción y sensibilidad a las catecolaminas y por este motivo reducen el edema, disminuye la migración de neutrófilos hacia los tejidos y reduce el depósito de fibrina ⁽²⁷⁾.

Actualmente los regímenes recomendados son: Pacientes multibacilares adultos: Rifampicina 600 mg 1 vez por mes, toma supervisada. Dapsona: 100 mg/día. Clofazimina: 300 mg 1 vez por mes, supervisada, luego se sigue con 50 mg/día.

Duración: 12 blisters en no más de 18 meses. Los que tienen índice bacilífero (IB) (+++) o más, al completar el esquema y si clínica y pruebas de laboratorio no mejoran, deberán recibir 12 blisters más. Pacientes paucibacilar en adultos: Rifampicina 600 mg 1 vez por mes toma supervisada. Dapsona 100 mg/día. Duración: 6 blisters en no más de 9 meses⁽²⁸⁾.

La lepra se entiende mejor como dos enfermedades unidas. Primero como una enfermedad infecciosa crónica que provoca una gama de respuesta inmune. En segundo lugar la presencia de una neuropatía periférica la cual se inicia con la infección y sus eventos inmunológicos que la acompañan más allá de la cura, dejando secuelas físicas, sociales y psicológicas importantes. Ambos aspectos deben ser considerados por los médicos, investigadores y quienes tratan a las personas afectadas por esta enfermedad⁽²⁹⁾.

Una de la clasificaciones más importantes de la lepra es la inmunológica según clasificación realizada por Ridley y Jopling en 1966⁽³⁰⁾, la cual correlaciona aspectos clínicos, histopatológicos e inmunológicos que permiten dividir en: Lepra indeterminada (LI), lepra tuberculoide completa (TT), lepra borderline-tuberculoide (BT), lepra borderline (lepra dimorfa) (BB), lepra borderline lepromatosa (BL), lepra lepromatosa (LL)^(1,31,32,33). Los pacientes que presentan fuerte respuesta inmune celular desarrollan la forma localizada de la enfermedad, su sistema inmune es capaz de destruir gran número de bacilos. Estos pacientes se encuentran en el polo tuberculoide (TT) del espectro. En el polo opuesto, en la lepra lepromatosa (LL), la reactividad específica inmune celular está prácticamente ausente, por lo que los bacilos se multiplican en los macrófagos y en células fagocitarias; además se infiltran en los nervios periféricos y se extienden a piel y órganos excepto pulmón y cerebro⁽³⁴⁾.

Son considerados como signos clínicos cardinales de lepra los siguientes:

a) Lesión cutánea única o múltiples (hipopigmentadas o eritematosas), no típica de alguna otra enfermedad cutánea, b) Pérdida de sensibilidad (térmica, dolorosa y/o del tacto) con o sin lesión cutánea y c) Troncos nerviosos o nervios cutáneos engrosados. Son considerados equivalentes de los signos cardinales: a) La

presencia de bacilos ácido-alcohol resistente en frotis o biopsias de piel, y b) La evidencia histopatológica definida de lepra, confirmada por un dermatólogo con experiencia en la enfermedad. Se consideran como sospechosos de lepra los casos donde se encuentra apenas uno de los signos cardinales (o equivalente) de los anteriormente mencionados ⁽³⁴⁾.

El diagnóstico de la lepra debe tener como base los siguientes aspectos:

a) Epidemiología: el paciente debe proceder de, o residir en un área endémica, o bien haber mantenido contacto con un caso contagiante, bacilífero, multibacilar. No en todos los casos es posible descubrir la fuente de contagio de un determinado caso pero en un área endémica el diagnóstico de lepra debe incluirse ante síntomas sospechosos.

b) Clínica: presencia de lesiones cutáneo-nerviosas y/o mucosas.

c) Bacteriología: hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistente en la piel, especialmente a nivel de las lesiones utilizando la técnica de coloración Ziehl-Neelsen. Con esta tinción las bacterias toman una coloración rojo intenso sobre el fondo azul, tienen el aspecto de un bastoncito recto. El recuento bacilar observado por campo en el microscopio de luz ha permitido establecer un índice bacteriológico. Este índice se expresa con un código numérico en una escala semi-logarítmica establecido por la OMS (Anexo 1).

d) Histopatología: estudio de la biopsia tomada a nivel de las lesiones sometiéndola a coloraciones de Hematoxilina-Eosina y Fite Faraco ⁽³⁵⁾. El desarrollo de métodos de diagnóstico altamente específicos y sensibles para detectar esta población, es actualmente necesario, éstos probablemente serán significativos en la comprensión de la progresión de la enfermedad ⁽³⁶⁾

e) Inmunología: desde el punto de vista inmunológico, se observa una respuesta celular diferencial frente al *M. leprae* y se expresa con intensidad variable en las diferentes formas clínicas de la enfermedad. Los pacientes multibacilares lepromatosos y borderline lepromatosos son incapaces de efectuar transformación linfocitaria al exponer sus linfocitos ante componentes micobacterianos, es decir hay una ausencia de respuesta celular altamente específica. En el caso de los pacientes

tuberculoides su defecto es moderado donde los linfocitos T de estos pacientes proliferan en respuesta al estímulo frente al microorganismo intacto y a proteínas de *M.leprae*. En relación a la respuesta de anticuerpos ocurre con mayor frecuencia y con títulos altos en la forma más severa de la enfermedad estando estrechamente relacionada con la presencia de la carga bacilar en los tejidos de los pacientes ⁽¹²⁾.

Es importante señalar que el conocimiento y secuenciación del genoma micobacteriano, ha dado nuevas directrices para la búsqueda y síntesis de proteína, que nos permitan desarrollar nuevas alternativas para realizar un diagnóstico temprano, dando un tratamiento oportuno y de esta manera reducir la transmisión de la enfermedad. A pesar que hasta los momentos no se ha podido cultivar in vitro el *Mycobacterium leprae*, hay aspectos de mucho interés que hay que seguir estudiando, entre ellas las reacciones tipo 1 y 2 en lepra y los eventos responsables de su aparición en algunos pacientes. Por otra parte también es un aspecto de suma importancia el estudio de los mecanismos involucrados en el daño a nivel de nervios y de esta manera lograr prevenir las discapacidades ⁽¹⁹⁾.

Objetivo general

Evaluar las características clínicas y serológicas en pacientes con ENL de la consulta de Hansen Servicio Central de Dermatología Sanitaria del Instituto de Biomedicina, periodo comprendido del 2002-2009.

Objetivos específicos

- Comparar las características clínicas, bacteriológicas, epidemiológicas de pacientes con ENL frente al grupo control.
- Establecer la frecuencia del número de episodios reaccionales antes, durante, y después del tratamiento.
- Comparar la presencia de fenómenos reaccionales, y su relación con el tiempo de diagnóstico de la enfermedad de Hansen.
- Comparar la respuesta de anticuerpos IgG frente a la proteína LID-1 en pacientes con ENL, antes, durante y después de tratamiento.

Actualmente, las proteínas mas inmunoreactivas ensayadas en los pacientes con Hansen MB son las ML 0405 Y ML 2331. La proteína LID-1 es una proteína de fusión que incorpora las dos proteínas antes mencionadas.

