

Oxido nítrico en el síndrome de Sjögren

Posible participación en el bloqueo de la apoptosis linfocitaria

Juan Manuel Anaya, Fabio M. Jiménez, Susana Restrepo, Cecilia A. Henao · Medellín.
Jorge Rueda · Cali. Rubén D. Mantilla · Santafé de Bogotá, Colombia

Objetivo. Evaluar el papel del óxido nítrico (NO) en el síndrome de Sjögren primario (SSp) y su relación con la apoptosis tisular en glándulas salivares menores (GSM).

Métodos. Las GSM correspondieron a sialoadenitis focal propia del SSp, sialoadenitis crónica (SAC) y a GSM histológicamente normales. El progreso del SSp fue evaluado mediante el puntaje por focos inflamatorios en GSM. Los niveles salivares y séricos de nitrito (NO₂) fueron medidos mediante la reacción de Griess. La expresión de la óxido nítrico sintasa tipo 2 (NOS2) y de la cistatina C (Cis-C), un inhibidor fisiológico de proteasas, fue examinada en GSM por inmunohistoquímica, y analizada de manera semi-cuantitativa. La apoptosis tisular fue evaluada determinando la fragmentación del ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados.

Resultados. Los niveles de NO₂ - en saliva fueron mayores en pacientes con SSp (n=17) que en controles sanos (n=17) (71.7 ± 20.6 vs 19.5 ± 3.7 uM, p=0.02), mientras que en suero fueron similares (22.3 ± 3.8 vs 17 ± 1.4 uM). En el infiltrado inflamatorio la expresión de NOS2 fue mayor en pacientes con SSp que con SAC (n=4) (94% vs 7%). La NOS2 fue observada también en células epiteliales canaliculares, células acinares y fibroblastos de pacientes (SSp y SAC), y de controles normales (n=5). En GSM de pacientes con SSp la expresión de NOS2 fue mayor en aquellas con focos inflamatorios <4 (78% vs 17%, p=0.04) y con menor número de células apoptóticas en el infiltrado inflamatorio (0.6 ± 0.2 vs 1.66 ± 0.3, p=0.02). La expresión de Cis-C fue observada en los tres grupos estudiados, principalmente en células epiteliales canaliculares, en algunos plasmocitos y células acinares de pacientes con SSp. No se observó asociación entre la expresión de Cis-C y la apoptosis tisular.

Conclusión. Este estudio confirma el aumento de la síntesis de NO en el SS primario, producido localmente en el sitio inflamatorio, principalmente durante las fases tempranas de la enfermedad, y sugiere su participación en el bloqueo de la apoptosis linfocitaria, la cual no es regulada por la Cis-C. El mecanismo de esta inhibición apoptótica podría estar asociado a la S-nitrosilación de caspasas. (*Acta Med Colomb* 1999;24:89-95).

Palabras clave: Oxido nítrico, síndrome de Sjögren, apoptosis linfocitaria.

Introducción

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune caracterizada por un infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico benigno en las glándulas exocrinas, que conlleva a la disminución de secreciones glandulares y sequedad de mucosas, ocasionando síntomas secos, principalmente en ojos (xeroftalmía) y en boca (xerostomía). El SS puede observarse asociado a otras enfermedades autoinmunes, en particular a la artritis reumatoidea (SS secundario), o presentarse aisladamente como entidad única (SS primario) (1).

Para diagnosticar el SS hay varias pruebas disponibles. Ellas incluyen un examen cuidadoso de los ojos, la medida

de la producción lagrimal y de saliva, la biopsia de las glándulas salivares menores (GSM) y la determinación de autoanticuerpos séricos.

En la biopsia de GSM de pacientes con SS primario se observa la presencia de una sialoadenitis focal (SAF), con-

Dr. Juan-Manuel Anaya: Unidad de Reumatología, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín; Fabio Jiménez: Estudiante de Microbiología, Convenio Unidad de Reumatología, CIB y Universidad de los Andes, Santafé de Bogotá; Dra. Susana Restrepo: Unidad de Reumatología, CIB; Dra. Cecilia A. Henao: Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, Medellín; Dr. Jorge Rueda: Sección de Reumatología, Centro Médico Fundación Valle del Lili, Cali; Dr. Rubén D. Mantilla: Unidad de Reumatología, CIB, y Clínica de Artritis y Rehabilitación, Santafé de Bogotá.

