

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICA Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESTUDIO PILOTO PARA EVALUAR LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA SISTÉMICA POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO EN
PERSONAS CRÓNICAMENTE INFECTADAS POR EL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA HUMANA MEDIANTE EL USO DE INHIBIDORES DE LA
ACETILCOLINESTERASA

Tesis que, para obtener el título de especialista en Neurología Clínica,
presenta Sergio Iván Valdés Ferrer.

Tutor:

Dr. Carlos Gerardo Cantú Brito, Departamento de Neurología

México, D.F., octubre del 2006



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.

A Lilia porque desde su llegada todo valió la pena.

A Victoria Eugenia Ferrer y Carlos Manuel Valdés, mis padres. De ambos he aprendido el amor al conocimiento y heredado la inquietud intelectual.

A los que me han develado la pasión por la medicina: Juan Rull y a Donato Alarcón Segovia.

A Paco Belaunzarán y José Carlos Crispín por llevar la amistad al nivel de la hermandad y porque -después de muchos desvelos- han sido mis cómplices en esta aventura.

A Carlos Cantú. Es mi tutor pero antes un neurólogo ejemplar y un maestro generoso.

A Juan Sierra por ser escéptico y, como tal, motor de este esfuerzo. Además, claro está, porque el escepticismo fue una extensión de la amistad y la confianza.

A Gerardo Gamba por generar dudas e inquietud científica, por su mente privilegiada y por su enriquecedora amistad.

A mi alma mater, la UNAM y a su advocación, el INCMNSZ.

Contenido

1. Introducción
 - a. Hipótesis
 - b. Justificación
 - c. Objetivos
2. Métodos
 - a. Criterios de elección
 - b. Criterios de eliminación
 - c. Cálculo del tamaño de muestra
 - d. Método de análisis
3. Resultados
 - a. Figura 1. Activación celular postestímulo con piridostigmina o placebo
 - b. Figura 2. Células T reguladoras pre y postestímulo
 - c. Figura 3. proliferación celular postestímulos no específico (PHA o PMA+ionomicina)
4. Discusión de resultados
5. Bibliografía

Introducción

La sobreproducción de ciertas citocinas proinflamatorias (p.ej., IL-1, TNF- α , grupos de alta movilidad) puede inducir una respuesta inflamatoria sistémica de tal magnitud –incluso ante estímulos antigénicos menores- que condicione la muerte del individuo o al menos un daño tisular intenso e irreversible. Este daño se ha demostrado de manera experimental en modelos animales sometidos a inyecciones titulares de tales citocinas proinflamatorias en ausencia de estímulos nocivos (p.ej., bacterias). El resultado es una respuesta inflamatoria exacerbada que es el principio fisiopatológico del choque séptico. Por poner otro ejemplo es difícil entender por qué en una población de pacientes infectados unos serán capaces de montar una respuesta inflamatoria adecuada y otros –la minoría- montarán una respuesta amplificada que les condicionará un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

El mecanismo reflejo de inflamación consiste de vías tanto aferentes como eferentes vagales que sensan –a través de la primera- la presencia de IL-1 y TNF- α y ante éstas, (a través de la vía eferente) producen una modulación de la respuesta inflamatoria gracias a la secreción de acetilcolina en todas las terminales sinápticas vagales. Tal liberación estimula receptores colinérgicos nicotínicos (tipo $\alpha 7$) en macrófagos y probablemente en linfocitos T con lo que hay regulación a la baja de la respuesta celular inflamatoria y disminución en la producción y liberación de citocinas.