Hipótesis

¿Existen diferencias serológicas frente a la proteína LID-1 en pacientes diagnosticados con enfermedad de Hansen en proceso reaccional tipo eritema nodoso (ENL) antes, durante y después de tratamiento?

Aspectos éticos

El trabajo cumplió con todos los avales de la dirección para el uso de las historias médicas y el cumplimiento de las pautas de confidencialidad y ética de la información, de acuerdo al Código de Ética Para La Vida (Fonacit – MPPCTI).

METODOS

Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo caso y controles de las características clínicas y el seguimiento serológicos en los pacientes con diagnóstico de enfermedad de Hansen con proceso reaccional tipo ENL. Los pacientes que se estudiaron fueron seleccionados del Proyecto S1-2001000859 estados reaccionales en la enfermedad de Hansen.

Población y muestra

Durante el periodo comprendido del 2002-2009 se registraron una población de 392 pacientes con lepra, las cuales 89 presentaron fenómeno reaccional tipo ENL, 36 con el tipo I y 36 controles en ausencia de proceso reaccional. Todos fueron evaluados en el protocolo de los estados reaccionales en Hansen realizado en el Servicio de Dermatología del Instituto de Biomedicina el cual tenían consentimiento informado (Anexo 2,3).

La población total incluyeron 47 pacientes, las cuales se le extrajo muestra de sangre para la obtención de los sueros. De estos 32 pacientes presentaron fenómeno reaccional tipo ENL, 28 hombres y 4 mujeres. El grupo control estuvo conformado por 15 pacientes sin presencia de ENL, 13 masculinos y 2 femeninos relación estadística de 2:1.

Criterios de Inclusión

- ❖ Pacientes con diagnóstico clínico, bacteriológico e histológico confirmado de enfermedad de Hansen.
- ❖ Pacientes que pertenezcan al proyecto de estados reaccionales en Hansen y presenten reacciones de tipo ENL.
- ❖ Mayores de 18 años.

Criterios de Exclusión

Pacientes VIH (+) /SIDA, embarazadas, con trastornos mentales severos, y otras enfermedades crónicas

Procedimiento.

Se realizó un cuestionario donde se reflejan los datos demográficos, antecedentes personales, espectro clínico de la enfermedad, tiempo de evolución, técnicas de diagnóstico, índice bacteriológico, número de lesiones, tipo de lesión, nervios afectados, tratamiento recibido, presencia de fenómenos reaccional tipo ENL, enfermedades concomitantes y resultado serológico con la proteína LID-1 antes, durante y después de tratamiento (anexo 4).

Se procedió a evaluar la respuesta humoral a través del ensayo inmunoenzimático (ELISA) según metodología previamente establecida por Rada, Duthie y cols, 1999, 2007 ^(11,37,23).

La proteína recombinante LID-1 fueron facilitadas por el Dr. Malcom Duthie, Seattle, USA (IDRI).

Para el estudio serológico (monitoreo de anticuerpos) utilizamos un ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando la proteína recombinante LID-1 de *Mycobacterium leprae*. La técnica de ELISA se basa en el uso de antígenos y anticuerpos marcados con una enzima de forma tal que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte, la reacción antígeno-anticuerpo quedo inmovilizada y por tanto, fue fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar con la enzima produjo un color cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

Para la realización de la técnica, todos los buffers fueron utilizados a temperatura ambiente (no es necesario el buffer de bloqueo). Las placas de fondo plano (Dynatech, Immunolon 2) fueron sensibilizadas con el antígeno recombinante micobacteriano: la proteína LID-1 a 0.05 µg en un volumen de 50µL /pozo, utilizando buffer de captura para el antígeno proteico cubriendo la placa con una cubierta plástica. Se trabajo el antígeno LID-1 luego por duplicado. Se dejaron las placas a 4°C durante la noche. Al cabo de este período se descarto la solución en las placas invirtiendo la placa sobre un papel absorbente. Luego se añadió 100µL de buffer de bloqueo a cada pozo y se puso a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en

agitación suave, se lavaron las placas con la solución de lavado con PBS/Tween-20 (5 veces) y luego con PBS (2 veces).

Finalizado este tiempo se colocaron los sueros de los pacientes (en presencia ó no de ENL) a una dilución de 1:200 (50 μ L) en solución diluyente y se añadió el suero secundario anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Fc específica, Sigma) en todos los pozos, previamente titulado y diluído en PBS-T-20/BSA (1:2500) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se lavaron las placas en la solución de lavado con PBS/Tween (5 veces) y con PBS (2 veces) y por último se colocó 50 μ L del sustrato, peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (30%, Merck) junto con el cromógeno ortofenilendiamino-2HCl (Sigma) se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 1 N H₂SO₄ (25 μ L). Las placas se leyeron en un lector de ELISA (*Lab Systems Multiskan EX, type 355, Finlandia*) utilizando un filtro a 492 nm. Los valores de anticuerpos IgG circulantes dirigidos hacia antígenos recombinantes fueron expresados en densidad óptica. Un valor de densidad óptica (D.O.) > 0.2 se interpretó como *positivo*. La proteína LID-1 es altamente sensible y específica en pacientes con enfermedad de Hansen con mayor énfasis en los casos MB. Los controles positivos y negativos fueron incluidos en cada placa. Para establecer el criterio de positividad en los ensayos ELISA, se tomó el valor resultante de la suma de la DO media + 3 veces la desviación estándar de los sueros de personas relativamente sanas.

Tratamiento estadístico propuesto

Los datos fueron recolectados en una base de datos Excel y analizados por Epi info ó SSPS.

En las variables cualitativas se calcularon las proporciones con los límites de confianza del 95% utilizando la binomial exacta.

En las variables cuantitativas se calcularon las medidas de tendencia central (promedio, mediana) y de dispersión (desviación estándar, percentiles).

Se calcularon las diferencias serológicas en los valores en los diferentes puntos medidos (antes durante y después del tratamiento) y se compararon con una prueba de T para ver si la variación es significativa, se tomo como nivel de significancia $P=0,05$ o menor.

Se compararon la relación de las diversas variables según forma clínica presente y se compararon utilizando el chi cuadrado o test de Fisher para las variables cuantitativas y análisis de varianza (paramétrico o no paramétrico) para las cuantitativas.

RESULTADO

En este trabajo se incluyeron cuarenta y siete pacientes con enfermedad de Hansen, 32 pacientes presentaron fenómeno reaccional tipo II (ENL) y 15 sin proceso reaccional tipo ENL. Todos los pacientes estudiados con ENL fueron adultos donde el 50,0% (16/32) presentaron edades entre 18-30 años con un predominio del género masculino 87,5% (28/32). Dichos pacientes el 71,9% (23/32) procedían de la zona del centro del país Tabla 1 (Anexo 5)

Comparando estos resultados con nuestro grupo control (n=15), el 40% (6/15) de los pacientes adultos tenían edades comprendida entre 18-30 años, no encontrándose diferencia significativa $p=0.54$. El sexo masculino fue el predominante en un 86,7% (13/15). El 60% (9/15) de los pacientes sin fenómeno reaccional tipo ENL procedían de la zona centro del país.

En cuanto a la presentación de las formas clínicas de los pacientes con ENL según la clasificación de Ridley y Jopling⁽³⁰⁾ la forma lepromatosa fue la más predominante 62,5% (20/32), seguido en un 25,0% (8/32) BL-LL, quedando en iguales proporciones las formas BL, BB-LL, BB-BL y BB-BT con un porcentaje de 3,1% respectivamente, Figura 1 (Anexo 6).

