

11262  
10



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRIA CENTRO MEDICO NACIONAL S. XXI  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN INMUNOLOGIA  
Laboratorio de Auto - Inmunidad

**RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL *IN VITRO* A  
PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Salmonella*  
*typhimurium* EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO  
SISTEMICO INACTIVO**

TESIS DE POSTGRADO  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS  
PRESENTA:

**HERNANDO, CERVERA CASTILLO**



IMSS

México, D. F. 2003

TESIS COMPLETA  
FALLA DE CALIFICACION

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Inmunología, Laboratorio de Auto-Inmunidad del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S. XXI, con pacientes de la Consulta Externa del Servicio de Reumatología del Hospital General Regional No. 25 del IMSS, bajo la dirección del Dr. Francisco Antonio Blanco Favela.

TESIS CON  
FALLA DE CIRCUN

B

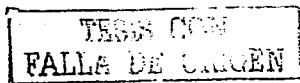
**Agradecimientos:**

**A mis hijas, Verónica y Carolina, por que son el motivo que dan sentido a mi vida.**

**A mi esposa, Verónica, por que sin su apoyo no hubiera podido finalizar esta etapa de mi vida profesional.**

**A Natalia, Sylvia, Alejandra y Ana, mujeres de mi familia, quienes siempre han estado a mi lado, cuando mas las necesito.**

**A mi maestro y asesor, Dr. Francisco Antonio Blanco Favela, por su ejemplaridad y apoyo, que me han permitido alcanzar esta meta académica.**



**“Cuanto más sólido, bien definido y espléndido es el edificio erigido por el entendimiento, más imperioso es el deseo de la vida por escapar de él hacia la libertad”.**

**“Las ciencias después de todo, son nuestra propia creación, incluidos los severos estándares que parecen imponernos”**

**Paul K. Feyerabend**

TESIS  
FALLA DE CALLEN

D

**Lost in Myself**

**Sometimes I feel as if I were  
alone with my thoughts;  
asking for help,  
asking for hope,  
shouting for ears,  
looking for souls.**

**In prison I am,  
behind no other bars,  
but the bars of my thoughts.**

**Thoughts of moisten tombs,  
rotten legs,  
frozen hearts,  
hearts without beats,  
hearts without hopes.**

**Sometimes I feel as if I were  
alone in the world,  
alone with my thoughts,  
with nobody helping me  
to get out of myself  
and my thoughts.**

**Carlos Lavallo Montalvo**

TESIS COM  
ALLA DE URGEN

## INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSION.....	32
CONCLUSIONES.....	37
ANEXOS.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	41

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD



## RESUMEN.

### RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL *IN VITRO* A PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE *Salmonella typhimurium* EN PACIENTES CON LUPUS ERYTEMATOSO SISTEMICO (LES) INACTIVO.

**INTRODUCCION.** El LES es una enfermedad de naturaleza autoinmune con manifestaciones clínicas y serológicas diversas, afecta cualquier órgano o sistema y se caracteriza por un amplio espectro de autoanticuerpos. Su etiología se desconoce, sin embargo se implican factores genéticos, ambientales, hormonales e infecciosos como desencadenantes. El principal agente infeccioso relacionado es la *S. typhimurium*, que puede ser concomitante a la presentación inicial de LES. Se tiene conocimiento que las PME de *S. typhimurium* son inmunógenos capaces de inducir activación linfocitaria vía IL2 e IFN $\gamma$ , citocinas implicadas en la patogenia de LES. En un intento de examinar la posible asociación patogénica entre las PME de *S. typhimurium* y LES, se decidió investigar el efecto de estas proteínas sobre la respuesta proliferativa mononuclear y síntesis de inmunoglobulinas *in vitro* en pacientes con LES inactivo.

**OBJETIVO.** Cuantificar y comparar la respuesta proliferativa mononuclear y la síntesis de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG e IgM) *in vitro* a la estimulación con PME de *S. typhimurium* en pacientes con LES inactivo vs. sujetos sanos.

**MATERIAL Y METODOS.** Se incluyeron 6 pacientes adultos, 5 mujeres y un hombre, con diagnóstico de LES con 4 o más criterios del ACR e inactividad mediante SLEDAI. Como controles se incluyeron 6 sujetos sanos con edad y sexo similar a los pacientes. Se tomó 10 ml. de sangre venosa a pacientes y controles, se obtuvieron las células mononucleares con gradiente de ficoll y se cultivaron en placas de 96 pozos (1.5 x 10<sup>5</sup> células/pozo en 100  $\mu$ l de medio RPMI), luego se agregó PME de *S. typhimurium* (20  $\mu$ l [40  $\mu$ g/ml]), como control se utilizó Concanavalina-A (20  $\mu$ l [10  $\mu$ g/ml]) y RPMI. La proliferación celular se midió mediante la incorporación de <sup>3</sup>H Timidina y se calculó el índice de estimulación (IE). Se determinó la síntesis de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG, e IgM) en los sobrenadantes de los cultivos mediante ELISA. Los resultados se compararon con la prueba *t* de Student y Mann-Whitney-Wilcoxon con significancia de  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS.** La respuesta proliferativa mononuclear en pacientes con LES inactivo fue mayor que la encontrada en controles  $6,997 \pm 4,506$  c.p.m vs  $753 \pm 720$  c.p.m. ( $p < 0.005$ ), no se encontraron diferencias en la proliferación mononuclear entre pacientes con LES y controles sanos a la estimulación con Concanavalina-A y RPMI. La síntesis de inmunoglobulinas totales en pacientes con LES inactivo fue de  $1,298 \pm 0,147$  D.O. y en los sujetos control de  $1,183 \pm 0,179$  D.O., a pesar de ser mayor la síntesis de inmunoglobulinas en pacientes con LES no se observó una diferencia significativa con los controles.

**CONCLUSIONES.** Los pacientes con LES inactivo tienen una respuesta proliferativa celular mayor a las PME de *S. typhimurium* al compararla con sujetos sanos. La síntesis de inmunoglobulinas totales no mostró diferencia significativa con sujetos sanos. Es factible que las PME de *S. typhimurium* participen en los mecanismos de disparo y activación de LES.

## **INTRODUCCION.**

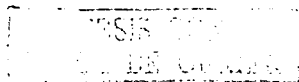
El lupus eritematoso sistémico (LES) es una de las enfermedades del tejido conectivo más diversas en cuanto a manifestaciones clínicas y serológicas. Puede presentarse a cualquier edad, afectar cualquier órgano o sistema y se caracteriza por la presencia de un amplio espectro de autoanticuerpos (1).

La etiología en LES es desconocida aunque se han implicado factores genéticos, ambientales, hormonales e infecciosos en la inducción o activación de la enfermedad. Los pacientes con LES activo se caracterizan por una hiperreactividad policlonal de las células B, lo que se traduce en una amplia producción de anticuerpos y autoanticuerpos. Se ha propuesto que los agentes infecciosos pueden producir autoinmunidad, modificando autoantígenos por mimetismo molecular o teniendo un efecto de activadores policlonales (2).

No obstante que el pronóstico y la sobrevida en los enfermos con LES se ha modificado de manera favorable con el uso de corticoesteroides e inmunosupresores (3,4,5), y aún cuando han emergido estados comorbidos que contribuyen a la mortalidad en LES, tales como dislipidemia, aterosclerosis y la enfermedad coronaria con sus implicaciones: angina e infarto al miocardio (con un riesgo calculado hasta 50 veces mayor en pacientes con LES para sufrir un evento cardiovascular cuando se comparan con sujetos controles ajustados por edad y sexo), en donde la frecuencia de eventos cardiovasculares en mujeres con LES no superan el 10% (6,7,8), la principal causa de muerte es secundaria a procesos infecciosos que alcanzan hasta el 33% del total de la mortalidad en LES, acompañados generalmente de actividad de la enfermedad, principalmente renal y a sistema nervioso central (9,10,11). Parece que los procesos infecciosos son

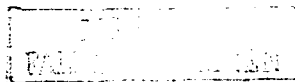
favorecidos o secundarios al uso de corticoesteroides. Sin embargo existe una incidencia mayor de infecciones en pacientes con LES, en comparación con pacientes con artritis reumatoide y síndrome nefrótico idiopático con factores de riesgo similares como: el consumo de corticoesteroides y daño renal (12). Las infecciones son más frecuentes en pacientes con LES activo, predomina la actividad renal con bajos niveles de complemento y un alto consumo de corticoesteroides. Las infecciones en LES son de origen bacteriano y por oportunistas, generan altos porcentajes de letalidad del 35% y 66% respectivamente (13,14). Así mismo se encontró en un estudio retrospectivo, donde se incluyeron 81 pacientes hospitalizados con diagnóstico de LES, bajo vigilancia durante 5 años, que el 33% desarrollaron procesos infecciosos. Cuando se analizó la asociación de infecciones con factores tales como; duración de la enfermedad, actividad clínica de LES y dosis de prednisona, mediante un modelo de regresión logística, se encontró que la actividad clínica de LES fue el único factor asociado que predispone a infecciones ( $p=0.005$ ), no así la duración de la enfermedad ni el uso de corticoesteroides. Se destaca que un tercio de los pacientes con LES estudiados desarrollaron infecciones durante su hospitalización (15).