Hasta el momento no existen modelos humanos de modulación de la respuesta inmune por el sistema nervioso autónomo, mas se sabe que los macrófagos ex-vivo sometidos a concentraciones crecientes de acetilcolina liberan menores cantidades de citocinas. Existe un experimento sencillo pero elegante en ratones a los que se les induce de manera quirúrgica isquemia suprarrenal: aquellos que fueron sometidos a estimulación vagal mediante un electro-estimulador antes de la cirugía montaron una respuesta inflamatoria

más satisfactoria, toda vez que la concentración de TNF fue menor y la presión arterial no mostró variaciones graves en comparación con los ratones no sometidos a estimulación vagal. Con lo anterior queda claro que la respuesta inflamatoria puede ser modulada con maniobras que amplifiquen la respuesta vagal. Dos problemas surgen pensando en estimulación directa: la acetilcolina en suero es inestable y se disocia rápidamente en acetil-CoA y colina; el segundo es que la estimulación vagal es cara y requiere de la colocación quirúrgica de un estimulador.

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa (I-ACh-e) son medicamentos fácilmente disponibles cuyo efecto es disminuir la degradación de la acetilcolina periférica en cualquier terminal sináptica (autónoma o motora), con lo que aumenta su biodisponibilidad y su capacidad para fijarse a los receptores colinérgicos tanto muscarínicos como nicotínicos.

Los I-ACh-e son medicamentos con los que se tienen más de 50 años de experiencia en sujetos con problemas postsinápticos de la placa neuromuscular y que han demostrado ser eficientes y seguros incluso en sujetos sanos o sin afecciones neuromusculares como se explicará a continuación. Dado que son bloqueadores reversibles de la acetilcolinesterasa, los I-ACh-e han sido utilizados como profiláctico contra gases neurotóxicos (que son I-ACh-e irreversibles) en sujetos sanos y en soldados en la primera guerra del Golfo. Durante el período de prueba no hubo efectos adversos serios y en general los efectos adversos fueron raros (<1%) y en un estudio después de 6 años no se demostró que hubieran disparado o potenciado efectos adversos mayores.

Es imposible medir o predecir en quién se montará una respuesta inflamatoria exagerada en una población abierta sin embargo, las personas crónicamente infectadas por el VIH, a pesar de la inmunodeficiencia provocada por la infección, están en un estado de

hiperactividad del sistema inmune que utiliza el virus para aumentar su replicación. De hecho se ha observado que las respuestas proliferativas ante diferentes antígenos son más intensas durante las etapas tempranas de la enfermedad que durante la inmunosupresión avanzada. Esta hiperactividad crónica, además de ser utilizada por el virus para su replicación tiene efectos deletéreos a largo plazo sobre la capacidad de respuesta inmune ante otros antígenos y se ha asociado a desajustes en la regulación de la red de citocinas del hospedero. La infección por el VIH se ha asociado a un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias secretadas por macrófagos y células mononucleares de sangre periférica (TNF- α , IL-1 β , IL-6), que a su vez estimulan la replicación viral por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. A la luz de estas observaciones se ha intentado el uso de diversos inmunomoduladores (ciclosporina, pentoxifilina, prednisona, mofetil micofenolato, talidomida, estatinas) con relativo éxito con el fin de disminuir la replicación viral o atenuar la destrucción de células T CD4+. La infección por el VIH como modelo para probar el efecto inmunomodulador in vivo de la acetilcolina, tiene la ventaja de limitar el número de variables a considerar a comparación de cuando se estudian procesos inflamatorios graves como la sepsis.

Hipótesis

La proporción de células T activadas in vivo, así como el incremento en la respuesta proliferativa ante estímulos policlonales y la producción exagerada de citocinas proinflamatorias (de células T y macrófagos), disminuyen en los pacientes a quienes se les administre el inhibidor de la acetilcolinesterasa.

Justificación

El sistema nervioso autónomo regula la respuesta inflamatoria sistémica a través de la liberación de acetilcolina por el nervio vago. El uso de los inhibidores de la acetilcolinesterasa incrementa su biodisponibilidad y la capacidad para fijarse a los receptores colinérgicos de los tejidos periféricos, incluyendo macrófagos y linfocitos. La infección crónica por el VIH ocasiona un estado de respuesta inflamatoria persistente que aparentemente contribuye al daño del sistema inmune durante la infección. La administración de un inhibidor de la acetilcolinesterasa en personas crónicamente infectadas por el VIH podría disminuir esta respuesta inflamatoria al activar un subtipo de receptores nicotínicos (α -7) que regulan a la baja la liberación de TNF e IL-1.