Comparando con el grupo control, el 53,3% (8/15) presentó la forma clínica LL, seguido por la forma BB-BL 20,0% (3/15), 13,3% (2/15) el grupo BL-LL y en menor proporción 6,7% la forma BL y BB.

En lo que se refiere a las características clínicas del tipo de lesión en los pacientes con ENL, las lesiones más predominantes correspondió a nódulos en un 59,4% (19/32) de localización principalmente en miembros superiores e inferiores, seguido por lesiones mixta tipo nódulos y placas 25,4% (8/32) , un porcentaje menor de pacientes con ENL presentaban solo placas 9,4% (3/32) , más había otro grupo de pacientes en menor proporción que presentó lesiones tipo maculas, nódulos, placas 3,1% y otro solo nódulos y pápulas en un 3,1% Figura 2 (Anexo 6). Del total de los 32 pacientes con ENL el 56,3% (18/32) presentaron además de las lesiones ya descritas, otros síntomas acompañantes tales como fiebre, escalofrío, artralgias y toque del estado general.

Comparando estos resultados con el grupo control encontramos que el 33,3% (5/15) presentaron placas, seguido por lesiones mixtas placas y nódulos en un 26,7% (4/15), un solo paciente 6,7% presentó lesión tipo nódulo. La localización más frecuente de las lesiones fue cara, tronco y extremidades superior e inferior.

Con respecto a la presencia de carga bacteriana agrupamos el índice bacteriano (I.B) en dos grupos, uno con IB menor a dos cruces y el otro grupo con IB mayor a dos cruces, teniendo en cuenta esto encontramos que antes del tratamiento con poliquimioterapia 93,7% (30/32) de los pacientes con ENL tenían un índice bacteriano mayor a dos cruces, comparando estos resultados con el grupo control encontramos que 80% (12/15) de los pacientes sin ENL presentaban un índice bacteriano mayor de dos cruces. Pero con el transcurrir del tiempo de tratamiento con poliquimioterapia en los pacientes con ENL comienzan a disminuir el porcentaje de índice bacteriano 75% (24/32) durante el tratamiento y después de este observamos que 43,3% (14/32) de estos pacientes tenían un IB mayor a dos cruces Tabla 2 (Anexo 7).

En relación al inicio del cuadro inflamatorio de ENL al momento del diagnóstico de la enfermedad de Hansen 25% (8/32) de los pacientes debutaron con ENL, del 75% restante paulatinamente 37,5% (12/32) presentaron ENL en el primer año de tratamiento multidroga.

En lo que concierne al número de episodios de fenómenos reaccional tipo ENL que manifestaron los pacientes, el 34,4% (11/32) presentaron entre 1 y 3 episodios en el transcurso de la enfermedad. Teniendo en cuenta que el número mayor de episodios reaccionales fue 12. El 12,5% de pacientes presentaron entre 10 y 12 episodio de ENL. Aunque el 62,6% (20/32) presentaron entre 1 y 6 episodios Tabla 3 (Anexo 7). El valor promedio de aparición de ENL después del diagnóstico fue de 10 meses.

Con respecto a la respuesta humoral podemos mencionar que la concentración de anticuerpos IgG dirigidos hacia la proteína de fusión LID-1 en las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Hansen observamos que antes de iniciado el tratamiento con poliquimioterapia el 60,7% (17/28) de los pacientes con ENL

presentaron un valor promedio de 0.741 (D.O), comparando este valor con el grupo control encontramos que el 86,7% (13/15) de los pacientes sin ENL tenían anticuerpos positivos frente a proteína LID-1, obteniendo un promedio de absorbancia de 0.432, aunque la tendencia de los valores promedio de anticuerpos fueron menores, y no se encontró diferencia significativa, $p=0,063$. Durante el tratamiento, el 50,0% (13/26) de los pacientes con ENL presentaron anticuerpos positivos frente a la proteína LID-1 y después del tratamiento, el 71,9 % (23/32) de los pacientes tuvieron un incremento en los valores de anticuerpos dirigidos hacia la proteína de fusión LID-1, Figura3 (Anexo 8)

Con respecto a la respuesta serológica de anticuerpos IgM dirigidos hacia el glicolípido fenólico (GLP-I) en las diferentes formas clínicas. El 89,3% (25/28) de los pacientes con ENL presentaron anticuerpos GLP-I positivo antes del tratamiento con un promedio de índice de reconocimiento de 6,108. Comparando con el grupo control el 73,3% (11/15) de los pacientes con Hansen sin fenómeno reaccional tipo ENL presentaron anticuerpos contra glicolípido positivos con un valor promedio de índice de reconocimiento de 5,107 obteniéndose una $p=0.47$. Durante el tratamiento el 73,1% (19/26) de los pacientes con ENL presentaron niveles de anticuerpos GLP-I positivo, disminuyendo el porcentaje 54,8% (17/31) después de instaurado el tratamiento con poliquimioterapia Figura 4 (Anexo 9).

DISCUSION

La lepra es un problema de salud pública en 32 países ⁽³⁸⁾, se presentan 228.474 casos nuevos a nivel mundial, entre el año 2004 al 2010, se registraron 2.596 casos de recurrencia ⁽³⁹⁾. Para el 2011 se han registrado a nivel mundial 192.246 casos cuya prevalencia es de 0.34/10.000 habitantes ⁽⁴⁰⁾. Es una enfermedad infecciosa crónica cuyo agente etiológico es el *Mycobacterium leprae*, bacilo de crecimiento lento intracelular, que afecta principalmente la piel y los nervios periféricos, lo que con lleva a lesiones infiltrativas con pérdida de la sensibilidad discreta, hasta lesiones diseminadas con secuelas importante e incapacitante ⁽³⁸⁾.

Dos de los fenómenos inmunopatológicos más frecuente en la enfermedad son: Reacciones tipo I ó de reversión y las reacciones tipo II, el cual el más frecuente es el ENL. En este trabajo enfocamos nuestros estudios en las reacciones ENL, como ya mencionamos estas reacciones se han definido como una complicación inmunológica en los pacientes multibacilares. Se presenta con nódulos eritematosos subcutáneos dolorosos que pueden ulcerar. También puede haber compromiso sistémico, como fiebre, inflamación de los linfonódulos, poliartralgia, paniculitis, neuritis, ginecomastia por atrofia testicular y problemas oculares como iritis, iridociclitis, uveítis entre otras⁽⁴¹⁾. Los episodios reaccionaes son complicaciones graves de la lepra debido a que estas reacciones son muy probablemente la principal causa de daño permanente del nervio, lo que con lleva a la discapacidad y deformidades. Hay una prioridad de comprender la patogénesis de estas alteraciones para determinar qué pacientes pueden ser considerados en riesgo de padecer ENL. Estos episodios representan una exacerbación del proceso inflamatorio que puede ocurrir antes, durante y después del tratamiento de la lepra y pueden ser causado por un aumento en la respuesta celular mediada por Th1 a *Mycobacterium leprae* ⁽⁴²⁾.