sistente en un agregado de 50 o más células mononucleares (un foco inflamatorio), principalmente linfocitos T CD4 y B (en proporción 4:1), en áreas periductuales o perivasculares, adyacentes a acinos glandulares de apariencia normal, con ausencia de fibrosis (2, 3). La sialoadenitis se evalúa de acuerdo con el puntaje por focos. Este es el número de focos inflamatorios /4mm² de tejido. El puntaje por focos se califica en una escala de 1 a 12, donde 10 es el valor máximo que se puede asignar antes de que el infiltrado sea confluyente; cuando esto ocurre se da un valor de 12. Un puntaje por focos > 1 tiene una especificidad del 95% y una sensibilidad del 63% para el diagnóstico del SS (4). Por estudios longitudinales se sabe que el infiltrado inflamatorio progresa durante el transcurso de la enfermedad (5). Desde el punto de vista histopatológico, el principal diagnóstico diferencial de la SAF es la sialoadenitis crónica (SAC), la cual es definida como la presencia de un infiltrado inflamatorio disperso, en número menor a 50 células/4 mm² de tejido (1-3).

Si bien los mecanismos que conducen a la destrucción glandular y disminución de la producción salivar no son completamente conocidos, la participación de citoquinas, principalmente con perfil TH1, y autoanticuerpos, son importantes en la fisiopatología del SS primario (1, 6). Los linfocitos que infiltran las glándulas salivares de pacientes con SS tienen un bloqueo en la apoptosis, con aumento de los niveles de Bcl-2 (un protooncogen que inhibe la apoptosis), a pesar de expresar Fas (una proteína de membrana que induce apoptosis) (7).

La apoptosis, o muerte celular programada, es un evento homeostático involucrado en el desarrollo y renovación celular, así como en la defensa inmunológica, tanto contra agentes externos como internos. En la apoptosis, la célula se separa de las aledañas, comienza a perder su morfología típica, el citoplasma comienza a condensarse al igual que la cromatina, los distintos organelos se compactan, el ADN se fragmenta y, finalmente, la célula se desvanece mediante la generación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados sin generar una respuesta inflamatoria (8-10).

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso sintetizado a partir de la L-arginina por la familia de las óxido nítrico sintasas (NOS) (11). Es un poderoso e importante mediador fisiológico que participa en la relajación endotelial, la neurotransmisión, la inhibición de la agregación plaquetaria, la modulación del sistema inmune, la toxicidad microbiana y cancerígena, y la regulación de las funciones fisiológicas de la membrana muscular (12-14).

Estudios realizados en pacientes con enfermedades inflamatorias autoinmunes, o en modelos experimentales de éstas, han mostrado que el NO puede ser un mediador patológico (15-18). En 12 pacientes con SS primario, Kontinen y cols (17) observaron niveles superiores de nitritos (NO₂⁻), un producto estable de la oxidación del NO, en saliva comparado con controles. En las glándulas salivares reportaron la presencia de NOS inducible (NOS2) en célu-

las mononucleares y acinales, así como la localización simultánea de NOS2 y del factor de necrosis tumoral- α en células epiteliales de los canalículos. Estos resultados sugieren que el NO puede contribuir con el daño tisular y la atrofia acinar en el SS primario (17).

El NO también participa en la apoptosis, en donde se ha observado tiene un papel tanto inductor como protector. Este efecto, aparentemente contradictorio, depende de las condiciones de cada experimento, en particular del tipo de célula evaluada y de las concentraciones de NO (19-24). En el presente estudio evaluamos la relación entre el NO y la apoptosis tisular en pacientes con SS primario. Nuestros resultados sugieren que el NO podría participar en el bloqueo de la apoptosis linfocitaria característica de esta enfermedad.

Material y métodos

Pacientes

Los pacientes fueron seleccionados de la Unidad de Reumatología de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) en Medellín y de la Sección de Reumatología del Centro Médico Fundación Valle del Lili, en Cali. Todos los pacientes cumplieron al menos cuatro de los seis criterios de clasificación diagnóstica para el SS primario, incluyendo una biopsia positiva de GSM (puntaje por focos >1) (25).

Controles

Correspondieron a individuos sanos, sin evidencia de enfermedad crónica, apareados a los pacientes por edad y sexo. Fueron incluidos para el estudio de saliva y suero.