Existen distintos mecanismos reconocidos por los cuales los pacientes con LES tienen una mayor susceptibilidad a infectarse, estos son: deficiencias en componentes del complemento con mayor riesgo de infección por organismos capsulados como *Neisseria sp.* (16,17), hipogammaglobulinemia del tipo de la inmunodeficiencia variable común y riesgo de infección por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Mycoplasma sp.* (18), alteraciones en la



fagocitosis a nivel de monocitos y sistema reticuloendotelial lo que favorece infecciones bacterianas (19,20). Dentro de las infecciones bacterianas, una de los agentes patógenos mas comunes que afectan a LES son las salmonellas no typhi.

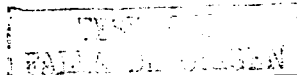
Los miembros del género *Salmonella* pertenecen a la familia de las enterobacterias, son patógenos intracelulares Gram negativos, que pueden encontrarse en humanos, ganado, animales salvajes, reptiles, pájaros y aun en insectos. La clasificación del género *Salmonella* ha sido reestructurado, combinando la misma especie como *Salmonella enterica* agregando el serotipo, así lo que conocemos como *S. typhimurium* se clasifica como: *Salmonella enterica* subespecie *enterica* y serotipo Typhimurium. Los estudios de hibridación de DNA han demostrado que existen siete grupos evolutivos, casi todos los serotipos *Salmonella* que infectan humanos pertenecen al grupo I de hibridación de DNA. Existen mas de 2400 serotipos de *Salmonella* que en base a su envoltura se conocen hasta 1500 serotipos clasificados dentro del grupo I de hibridación de DNA. No obstante solo 10 de estos son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos. Sin embargo por razones prácticas, de seguridad y de conveniencia por la correlación con síndromes clínicos establecidos, se ha decidido mantener el nombre de *Salmonella typhimurium*. La enfermedad clínica asociada a *Salmonella*, usualmente es secundaria a la ingesta de alimentos contaminados, se requieren aproximadamente 10,000 bacilos como inóculo para generar enfermedad, y se manifiesta con distintos síndromes clínicos; fiebre entérica, gastroenteritis, bacteremia y estado de portador (21,22,23). Dos terceras partes de la población general que se infecta por *Salmonella* presentan fiebre y gastroenteritis. La septicemia se presenta entre el 5% y 10% del total de las



infecciones conocidas, tiene una presentación bimodal, alcanzando el 40% en niños menores de 10 años y el 25% en pacientes mayores de 60 años, solo entre el 5% y 10% de septicemias se desarrollan en pacientes mayores de 10 años y menores de 60 años.

En poblaciones con enfermedades subyacentes como insuficiencia hepática y enfermedades reumáticas se encuentran porcentajes mayores, hasta el 60% de septicemia entre las edades de 15 a 40 años (24). En LES se han reportado casos asociados a infección principalmente por salmonellas no typhi como *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, la mayoría de estos pacientes cursan con actividad lúpica severa durante la infección y el diagnóstico de LES en algunos casos se ha retrasado por similitud de las manifestaciones clínicas entre las dos entidades (25,26,27).

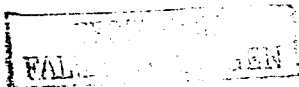
En adición, se ha descrito en un hospital de Nueva York, que la enfermedad más comúnmente relacionada con la bacteremia secundaria a salmonellas no typhi es el LES, se ha encontrado que el 20% de las bacteremias por *Salmonella* no typhi ocurren en pacientes con LES. Así mismo se demostró una diferencia estadísticamente significativa al comparar la frecuencia de bacteremia causada por *Salmonella* no typhi con la bacteremia causada por otras enterobacterias 0.54% en LES ( $p < 0.001$ ) (28). También se ha reportado un incremento de infección por *S. typhimurium* a nivel de tracto urinario. Esta salmonella ocupó el segundo lugar como agente causal, solo precedida por *E. coli* en una cohorte de 59 pacientes con LES. Se destaca que del total de urocultivos positivos para salmonella no typhi en un hospital de Beirut, obtenidos en un periodo de 5 años, el 53% correspondió a pacientes con LES (29).



En LES las salmonellas no typhi ocasionan también procesos sépticos localizados, de los cuáles destaca la artritis séptica y osteomielitis. En nuestro país se han descrito estas complicaciones en 8 pacientes, las condiciones clínicas relacionadas fueron la presencia de nefropatía lúpica activa, dosis altas de esteroides y uso de ciclofosfamida intravenosa, la mayoría de los procesos sépticos se desencadenaron en un periodo corto de aproximadamente 30 días después de utilizar el tratamiento con ciclofosfamida. Se aisló *S. enteritidis* en el líquido sinovial en todos los pacientes y se destacó el estado de portador crónico en 3 de 5 pacientes estudiados de manera intencional (30).

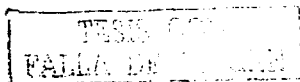
En una situación diferente en donde los esteroides e inmunosupresores se han implicado en la predisposición para el desarrollo de una infección por salmonellas no typhi en pacientes con LES, se ha descrito la presencia de bacteremia por *Salmonella* no typhi simultánea a la presentación inicial de LES en dos pacientes, que presentaron actividad renal, hipocomplementemia, anti-DNA y sin tratamiento, sugiriendo que los pacientes con LES tienen defectos inmunológicos para eliminar a la salmonella siendo esta infección independiente del tiempo de evolución de la enfermedad y de la terapia inmunosupresora (31).

Una de estas alteraciones inmunológicas pudiera relacionarse con el factor de necrosis tumoral alpha (FNT- $\alpha$ ), implicado en la protección contra patógenos intracelulares, en los procesos de inflamación, fiebre, entre otros de sus efectos sistémicos. Es intrigante su papel en la relación LES-infección por *Salmonella* no typhi. En primer término debe destacarse que el FNT- $\alpha$  confiere un efecto protector en la infección por *S. typhimurium* en modelos murinos, pues se ha



observado que esta citocina al ser bloqueada con una globulina anti-FNT- $\alpha$  acelera la mortalidad en ratones BALB/c infectados por *S. typhimurium* (32). En segundo término, si bien no se ha aclarado si el FNT- $\alpha$  juega un papel benéfico o deletéreo en la patogenia de LES, se ha establecido que los pacientes con LES no muestran defectos en la producción de FNT- $\alpha$ , pues al ser medido, se han detectado niveles elevados de esta citocina en pacientes con LES tanto activos, inactivos e incluso se han determinado niveles marcadamente elevados en pacientes con infección concomitante al ser comparados con sujetos sanos (33,34) Sería de interés determinar los niveles de FNT- $\alpha$  en pacientes con LES e infección concurrente por *Salmonella*.

Por otra parte se ha descrito una serie de 10 casos con salmonelosis asociados a LES, donde destacan varios aspectos en relación a factores de riesgo e influencia de la infección sobre las manifestaciones de LES: el intervalo de tiempo entre el inicio de LES y la infección por *Salmonella* tuvo un rango de 0 a 8 años, en seis pacientes la infección se presentó durante el primer año de la enfermedad lúpica y en un paciente fue simultáneo, la mitad de los pacientes presentaron actividad clínica, la nefropatía e hipocomplementemia con niveles bajos de C3 y C4 durante la infección, en dos pacientes se detectó positividad para anti-DNA. Todos los pacientes presentaron fiebre y la mitad manifestaciones intestinales, en los hemocultivos se aisló *S. enteritidis*, no se identificaron salmonellas en otros sitios y no se detectaron pacientes portadores crónicos. Así mismo no se identificó ninguna diferencia especial entre estos pacientes con infección por *Salmonella* de otros pacientes con LES sin la infección. Los autores



sugieren que la actividad clínica de LES favorece la infección por salmonella y de una manera alternativa, que la infección dispara el inicio de LES (35).

La forma como los procesos infecciosos exacerbaban o participan en la activación de la enfermedad clínica en LES no se conocen. Sin embargo, se piensa que los productos bacterianos como son los lipopolisacáridos, pueden inducir exacerbación a través de activación policlonal de células B e incrementando la actividad de linfocitos T CD4 (36). Otro mecanismo propuesto es a través de superantígenos; moléculas bifuncionales capaces de interactuar con el receptor de la célula T y las moléculas de histocompatibilidad clase (MHC) II, sin requerir procesamiento ni presentación antigénica, activando y expandiendo células T potencialmente autorreactivas, con liberación excesiva de citocinas y generando daño tisular con exposición de autoantígenos (37).

Durante un proceso infeccioso normalmente se activan y expanden clones de células T tolerantes como respuesta normal, para combatir al agente patógeno, pero existe la posibilidad que en este proceso se activen también células T tolerantes pero potencialmente autorreactivas y favorezcan la enfermedad autoinmune (38).