En el Instituto de Biomedicina- Hospital Vargas Caracas-Venezuela se llevó a cabo una investigación sobre los estados reaccionaes en la Enfermedad de Hansen. En este estudio, el número total de pacientes a los que se les diagnosticó enfermedad de Hansen en la consulta de Lepra desde el primero de enero del año 2002 al 31 de Diciembre del 2009 fue de 392 pacientes. El porcentaje de fenómenos reaccionaes

en esta población fue de 120 (30.6%), de las cuales 7.9% correspondió a reacciones tipo I ó de reversión y el 22.7% a tipo ENL. Estudio realizado por Motta AC y col reportaron similares resultados en el Hospital Universitario Escuela de Medicina Ribeirão Preto entre el año 2000 al 2010 donde la mayor frecuencia correspondió a los pacientes con fenómeno tipo 2, se incluyeron 225 pacientes cuyos criterios diagnósticos se basaron en la clasificación de Ridley y Jopling ⁽³⁰⁾. La forma más frecuente fue la multibacilar con 146 pacientes seguido por la forma paucibacilar con 79 pacientes, la mayoría de los pacientes diagnosticados con lepra eran de sexo masculino 68,8% (155) y 31,1% del sexo femenino (70), con edad promedio de 49,31 ± 15,94 años. De 122 pacientes, 78 presentaron fenómeno reaccional (63,9%) tipo ENL y 44 pacientes (36,1 %) tipo reversión y el resto de los pacientes 103 no mostraron ningún fenómeno reaccional ⁽⁴²⁾.

En un estudio realizado por Guerra JG y col presenta datos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos, serológicos sobre la terapéutica en una serie de casos de la forma clínica BL y LL con ENL, en comparación con el grupo control de las mismas formas clínicas sin ENL. Estos investigadores reportan 58 pacientes con episodio de ENL registrado entre julio y diciembre del 2000 en un área hiperendémica de el Brasil Central (Estado de Goiás) la mitad de los pacientes presentaron cuadro reaccional grave y el 66% de los pacientes presentaron su primer cuadro durante el tratamiento. La mayoría de los casos de ENL y controles dieron reactividad para la Ig-M frente al GLP-1⁽¹⁸⁾. En nuestro estudio, el 87,5% de los pacientes estudiados eran de sexo masculino según la clasificación de Ridley-Jopling ⁽³⁰⁾ y la forma clínica más predominantemente fue LL-BL (87.5%) en concordancia con la literatura que describe que esta forma clínica es un factor de riesgo importante para el desarrollo de ENL aunque no es predisponente ⁽⁴³⁾. Kumar B y col realizaron un estudio sobre la frecuencia, tiempo de inicio y factores de riesgo de las reacciones leprosas en las clínicas de lepra en PGIMER Chandigarh en la India entre el año 1983 a 1998 y encontraron que pacientes con lepra lepromatosa, sexo femenino y un alto índice bacteriano son factores de riesgo para el desarrollo de ENL⁽⁴⁴⁾. A diferencia de nuestro trabajo donde el sexo masculino era el más

predominante. Hay reportes en algunos países donde el factor de riesgo es la edad, cuyas edades estuvieron comprendidas en pacientes menores de 40 años ⁽⁴⁵⁾. Concordando con lo obtenido en nuestra población donde el 81.3% de los pacientes presentaron episodios en edades comprendida entre 18 e 40 años.

Con el objetivo de caracterizar mejor la relación dosis-respuesta entre la talidomida y ENL, Villahermosa y col realizaron un estudio en 22 pacientes con ENL la cual presentaban más de 10 lesiones nodulares en piel y síntomas sistémicos acompañantes que incluyen fiebre neuritis artralgiás y/o orquitis⁽⁴⁶⁾. Comparando estos resultados con nuestro estudio el 59,4% presentaron lesiones tipo nódulos de localización en miembros superiores e inferiores además encontramos que el 56,3% presentaban síntomas sistémicos. Igualmente, Guerra JG y col reporta la localización más frecuente de lesiones en miembros superiores e inferiores ⁽¹⁸⁾.

El episodio reaccional puede ocurrir antes, durante o después del tratamiento ⁽⁴⁷⁾ Feuth M y col encontraron que el 30% de los pacientes debutaron con ENL al momento del diagnóstico, donde el 41% desarrolló ENL en el primer año durante el tratamiento con poliquimioterapia ⁽⁴⁸⁾. En nuestro estudio el 25% presentaron el cuadro de ENL al momento del diagnóstico y el 37,5% durante el primer año de tratamiento. Saunderson P y col encontraron que la mayor incidencia de ENL ocurría entre el segundo y tercer año de iniciado el tratamiento y al igual que otros trabajos la presencia de índice bacteriano alto y pacientes con la forma clínica lepra lepromatosa tienen mayor riesgo de padecer ENL ⁽⁴⁹⁾. Similares resultados fue encontrados por Manandhar R y col donde la tercera parte de los pacientes estudiados presentaron ENL antes del tratamiento con poliquimioterapia, un tercio en los primeros 6 meses de tratamiento y un tercio después de 6 meses de tratamiento y el 45% de los pacientes tuvieron más de un episodio de ENL en el transcurso de la enfermedad. Y además encontraron, al igual que Saunderson P y col, que pacientes con lepra lepromatosa, lesiones infiltradas en piel e índice bacteriano mayor de 4 + tenían mayor riesgo de padecer ENL. En relación a la edad, los pacientes mayores de 40 años tenían un riesgo significativamente menor de ENL. Estas observaciones deben permitir a los médicos reconocer pacientes en la primera consulta que será

propenso a desarrollar ENL ⁽⁴⁵⁾. Riesgos similares de padecer ENL fue encontrado en nuestro trabajo.

Por otra parte es conocido que los pacientes con la forma clínica LL presentan una hyper-reactividad de los linfocitos B encontrándose localizados en mayor proporción anticuerpos IgM e IgG entre las células de la dermis (tejido conectivo) en biopsias de piel en comparación con los anticuerpos encontrados en los vasos sanguíneos y en las uniones dermoepidermicas ⁽⁵⁰⁾.

La producción de anticuerpos está altamente relacionada con la carga bacilar ^(51,52). En relación a la respuesta de anticuerpos IgG frente a la proteína recombinante antes, durante y después de tratamiento, la proteína LID-1 es una proteína de fusión la cual comprende la proteína MI0405 y MI 2331 proteínas de secreción con una masa molecular de 25.3 kDa y 26.5 kDa respectivamente la cual ha sido utilizada en diferentes estudios a nivel mundial como proteína para diagnóstico en la enfermedad de Hansen y monitoreo de tratamiento adecuado ^(24,53). Los valores de anticuerpos dirigidos hacia la proteína LID-1 en los pacientes con ENL en nuestro estudio permanecieron elevados antes y después de tratamiento.

A pesar que las reacciones son la mayor causa de daño a nervio en lepra hay pocos estudios donde demuestren si la serología frente a proteínas micobacterianas puedan ser usadas para el diagnóstico y aún más predecir estados reaccionales. Chujor CS y Col demostraron que la ocurrencia de ENL no tiene efectos significantes en los niveles de anticuerpos ⁽⁵⁴⁾.