¿Por qué la utilización de Piridostigmina? Es inespecífica en sus efectos (produciendo estimulación colinérgica tanto nicotínica como muscarínica) con poca penetración al SNC. Nuestra hipótesis (vide supra) era que habría una regulación a la baja en la liberación de citocinas proinflamatorias esencialmente ubicua (al menos en todos aquellos tejidos inervados por el nervio vago). Hay evidencia de su poca toxicidad en sujetos sanos, es un medicamento de bajo costo y de fácil acceso. En contraparte su cinética es poco predecible y su metabolismo varía marcadamente entre individuos. De cualquier manera, la dosis a utilizar es una dosis segura que ha sido probada en sujetos sanos, con aparición de efectos

adversos gastrointestinales en menos de 1% de los pacientes y que en esencia no generó abandonos de tratamiento.

Ante la pregunta de porqué realizar el estudio en pacientes con SIDA, la respuesta es porque es un grupo de pacientes en los que sabemos que la respuesta inflamatoria predeciblemente se montará a corto plazo.

Objetivos

1. Evaluar el efecto de la administración de piridostigmina en la actividad del sistema inmune de pacientes con infección crónica por el VIH.
2. Cuantificar la proporción de células T CD4+ activadas in vivo en pacientes pre y post exposición a piridostigmina.
3. Medir la producción de citocinas proinflamatorias pre y post exposición a piridostigmina.
4. Medir la respuesta proliferativa de células T CD4+ ante estímulos policlonales pre y pos exposición a piridostigmina.

Métodos

El presente es un estudio piloto experimental, prolectivo, longitudinal y aleatorizado que compara el efecto de la administración de una dosis baja de piridostigmina contra placebo sobre marcadores de la respuesta inmune en dos grupos de pacientes con infección crónica por el VIH que no estén recibiendo terapia antirretroviral.

Invitamos a 20 pacientes con infección por VIH con o sin SIDA que no requiriesen de tratamiento para tal problema (cuentas de linfocitos T CD4⁺ mayores a 250 células / μ L y sin enfermedades infecciosas, neoplásicas, enfermedades autoinmunes u otros estados proinflamatorios concomitantes).

Los sujetos fueron divididos en dos grupos: un grupo activo al que se le darían cápsulas de piridostigmina (Mestinon®) a dosis bajas (30 mg cada 8 horas) y un grupo control al que se le dieron cápsulas idénticas de placebo. En ambos grupos se tomo una muestra basal de 20ml de sangre periférica de la que se estudiaron las características funcionales de las células T CD4⁺ y la carga viral del VIH. Una semana después se hizo una nueva toma de 20ml de sangre periférica. A cada muestra se le realizaron los siguientes ensayos:

- a) Cuantificación de poblaciones celulares en sangre periférica (citometría de flujo):
 - a. Células T CD4⁺ y CD8⁺.
 - b. Células T vírgenes (CD62L⁺, CD44⁻) y de memoria (CD45RA⁻, CD62L⁻, CD44⁺).
 - c. Células T activadas (CD4⁺DR, CD69⁺)
 - d. Células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺, FoxP3⁺).
- b) Evaluación de la proliferación de células T CD4⁺ ante un estímulo policlonal (PMA + ionomicina) (anti-CD3 + anti-CD28).

El medicamento se inició inmediatamente después de la toma basal de sangre y se tomó tres veces al día, siendo la última toma del medicamento no más de 3 horas antes de la toma de muestra post exposición.