Muestras de saliva y suero

Las muestras fueron recolectadas en la mañana. La saliva total, de los pacientes y de los controles, fue recolectada bajo estímulo con parafina durante 15 minutos en tubos estériles Falcon de 15 ml. Cuando la muestra de saliva fue insuficiente por importante hiposialia (< 2 ml), se diluyó 1:10 en solución salina al 0.85%. Las muestras de saliva total fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue guardado a -70°C hasta su análisis.

Determinación de nitritos en suero y saliva

Los nitritos (NO₂⁻) fueron determinados utilizando el reactivo de Griess compuesto por sulfanilamida al 1% (w/v) en 5% de H₃PO₄ (v/v) y 0.1% de N-(1-naphthyl) etilenediamina HCl (w/v), en microplatos de 96 pozos de fondo plano. En resumen, a 50 μ l de la muestra se agregaron 50 μ l de cada una de las soluciones del reactivo de Griess, con incubaciones de ocho minutos para cada una, protegidas de la luz. La absorbancia de la reacción de color fue leída a 540 nm por espectrofotometría (LabSystems Multiskan MCCV340, Helsinki, Finlandia). Para la lectura de NO₂⁻ en suero se preparó una curva estándar de nitrito de sodio

(NaNO₂) en suero bovino fetal al 10%, con un rango de concentración de 0 a 100 uM para cada ensayo. La concentración de NO₂⁻ en todas las muestras fue determinada por triplicado. La lectura de NO₂ en saliva se realizó de la misma manera que en el suero pero, a diferencia de éste, la curva estándar de NaNO₂, se preparó en agua con un rango de concentración de 0 a 250 uM. El cálculo de la concentración de NO₂ fue realizado mediante el promedio de las absorbancias a través de la ecuación de la recta, generada a partir de un análisis de regresión lineal para cada ensayo.

Inmunohistoquímica

Muestras

Las biopsias de GSM fueron obtenidas de pacientes con SS primario (n=17), sialoadenitis crónica (n=4) e individuos con xerostomía en los que se practicó una biopsia de GSM y cuyo análisis no mostró alteraciones histológicas (n=5).

El análisis histológico de las biopsias de glándula salivar se realizó en cortes de 1-4 micras luego de haber fijado el tejido en formol neutro al 10%, procesado en parafina y coloreado con hematoxilina-eosina. El resultado fue considerado en favor del compromiso oral del SS cuando se observó una sialoadenitis focal con importante infiltrado linfoplasmocitario. Este infiltrado fue clasificado de acuerdo con el puntaje por focos (4). La confirmación del puntaje por focos fue realizada mediante análisis semiautomático, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Puntaje por focos} = \frac{\text{Número de focos inflamatorios} \times 4}{\text{Área de glándulas salivares (mm}^2\text{)}}$$

Anticuerpos

Anticuerpo policlonal de conejo anti-NOS2 (Affinity BioReagents, Golden, CO, E.U.), anticuerpo policlonal de conejo anticistatina-C humana (cortesía del Dr. Orlando Chaparro y Dra. Phyllis A. Shaw, Departamento de Biología Celular y Anatomía, Hospital Mount Sinai, Nueva York, E.U.), anticuerpo secundario de cabra biotinilado anti IgG de conejo (Chemicon, CA, E.U.), estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Kirkegard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MA, E.U.), kit sustrato Vector red (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.).

Inmunohistoquímica

Los cortes de las biopsias parafinadas fueron colocadas individualmente en láminas superfrost/plus (Fisher scientific, Pittsburgh, PA, E.U.) para disminuir el riesgo de desprendimiento, y desparafinadas mediante calentamiento a 57 °C durante 12 horas, para luego ser rehidratadas con etanol a concentraciones descendentes (100%, 90%, 70%) y agua, previo lavado con xilol. Luego, las láminas fueron permeabilizadas en Triton X-100 al 0,05% (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, E.U.). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con albúmina sérica bovina (Sigma) al

5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las secciones fueron incubadas con anti-NOS2 (1:300) durante una hora a temperatura ambiente. Previo lavado con PBS, se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado (1:200) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, y previo lavado con PBS, se adicionó la estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Previo a un último lavado con buffer Tris HCL durante cinco minutos, se reveló con la solución sustrato Vector red y levamisol al 0.01 M (como inhibidor de la fosfatasa alcalina endógena). Finalmente, las láminas fueron contrateñidas con hematoxilina-eosina (Sigma), deshidratadas en etanol a concentraciones ascendentes (70%, 90%, 100%), aclaradas con xilol absoluto y montadas con cyto seal (Stephens Scientific, Riverdale NJ, EU). Para cada muestra se preparó un control negativo en el que el anticuerpo primario anti-iNOS fue sustituido por PBS. El mismo procedimiento anterior se siguió para la cistatina-C, 1:300 para el anticuerpo primario, y 1:300 para el anticuerpo secundario biotinilado. El control negativo se generó reemplazando el anticuerpo primario anti-cistatina-C por PBS.