En la gran mayoría de los casos tratados los niveles de anticuerpos disminuyen una vez empezado el tratamiento. En nuestro estudio los niveles de anticuerpos anti-LID-1 permanecen en el tiempo. Podría ser que la respuesta de anticuerpos frente a esta proteína esté correlacionada con la persistencia del bacilo vivo y esto podría ser de particular interés. Otros investigadores han utilizado otras proteínas micobacterianas entre ella la proteína con una movilidad relativa de 30 kDa predominantemente reconocida por anticuerpos de los pacientes multibacilares, lo cual es altamente sugestivo de la posible importancia en el diagnóstico, pronóstico y estudios epidemiológicos ⁽¹⁹⁾. La reactividad serológica frente a esta proteína de 30

kDa en pacientes con ENL, la respuesta siempre fue mayor en comparación con los pacientes MB que no presentaron reacción. La proteína de 30 kDa pertenece al complejo 85 y es conocido que el bacilo de *M. leprae* vivo se ancla a superficies cubiertas con fibronectina y puede ser uno de los mecanismos de evasión y escape del sistema inmunológico ⁽⁵⁵⁾.

Investigadores en los últimos 20 años han tratado de conseguir ciertas secuencias específicas de péptidos que permitan identificar los procesos reaccionales del tipo ENL la necesidad de conseguir determinantes antigénicos para identificar pacientes con lepra lepromatosa con alto riesgo de desarrollar episodios tipo ENL ⁽⁵⁶⁾.

En algunos casos la seropositividad frente a componentes micobacterianos podría ser por presentar reactividad cruzada con otras micobacterias ambientales. Estudios realizados desde hace 5 años con LID-1 en diferentes regiones geográficas, esta proteína ha resultado ser bien específica. Se ha colectado suero proveniente de individuos estados unidenses inmunizados con BCG (ninguno de estos individuos presentaron serología positiva frente a BCG y NDO-BSA) ⁽⁵⁷⁾. Está bien demostrado que durante las reacciones tipo ENL hay un aumento selectivo de la expresión de RNAm de IL-6, IL-8 e IL-10 en las lesiones indicando de una respuesta tipo Th2 ^(58,59)

Otros investigadores han señalado que los pacientes que presentan episodios tipo ENL difieren considerablemente de los grupos controles, contactos y pacientes que no presentan ENL en relación a la formación de complejos inmune. También se ha reportado que determinaciones de anticuerpos libre anti-GLP-1 y anti-10 kDa de *Mycobacterium leprae* fueron menores mostraron diferencias entre los pacientes que presentaron ENL y el grupo control ⁽⁶⁰⁾.

Guerra y col en sus investigaciones de una serie de casos en pacientes con ENL reportó que el 54.5% (18/33) presentaron serología positiva para anticuerpos IgM anti-PGL-I y los valores siempre fueron menores a los valores de anticuerpos en los pacientes sin reacción ⁽¹⁸⁾.

A pesar de la disminución de la prevalencia en la mayoría de los países endémicos en la última década, el número de casos anualmente nuevo se mantiene elevado. Se considera una prioridad de urgencia en investigación conseguir herramientas de

diagnóstico específicos aplicables en trabajo de campo, tomando en cuenta que los pacientes multibacilares son los causantes de la transmisión ⁽²⁰⁾. Además aunado el hecho que la morbilidad en lepra está siempre asociada a reacciones. La mayoría de las deformidades en lepra son la consecuencia de las reacciones ocurridas en pacientes Borderline y en pacientes Lepromatosos. En los últimos años hay un interés mundial de buscar que elementos provoca las reacciones de inflamación aguda, identificando los factores de riesgos .Es necesario alertar al paciente de su presencia y así mejorar el manejo de las mismas para aliviar y prevenir rápidamente el daño neural severo .

Conclusiones

El eritema nodoso leproso representa una exacerbación del proceso inflamatorio que puede ocurrir antes, durante y después del tratamiento de la lepra. La forma clínica predominante fue la lepromatosa, cuyas lesiones más frecuentes fueron del tipo nódulos, localizadas principalmente en miembros superiores e inferiores. El 93,7% de los pacientes presentaron índice bacteriano mayor a dos cruces (2 +) antes del tratamiento con terapia multidroga, disminuyendo lentamente a 43,3%. El 62,6% de los pacientes con ENL presentaron entre uno y seis episodios reaccionales. No se encontró diferencia estadísticamente significancia entre los valores de anticuerpos frente a la proteína LID antes, durante y después de tratamiento.

Recomendaciones

- Hacer un estudio con un número mayor de pacientes en presencia de ENL para corroborar la persistencia de los Anticuerpos anti-LID-1.
- Utilizar otros componentes micobacterianos como la molécula sacárida del glicolípidio fenólico (NDO o NTO)
- Hacer seguimiento con la proteína LID-1 en aquellos pacientes que no presentan fenómeno reaccional tipo ENL y compararla con aquellos que si presenta reacción.
- Determinar la frecuencia de los fenómenos reaccionales con el nuevo cambio del esquema de tratamiento, pautado recientemente por la OMS, donde se reduce a 24 meses para las formas multibacilares.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado gracias a la contribución del proyecto LOCTI DIA02-2010 financiado por la empresa Duty Free Americas,CA. Al Dr Malcolm Duthie del Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas (IDRI) por la gentileza de proveer la proteína recombinante LID-1 A los inspectores de Salud Publica por la búsqueda activa de las historias clínicas de los pacientes con enfermedad de Hansen. A Wilman Clark por su valiosa ayuda en la asesoría informática.

REFERENCIAS

- 1-Aranzazu N. Enfermedad de Hansen etiología, clínica y clasificación. *Dermatol Venez* 1994; 32(4): 145-151.
- 2-Cuevas L, De la Hoz F, León C, Guerrero M, Gamboa L, Araujo M. Caracterización clínica y sociodemográfica de casos nuevos de lepra en municipios endémicos y no endémicos de Colombia. *Rev Salud Pública* 2004; 6 (1):50-63.
- 3-Gomez JR, Moll F. Lepra: enfermedad olvidada. Situación actual y trabajo sobre el terreno. *Enf Emerg* 2005; 7(2):110-119.
- 4-Rodriguez M, Castillo S. Reporte de 9 casos nuevos de lepra estudiados en el Centro Dermatológico Pascua en el año 2001. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2003; 12(1):15-22.
- 5-Paredes V, Ríos J, Ocha A. Enfermedad de Hansen. *Rev Bol Dermatol* 2008; 5(1):41-42.
- 6-De el Agua JT. Consideraciones históricas epidemiológicas de la lepra en América. *Med Cutan Iber Lat Am* 2006; 34(4):179-194.
- 7-Prabhu S, Shenoi SD, Pai SB, Sripathi H. Erythema nodosum leprosum as the presenting feature in multibacillary leprosy. *Dermatol Online J* 2009; 15(6):15.
- 8-Concha M, Cossío L, Salazar I, Fich F, Pérez C, González S. Enfermedad de Hansen: Revisión a propósito de un caso. *Rev Chil Infect* 2008; 25 (1): 64-69.
- 9-Stefani MM. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(2): 89-94.
- 10-Young DB, Kaufmann SH, Hermans PW, Thole JE. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol Microbiol* 1992; 6(2):133-145.
- 11-Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, Martelli CM et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vacc Immunol* 2007; 14(11): 1400-1408.
- 12-Rada E, Aranzazu N, Convit J. Ciertos aspectos inmunológicos en los estados reaccionales en la enfermedad de Hansen. Revisión. *Invest Clin* 2005; 46 (4); 381- 389.