Criterios de selección

Criterios de Inclusión

- 1) Hombres o mujeres con infección por VIH
- 2) Individuos mayores de 18 años de edad
- 3) Linfocitos CD4+ \geq 200 cel/ml
- 4) Carga viral de VIH $>$ 50 copias/ml
- 5) Sin tratamiento antirretroviral
- 6) Firma de consentimiento informado

Criterios de Exclusión

- 1) Infección concomitante aguda activa al momento de la aleatorización.
- 2) Embarazo o lactancia.
- 3) Individuos que han recibido tratamiento con un agente en investigación, quimioterapia, o radioterapia dentro de los primeros 28 días previos a la primera toma del tratamiento del estudio.
- 4) Individuos que han recibido tratamiento con un agente en investigación dentro de los 28 días previos a la toma de tratamiento del estudio.

- 5) Sujeto que se encuentra recibiendo o requieren iniciar tratamiento antifímico.

- 6) Sujeto que sufre un problema psicológico o trastorno de adicción que pudiera comprometer la adherencia a las indicaciones del protocolo.

Criterios de Eliminación

- 1) Eventos adversos serios o que pusieran en riesgo la integridad de los sujetos
- 2) Muerte
- 3) Progresión de la enfermedad
- 4) Embarazo
- 5) Pérdida del seguimiento
- 6) El sujeto retira su consentimiento
- 7) Falta de apego al tratamiento o violación al protocolo
- 8) Decisión del investigador en beneficio del sujeto

Cálculo del tamaño de muestra

No existen precedentes de un estudio similar en la literatura. Por ese motivo, se han tomado en cuenta estudios análogos, pero en poblaciones diferentes (en pacientes con enfermedades autoinmunes). En base a lo anterior se consideró que la cuantificación de 40 muestras (2 a cada paciente) será suficiente para detectar cambios significativos.

Métodos de Análisis

Los valores descriptivos se expresaron como el promedio \pm desviación estándar (DE). Las variables con distribución normal se analizaron con la prueba t de Student. Para aquellas con otro tipo de distribución se utilizará la prueba de Mann-Whitney. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

Resultados

Datos demográficos y basales

Encontramos diferencias basales entre aquellos pacientes que recibieron placebo y los que recibieron Piridostigmina en cuanto a edad (27.7 vs. 43.3 años), género (relación hombre/mujer 9:1 para placebo, 6:3 para piridostigmina), duración de la enfermedad (32.2 meses vs. 51.33) y conteo de linfocitos T CD4⁺ (487 vs. 777 células/ μ L).

No encontramos, en contraparte, diferencias entre las mediciones basales de linfocitos T CD4⁺ ni entre los linfocitos T activados (CD4⁺DR⁺, CD69⁺), reguladores (CD4⁺CD25⁺, FoxP3⁺), vírgenes (CD62L⁺, CD44⁻) y de memoria (CD45RA⁻, CD62L⁻, CD44⁺).

En cuanto a la proporción de linfocitos T activados, encontramos una disminución en los sujetos que tomaron piridostigmina respecto al basal, usando tanto CD4⁺DR⁺, como CD69⁺ como marcadores de activación; este último con una diferencia significativa ($p=0.025$) respecto al basal (figura 1).