La lectura de las láminas se realizó en doble ciego por dos investigadores. Cuando existió disparidad entre ellos, una tercera lectura fue realizada. La expresión de NOS2 y cistatina-C fue cuantificada en porcentaje para cada tipo celular (célula epitelial, infiltrado inflamatorio, acinos). El porcentaje se determinó estableciendo cualitativamente la cantidad aproximada de células de la lámina que fueron positivas para NOS2 y cistatina-C. De este modo se estableció la siguiente asignación: + (<30%), ++ (entre el 30 y el 70%), +++ (>70%).

Determinación de la apoptosis tisular

La apoptosis en glándulas salivares fue determinada mediante mareaje de la fragmentación del ADN utilizando el kit "Fragment End Labeling" (FragEL) (Amersham, Londres, Inglaterra). En resumen, los cortes de tejido fueron desparafinados en xilol, rehidratados en alcoholes graduados y permeabilizados con proteinasa K [20 ug/ml en Tris 10mM (pH 8,0)] durante 15 minutos. Posteriormente, las peroxidasas endógenas se inactivaron con H₂O₂ al 3% en metanol durante cinco minutos. A continuación, las secciones fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 1,5 horas con la mezcla de reacción de mareaje, la cual contiene la enzima terminal dideoxynucleotidyl transferasa (TdT) y deoxynucleótidos marcados (dCTP) con biotina y sin marcar. Seguidamente se adicionó estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente, el ensayo fue revelado con diaminobenzidina, por un tiempo de 15 minutos, al término del cual la reacción fue detenida con H₂O_d. Finalmente las muestras fueron contrateñidas con verde de metilo, deshidratadas en lavados con alcohol ab-

soluto, clarificadas con xilol, y montadas con cytoseal (Stephens Scientific, Los Angeles, CA, E.U.). Los controles negativos fueron obtenidos reemplazando la enzima TdT en la mezcla de reacción de mareaje por H₂O_d. A parte de las láminas control suministradas por el proveedor, se usaron tejidos de cáncer neuroectodérmico.

El índice de apoptosis fue definido mediante la relación entre el número de acinos presentes en la lámina y el número de células apoptóticas presentes en el infiltrado inflamatorio.

Análisis estadístico

Las diferencias entre porcentajes se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher a dos colas. Las diferencias entre promedios se calcularon mediante la prueba de Mann-Whitney. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Resultados

Diecisiete mujeres con SS primario fueron incluidas en este estudio. La edad promedio fue 49.6 ± 1.5 años, con una duración de la enfermedad de 5.7 ± 0.6 años. Todas las pacientes presentaron xerostomía.

Niveles de nitritos

Los niveles de NO₂ - fueron significativamente mayores en saliva de pacientes con SSp que en controles sanos, mientras que en suero éstos fueron similares (Tabla 1).

Expresión de NOS₂ en glándula salivar

Se observó la presencia de NOS, en conductos salivares, acinos serosos e infiltrado inflamatorio. En los conductos salivares la expresión de la NOS, estuvo presente tanto en conductos intercalares como en conductos estriados. La expresión de NOS₂ en conductos se observó en pacientes con SS, SAC, y controles (Figura 1).

La presencia de NOS₂ se observó también en acinos, específicamente en las estructuras conocidas como semilunas de Von-Ebner presentes exclusivamente en sitios donde los acinos son mixtos, es decir donde se presentan conjuntamente acinos mucosos y serosos (Figura 2). La presencia de acinos serosos positivos para NOS₂ fue $< 30\%$ en las GSM de los tres grupos examinados.

En el infiltrado inflamatorio la expresión de NOS₂ fue mayor en pacientes con SS primario que con SAC (94% vs 7%); este infiltrado correspondía principalmente a linfocitos (Figura 2). Se observó NOS₂ en algunos fibroblastos en los

tres grupos estudiados y, ocasionalmente, en células mioepiteliales.

En GSM de pacientes con SS primario, la expresión de NOS₂, tanto en conductos e infiltrado inflamatorio, fue mayor en las GSM con focos inflamatorios < 4 (Tabla 2).