En modelos murinos de enfermedad autoinmune utilizando la raza NZB/B1, las cuales desarrollan sobre la semana 14 a 42 de vida anemia hemolítica autoinmune y prueba de Coombs positiva, se ha observado que la infección inducida por *S. typhimurium* acelera la mortalidad en esta raza de manera significativa al ser comparadas con individuos más jóvenes de la misma raza que aún no desarrollan la enfermedad hemolítica ni tienen prueba de Coombs positiva, se destaca que la eritrofagocitosis secundaria por células del sistema



reticuloendotelial, interfiere con la capacidad de estas células para matar y eliminar a la Salmonella y por ende favorece la diseminación bacteriana (39). Por otra parte en ratones NZB/NZW F1 un modelo murino de LES, caracterizado por presencia de anticuerpos antinucleares y glomerulonefritis por depósito de complejos inmunes, al ser tratada con BCG que se considera como un agente inmunoestimulador inespecífico que eleva los niveles de interferon  $\gamma$ , acelera la mortalidad en estos ratones como consecuencia de un desarrollo temprano de la enfermedad renal (40).

Por otra parte se han descrito diversas alteraciones en el comportamiento de los linfocitos T en pacientes con LES activo, tales como: una pobre respuesta proliferativa a mitógenos como la concanavalina-A, fitolaca y fitohemaglutinina, así como nula respuesta proliferativa *in vitro* a la estimulación con IL-2 y una absorción disminuida de esta citocina al ser comparados con linfocitos de pacientes inactivos. La actividad celular suprimida a mitógenos se ha correlacionado con actividad clínica de LES, niveles bajos de complemento, presencia de anti-DNA y con las condiciones del tratamiento (41,42). De una manera similar los linfocitos B de pacientes con LES inactivos, o células B en reposo al ser estimuladas *in vitro* con *S. aureus* Cowan I, muestran una respuesta y proliferación excesiva (43). Luego la respuesta proliferativa tanto de células T como B en LES a la estimulación antigénica y mitogénica *in vitro* depende del estado de activación de las células, es decir si se encuentran activadas o en reposo, y dicho estado se relaciona directamente con la actividad de la enfermedad, por lo que es necesario tomar en cuenta la actividad de la



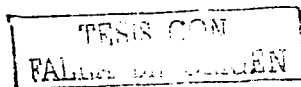
enfermedad para realizar pruebas de estimulación antigénica y mitogénica *in vitro*.

Por otra parte existen modelos murinos y pruebas en humanos sanos, en quienes se ha inducido una respuesta inmune específica a ciertos antígenos de *Salmonella*, denominadas proteínas de membrana externa (PME) las cuales pueden expresarse con más de 100 mil copias por célula y de las que se han descrito alrededor de 10, entre las que se encuentran las PME mayores cuyo peso molecular se ha determinado entre 32 y 41 kDa (44,45,46):

- a) Proteínas matrices o porinas (OmpC, D, F, PhoE, etc.), que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana.
- b) Proteína modificable por el calor (OmpA), que se involucra en los procesos de conjugación y actúa como receptor para fagos y colicinas.
- c) Lipoproteína de Braun, unida de manera covalente al peptidoglicano y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

Con respecto a las proteínas menores cuyo peso molecular se encuentra sobre los 17 kDa, se ha determinado que intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular que están en relación a la división celular. Entre ellas se encuentra la única PME con actividad de fosfolipasa A (44, 47). En la Figura 1 se muestra la disposición de los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas y el arreglo de las PME.

La respuesta inmune, luego de la inmunización con las PME de *S typhi* y *S typhimurium*, básicamente consiste en la inducción de proliferación celular linfocitaria y mononuclear, así como síntesis de anticuerpos específicos contra

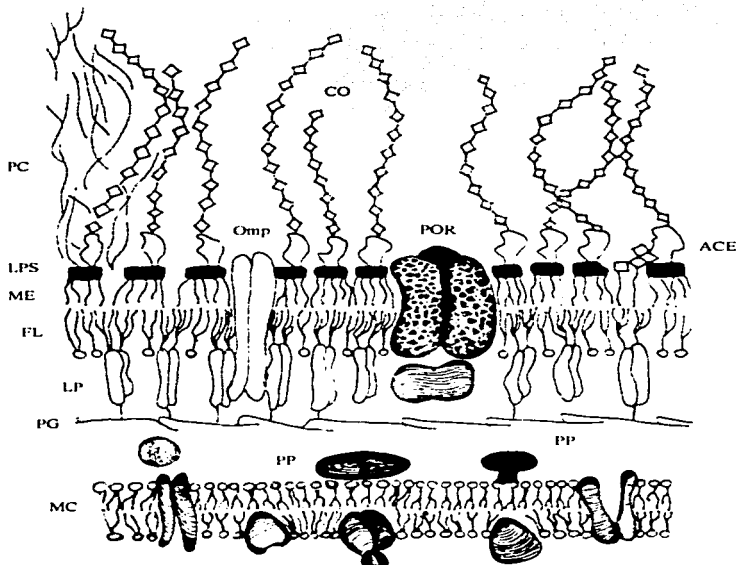


porinas (48,49). Estos trabajos se han realizado con intenciones de desarrollar vacunas, que induzcan respuestas inmunes celulares y protección principalmente contra *S. typhi*.

Se piensa que la activación de los linfocitos es vía IL-2 e IFN- $\gamma$  y es factible que la resistencia del huésped sea mediada por estas citocinas (50,51).

Por lo anteriormente expuesto, nos pareció interesante explorar la respuesta inmune celular y humoral *in vitro* en pacientes con LES inactivo a las PME de *S. typhimurium*, a fin de determinar un vínculo entre estos inmunógenos bacterianos y la capacidad de poder activar los mononucleares provenientes de pacientes con LES inactivo e inducir la producción de anticuerpos *in vitro*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 1.** Esquema de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas.  
 ME: membrana externa, LPS: lipopolisacárido, FL fosfolípidos, ACE: antígeno común enterobacteriano, POR: porina, Omp: proteína modificable por el calor, PG peptidoglicano, LP: lipoproteína, PP: proteína periplasmática, MC: membrana citoplasmática, PC: polisacárido capsular, CO: cadena O.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general:**

Demostrar que la respuesta inmune celular y humoral *in vitro* a la estimulación con PME de *S. typhimurium* en pacientes con LES inactivo es mayor que en sujetos sanos.

### **Objetivos específicos.**

1. Cuantificar y comparar la respuesta proliferativa de las células mononucleares *in vitro* a PME de *S. typhimurium* en pacientes con LES vs sujetos sanos.
2. Cuantificar y comparar la síntesis *in vitro* de inmunoglobulinas en la respuesta a PME de *S. typhimurium* en pacientes con LES inactivo vs sujetos sanos.

## **MATERIAL Y METODOS.**

### **Población de estudio.**

Se estudiaron 6 pacientes con diagnóstico de LES que cumplieron cuatro o más criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1982 (52), que asistieron a la consulta Externa del Servicio de Reumatología de la Clínica No. 25 del IMSS y que cumplieron con los siguientes criterios de selección:

#### **Criterios de inclusión:**

1. Inactivos de acuerdo al Índice SLEDAI (53) (Anexo No. 1).
2. Con edades entre 18 y 60 años.
3. Con un consumo de prednisona menor o igual a 7.5 mg/día.
4. Manifestación por escrito de su participación libre y sin interés en el proyecto (Anexo No. 2).

#### **Criterios de no inclusión:**

1. Pacientes con consumo de azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina-A, metotrexate, cloroquina o que recibieran al momento del estudio bolos de metilprednisolona.
2. Infección presente documentada previo examen clínico y mediante cultivos.
3. Insuficiencia renal crónica.
4. Cirrosis.
5. Diabetes Mellitus.
6. Embarazo.

RECIBIR CON  
FECHA DE ORIGEN

7. Contacto previo con productos bacterianos por vacunas con PME S. *typhimurium*.

Criterios de exclusión:

1. Cambio de residencia.
2. Pacientes que cursaran síndrome de sobreposición.
3. Cultivo celular fallido (frustrado).

Grupo control.

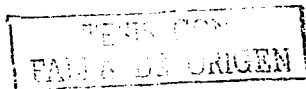
Participaron como grupo control en el estudio 6 sujetos sanos (no embarazado), con edades y sexo similares a los pacientes con LES.

Procedimiento.

Obtención de sangre periférica y células mononucleares.

A los pacientes con LES inactivo y sujetos sanos controles se les tomó una muestra de 10 ml de sangre venosa periférica con jeringa estéril heparinizada. La sangre se colocó en un matraz estéril de 125 ml y se mezcló con un volumen de 10 ml de PBS pH 7.4.

Las células mononucleares de los pacientes con LES inactivo y controles sanos se obtuvieron a partir de la sangre periférica heparinizada, mediante centrifugación con gradiente de ficoll (Lymphoprep Gibco BRL). La interfase se colectó con pipetas Pasteur y se contaron las células hasta ajustar a una concentración  $1.5 \times 10^6$  células /ml (Anexo 3).



