

11227

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA 17
DE MEXICO *2ej*



FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Postgrado
Instituto Nacional de la Nutrición
"Salvador Zubirán"

ALTERACIONES EN LA INMUNIDAD CELULAR EN EL
LIQUIDO CEFALORAQUIDEO DE PACIENTES CON LU-
PUS ERITEMATOSO GENERALIZADO Y COMPROMISO
DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

T E S I S

Que para obtener el Titulo en la Especialidad de
MEDICINA INTERNA
p r e s e n t a

DRA. DEBORAH DION ALEMAN-HOEY



México, D. F.

Deborah Dion Aleman-Hoey
R. D. M.

Febrero, 1990

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCION

Se han llevado a cabo un sinnúmero de estudios que intentan dilucidar la patogenia del compromiso del sistema nervioso central (SNC) en el lupus eritematoso generalizado (LEG). Todos ellos se han enfocado en los posibles mecanismos inmunes de tipo humoral que pudiesen explicar la inmunopatogénesis de este ecléctico grupo de signos y síntomas. Entre estos destacan, la detección inconsistente de anticuerpos anti-nucleares (1,2), niveles bajos de fracciones del complemento (3,4), concentraciones elevadas de inmunoglobulinas (5) y la presencia de anticuerpos específicos anti-neuronales (6-11) y anti-asialo GM1 (12) en el compartimiento del líquido cefalo-raquídeo (LCR).

La vasculitis ha sido prácticamente excluida como mecanismo fisiopatogénico del compromiso del SNC aunque histológicamente, puede observarse daño a nivel de la microvasculatura cerebral (13,14). Tradicionalmente, toda manifestación neuro-psiquiátrica se había atribuido a vasculitis cerebral pero el hallazgo es por demás inconsistente.

En la actualidad, se ha sugerido que el daño principal es a nivel del plexo coroides y se traduce por el de-

pósito de complejos inmunes en el mismo; estos depósitos, a su vez, favorecen un aumento en la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (15,16,17,18). De ahí la detección de anticuerpos anti-neuronales y anticuerpos anti-asialo GM1 en el LCR. Como es patente, todos estos estudios abarcan el campo de la inmunología humoral.

Dada la mínima celularidad del LCR, no se han llevado a cabo estudios que se enfoquen hacia los mecanismos inmunes celulares como posibles mediadores del daño en SNC.

En este trabajo, intentamos caracterizar las subpoblaciones de linfocitos T en el LCR y su estado de activación celular, así como determinar que papel juegan dos citocinas, interleucina-1 e interleucina-2 en la inmunopatogénesis del daño en SNC. Así mismo, caracterizamos las sub-poblaciones de linfocitos T en el LCR y su estado de activación celular.

Nuestros resultados no sólo tienen importantes repercusiones desde el punto de vista de la inmunología básica, sino que en un futuro, podrían permitir la diferenciación entre la psicosis de origen lúpico per se, de aquella secundaria a la administración de dosis altas de esteroides.

MATERIAL Y METODOS

Estudiamos prolectivamente a 12 pacientes femeninas con el diagnóstico establecido de LEG de acuerdo con los criterios modificados de la ARA (19). Todas se encontraban con actividad del SNC al momento en que se realizó el estudio. El trabajo se condujo de junio de 1987 a febrero de 1988. Las manifestaciones neurológicas se encuentran detalladas en la tabla 1 y fueron por demás variadas. La edad promedio fué de 26.9 años (rango: 15-62 años). El tiempo de evolución promedio del LEG fué de 44.7 meses (rango: 4-120 meses).

Como control, se estudió el LCR de 8 pacientes, masculinos y femeninos, sometidos a bloqueo sub-aracnoideo para cirugías menores tales como histerectomía trans-vaginal, resección prostática trans-uretral o reducción de hernia inguinal. Ninguno de ellos cursaba con datos clínicos sugerentes de padecimientos neurológicos o autoinmunes concomitantes.