Apoptosis tisular

Se observó apoptosis de células epiteliales canaliculares en los tres grupos evaluados, sin diferencias significativas entre ellos. En el infiltrado inflamatorio de pacientes con SS primario, las GSM con menor número de células mononucleares apoptóticas/acino glandular, correspondieron a aquellas con mayor expresión de NOS₂ (Tabla 3 y Figura 3). No observamos asociación entre apoptosis linfocitaria y el puntaje por focos.

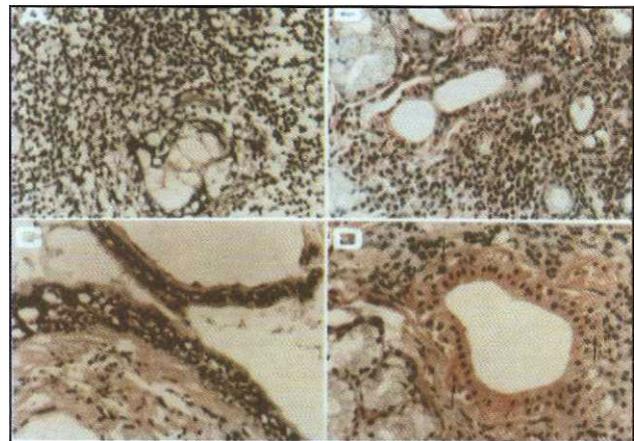


Figura 1. Inmunohistoquímica para NOS₂ en glándulas salivares menores (GSM). A. Control negativo. Infiltrado linfocitaria alrededor de acino glandular en GSM de paciente con SS primario (x10). B. Expresión de NOS₂ en GSM de paciente con SS primario en canaliculos (flechas delgadas, a la izquierda), y en plasmocitos del infiltrado inflamatorio (flecha ancha, en el centro) (x10). C. Expresión de NOS₂ en canaliculo secretor de GSM de sialoadenitis crónica (x40). D. Expresión de NOS₂ en conducto estriado de GSM en SS primario, con cambios de exocitosis (permeabilización de linfocitos en área de células epiteliales -flechas-). A la izquierda se observan algunos acinos glandulares mucosos de apariencia normal (x40).

Tabla 2. Expresión de NOS₂ en el infiltrado inflamatorio de glándulas salivares de pacientes con síndrome de Sjögren.

	Puntaje por focos < 4 N=9	Puntaje por focos > 4.1 N=6
NOS ₂ $> 30\%$	7 (77.7%)	1 (16.6%)
OR= 17.5; 95%CI 1.2-250, p=0.04*		
* por la prueba exacta de Fisher		

Tabla 3. Relación entre la expresión de NOS₂ y la apoptosis linfocitaria en glándula salivar de pacientes con síndrome de Sjögren.

	NOS ₂ $< 30\%$ N=8	NOS ₂ $> 30\%$ N=8	p ²
Índice de apoptosis linfocitaria ¹	1.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.02
1. Número de células apoptóticas en infiltrado linfocitario / acinos glandulares en la lámina. 2. Por la prueba de Mann-Whitney.			

Tabla 1. Niveles de nitritos en saliva y suero de pacientes con síndrome de Sjögren primario e individuos sanos controles

Muestra	Pacientes N=17	Controles N=17	p*
Saliva, uM	71.7 \pm 20.6	19.5 \pm 3.7	0.02
Suero, uM	22 \pm 3	17 \pm 1.4	NS
* por la prueba de Mann-Whitney			