### Cultivos celulares.

Las células mononucleares de los pacientes con LES inactivo y controles sanos se cultivaron en placas de 96 pozos (Nunc Ion Co.) a razón de  $1.5 \times 10^5$  células/pozo contenidas en 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640 (Sigma BRL), suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, L-glutamina 0.3 mg/ml y 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco BRL). Se agregaron PME de *S. typhimurium* con pureza del 95% (donadas gentilmente por el Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Unidad de Investigación Biomédica C.M.N. S. XXI, IMSS.) a una concentración de 40  $\mu$ g/ml en un volumen de 20  $\mu$ l y se ajustó el volumen final a 200  $\mu$ l/pozo. Como control positivo y a fin de garantizar la viabilidad de los cultivos celulares se utilizó Concanavalina-A 10  $\mu$ g/ml (Sigma) en un volumen de 20  $\mu$ l y medio RPMI 1640 como control negativo (Sigma), de igual manera se ajustó el volumen final de 200  $\mu$ l/pozo. Todos los cultivos se realizaron por triplicado, las placas permanecieron por 96 hrs en una incubadora a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Luego, 18 hrs antes de ser cosechadas las células se agregó 1  $\mu$ Ci/pozo de timidina tritiada (<sup>3</sup>H Thymidine, Amersham Pharmacia Biotch).

La proliferación celular se valoró mediante la incorporación de timidina tritiada, las células fueron cosechadas con un cosechador (Minimash II), se retuvieron los restos celulares en un filtro compuesto de fibra de vidrio y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Beckman Inst.), los resultados se reportaron en cuentas por minuto (c.p.m.) y por índice de estimulación (I.E), que es la relación del promedio de las cuentas por minuto obtenidas en los cultivos estimulados con PME de *S typhimurium*, entre el



promedio de las cuentas por minuto obtenidas en los cultivos utilizados como control negativo con RPMI 1640 (49,54).

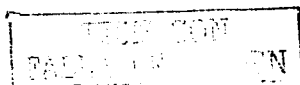
#### Determinación de inmunoglobulinas.

Se determinó la síntesis total de inmunoglobulinas (IgA, IgG, e IgM) en los sobrenadantes de los cultivos celulares de los pacientes con LES inactivo y controles sanos, mediante un ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA). Para determinar la cantidad de inmunoglobulinas se utilizaron placas de 96 pozos (Nunc Co.), se incubaron con anti-inmunoglobulina humana polivalente de conejo en la porción Fab 100  $\mu$ l/pozo de una solución 1:20,000 durante toda la noche a 4 °C, una vez transcurrido ese tiempo se lavaron las placas con PBS tween cuatro veces, posteriormente se bloquearon las pozos con PBS tween leche al 5% por 1.30 hrs, nuevamente se lavaron cuatro veces con PBS tween y se agregó 100  $\mu$ l/pozo de sobrenadante de los cultivos celulares incubados por 96 hrs. con PME de *S. typhimurium*, controles (Concanavalina-A y medio de cultivo RPMI 1640) por espacio de 1.30 hrs, luego se lavaron las placas 4 veces. Las placas se incubaron por una hora con 100  $\mu$ l/pozo de una solución 1:8,000 de anti-Ig's Dakor IgA, IgG, IgM kappa lambda rabbit anti-human, posteriormente se lavaron en cuatro ocasiones con PBS tween y se agregó solución de sustrato (Ortofenilendiamina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y amortiguador de citratos pH 5)) 100  $\mu$ l/pozo por 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. La reacción se detuvo con 100  $\mu$ l/pozo de HCl 3N y la reacción enzimática se leyó a una absorbancia de 490 nm en un lector de ELISA (Dynatec MR 5000). La determinación de inmunoglobulinas

se realizó por duplicado y se obtuvo el valor promedio, los resultados de la producción de inmunoglobulinas se reportaron en densidades ópticas (D.O) (49).

#### **ANALISIS ESTADISTICO.**

Los valores de la proliferación celular mononuclear, I.E y de la síntesis de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG e IgM) *in vitro* obtenidas de los pacientes con LES inactivo y de los controles sanos, se compararon mediante la prueba *t* de Student y Mann-Whitney-Wilcoxon con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .



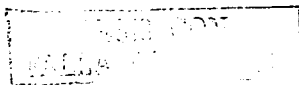
## **RESULTADOS.**

Se estudiaron 6 pacientes con LES inactivo, 5 mujeres y un hombre, con edades promedio de 36.8 años  $\pm$  11.8, tiempo de evolución de la enfermedad promedio de 5.3 años  $\pm$  2.06 y consumo promedio de prednisona menor de 2.5 mg/d. Tres pacientes no consumían tratamiento alguno a la toma de muestra de sangre periférica. Todos los pacientes cumplieron con los criterios de inclusión del estudio, las características clínicas se resumen en el cuadro No. 1. Cabe señalar que la paciente No. 5 fue sometida a esplenectomía en el transcurso de su evolución clínica, como parte de su tratamiento para control de manifestaciones hematológicas (Síndrome de Evans).

Fueron incluidos 6 sujetos sanos como grupo control, 5 mujeres y un hombre cuyas edades fueron pareadas con la de los enfermos de LES inactivo.

La respuestas proliferativas e índice de estimulación bajo las diferentes condiciones de los cultivos celulares (RPMI 1640, Concanavalina-A y PME de *S. typhimurium*) tanto de los pacientes con LES inactivo como en los sujetos sanos se muestran en la Tabla 1.

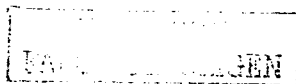
La viabilidad de las células mononucleares de los pacientes con LES y los sujetos sanos en los cultivos celulares utilizando Concanavalina-A no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) en la respuesta proliferativa, se obtuvo una incorporación media de timidina de tritida promedio de 69,390  $\pm$  42,971 c.p.m., para el grupo de pacientes con LES inactivo y de 62,450  $\pm$  38,905 c.p.m., para el grupo de sujetos sanos (Gráfica 1).



Así mismo no se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) en la incorporación de timidina tritiada en los dos grupos utilizando solo medio de cultivo RPMI 1640 como control negativo, se obtuvieron valores medios en la incorporación de  $1,408 \pm 695$  c.p.m., para los pacientes con LES inactivo y de  $884 \pm 651$  c.p.m. para los sujetos sanos.

La respuesta proliferativa de las células mononucleares de los pacientes con LES inactivo utilizando las PME de *S. typhimurium* fue de un valor medio de  $6,997 \pm 4,506$  c.p.m., y la respuesta proliferativa promedio en sujetos sanos fue de  $753 \pm 720$  c.p.m.

No obstante que se encontraron variaciones individuales a la estimulación con las PME de *S. typhimurium*, la respuesta proliferativa mononuclear fue mayor en los pacientes con LES inactivo que en los sujetos sanos, mostrando una diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.005$  (Tabla 2 y Gráfica 2). De igual forma se observó una diferencia estadísticamente significativa en los pacientes con LES inactivo que en los sujetos sanos, al comparar las respuestas proliferativas por I.E, se obtuvo un promedio de  $4.97 \pm 2.18$  para los pacientes con LES inactivo vs  $0.749 \pm 0.312$  para los sujetos sanos controles con una  $p < 0.005$  (Tabla 3 y Gráfica 3). El resultado mediante el I.E fue 5 veces mayor para los pacientes con LES inactivo al compararlo con los sujetos sanos. Se destaca este método para eliminar el sesgo que pudiera existir, dado que las células en cultivo de los pacientes con LES pueden presentar activación espontánea.

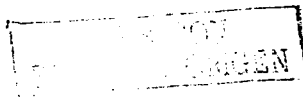


La síntesis de inmunoglobulinas determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares bajo las diferentes condiciones de estimulación de los pacientes con LES inactivo y controles sanos se muestran en la Tabla 4.

En estas determinaciones no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ). Así para los pacientes con LES inactivo se encontró  $1.298 \pm 0.147$  D.O., en los sobrenadantes estimulados con PME de *S. typhimurium*, en tanto para los controles sanos la determinación fue de  $1.183 \pm 0.179$  D.O.

La determinación de inmunoglobulinas bajo la estimulación con Concanavalina-A para el grupo con LES inactivo fue de  $1.475 \pm 0.076$  D.O., y de  $1.325 \pm 0.225$  D.O, para el grupo de sujetos sanos. La determinación de inmunoglobulinas con medio de cultivo solo RPMI 1640 fue de  $1.538 \pm 0.066$  D.O., para los pacientes con LES inactivo y de  $1.357 \pm 0.216$  D.O, para los pacientes controles sanos. De igual forma bajo las condiciones de estimulación con PME de *S. typhimurium*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos bajo estimulación con concanavalina-A, como con el medio de cultivo solo ( $p > 0.05$ ).

Cabe señalar, que a pesar de que las determinaciones de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG e IgM) en los sobrenadantes de los cultivos celulares siempre fueron mayores en los pacientes con LES inactivo vs sujetos sanos en las diferentes condiciones de estudio, no alcanzaron significancia estadística en este estudio.



### CUADRO No. 1

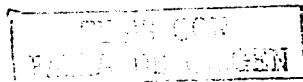
CARACTERISITICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES CON LES INACTIVO, QUE PARTICIPARON EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL *IN VITRO* A PME DE *S typhimurium*.