Se obtuvieron muestras de 5 a 8 cc. de LCR tanto de los pacientes como de los controles y se congelaron a -70°C hasta que se elaboraron los ensayos. Las muestras

Tabla 1.

**Manifestaciones neurológicas en
12 pacientes con LEG.**

Crisis convulsiva:	6
Signos piramidales:	5
Paresia o parálisis de N. craneanos	3
Cefalea:	2
Hidrocefalia normotensa	1
Alteraciones del comportamiento:	5
Afasia:	4
Hemiparesia corporal:	2
Temblor:	1
Infarto cerebral:	1

también fueron procesadas para contenido de glucosa y proteínas. Por motivos éticos, no nos fué posible obtener muestras de LCR de pacientes con LEG sin compromiso del SNC.

Ensayo de actividad de IL-1.

La actividad de IL-1 se detectó por un método indirecto con células LBRM-33.1A.5 como se ha descrito con anterioridad (20). En respuesta a la presencia de IL-1, las células LBRM-33.1A.5 producen IL-2. En breve, 1×10^5 células se incubaron con un mismo volumen de LCR y fitohe-maglutinina a concentraciones sub-óptimas durante 24 horas. Se cosecharon los sobrenadantes y se determinaron los niveles de IL-2 como se describe a continuación.

Ensayo de actividad de IL-2.

Las muestras de LCR fueron procesadas con células CTLL (21) para determinar la presencia o ausencia de IL-2. 5×10^4 células CTLL se incubaron durante 24 horas con los diferentes sobrenadantes obtenidos del ensayo con las células LBRM-33.1A.5.

Durante las últimas 8 horas de este cultivo a cada pozo se agregó 0.5 μ Ci de 3HTdR y la cosecha medida de la incorporación de timidina tritiada se llevó a cabo como

ha sido descrito anteriormente (22).

Tinción inmunofluorescente de células de LCR.

Las células del LCR tanto de pacientes con LEG como de controles se obtuvieron por centrifugación de la muestra (1200 RPM durante 10 minutos). Se resuspendió el botón celular en 0.5 ul de RPMI (medio de cultivo del Royal Park Memorial Institute) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SRF), estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y L-glutamina 2 mMol. Las células se colocaron en microlaminillas, fueron secadas al aire, fijadas en acetona durante 10 minutos y lavadas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se agregaron 50 µl del anticuerpo monoclonal (anti-CD4, anti-CD8, anti-TAC, anti-receptor de transferrina, anti-antígeno T10 y anti-antígeno VLA-1) (Cia. Ortho Chemical). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C.

Las laminillas se lavaron dos veces en PBS y se les agregó 50 µl FITC-IgG anti-ratón permitiendo que la reacción se llevara a cabo durante 30 minutos. Después de tres lavados finales, las laminillas se montaron y fueron observadas con microscopio de fluorescencia. Por lo menos se contaron 50 células por laminilla.

Análisis estadístico.

Se llevó a cabo el análisis estadístico con *t* de Student para muestras pareadas.

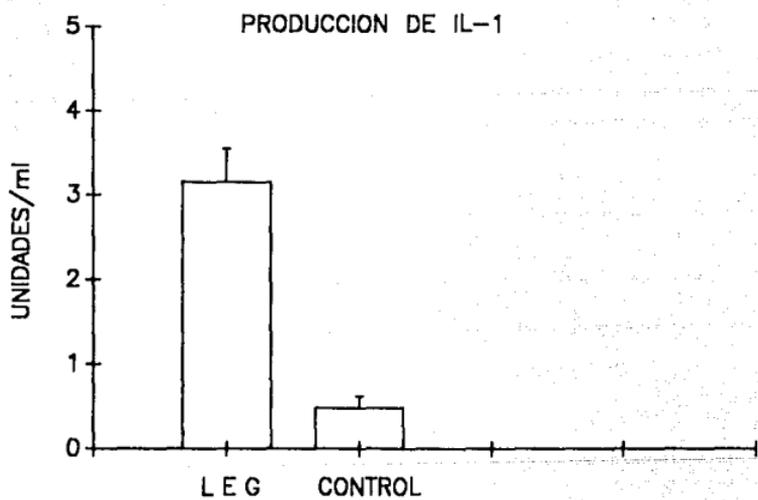
RESULTADOS

Concentraciones de IL-1 e IL-2 en LCR de pacientes con LEG y manifestaciones neurológicas versus LCR de controles.