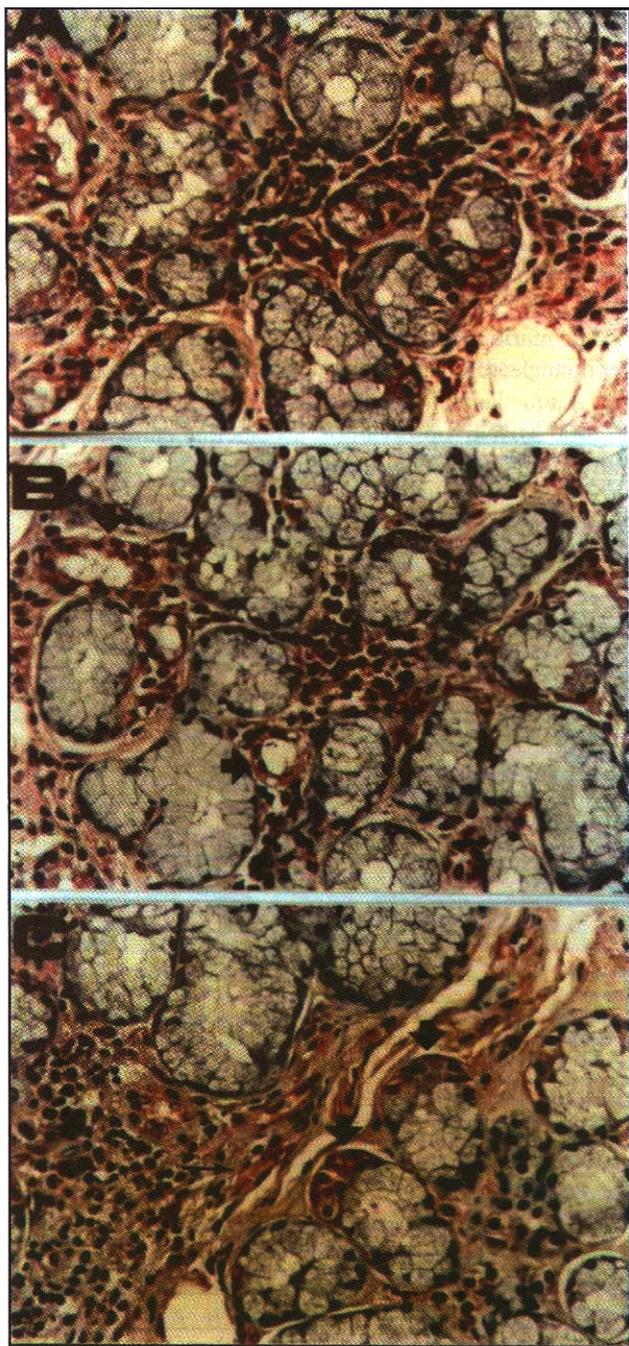


Figura 2. Inmunohistoquímica para NOS2 en GSM de pacientes con SS primario. **A.** Expresión de NOS2 en infiltrado mononuclear que rodea acinos de característica normal (x40). **B.** Se resalta la expresión de NOS2 en conductos intercalares (flechas). En el centro, se observa un acúmulo de plasmocitos que expresan NOS2 (x40). **C.** Expresión de NOS2 en las medialunas de Von-Ebner de acinos mixtos (flechas anchas). También se observa la expresión de NOS2 en algunos fibroblastos (flecha delgada) (x40).

Cistatina C

La expresión de cistatina-C, un inhibidor de las proteasas tipo cistinas, fue observada en los tres grupos estudiados, principalmente en células epiteliales canaliculares, en algunos plasmocitos y células acinares de pacientes con SS primario. No se observó asociación entre la expresión de cistatina-C y la apoptosis tisular.

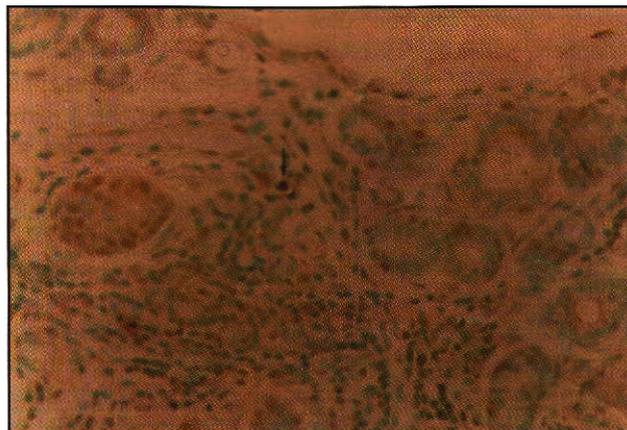


Figura 3. Apoptosis en GSM de paciente con SS primario. Marcaje de la fragmentación del DNA en célula apoptótica (núcleo picnótico), que parece corresponder a un plasmocito (flecha) (x40).

Discusión

El presente estudio confirma el aumento de la síntesis de NO en el SS primario, en donde es producido localmente, en el sitio inflamatorio, por células epiteliales canaliculares, acinares y linfocitos. Además, nuestros resultados sugieren la participación del NO en el bloqueo de la apoptosis linfocitaria característica de la enfermedad.