Caso	*Edad	Sexo	Manifestaciones clínicas	*Tiempo de evolución de la enfermedad	Tratamiento a la toma de muestra	SLE-DAI
1	58	F	Artritis, eritema malar, alopecia, linfopenia, ANA y anti-DNA(+)	8	Sin tratamiento	0
2	26	M	Serositis, artritis, eritema malar, fiebre, ANA(+) y anti-DNA(+)	6	PDN 5 mg/d.	0
3	42	F	Eritema malar, artritis, linfopenia y ANA(+)	7	PDN 5 mg/d.	0
4	32	F	**GNPD, serositis, fiebre, linfopenia, ANA y anti-DNA(+)	3	PDN 5 mg/d.	0
5	35	F	Anemia hemolítica, trombocitopenia, úlceras orales, eritema malar, artritis y alopecia	5	Sin tratamiento	0
6	28	F	Eritema malar, artritis, linfopenia y ANA(+)	3	Sin tratamiento	0

\*Edad y Tiempo de evolución de la enfermedad en años.

\*\*GNPD, corresponde a la glomerulonefritis tipo IV de la OMS.

PDN es prednisona.



**TABLA I**

INCORPORACION DE  $^3\text{H}$  TIMIDINA (c.p.m.) E INDICE DE ESTIMULACION (I.E) EN LOS CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES\* DE PACIENTES CON LES INACTIVO Y SUJETOS SANOS A LA ESTIMULACION CON PME DE *S. typhimurium* y Concanavalina-A.

Pacientes con LES inactivo	RPMI 1640	Concanavalina-A	PME <i>S. typhimurium</i>	I.E
1	665	26,690	2,300	3.45
2	1,506	34,140	3,350	2.22
3	723	35,320	3,979	5.50
4	1,126	128,900	9,382	8.33
5	2,215	89,090	9,134	4.12
6	2,218	102,200	13,840	6.24
Media	1,408	69,390	6,997	4.97
<b>Sujetos sanos</b>				
1	681	41,491	678	0.99
2	2,183	16,400	2,129	0.97
3	732	59,750	734	1.00
4	778	42,600	640	0.82
5	524	124,500	206	0.39
6	407	89,960	132	0.32
Media	884	62,450	753	0.74

c.p.m. son cuentas por minuto.

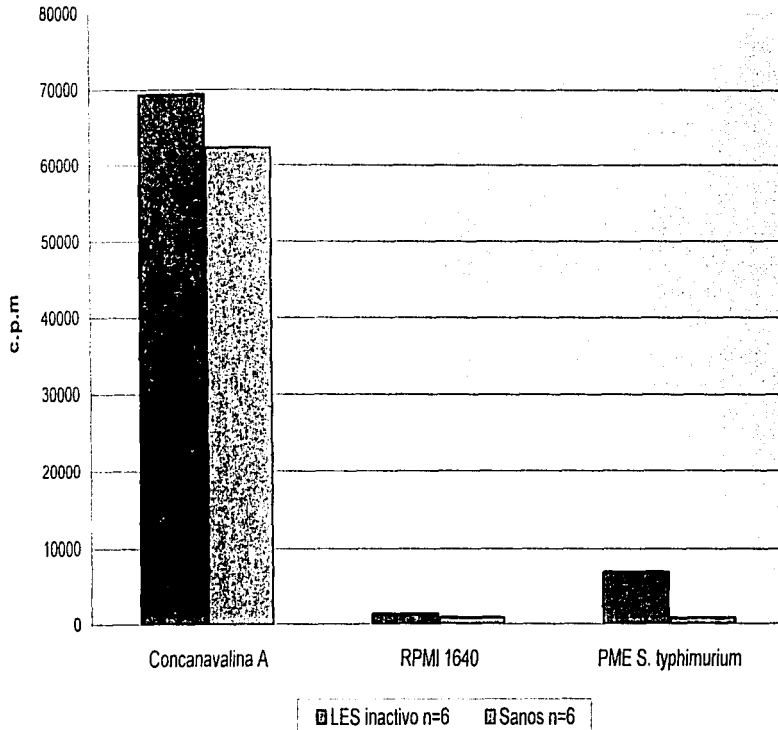
\*  $1.5 \times 10^5$  células mononucleares/pozo.

PME son proteínas de membrana externa. RPMI 1640 es medio de cultivo.

TESIS CON  
FALLA DE

Gráfica 1.

Incorporación de  $^3\text{H}$  Timidina en cultivos de células mononucleares de pacientes con LES inactivo y sujetos sanos a la estimulación con PME de *S. typhimurium* y Concanavalina A.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS DEL GOBIERNO  
NACIONAL



**TABLA 2**

**VALORES ORDENADOS DE LA INCORPORACION DE  $^3\text{H}$  TIMIDINA (c.p.m.) EN LOS CULTIVOS CELULARES\* DE PACIENTES CON LES INACTIVO Y SUJETOS SANOS A LA ESTIMULACION CON PME DE *S. typhimurium*.**

PACIENTES CON LES INACTIVO			SUJETOS SANOS		
Paciente No.	$^3\text{H}$ Timidina	Rango	Sujeto No.	$^3\text{H}$ Timidina	Rango
1	2,300	7	1	678	4
2	3,350	8	2	2,129	6
3	3,979	9	3	734	5
4	9,382	11	4	640	3
5	9,134	10	5	206	2
6	13,840	12	6	132	1
Media	6,997	$R_1 = 9.5^{**}$		753	$R_2 = 3.5^{**}$

c.p.m cuentas por minuto.

PME son proteínas de membrana externa.

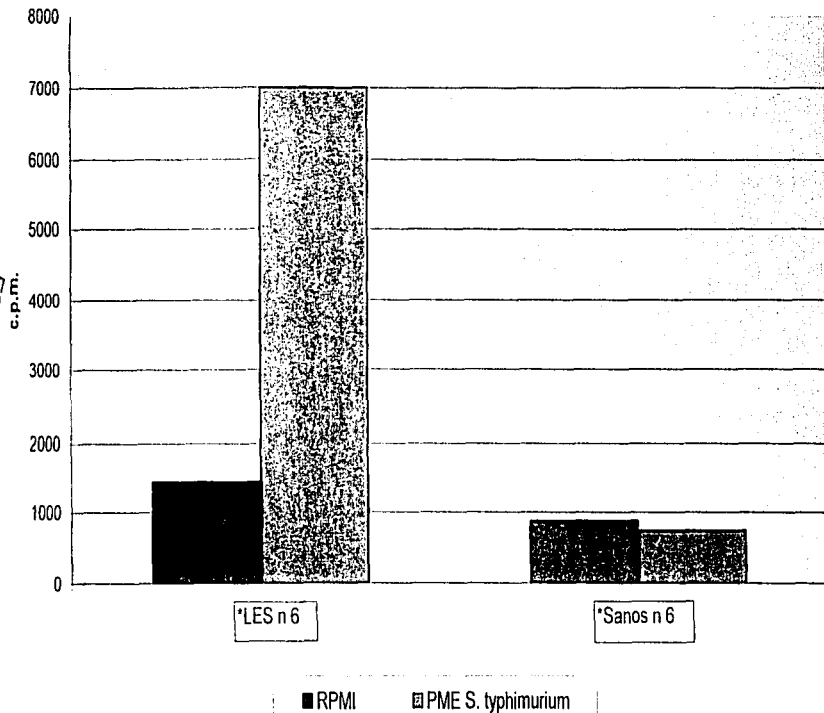
\*  $1.5 \times 10^5$  células mononucleares/pozo

\*\*Mediante la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

TESTE CON  
FAIXA DE ORIGEN

Gráfica 2.

Incorporación de  $^3\text{H}$  Timidina en cultivo de células mononucleares de pacientes con LES inactivo y sujetos sanos a la estimulación con PME de *S. typhimurium*.



\*  $p < 0.005$  mediante Wilcoxon-Mann-Whitney

**TABLA 3**

VALORES ORDENADOS DE LA INCORPORACION DE <sup>3</sup>H TIMIDINA POR INDICE DE ESTIMULACION (I.E) EN LOS CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES CON LES INACTIVO Y SUJETOS SANOS A LA ESTIMULACION CON PME DE *S. typhimurium*.

PACIENTES CON LES INACTIVO			SUJETOS SANOS		
Paciente No.	I.E	Rango	Sujeto No.	I.E	Rango
1	3.45	8	1	0.99	4
2	2.22	7	2	0.97	5
3	5.50	10	3	1.00	6
4	8.33	12	4	0.82	3
5	4.12	9	5	0.39	2
6	6.24	11	6	0.32	1
Media	4.97	$R_1 = 9.5^*$	Media	0.74	$R_2 = 3.5^*$

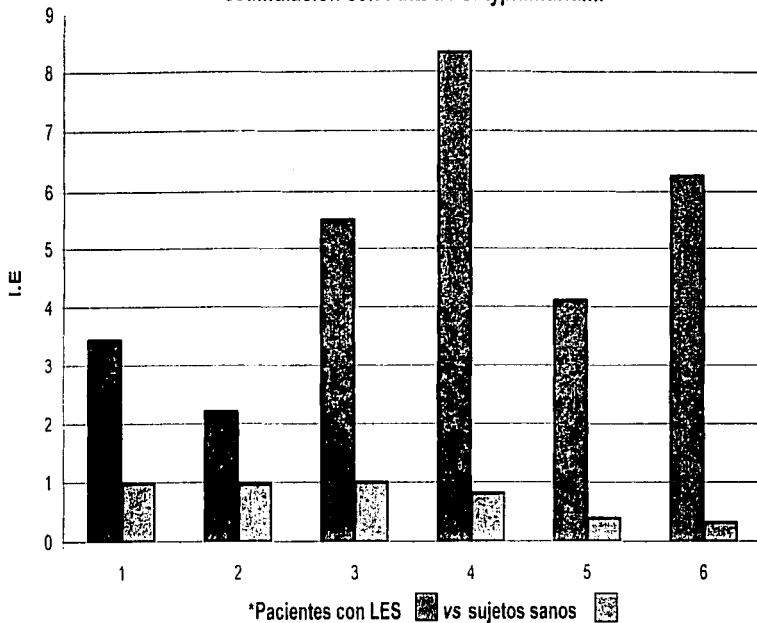
PME son proteínas de membrana externa.