13-Rodríguez G. Adenopatías generalizadas como presentación de la reacción leprótica tipo 2. *Biomédica Instituto Nacional de Salud Bogotá Colombia* 2003; 23 (004): 373 – 387.

14-Olivares L, Pizzariello G, D'atri G, Martínez A, Casas C, Belén J y Col. Lepra reaccional. *Dermatol Argent* 2009; 15(2):126-130.

15-Reyes Flores O. La reacción lepromatosa una revisión. *Dermatol Venez* 2000; 38(4):85-95.

16-Montes A, Orozco B, Gaviria M. Lepra dimorfa en estado reaccional tipo 1 y 2. *Rev Asoc Col Dermatol* 2009; 17(1):51-53.

17-Valente Mdo S, Vieira JL. Thalidomide used by patients with erythema nodosum leprosum. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(2):201-204.

18-Guerra JG, Penna GO, Castro LC, Martelli CM, Stefani MM, Costa MB. Erythema nodosum leprosum case series report: clinical profile, immunological basis and treatment implemented in health services. *Rev Soc Bras Med Trop.*2004;37(5):384-390.

19-Rada E, Aranzazu N, Rodríguez V, Borges R, Convit J. Reactividad serológica y celular frente a proteínas micobacterianas en la enfermedad de Hansen. *Invest Clin* 2010; 51(3):325-340.

20-Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 2003;74(3):196-205.

21-Cho SN, Cellona RV, Fajardo TT Jr, Abalos RM, De la Cruz EC, Walsh GP et al. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. *Int J Lepr* 1991; 59(1):25-31.

22-Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(3):333-340.

23- Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, Oyafuso LK . Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30 (10):1257-1265.

24-Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath TH, Ito L et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(2):298-303.

- 25-Azizi MH, Bahadori M. A history of leprosy in Iran during the 19th and 20th centuries. Arch Iran Med. 2011; 14(6):425-430.
- 26- Reyes Flores O. Lepra y afecciones relacionadas. En Reyes Flores O. Tratamiento Anti-Leproso. cap 23. Editorial Creser Publicidad: 1ra ed. Caracas. Venezuela, 2010, p: 361-376.
- 27- Reyes Flores O. Lepra y afecciones relacionadas. En Reyes Flores O. Reacción Lepromatosa. cap 15. Editorial Creser Publicidad: 1ra ed. Caracas. Venezuela, 2010, p: 259-284.
- 28-Aldana A, Rivelli V, Aldana O, Ozecoski D, Gorostiaga G. Lepra Hoy Consideraciones Epidemiológicas del Hospital Nacional. Rev. Nac. (Itauguá). 2009;1(2):27-30.
- 29-Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2):338-381.
- 30-Ridley DS and Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. Int J lepr 1966; 34(3):255-273.
- 31-Rada E, Aranzazu N, Convit J. Respuesta inmunitaria de la enfermedad de Hansen. Revisión. Invest Clin 2009;50(4):513-527.
- 32-Marcano G, González M, Vidal J. Moreno C, Zamora A. Enfermedad de Hansen y embarazo a propósito de dos casos. Dermatol Venz 1993; 31(3):105-108.
- 33-Raman V, O'Donnell J, Bailor R, Goto W, Lahiri R, Gillis T et al. Vaccination with the ML0276 Antigen reduces local Inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. Infect Immun 2009; 77 (12):5623–5630.
- 34-López-Antuñano FJ, Diagnóstico y tratamiento de la lepra. Salud Pública Méx.1998; 40(1): 66-75.
- 35-Reyes Flores O. Lepra y afecciones relacionadas. En Reyes O, Aranzazu N. Diagnóstico . cap 9. Editorial Creser Publicidad: 1ra ed. Caracas. Venezuela, 2010, p: 134-141.
- 36-Gupta N, Shankernarayan NP, Dharmalingam K. Alpha1-acid glycoprotein as a putative biomarker for monitoring the development of the type II reactional stage of leprosy. J Med Microbiol 2010; 59(4):400-407.

- 37-Rada E, Aranzazu N, Ulrich M, Convit J. Serologic response to mycobacterial proteins in Hansen's patients during multidrug treatment. *Int J Lepr* 1999; 67(4): 414-421.
- 38-Cavalcanti AA, Lucena-Silva N, Montarroyos UR, Albuquerque PM. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(5):616-9.
- 39-Ferreira SM, Ignotti E, Gamba MA. Clinical and laboratory characteristics in the retreatment of leprosy relapse. *Rev Bras Epidemiol.*2012; 15(3):573-581.
- 40-World Health Organization. Leprosy update. *Weekly Epidemiological Record.*2011;86(35):389-400
- 41-Reyes Flores O. Reacción leprosa. En: Reyes O, Editorial Creser Publicidad: *Lepra y afecciones relacionadas.* 1ra ed. Caracas. Venezuela, 2010, cap 15.p:258-284.
- 42-Motta AC, Pereira KJ, Tarquínio DC, Vieira MB, Miyake K, Foss N. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics (Sao Paulo).* 2012; 67(10):1145-1148.
- 43-Becx-Bleumink M, Berhe D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in leprosy control of the all Africa leprosy and rehabilitation training center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr* 1992; 60(2):173-183.
- 44-Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions:15 years experience from north India. *Int J Lepr* 2004; 72(2):125-33.
- 45-Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* 1999; 67(3):270-278
- 46-Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Abalos RM, Balagon MV et al. A randomized, double-blind, double-dummy, controlled dose comparison of thalidomide for treatment of erythema nodosum leprosum. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72(5):518-26.
- 47-Legendre DP, Muzny CA, Swiatlo E. Hansen's disease (Leprosy): current and future pharmacotherapy and treatment of disease-related immunologic reactions. *Pharmacotherapy* 2012; 32(1):27-37.

- 48-Feuth M, Brandsma JW, Faber WR, Bhattarai B, Feuth T, Anderson AM. Erythema nodosum leprosum in Nepal: a retrospective study of clinical features and response to treatment with prednisolone or thalidomide. *Lepr Rev* 2008; 79(3):254-269.
- 49-Saunderson P, Gebre S, Byass P. ENL reactions in the multibacillary cases of the AMFES cohort in central Ethiopia: incidence and risk factors. *Lepr Rev* 2000; 71(3):318-24.
- 50-Kano K, Aranzazu N, Nishimaki T, Convit J, Albini B and Milgrom F. Serological and immunohistological studies on lepromatous leprosy. *Int Archs Allergy Appl Immun* 1981; 64(1):19-24.
- 51-Bach MA, Wallach D, Flageul B, Hoffenbach A, Cottenot F. Antibodies to phenolic glycolipid-1 and to whole *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: evolution during therapy. *Int J Lepr* 1986; 54(2):256-267.
- 52-Rada E, Ulrich M, Aranzazu N, Santaella C, Centeno M, Rodriguez V et al. A longitudinal study of immunologic reactivity in leprosy patients treated with immunotherapy *Int J Lepr* 1994; 62(4):552-558
- 53-Duthie MS, Ireton GC, Kanaujia GV, Goto W, Liang H, Bhatia A et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(10):1590-1597.
- 54- Chujor CS, Bernheimer H, Levis WR, Schwerer B. Serum IgA1 and IgM antibodies against *Mycobacterium leprae*-derived phenolic glycolipid-I: a comparative study in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr* 1991; 59(3):441-449.
- 55-Rada EM, Zambrano EA, Aranzazu N, Convit J. Serologic recognition of low molecular weight mycobacterial protein fractions in lepromatous patients with type II reactions (ENL). *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2005; 73(3):222-225.
- 56-Singh S, Narayanan NP, Jenner PJ, Ramu G, Colston MJ, Prasad HK et al. Sera of leprosy patients with type 2 reactions recognize selective sequences in *Mycobacterium leprae* recombinant LSR protein. *Infect Immun* 1994; 62(1):86-90.
- 57-Anderson H, Stryjewska B, Boyanton BL, Schwartz MR. Hansen disease in the United States in the 21 st century: a review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:982-986.
- 58-Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop Geogr Med*. 1994; 46(2):80-84.