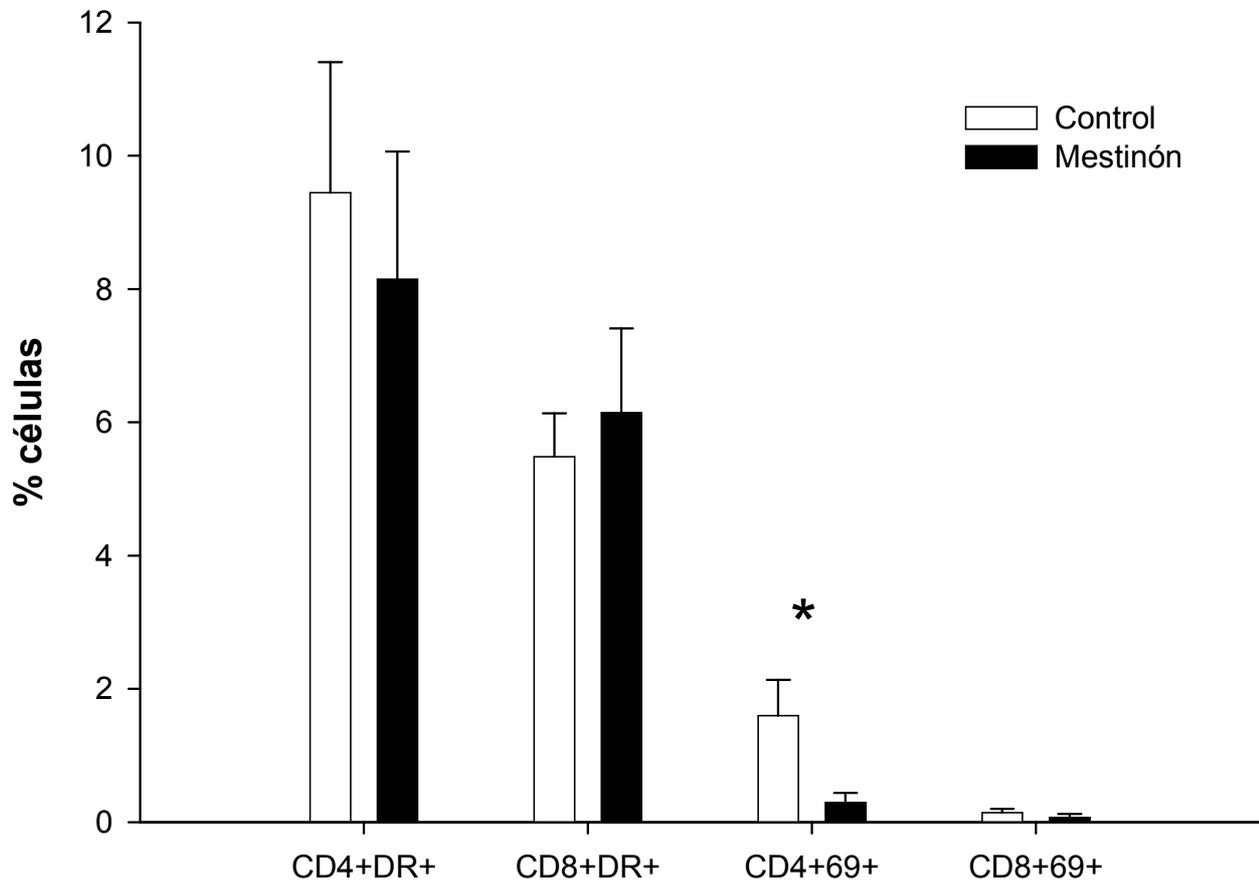
Con respecto a la proporción de células T reguladoras pre y postestímulo, hubo un incremento entre el basal y el momento postestímulo (figura 2). Los sujetos que tomaron Piridostigmina mostraron un incremento en estas células en una proporción de casi 2:1 respecto a aquellos sometidos a placebo. Aunque esta elevación no mostró una diferencia estadísticamente significativa, es claro que en aquellos sometidos a Piridostigmina incrementaron las células reguladoras de manera solidamente predecible respecto al basal, mientras que en los sujetos que usaron placebo no hubo tal elevación.

La proliferación celular fue medida usando estímulos mitogénicos inespecíficos como se comenta arriba. Fue interesante ver como las curvas de proliferación celular sin estímulo fueron semejantes en ambos grupos, más al ser sometidas a tales estímulos la proliferación celular es claramente menor en aquellos que usaron Piridostigmina. En los

sujetos que tomaron piridostigmina la proliferación con PHA a dosis bajas es muy semejante a la proliferación sin estímulo y, aunque se incrementa de manera clara con dosis mayores en ambos grupos, la proliferación celular es claramente menor entre los sujetos que usaron piridostigmina. (Tabla 3.)