\*Mediante la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

TRABAJOS DE  
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3

Valores de la incorporación de  $^3\text{H}$  Timidina por índice de estimulación (I.E) en los cultivos celulares de pacientes con LES inactivo y sujetos sanos a la estimulación con PME de *S. typhimurium*.



\* $p < 0.005$  mediante Wilcoxon-Mann-Whitney

NEONCOLOGIA  
MAY 1984  
TOMO 10  
NO. 5

30

**TABLA 4**

DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES (IgA, IgG e IgM)  
OBTENIDAS MEDIANTE ELISA (D.O.) EN LOS SOBRENADANTES DE LOS  
CULTIVOS CELULARES DE PACIENTES CON LES INACTIVO Y SUJETOS SANOS  
A LA ESTIMULACION CON PME DE *S. typhimurium* y Concanavalina-A.

Pacientes con LES inactivo	RPMI 1640	Concanavalina-A	PME <i>S. typhimurium</i>
1	1.54	1.43	1.35
2	1.41	1.47	1.04
3	1.58	1.61	1.44
4	1.57	1.45	1.32
5	1.59	1.47	1.21
6	1.51	1.39	1.40
Media	1.53	1.47	1.29*
Sujetos sanos			
1	1.45	1.35	1.40
2	1.63	1.54	1.37
3	1.48	1.30	1.01
4	1.07	1.39	1.12
5	1.12	1.45	0.97
6	1.39	0.89	1.19
Media	1.35	1.32	1.18*

D.O. densidades ópticas.

PME son proteínas de membrana externa, RPMI 1640 es medio de cultivo.

\*Diferencia no significativa ( $p > 0.05$ )

TESIS CON  
FALLA DE CANCEL

## DISCUSION.

Hasta el momento la etiología de LES no se ha establecido, sin embargo al igual que otros padecimientos de naturaleza autoinmune, se piensa que agentes externos del medio ambiente están implicados (55).

En general se considera a LES como una enfermedad poligénica y multifactorial, donde participan factores genéticos, hormonales, ambientales, físicos y biológicos, como son los procesos infecciosos (11).

Con respecto a las infecciones, no hay duda de que los pacientes con LES son susceptibles a infectarse con diferentes microorganismos (13,16), sin embargo se destacan las infecciones por *Salmonella* en especial las no typhi (30), mismas que coinciden en la mayor parte de los casos con la presencia de actividad clínica de la enfermedad (31,35). Así mismo se ha establecido recientemente que: la presencia de infección por *Salmonella* no typhi simultánea al diagnóstico de LES, pacientes con LES y reinfección por *Salmonella* e infección por otras bacterias concomitantes, presentan un mayor riesgo relativo (RR) de mortalidad (presentación de LES concomitante con salmonella RR de 63 e infección recurrente por *Salmonella* RR de 84) al ser comparados con otras variables como el nivel de creatinina, proteinuria, hematuria, dosis de esteroides, inmunosupresores, etc. mediante un análisis de regresión logística (56).

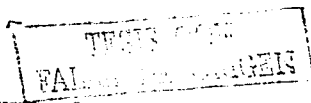
En un intento de explorar la posible asociación patogénica entre la salmonella y el LES como se ha sugerido (35), nosotros decidimos investigar el efecto de las PME de *S. typhimurium* sobre las células mononucleares de pacientes con LES in vitro, ya que estos productos bacterianos se han utilizado previamente en modelos animales y en pruebas en humanos sanos, demostrando

su capacidad antigénica para promover principalmente respuestas inmunes mediadas por células (48,49).

En nuestro estudio consideramos fundamental que los pacientes se encontraran inactivos y sin tratamiento con inmunosupresores, pues de antemano se conoce que los pacientes con actividad clínica de la enfermedad y con tratamientos que deprimen la respuesta inmunológica, ofrecen respuestas proliferativas mononucleares pobres a la estimulación mitogénica (42,57,58). De tal manera, estando inactivos los pacientes con LES, la viabilidad de los cultivos celulares en nuestro trabajo a la respuesta mitogénica con concanavalina-A se garantizó.

En primera instancia no observamos, como se esperaba, una diferencia a la respuesta mitogénica entre los pacientes con LES inactivo y nuestro grupo de sujetos sanos controles, lo que indica que el comportamiento celular de los pacientes con LES inactivo en esta condición es normal, lo que sugiere que solo hace falta el estímulo endógeno o exógeno para desencadenar la respuesta inmunológica alterada en los pacientes con LES.

En nuestro trabajo observamos una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta proliferativa mononuclear entre pacientes con LES inactivo y sujetos sanos en respuesta a PME de *S. typhimurium*, sin tener antecedente de que los pacientes y sujetos sanos hubieran tenido contacto previo con los productos bacterianos por vacunas. No obstante que el tipo de respuestas obtenidas en los pacientes con LES inactivo mostraron variaciones individuales, las respuestas son similares a las obtenidas en sujetos expuestos a vacunación previa con PME (49).



En cuanto a la síntesis de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG e IgM) y a pesar de que se observó una mayor producción in vitro en los pacientes con LES inactivo al compararla con sujetos sanos, no se encontraron diferencias significativas en la producción de anticuerpos entre los grupos de estudio, puede explicarse por una parte a que la respuesta inmunológica desencadenada por las PME de *S. typhimurium* es mas celular que humoral, con participación de IL-2 e IFN $\gamma$  el cual tiene un efecto supresor sobre la producción de anticuerpos (48,59) y por otra parte posiblemente a que no se exploró la producción de anticuerpos para isotipos específicos (IgG e IgM).

Los mecanismos biológicos de la relación entre las salmonellas y su huésped aún no se conocen y poco se sabe de la respuesta inmune celular. No obstante, se sugiere que péptidos bacterianos de patógenos intracelulares, pueden activar respuestas inmunes vía moléculas de histocompatibilidad MHC tanto tipo I como tipo II, sin necesidad de procesamiento antigénico citoplasmático, por medio de procesos de regurgitación o por autólisis bacteriana en el espacio extracelular (21,60).

Por otra parte se ha sugerido que ciertos productos sobre la superficie bacteriana de *S. typhimurium* hasta ahora no identificados tienen la capacidad de ligarse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), presumiblemente iniciando la cascada de señales para la fosforilación de cinasas, culminando en un incremento de Ca<sup>++</sup> intracelular, paso necesario para la activación celular (61).

Otra alternativa es que las PME de *S. typhimurium* podrían contener pequeñas cantidades de lipopolisacáridos (LPS) no eliminados durante el proceso

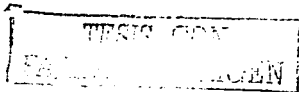
FALLA EN ORIGEN



de aislamiento (menos del 5% de contenido de lipopolisacáridos en las muestras de PME de *S. typhimurium* empleadas en el presente estudio), dichos LPS son ampliamente encontrados en bacterias y se han implicado en la inducción de respuestas proliferativas celulares e incluso han sido asociados en la reactivación de la enfermedad clínica de LES y el síndrome de anticuerpos antifosfolípido catastrófico, por lo que se ha recomendado a los pacientes con LES no aplicarse vacunas para *S. typhi* por su contenido de poliósidos bacterianos que pueden inducir una posible reactivación y a estar informados cuando dichos pacientes viajen a zonas endémicas de fiebre tifoidea (44,54,62).

Los hallazgos encontrados en este trabajo indican que ciertas clonas de los pacientes con LES inactivo pueden activarse por las PME de *S. typhimurium*, como se ha demostrado para las clonas de células T $\gamma\delta$  que son expandidas de manera significativa in vivo e in vitro por diferentes especies de salmonellas tanto typhi como no typhi. Se ha descrito que estas clonas de células T $\gamma\delta$  tienen una participación destacada en la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos intracelulares (63). Cabe señalar que estas clonas se han encontrando también expandidas en subgrupos de pacientes con LES y se consideran que tienen un papel patogénico en la enfermedad, presumiblemente alterando el equilibrio inmunológico entre células tolerantes y autorreactivas (64).

Es factible que pueda existir reactividad cruzada entre las PME de *S. typhimurium* con las PME de otras enterobacterias en especial *E. Coli* por la alta similitud en el patrón general de expresión de las PME de las enterobacterias (44, 46,51), que bien pudiera explicar la proliferación mononuclear in vitro encontrada



en los pacientes con LES inactivo de este estudio, por contacto previo con dichas enterobacterias, de cualquier forma sería un factor adicional en sujetos susceptibles para desencadenar o reactivar el padecimiento (65) y no se contrapone con el propósito del estudio, sin embargo es indispensable investigar el comportamiento de la proliferación celular de los pacientes con LES inactivo al reto antigénico con PME proveniente de *E. coli* y de otras enterobacterias diferentes a *S. typhimurium*.