Como se muestra en la figura 1, la actividad de IL-1 en el LCR de pacientes con LEG y compromiso de SNC fué significativamente mayor que en los controles. La concentración de IL-1 en LCR de pacientes con LEG fué en promedio de 3.15 ± 0.4 unidades/ μ l, mientras que en los controles, fué de 0.5 ± 0.14 unidades/ μ l ($p < 0.01$). El amplio rango en las concentraciones de IL-1 detectadas no se correlacionó con alguna manifestación neurológica en particular. Los niveles de glucosa y de proteínas fueron normales en ambos grupos. No hubo evidencia de actividad de IL-2 ni en las pacientes con LEG, ni en los controles (figura 2).

Sub-poblaciones de células T.

La cuenta linfocitaria total en LCR fué de 25.4 ± 5

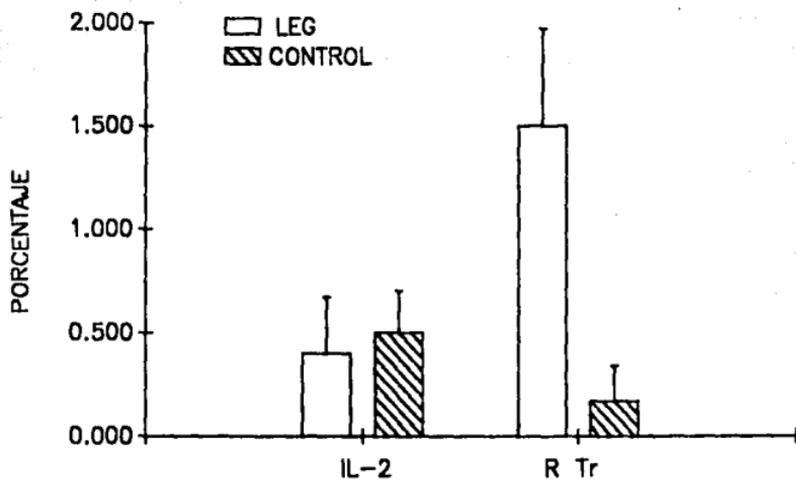


células/mm³ en pacientes con LEG y de 3.6 ± 0.6 células/mm³ en los controles. Se detectaron las sub-poblaciones CD4 y CD8 de linfocitos T por tinción de inmunofluorescencia como se muestra en la tabla 2. Las células CD4 positivas en LEG fueron de 13.9 ± 1.8 células/mm³ versus 4.3 ± 0.5 células/mm³ en controles. Las células CD8 positivas en LEG fueron de 22.5 ± 7 células/mm³ versus 4.4 ± 2.1 células/mm³ en controles. Esta relación, favoreciendo un aumento en la sub-población celular T CD-8 positivas (supresoras) es de llamar la atención, ya que es comparable a la clásica relación inversa de las sub-poblaciones CD4-CD8 característicamente detectada en la sangre periférica de los pacientes con LEG.

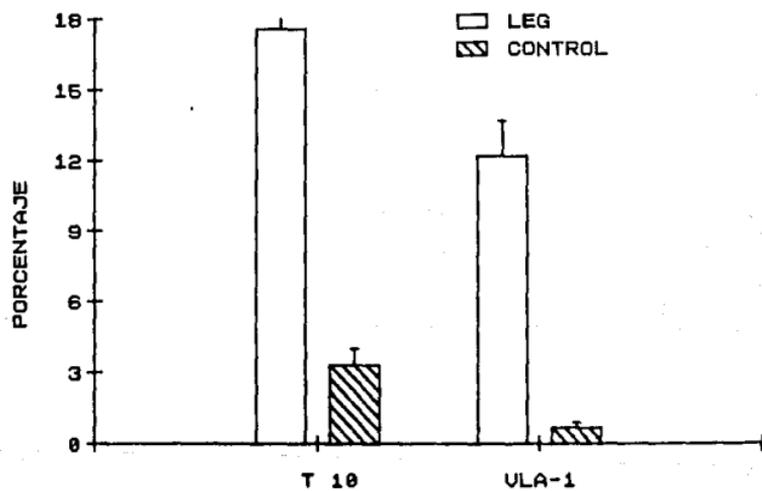
Activación de células T en LCR.