En condiciones fisiológicas, el NO en las glándulas salivares puede contribuir a la regulación vascular, al flujo salivar, y a la liberación de neuropéptidos (17). En el SS primario, dados los efectos neurotóxicos que presenta, al NO puede ser responsable de la pérdida de la inervación glandular (17). Además, la participación del NO en el bloqueo de la apoptosis linfocitaria facilitaría la perpetuación de la citotoxicidad. Por lo tanto, el NO es uno de los factores responsables de la hiposaliva observada en esta enfermedad. La participación de NO fue mucho más evidente en las fases tempranas de la enfermedad (puntaje por focos <4). No obstante, no existe una estrecha correlación entre el grado del infiltrado inflamatorio y la producción de saliva (1). Por lo tanto, otros factores (citoquinas, autoanticuerpos), producidos localmente en distintas etapas de la enfermedad, intervienen también en la hiposaliva.

La NOS existe como tres isoformas que son la endotelial (eNOS o NOS₁), la neuronal (nNOS o NOS₃), y la inducible (iNOS o NOS₂) (11-14), aunque también se ha descrito la muscular (nNOSu), derivada de la NOS₃ (13). La NOS₁ y la NOS₃ son expresadas constitutivamente y producen niveles bajos de NO (12-14). La NOS₂, a diferencia de las constitutivas, es expresada bajo estímulos muy regulados en los que intervienen citoquinas, principalmente TH1, que permiten una catálisis sostenida y una mayor producción de NO (12-15).

El papel del NO en enfermedades inflamatorias está dado por su reactividad como radical libre, que lo hace inestable, favoreciendo su reacción con otros agentes químicos oxidantes, tales como el anión superóxido O₂⁻ que lo transforma en peroxinitrito, un poderoso agente oxidante

(13). El NO tiene la capacidad de nitrosilar proteínas que contienen tioles, actuar sobre agrupamientos Fe-S, y hemoproteínas (13, 14, 16). Las consecuencias de estas acciones son el bloqueo enzimático y un estado de agotamiento energético celular.

La apoptosis se lleva a cabo fundamentalmente a través de la acción de proteasas específicas del tipo cisterna (10, 26), conocidas como caspasas, que actúan sobre un ácido aspártico (Asp), ubicado dentro un motivo consenso de cuatro aminoácidos (S4-S3-S2-S1, S1=Asp) (10). El NO, tal como ha sido mencionado, puede reaccionar con proteínas que contienen grupos hemo, agrupamientos de Fe-S y tioles; además, puede interrumpir la fosforilación oxidativa y la glicólisis, provocando la inhibición de DNA sintetasas y enzimas mitocondriales (13, 14). En relación con los resultados de este estudio, previamente ha sido señalado que el NO puede inhibir la apoptosis linfocitaria mediante la prevención de la disminución de la expresión de Bcl-2 (23), y mediante la inhibición de la acción de Fas (21). El NO inhibe la caspasa 8 (iniciadora de apoptosis) y la caspasa 3 (efectora de la apoptosis), mediante la S-nitrosilación de los residuos de cisterna, indispensables para la actividad enzimática (21, 26, 27). Estudios futuros que evalúen la activación de caspasas en GSM y su relación con el NO en el SS primario son necesarios para confirmar nuestros resultados.

Finalmente, este estudio sugiere que la cistatina-C, un inhibidor de las proteasas tipo cisternas y producido fisiológicamente en glándulas salivares (28), no participa en la regulación de la apoptosis linfocitaria del SS primario. Similares resultados fueron observados en glándulas salivares de ratones diabéticos no-obesos, que representan un modelo murino del SS (29). No obstante, no se descarta que otras cistatinas sean indispensables en este proceso.

Summary

Objective. To examine the role of nitric oxide (NO) in primary Sjögren's syndrome (pSS), and its relation to tissue apoptosis in minor salivary glands (MSG)

Methods. MSG corresponded to focal sialoadenitis (characteristic of pSS), chronic sialoadenitis (CSA) and to histologically normal MSG. The progress of pSS was evaluated measuring the focus score in MSG (by Daniels' method). Nitrite (NO₂⁻), a stable end-product of NO oxidation, was measured in serum and saliva using the Griess reagent. The expression of nitric oxide synthase type 2 (NOS2) and of cistatin C (Cis-C), a physiologic protease inhibitor, was examined on MSG by immunohistochemical techniques, and measured semi-quantitatively. Cellular apoptosis was evaluated by determining the fragmentation of DNA through the incorporation of marked nucleotides (Tunel method).