Respecto a la proliferación celular, al ser sometidas las células a PMA+ionomicina nuevamente hubo un incremento contra las células que no recibieron dicho estímulo. La proliferación ante estímulo -tanto a dosis bajas como altas- fue mucho menor en los sujetos que usaron piridostigmina. Tal disminución en la proliferación fue más clara antes dosis bajas de PMA+ionomicina, en donde hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.026$). Esta diferencia no se reprodujo a dosis mayores pero la proliferación fue igualmente menor entre grupos. (Tabla 3.)

Figura 1. Activación celular postestímulo con piridostigmina o placebo.



* $P=0.025$

Figura 2. Células T reguladoras pre y postestímulo

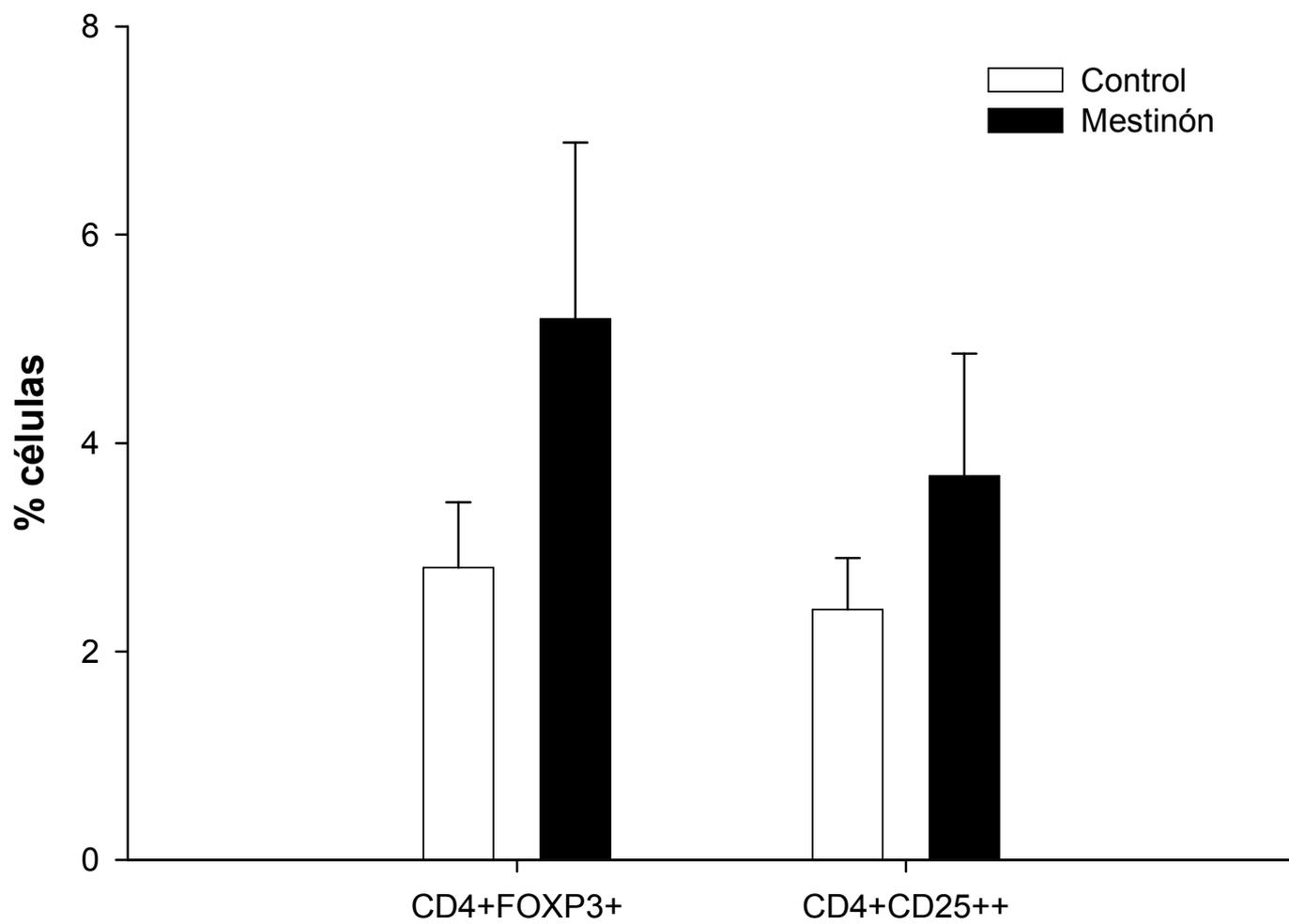
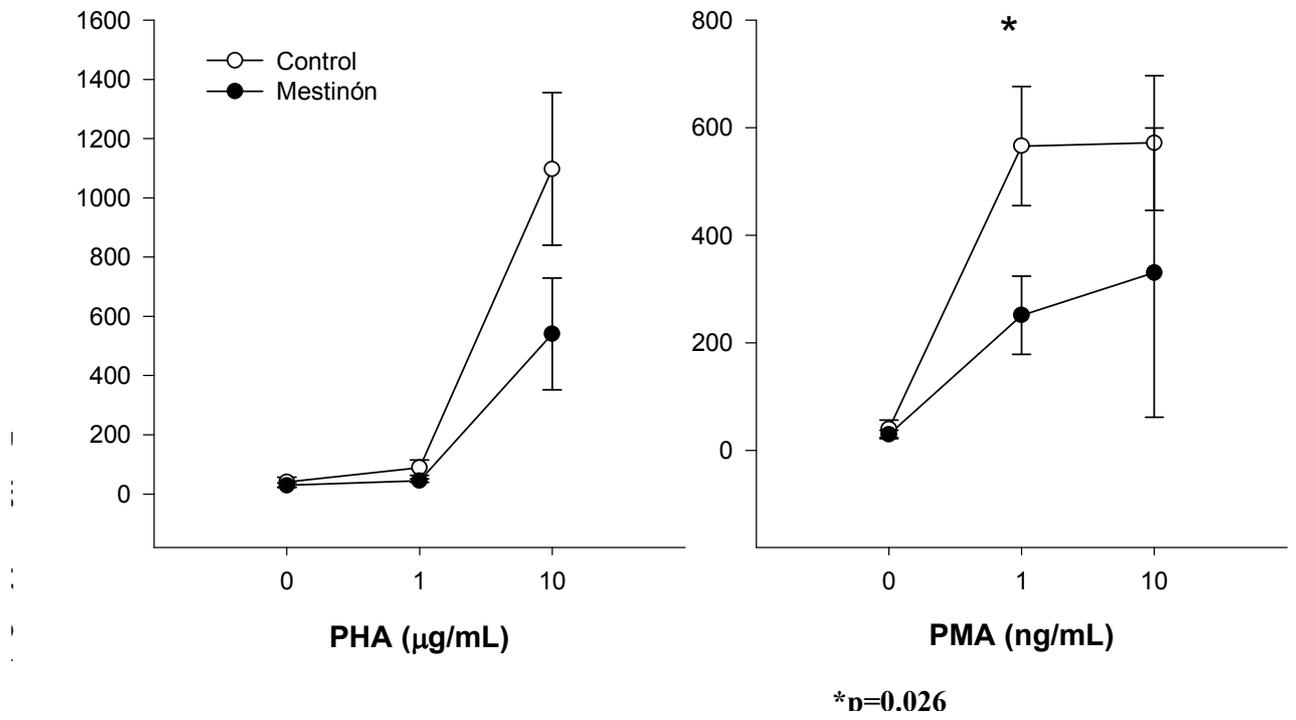


Figura 3. proliferación celular postestímulos no específico (PHA o PMA+ionomicina).