Como se observa en las figuras 2 y 3, detectamos un mayor porcentaje de células reactivas con el antígeno de activación T10 en el LCR de pacientes con LEG, $17.6 \pm 2.0\%$ versus $3.3 \pm 0.7\%$ en el LCR de los controles. El porcentaje de células reactivas con el marcador antigénico tardío VLA-1 también se encontró elevado en el LCR de pacientes con LEG, $12.0 \pm 1.5\%$ versus $0.7 \pm 0.2\%$ en controles. Ambos resultados fueron estadísticamente significativos

ANTIGENOS DE ACTIVACION TEMPRANA



ANTIGENOS DE ACTIVACION INTERMEDIA Y TARDIA



con $p < 0.01$. Sin embargo, la reactividad con marcadores antigénicos tempranos (anti-TAC y anti-TrR) fué baja y no se detectó diferencia entre las muestras de pacientes con LEG y los controles.

DISCUSION

Durante cerca de 25 años, se asumió que las manifestaciones inmunológicas en el LEG eran secundarias a vasculopatía de tipo inflamatorio. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, ante la evidencia histopatológica de que este hallazgo es por demás infrecuente, la investigación se reorientó hacia la dilucidación de mecanismos inmunopatogénicos de tipo humoral, como la presencia de anticuerpos antineuronales (6,7,8,9,10,11).

Son tan variadas las manifestaciones neurológicas en el LEG, abarcando desde la sintomatología psiquiátrica, la neuropatía de pares craneanos o de nervios periféricos e incluso la mielopatía, que es probable que estén coaccionando diversos mecanismos inmunopatogénicos y no sea posible dilucidar un solo mecanismo de daño inmune.

En la actualidad, su estudio se ha dirigido hacia la

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

presencia de autoanticuerpos neuronales con reactividad cruzada con linfocitos periféricos (10,11), hacia el depósito de complejos inmunes en el plexo coroides (15-18) y hacia la presencia de anticuerpos anti-proteína P ribosómica (23). Estos resultados son, sin embargo, controvertidos.

Este trabajo intenta determinar cual es el posible papel que juega la respuesta inmune de tipo celular en la inmunopatogenia del compromiso del SNC. Hemos detectado la presencia de niveles elevados de IL-1 en LCR de pacientes con LEG al compararse con sujetos controles.

La IL-1 es una citocina producida por macrófagos y monocitos en respuesta a cualquier proceso inflamatorio agudo o crónico. También es producida por las células equivalentes en SNC, los astrocitos y la microglia y puede ser liberada espontáneamente ante la presencia de daño a dichas células. Es un polipéptido con peso molecular de 17000 daltons que promueve la diferenciación linfocitaria y favorece la producción de IL-2, factor estimulador de colonias, factor de crecimiento de células B, interferon gamma y factores quimotácticos derivados de los linfocitos (24).

Es posible que el aumento en IL-1 en LCR de pacientes con LEG y compromiso del SNC traduzca la presencia de un proceso inflamatorio localizado al encéfalo en el cual, tanto los astrocitos como la microglia, aumentan su producción de la citocina. Esta a su vez, llegaría al compartimiento del LCR en forma secundaria a alteraciones en la barrera hemato-encefálica o en forma secundaria a alteraciones inducidas en el plexo coroides por el depósito de complejos inmunes en el mismo.