TESIS CON  
FALLA EN ORIGEN

## CONCLUSIONES.

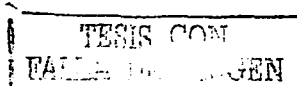
El presente estudio permite analizar una parte de la amplia y compleja relación entre los pacientes con LES y Salmonella. Esta investigación demuestra: que los pacientes con LES inactivo tienen una respuesta inmune celular, medida mediante proliferación celular mononuclear *in vitro* a PME de *S. typhimurium* superior, al compararla con la respuesta en sujetos sanos.

La respuesta inmune humoral obtenida *in vitro* entre los pacientes con LES inactivo y sujetos sanos, medida a través de la determinación de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG e IgM) en los sobrenadantes de los cultivos celulares a PME de *S. typhimurium* fue similar, lo que sugiere que la respuesta inmune desencadenada en los pacientes con LES inactivo es predominantemente celular.

La respuesta proliferativa celular mononuclear *in vitro* en pacientes con LES inactivo a PME de *S. typhimurium* hasta el momento no se había estudiado. El presente trabajo demuestra su existencia.

La importancia clínica de los hallazgos observados en nuestro estudio queda por definirse, es factible su relación en los mecanismos de disparo y activación de LES, cuando esta enfermedad coincide con la infección por Salmonella (37,58,64).

Históricamente se ha considerado la participación de autoantígenos (66,67) en la patogenia de LES, en nuestro estudio se apoya también la participación de antígenos externos de origen bacteriano.



ANEXO No. 1

SLEDAI

Nombre del médico \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
 Nombre del paciente \_\_\_\_\_ No. afiliación \_\_\_\_\_  
 (Anotar la calificación SLEDAI durante la revisión o a los diez días previos).

Peso	SLEDAI Calificación	Descriptor	Definición
8	_____	Crisis Convulsivas	De inicio reciente, excluir causas metabólicas, infecciones o por drogas.
8	_____	Psicosis	Alteraciones graves en la percepción de la realidad alucinaciones, incoherencia, asociaciones vagas, alteraciones del pensamiento lógico, conducta anormal. Excluir uremia y causas por drogas.
8	_____	Síndrome orgánico cerebral	Alteraciones de la memoria, orientación, u otras funciones intelectuales, de inicio rápido y características clínicas fluctuantes. Trastornos de la atención e incapacidad para concentrarse. Además de dos de los siguientes datos: trastornos perceptivos, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia diurna, aumento o disminución en la actividad psicomotora. Excluir causas metabólicas, infecciosas o por drogas.
8	_____	Trastornos visuales	Cambios retinianos lúpicos. Incluye cuerpos vitreos, hemorragias retinianas, exudados serosos, o hemorragias en la coroides, neuritis óptica. Excluir causas como hipertensión, drogas o infección.
8	_____	Trastornos de pares craneales	Nuevo inicio de neuropatía sensitiva o motora afectando nervios craneales.
8	_____	Cefalea lúpica	Dolor de cabeza persistente y severo, puede ser migrañoso y no responde a analgésicos de tipo narcótico.
8	_____	AVC	De reciente aparición, excluir aterosclerosis y hemorragia.
8	_____	Visculitis	Úlceras, gangrena, nódulos hipersensibles en los dedos, infartos perifunguales, hemorragias en astilla, biopsia o angiografía diagnósticas de vasos lúpicos.
4	_____	Artritis	Más de dos articulaciones con dolor y signos de inflamación.
4	_____	Miositis	Dolor o debilidad muscular proximal, con elevación de CK y/o aldolasa, cambios en EMG o biopsia diagnóstica.
4	_____	Cilindros urinarios	Granulosos o eritrocitarios.
4	_____	Hematuria	Más de 5 eritrocitos por campo. Excluir infección, litiasis u otras causas.
4	_____	Proteinuria	Más de .5 g de proteínas en 24 horas. De nuevo inicio o de incremento reciente en relación a la determinación previa.
4	_____	Pluria	Más de 8 leucocitos por campo. Excluir infección.
2	_____	Eritema malar	De nueva aparición o recurrencia, inflamatorio, fotosensible.
2	_____	Alopecia	Nueva o recurrente, localizada o difusa.
2	_____	Úlceras mucosas	Nuevas o recurrentes, orales o nasales.
2	_____	Pleuritis	Dolor pleurítico con derrame, frote o engrosamiento pleural.
2	_____	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes hallazgos: frote, derrame, confirmación ECG o ecocardiográfica.
2	_____	Hipocomplementemia	Disminución de C150, C3, o C4 a menos de la mitad del límite normal.
2	_____	Anti-DNA	FARK > 25 U/ml
1	_____	Fiebre	> 38 oC., excluir infección.
1	_____	Trombocitopenia	< 100,000 plaquetas/mm <sup>3</sup>
1	_____	Leucopenia	< 3,000/mm <sup>3</sup>

Calificación \_\_\_\_\_

TESIS COM  
 FALLA DE CLASEN

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE INVESTIGACION EN INMUNOLOGIA C.M.N. S. XXI  
H.G.R.Z. No. 25

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Por medio de la presente el (la) que suscribe: \_\_\_\_\_ ACEPTO PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION DENOMINADO: RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL IN VITRO A PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE SALMONELLA TYPHIMURIUM EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO INACTIVO.

En el cuál se me tomará una muestra de 10 ml de sangre venosa con equipo nuevo y estéril, con el fin de conocer el efecto que tiene la bacteria conocida como *Salmonella typhimurium* sobre la enfermedad conocida como Lupus eritematoso sistémico. También se que para participar en este estudio tendrán que aplicarme previamente un cuestionario, exploración física y exámenes de laboratorio, con el fin de garantizar que no tengo actividad de la enfermedad ni padezco infecciones.

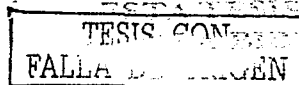
Es de mi conocimiento que se respetará la confidencialidad de los exámenes que se me practiquen y que puedo solicitar información adicional en el momento que yo así lo desee.

En caso de que decida no participar en el estudio, la atención que como paciente recibo en esta Institución no se verá afectada.

FIRMA DEL PACIENTE

FIRMA DE TESTIGO

FIRMA DE TESTIGO



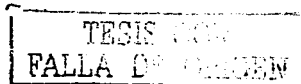
### ANEXO No. 3

#### OBTENCIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA. TECNICA ESTANDARIZADA.

Obtención de sangre periférica del donador:

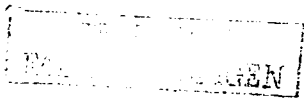
- a) Con jeringa estéril heparinizada, obtener 10 ml de sangre venosa periférica.
- b) Depositar sangre heparinizada en un matraz de 125 ml (con un volumen de 10 ml de PBS sin calcio ni magnesio, dilución 1:2), deslizar la sangre por la pared del matraz y mezclar con movimientos suaves.
- c) En tubo cónico de plástico de 15 ml, depositar 3.5 ml de Lymphoprep (Gibco BRL), luego depositar 7.5 ml de sangre heparinizada y diluida con PBS (se deposita por la pared del tubo cónico), cuidar de no romper interfase.
- d) Centrifugar a 1500 r.p.m. por 30' a 18°C sin freno (Sorvall RT 6000).
- e) Obtener con pipeta Pasteur y bulbo la interfase de células mononucleares (la interfase queda entre el plasma con plaquetas y Lymphoprep, en el fondo quedan granulocitos y eritrocitos).
- f) Depositar la interfase de células mononucleares en un tubo cónico de plástico de 15 ml con 8 ml de RPMI 1640 (Sigma BRL) y lavar las células dos veces (resuspender y centrifugar a 1200 r.p.m. por 10').
- g) El paquete celular se resuspende en 5 ml de RPMI 1640 y se ajusta la cuenta celular a  $1.5 \times 10^6$  células/ml.

Nota: se requiere equipo estéril, las muestras se manejan con guantes y se trabaja en campana de flujo laminar.