59-Yamamura M, Wang X-H, Ohmen JD, Uyemura TH, Rea TH, Bloom BR et al . Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992; 149(4): 1470-1475.

60-Rojas RE, Demichelis SO, Sarno EN, and Segal-Eiras A. IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997 ; 19(1) : 65-74

ANEXOS

Anexo 1

Recuento del número de bacilos examinado bajo observación al microscopio de luz utilizando lente 100x en aceite de inmersión. Técnica Ziehl-Neelsen

Número de bacilos observados/por campo	Resultado
No se encuentran bacilos en 100 campos	Negativo
1-10 bacilos en promedio por 100 campos	+
1-10 bacilos en promedio por 10 campos	++
1-10 bacilos en promedio por cada campo	+++
10-100 bacilos en promedio por cada campo	++++
100-1000 bacilos en promedio por cada campo	++++
Más de 1000 en promedio por cada campo	++++++

Anexo 2

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Para satisfacción de los Derechos del Paciente, como instrumento favorecedor del correcto uso de los Procedimientos Diagnósticos y Terapéuticos, y en cumplimiento de la Ley .

Yo, Sr/Sra./Srta.....
como paciente
(o Sr/Sra./Srta. Abel Ganes Banió)
como su representante), en pleno uso de mis facultades, libre y voluntariamente,

EXPONGO:

Que he sido debidamente INFORMADO/A por el Dr....., en entrevista personal realizada el día, de que es necesario que se me efectúe el procedimiento diagnóstico terapéutico denominado Protocolo Fenomenos Racionales

Que he recibido explicaciones tanto verbales como escritas (Anexo), sobre la naturaleza y propósitos del procedimiento, beneficios, riesgos, alternativas y medios con que cuenta el Hospital para su realización, habiendo tenido ocasión de aclarar las dudas que me han surgido.

MANIFIESTO:

Que he entendido y estoy satisfecho de todas las explicaciones y aclaraciones recibidas sobre el proceso médico citado. Y OTORGO MI CONSENTIMIENTO para que me sea realizado el procedimiento diagnóstico

terapéutico Protocolo de Fenomenos Racionales

Entiendo que este consentimiento puede ser revocado por mí en cualquier momento antes de la realización del procedimiento.

Y, para que así conste, firmo el presente documento

Caracas, a los 7 días del mes 10 de 02

Firma del paciente Abel Ganes Banió y N° C.I. 81.215.332

Huella del paciente [Huella]

Firma del médico informante [Firma]
(N° de colegiado) _____

Firma del testigo [Firma]
N° C.I. 15.821.607

Anexo 3

Yo, Abel Gomey Barrio, Cédula de Identidad N° 81215332 declaro que he sido informado que padezco de lepra tipo _____, enfermedad infectocontagiosa que es causada por una bacteria, y que amerita tratamiento con Praticebo F.A., suministrado gratuitamente por la Organización Mundial de la Salud, por el lapso de _____ meses.

Igualmente declaro que he sido informado que en el transcurso de la enfermedad puedo padecer de cuadros Reaccionales caracterizado por aparición de nuevas lesiones o empeoramiento de las existentes, fiebre, malestar general y/o dolor en nervios periféricos.

Por este motivo autorizo a tomar exámenes de laboratorio (ELISA, Prueba de Transformación Linfocitaria, función hepática y renal, hematología completa, orina, heces, VDRL, HIV) y biopsia de piel, antes de iniciar el tratamiento y cuando se presenten los cuadros Reaccionales con el fin de confirmar el Diagnostico y recibir el Tratamiento adecuado. Los riesgos de estas intervenciones están relacionados con infecciones secundarias por la falta de aseo local y dehiscencia de sutura.

También declaro haber sido notificado que los datos obtenidos en este estudio son confidenciales y solo serán utilizado con fines científicos. Luego de recibir toda la información declaro libremente estar dispuesto a participar en este estudio sometiéndome a los exámenes antes descritos o a no aceptarlos voluntariamente si no estoy satisfecho con la evolución del mismo.


Firma

Anexo 4“Formulario de Hansen”

País: _____

Fecha (mes/día/año): _____

Natural: _____

Procedente: _____

Nombre: _____

Edad: _____

Sexo: M / F

Tipo de Lepra: LI LT LTB LBB LBL LL

Fecha de diagnóstico: _____

Duración de enfermedad antes del diagnóstico
(meses): _____Técnicas de diagnóstico:

Frotis de piel: si / no

Índice bacteriano (si lo conoce): _____

Lesión cutánea: si / no

Lesión con pérdida sensorial: si / no

Histología: si / no

¿Otros? _____

Serología: si / no

Número de lesiones:

Tipo de lesión: mácula____ pápula____ nódulo____ placa____

Nervios afectados: si / no

¿Cuál? _____

Tratamiento (Fecha) _____

TPBA____ TMBA____

Fenómenos reaccionales: Tipo 1 / Tipo 2 (Especificar/Fecha) _____

Estado de nutrición: _____

Otras Enfermedades: Tuberculosis Malaria HIV/SIDA Dengue

Otras (Especificar) _____

PPD: Positivo / Negativo / Desconocido / MISA / Lepromina

Anexo 5

Tabla 1- Características socio-demográficas de los pacientes diagnosticados con ENL. n=32 pacientes.

Variables	Número	Porcentajes
Sexo		
Masculino	28	87,5%
Femenino	4	12,5%
Edad		
18-30 años	16	50,0%
31-43 años	10	31,3%
44-56 años	4	12,5%
>57 años	2	6,3%
Residencia		
Caracas	19	59,4%
Miranda	4	12,5%
Otros estados	7	21.1%

Anexo 6

Figura 1. Características clínica de los pacientes con ENL según la clasificación de Ridley & Jopling