Por otra parte, no se observaron diferencias en la concentración de IL-2 entre los LCR de pacientes con LEG y controles. La IL-2 es una citocina producida principalmente por la subpoblación celular CD4 (25). Esto implica que el proceso inflamatorio del SNC no involucra directamente a las células T cooperadoras sino que efectivamente, las repercusiones inmunológicas son a nivel de las células productoras de IL-1 (astrocitos, microglia).

El LEG es una enfermedad crónica autoinmune en la cual la evidencia ha sostenido un papel pivote de las células T. Algunas observaciones previas han permitido concluir que dichas células se activan por mecanismos aún poco claros (i.e. autoantígenos presentados por células

accesorias con el HLA apropiado, epítopes con reacción cruzada con agentes infecciosos aún no identificados, pérdida de los mecanismos de supresión periférica, etc.) (26).

Recientemente, se han identificado varias glicoproteínas en la superficie de las células T activadas. El significado de la mayoría de estas moléculas es poco claro pero se sabe que son parte de un sistema de regulación muy fino y complejo que se inicia cuando la célula T ha sido estimulada con antígeno o mitógeno: dos horas después de la estimulación, la célula T se activa definitivamente y un sistema de genes activados secuencialmente permite la expresión en 4 horas a 14 días, de diversas moléculas con cinéticas diferentes (27).

La activación celular linfocitaria normal se caracteriza por la aparición de diversos marcadores antigénicos en la superficie celular de activación. Los más tempranos en aparecer son los receptores de IL-2 y de transferrina que se presentan de 24-48 horas después del estímulo de activación celular. Nuestros resultados no mostraron activación temprana ni en los casos, ni en los controles. Posteriormente, alrededor de los 5 días post-estimulación,

el linfocito presenta marcadores antigénicos T10 y para el día 8-10 presenta el antígeno VLA-1 (very late antigen-1).

El antígeno T10 fué inicialmente descrito como una glicoproteína de superficie de la célula tímica humana. Se ha encontrado en tumores tímicos así como en células T mitógeno-activadas, 24 horas después de la estimulación. Se desconoce cual es su función. Se ha utilizado principalmente como marcador de la leucemia de células T y nunca se observa en células T en reposo (28). La significancia de nuestros hallazgos no es clara: probablemente solo podemos interpretar el hallazgo de células T T10 positivas en el LCR de pacientes con LEG activo como evidencia de activación de células T *in vivo*. Por otra parte, es tentador el especular que en vista de que T10 es un marcador de células en médula ósea y timocitos, las células periféricas pudiesen ser células que han escapado al procedimiento de selección negativa y de deleción clonal y son por lo tanto, susceptibles a ser activadas por autoantígenos.

Normalmente, la molécula T10 se pierde cuando los timocitos se transforman en células T maduras (28). Esto

pudiese no ocurrir en células T en LEG.

Simplemente T10 podría no ser el marcador de estas células que se "escaparon", sino solo un antígeno de activación celular T.

Dado que se desconoce el mecanismo fisiopatológico se han postulado diversas teorías. Una de ella implica una etiología infecciosa, de tipo viral. Ya que los linfocitos de pacientes con LEG y compromiso del SNC exhibieron marcadores antigénicos de activación T10 y VLA-1 podría considerarse la posibilidad de que por un efecto viral directo, o sobre la inmunorregulación genética mediada por proto-oncogenes de estirpe por determinar, podría modificarse el ciclo celular T permitiendo la expresión de estos marcadores.

PIES DE FIGURA

- Figura 1. Producción de IL-1: Se observa la concentración de IL-1 tanto en LEG como en controles (Promedio + EE).
- Figura 2. Antígenos de activación temprana: Porcentaje de expresión de receptores de IL-2 y de transferrina en LEG y controles (Porcentaje + EE).
- Figura 3. Antígenos de activación tardía. Porcentaje de expresión de marcadores T10 y VLA-1 en LEG y controles (Porcentaje + EE).