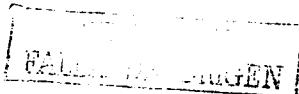


## BIBLIOGRAFIA.

1. Cervera R, Khamashta M, Font J, et al: Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Medicine* 1993;72: 113-123.
2. Steinberg A, Gourley M, Klinman D, et al: Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1991;115:548-559.
3. Austin H, Klippel J, Balow J, et al: Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N. Engl J Med* 1986;314:614-619.
4. McCune J, Golbus J, Zeldes W, et al: Clinical and immunologic effects of monthly administration of intravenous cyclophosphamide in severe systemic lupus erythematosus. *N. Engl J Med* 1988;318:1423-1431.
5. Steinberg A, Steinberg S. Long-term preservation of renal function in patients with lupus nephritis receiving treatment that includes cyclophosphamide versus those treated with prednisone only. *Arthritis Rheum* 1991;34:945-950.
6. Manzi S, Meilahn E, Rairie J, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham study. *Am J Epidemiol* 1997;145:408-415.
7. Ettinger W, Goldberg A, Applebaum-Bowden D, et al. Dislipoproteinemia in systemic lupus erythematosus. Effect of corticosteroids. *Am J Med* 1987;83:503-508.
8. Rahman P, Urowitz M, Gladman D, et al. Contribution of traditional risk factors to coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999;26:2363-2368.
9. Urowitz M, Brookman A, Koehler B, et al: The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1976;60:221-225.
10. Rosner S, Ginzler E, Diamond H, et al: A multicenter study of outcome in systemic lupus erythematosus II. Causes of death. *Arthritis Rheum* 1982;25:612-617.
11. Hochberg M: Epidemiology of rheumatic diseases. *Systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:617-639.
12. Staples P, Gerding D, Decker J, et al: Incidence of infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1974;17:1-10.
13. Ginzler E, Diamond H, Kaplan D, et al: Computer analysis of factors influencing frequency of infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978;21:37-44.
14. Hellmann D, Petri M, Whiting-O'keefe Q: Fatal infections in systemic lupus erythematosus: the role of opportunistic organisms. *Medicine* 1987;66:341-348.
15. Watanabe K, Duffy C, Gladman D: Infection and disease activity in systemic lupus erythematosus: a review of hospitalized patients. *J Rheumatol* 1991;18:1180-1184.
16. Mitchell S, Nguyen P, Katz P: Increased risk of neisserial infections in systemic lupus erythematosus. *Sem Arthritis Rheum* 1990;20:174-184.
17. Cook L, Agnello V: Complement deficiency and systemic lupus erythematosus. En: Robert G. Lahita. *Systemic Lupus Erythematosus*. New York: Churchill Livingstone, 1992: 569-586.

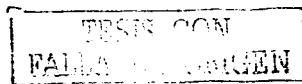


18. Lee A, Levinson A, Schumacher H: Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease. *Sem Arthritis Rheum* 1993;22:252-264.
19. Frank M, Hamburger M, Lawley T, et al: Defective reticuloendothelial system Fc-receptor function in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1979;300:518-523.
20. Salmon J, Kimberly R, Gibofsky A, et al: Defective mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus: dissociation of Fc receptor-ligand binding and internalization. *J Immunol* 1984;133:2525-2531.
21. Hess J, Schaible U, Raupach B, et al: Exploiting the immune system: Toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv Immunol* 2000;75:1-88.
22. Koneman E, Allen S, Dowell V, et al. *Diagnóstico microbiológico*. 3ª. Ed. México: Panamericana, 1998.
23. Brooks G, Butel J, Morse S. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 17ª. Ed. México: El Manual Moderno, 2002.
24. Cherubin C, Neu H, Imperato P, et al: Septicemia with non-typhoid salmonella. *Medicine* 1974;53:365-376.
25. Record E: Case 44012. *N Engl J Med* 1958;258:42-45.
26. Swartz M: Case 11-1968. *N Engl J Med* 1968;278:610-619.
27. Lovy M, Ryan P, Huges G: Concurrent systemic lupus erythematosus and salmonellosis. *J Rheumatol* 1981;8:605-612.
28. Abramson S, Kramer S, Radin A, et al: Salmonella bacteremia in systemic lupus erythematosus. Eighth-year experience at a municipal hospital. *Arthritis Rheum* 1985;28:75-79.
29. Frayha R, Jizi I, Saadeh G: Salmonella typhimurium bacteriuria. An increased infection rate in systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 1985;28:645-647.
30. Medina F, Fraga A, Lavalle C: Salmonella septic arthritis in systemic lupus erythematosus. The importance of chronic carrier state. *J Rheumatol* 1989;16:203-208.
31. Cohen EK, Ho AK, Cheng AE: Salmonella bacteremia occurring concurrently with the first presentation of systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1993;32:66-67.
32. Tite JP, Dougan G, Chatfield SN: The involvement of tumor necrosis factor in immunity to salmonella infection. *J Immunol* 1991;147:3161-3164.
33. Studnicka-Benke A, Steiner G, Petera P, et al. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmunity activity in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996;35:1067-1074.
34. Maury C, Teppo A: Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989;32:146-149.
35. Pablos J, Aragon A, Gomez-Reino J. Salmonellosis and systemic lupus erythematosus. Report of ten cases. *Br J Rheumatol* 1994;33:129-132.
36. Granholm N, Cavallo T: Autoimmunity, policlonal B-cell activation and infection. *Lupus* 1992;1:63-74.
37. Kott M: Superantigens: a link between infection and autoimmunity. *Lupus* 1995;4(Supp 2):136.
38. Röcken M, Shevach E: Do parasitic infections break T-cell tolerance and trigger autoimmune disease?. *Immunol Today* 1993;9:377-380.





39. Kaye D, Gill FA, Hook E: Factors influencing host resistance to salmonella infection: the effects of hemolysis and erythrophagocytosis. *J Med Sci* 1967;254:205-215.
40. Engleman E, Sonnenfeld G, Dauphinee M, et al: Treatment of NZB/NZW F1 hibrid mice with mycobacterium bovis strain BCG or type II interferon preparations accelerates autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1981;24:1396-1402.
41. Alcocer J, Alarcón D: Decreased production and response to interleukin-2 cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1982;69:1388-1392.
42. Tsokos G. Overview of celular immune function in systemic lupus erythematosus. En: Robert T G. Lahita, *Systemic Lupus Erythematosus*. New York: Churchill Livingstone 1992: 15-50.
43. Susuki N, Sakane T: Induction of excessive B cell proliferation and differentiation by an in vitro stimulus in culture in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1989;83:937-944.
44. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, et al. Protection against salmonella typhi infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from salmonella typhi 9,12,d,Vi. *Infect Immun* 1988;56:2953-2959.
45. Kuusi N, Nurminen M, Saxén H, et al. Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infec Immun* 1981;34:328-332.
46. Osborn M, Gander E, Parisi E, et al. Mechanism of assembly of the outer membrane of salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J Biol Chem* 1972;247:3962-3972.
47. Blanco F. Respuesta inmune celular a porinas de salmonella typhi en la respuesta inmune en humanos. Tesis de grado de Maestría en Ciencias Médicas. Fac. Med. UNAM., 1990.
48. González C, Isibasi A, Ortiz V, et al: Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from salmonella. *Microbiol Immunol* 1993;37:793-799.
49. Blanco F, Isibasi A, González C, et al: Human cell mediated immunity to porins from salmonella typhi. *Scand J Infect Dis* 1993;25:73-80
50. Ramarathinam L, Niesel D, Klimpel G: Salmonella typhimurium induces IFN-gamma production in murine splenocytes. *J Immunol* 1993;150:3973.
51. Yaegashi Y, Nielsen P, Sing A, et al: Interferon  $\beta$ , a cofactor in the interferon  $\gamma$  production induced by gram-negative bacteria in mice. *J Exp Med* 1995;181:953-960.
52. Tan E, Cohen A, Fries J, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
53. Bombardier C, Gladman D, Urowitz M, et al: Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-640.
54. Pérez C, Calderón M, Ximénez C, et al: Human cell-mediated immune responses to antigenic fractions of salmonella typhi. *Immunology* 1996;89:262-267.
55. Behar S, Porcelli S: Mechanisms of autoimmune disease induction. *Arthritis Rheum* 1995;38:458-476.



56. Ching-Hsiung T, Chung-Yi C, Liang-Shiou O, et al: Risk Factors of mortality for salmonella infection in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29:1214-1218.
57. Horwitz D, Gabrett M: Lymphocyte reactivity to mitogens in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and scleroderma. *Clin Exp Immunol* 1977;27:92-99.
58. Gottlieb A, Lahita R, Chiorazzi N, et al: Immune function in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1979;63:885-891.
59. Bao S, Beagley K, France M, et al: Interferon- $\gamma$  plays a critical role in intestinal immunity against salmonella typhimurium infection. *Immunology* 2000;99:464-472.
60. Kaufmann S: Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunology Today* 1995;16:338-342.
61. Pace J, Hayman M, Galán J: Signal transduction and invasion of epithelial cells by *s. typhimurium*. *Cell* 1993;72:505-514.
62. Hayem G, Kassis N, Nicaise P, et al: Systemic lupus erythematosus-associated catastrophic antiphospholipid syndrome occurring after typhoid fever. *Arthritis Rheum* 1999;42:1056-1061.
63. Hara T, Mizumo Y, Takaki K, et al: Predominant activation and expansion of  $V\gamma 9$ -bearing  $\gamma\delta T$  cells in vivo as well in vitro in salmonella infection. *J Clin Invest* 1992;90:204-210.
64. Al-Janadi M, Raziuddin S: B cell hyperactivity is a function of t cell derived cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993;20:1885-1891.
65. Gauthier T, So A: Vasculitis and bacteraemia with yersinia enterocolitica in late-onset systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1997;36:1122-1124.
66. Crow M, Delgiudice G, Zehetbauer JB, et al: Autoantigen specific T cell proliferation induced by the ribosomal P2 protein in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994;95:345-351.
67. Bockenstedt L, Gee R, Mamula M: Self-peptides in the initiation of lupus autoimmunity. *J Immunol* 1995;154:3516-3524.

FALLA DE ORIGEN