Results. Levels of NO₂⁻ in saliva were greater in patients with pSS (n=17) than in healthy controls (n=17) (71.7 ± 20.6 vs 19.5 ± 3.7 uM, p=0.02) whereas in serum they were

similar (22.3 ± 3.8 vs 17 ± 1.4 uM). NOS2 expression in inflammatory cells was higher in pSS MSG than in CSA MSGs (n=4) (94% vs. 7%). NOS2 was also present in ductal epithelial cells, acinar cells, and fibroblasts from patients (pSS and CSA) and in normal controls (n=5). NOS2 was found in significantly higher percentage in both ductal epithelial cells and inflammatory cells in SS patients with focus scores <4 (78% vs. 17%, p=0.04) and with a lower number of apoptotic cells in the inflammatory infiltrate (0.6 ± 0.2 vs. 1.66 ± 0.3, p=0.02). The expression of Cis-C was observed in the three groups studied, mainly in canalicular epithelial cells, some plasmocytes and acinar cells from patients with pSS. No association was observed between the expression of Cis-C and apoptosis.

Conclusion: This study shows the increase in the synthesis of NO in pSS, produced locally at the inflammatory site, predominantly in the early stages of the disease, and suggests its participation in the lymphocytic blocked apoptosis, which is not regulated by Cis-C. The mechanism of this apoptotic blockade could well be associated to the S-nitrosilation of caspases.

Key words: Nitric oxide, Sjögren syndrom, lymphocitic apoptosis.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Colciencias (2213-04-350-96), la Fundación Síndrome de Sjögren de Colombia y la empresa privada.

Referencias

1. Anaya JM, Talal N. Sjögren's syndrome and connective tissue diseases associated with other immunologic disorders. In: Koopman W. ed. Arthritis and Allied Conditions. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997: 1561-1580.
2. Greenspan JS, Path.MCR, Daniels TE, et al. The histopathology of Sjögren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; **37**: 217-229.
3. Daniels T, Whitcher J. Association of patterns of labial salivary gland inflammation with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 869-877.
4. Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S, et al. The European community study group on diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; **53**: 637-647.
5. Leroy JP, Pennec YL, Soulier C, et al. Follow up study of labial salivary gland lesions in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1992; **51**: 777-780.
6. Fox RI, Kang HI, Ando D, et al. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994; **152**: 5332-5339.
7. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, et al. Fas and Fas ligand expression of salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 87-97.
8. Wyllie A. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; **57**: 451-465.
9. Anderson P. Kinase cascade regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**: 33-46.
10. Thornberry N. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998; **5**: R97-R103
11. Marletta M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; **28**: 927-930.
12. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; **100**: 2417-2423.
13. Christopherson K, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2424-2429.
14. Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 1996; **55**: 7-20.
15. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2357-2363

16. **Stamler J.** Redox Signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; **78**: 931-936
17. **Konttinen YT, Platts LAM, Tuominen S, et al.** Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 875-883.
18. **Clancy RM, Amin AR, Abramson SB.** The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 1141-1151.
19. **Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, et al.** Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 1810-1816.
20. **Wang JS, Tseng HH, Shin DF, et al.** Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. *Nephron* 1997; **77**: 404-411.
21. **Mannick J, Qian Miao X, Stamler J.** Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; **272**: 24125-24128.
22. **Kim YM, Talanian RV, Billiar TR.** Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31138-31148.
23. **Zhao H, Dugas N, Mathiot C, et al.** B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displacing anti-apoptotic activity. *Blood* 1998; **92**: 1031-1043.
24. **Chlichlia K, Peter M, Rocha M, et al.** Caspase activation is required for nitric oxide-mediated, CD95 (APO-1/Fas) dependent and independent apoptosis in human neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1998; **91**: 4311-4320.
25. **Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al.** Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European community. *Arthritis Rheum* 1993; **36**: 340-347.
26. **Green D and Kroemer G.** The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 267-271
27. **Dimmeler S, Haendeler J, Sause A, Zeiher A.** Nitric oxide inhibits APO-1/Fas-mediated cell death. *Cell Growth Dif* 1998; **9**: 415-422
28. **Chaparro O, Williams G, Shaw P.** Regulation of cystatin S gene by steroid hormones and beta-adrenoreceptor agonists in rat submandibular glands. *Endocrine* 1994; **2**: 841-848
29. **Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, et al.** Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese (NOD) mouse for Sjögren syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5767-5771.