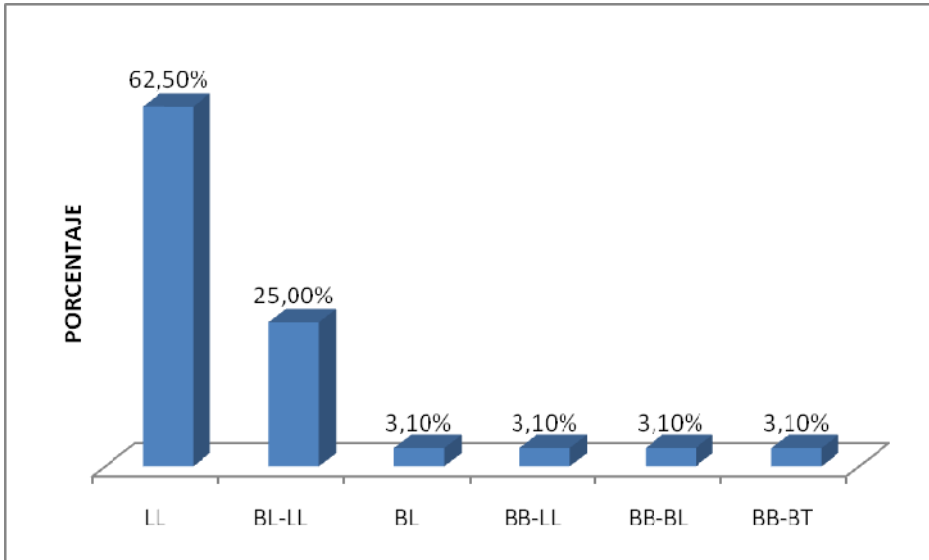
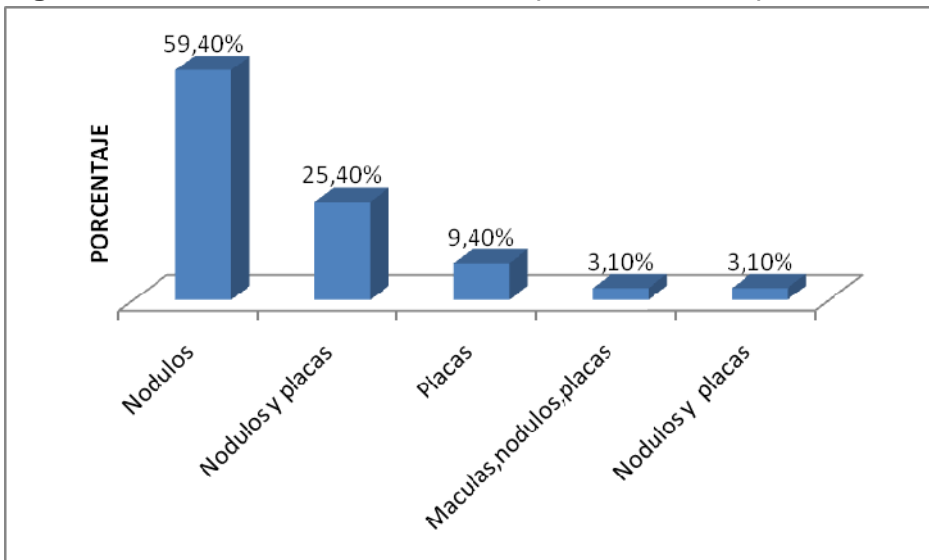


Figura 2. Características clínicas del tipo de lesión en pacientes con ENL



Anexo 7

Tabla 2. Índice bacteriano antes, durante, y después del tratamiento en pacientes con fenómeno reaccional tipo ENL (n=32).

Índice bacteriano	Antes	Durante	Después
Menor 2 +	2 (6,3%)*	8 (25,0%)	18 (56,2%)
Mayor 2 +	30 (93,7%)	24 (75,0%)	14 (43,8%)

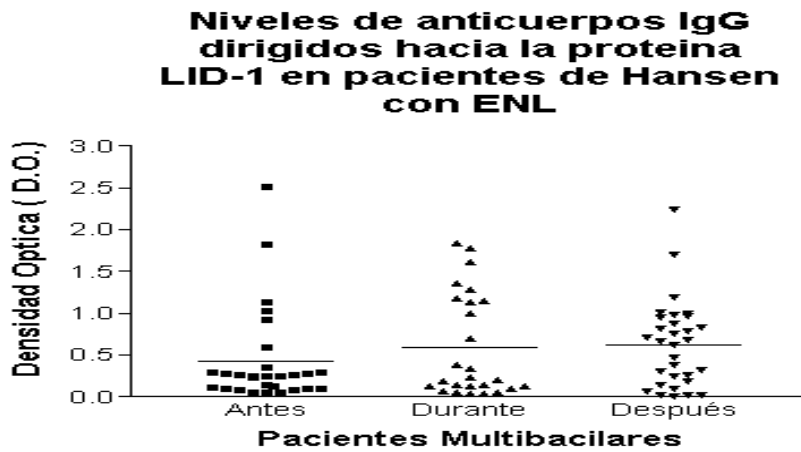
*Los resultados son expresados en porcentaje en relación al índice bacteriológico calculado según escala semilogaritmica establecida por la OMS. Para la coloración de las bacterias se utilizó el método de Ziehl-Neelsen donde toman un color rojo intenso sobre un fondo azul.

Tabla-3 Frecuencia del número de episodios en pacientes con eritema nodoso leproso durante el tratamiento de la enfermedad

Numero de episodios	Pacientes	Porcentaje
1-3	11	34,4%
4-6	9	28,2%
7-9	8	25,0%
10-12	4	12,5%

Anexo 8

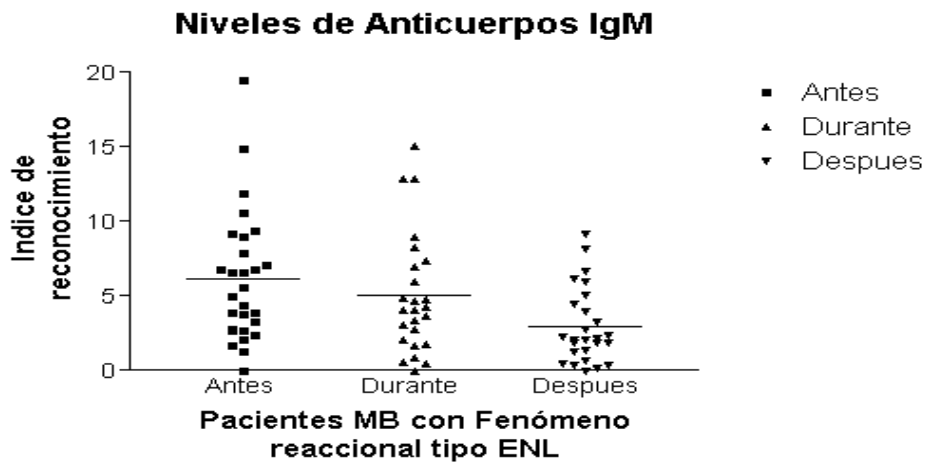
Figura 3. Respuesta serológica IgG dirigida hacia la proteína LID-1 antes, durante y después del tratamiento



Se comparo la respuesta serológica de LID-1 antes y después del tratamiento en pacientes con ENL, no encontrándose diferencia significativa $p=0,63$. Tomamos luego antes y durante el tratamiento en ENL no encontrándose diferencia significativa $p= 0,36$. Y por ultimo comparamos la respuesta de la proteína LID-1 durante y después del tratamiento en eritema nodoso leproso $p=0,99$ no encontrándose diferencia significativa

Anexo 9

Figura 4. Respuesta serológica frente al glicolípido fenólico antes, durante y después del tratamiento en pacientes de Hansen en proceso reaccional tipo ENL



Se comparo el glicolípido fenólico antes y durante el tratamiento $p=0,24$ no encontrándose diferencia significativa, luego tomamos GLI-1 antes y después de tratamiento $p=0,0053$ encontrándose diferencia significativa y por ultimo comparamos durante y después $p=0,0068$ encontrándose diferencia significativa