1. Keefe EB: Lupus meningitis. Antibody to deoxyribonucleic acid (DNA) and DNA: anti-DNA complexes in cerebrospinal fluid. *Ann Int Med.* Vol. 80 N° 1, p. 58, 1974.
2. Harbeck RJ: DNA antibodies and DNA: Anti-DNA complexes in cerebrospinal fluid of patients with SLE. *Arthr Rheum.* Vol. 16 N° 4, p. 552, 1973.
3. Pete LD: Serum and cerebral spinal fluid complement and serum autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Medicine* Vol. 50, N° 4, p. 259, 1971.
4. Hadler NM: The fourth component of complement in the cerebrospinal fluid in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum.* Vol. 16, N° 4, p. 507, 1973.
5. Adelman DC: The neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: an overview. *Sem Arthr Rheum.* Vol. 15, N° 3, p. 185, 1986.
6. Bluestein HG: Heterogeneous neurocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* Vol. 35, p. 210, 1979.
7. Bluestein HG: Neurocytotoxic antibodies in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci.* Vol. 75, N° 8, p. 3965, 1978.

8. Bresnihan B: An antineuronal antibody cross-reacting with erythrocytes and lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum.* Vol. 22, N° 4, p. 313, 1979.
9. Winfield JR: Serologic studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. *Arthr Rheum.* Vol. 21 N° 3, p. 289, 1978.
10. Bresnihan B: Brain reactivity of lymphocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus with and without cerebral involvement. *Clin Exp Immunol* Vol. 30, p. 333, 1977.
11. Bluestein HG: Brain-reactive lymphocytotoxic antibodies in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* Vol. 57 p. 509, 1976.
12. Hirano T: Antiglycolipid autoantibody detected in the sera from systemic lupus erythematosus patients. *J Clin Invest.* Vol. 66 p. 1437, 1980.
13. Ellis SG: Central nervous involvement in systemic lupus erythematosus: A review of neuropathologic findings in 57 cases. *Semin Arthr Rheum.* Vol. 8, N° 3, p. 212, 1979.

14. Bluestein HG: Immunopathogenesis of the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. Semin Immuno Pathol. Vol. 9, p. 237, 1986.
15. Harbeck RJ: Cerebrospinal fluid and the choroid plexus during acute immune complex disease. Clin Immunol Immunopathol. Vol. 13, p. 413, 1979.
16. Atkins CJ: The choroid plexus in systemic lupus erythematosus. Ann Inter Med. Vol. 76, N° 1, p. 65, 1972.
17. Rawle M: The choroid plexus: Immunologic injury and disease. Ann Int Med. Vol. 81, N° 1, p. 111, 1974.
18. Peress N: Binding sites for immune components in human choroid plexus. Arthr Rheum. Vol. 24 N° 3, p. 520, 1981.
19. Eng M: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthr Rheum. Vol. 25 N°1, p. 1271, 1982.
20. Linker-Israeli M, Bakke AC, Kifridou RC, et al: Defective production of interleukin-1 and interleukin-2 in patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol. Vol. 130, p. 2551, 1983.

21. Watson J: Continuous proliferation of murine antigen-specific helper T lymphocytes in culture. *J Exp Med* Vol. 150, p. 1510, 1979.
22. Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D: Decreased production of and response to interleukin-2 by cultivated lymphocytes from patients with SLE. *J Clin Invest.* Vol. 69, p. 1388, 1982.
23. Golombek SJ: Autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with systemic lupus erythematosus. *Arth Rheum.* Vol. 29, Nº 9, p. 1090, 1986.
24. Stites DP: *Basic and Clinical Immunology.* p. 84, Appleton Large ed., 1987.
25. Stites DP: *Basic and Clinical Immunology.* p. 87, Appleton Large ed., 1987.
26. Tsokos GC, Balow JE: Cellular immune responses in systemic lupus erythematosus. *Prog Allergy.* Vol. 35, p. 93, 1984.
27. Crabtree GR: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* Vol. 243, p. 355, 1989.
28. Terhorst C: Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9 and T10. *Cell* Vol. 23, p. 771, 1981.