Discusión

La relación entre el sistema nervioso autónomo y la respuesta inflamatoria sistémica ha sido materia de incertidumbre y estudio, pero no fue sino hasta que el grupo de Kevin J. Tracy encontró las primeras evidencias de modulación de la respuesta inflamatoria a estímulos diversos como endotoxina (Borovikova y cols.) o isquemia renal, entre otros. Ellos mismos describieron un receptor colinérgico en células presentadoras (Wang) de antígenos que al ser estimulado disminuía la liberación de citocinas inflamatorias a la circulación, siendo esta disminución postranscripcional.

La infección por VIH se caracteriza por un estado de sobreactivación persistente de las células T y alteración en las frecuencias de células T reguladoras, lo que puede tener un efecto proapoptótico que induzca los niveles bajos de células T en poblaciones selectas como aquellos no respondedores al tratamiento antirretroviral.

Con esa base de evidencia decidimos hacer este estudio usando por primera vez para tal motivo a la Piridostigmina. Nuestra hipótesis era que ésta, como inhibidor periférico de acetilcolinesterasa, la enzima degradadora de la acetilcolina, haría que la acetilcolina tuviera una vida media plasmática mayor y por tanto mayor capacidad de estimulación sobre las células presentadoras de antígenos y de esta manera funcionar como inmunoreguladora.

La disminución en la activación celular y en la proliferación ante estímulos mitogénicos en los pacientes que usaron piridostigmina contra aquellos que usaron placebo muestra claramente que podría ser planteada como alternativa terapéutica en estudios de fase II como modulador de la respuesta inflamatoria en estados de sobreactividad inflamatoria, tales como la infección crónica por VIH, el síndrome de respuesta inflamatoria que acompaña al choque séptico o algunos casos selectos de fenómenos autoinmunes.

La razón por la cual actúa son meramente hipotéticas (vide supra) y una evaluación formal estaría plenamente justificada, aunque no dudo que al menos parcialmente el efecto inmunomodulador sea debido a estimulación indirecta de la acetilcolina sobre las células mononucleares.

Este estudio tiene claras limitaciones desde el momento que se plantea como piloto. La idea era probar la veracidad y factibilidad de un concepto y por ende la muestra es pequeña. Quizás esta última sea la razón por la que a pesar de que las tasas de activación y modulación fueron mejores en sujetos con Piridostigmina, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Otra limitación del estudio es la diferencia que hubo entre ambos grupos en cuanto a variables demográficas. A pesar de que los sujetos control (grupo placebo) eran más jóvenes y tenían una menor duración de la enfermedad, lo que de manera teórica debería ser un impulsor de una mejor respuesta inflamatoria sistémica, la mejoría favorece claramente a la Piridostigmina.

Esta tesis muestra únicamente resultados preliminares y faltan por ser reportadas algunas otras variables como la producción de citocinas, lo cual será parte de la publicación in extenso.

Bibliografia

1. Tracy KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859
2. Serhan C, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology* 2005; 6: 1091-109
3. Tracey KJ, Czura CJ, Ivanova S. Mind over immunity. *FASEB J* 2001; 15, 1575–1576 Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg* 2002;36:1231-6
4. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed J, Czura CJ, Tracey JC. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421; 384-388
5. The Iowa Persian Gulf Study Group. Self-reported Illness and Health Status Among Gulf War veterans. A population-Based Study. *JAMA* 1997;277;238-245
6. Keeler JR, Hurst CG, Dunn MA. Pyridostigmine Used as a Nerve Agent Pretreatment Under Wartime Conditions. *JAMA* 1991;266;693-695
7. Del Real G, Jiménez Baranda S, Mira E, y cols. Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *J Exp Med* 2004; 200: 541-547
8. Haley RW, Thomas KL. Self reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf war. *JAMA* 1997; 277: 231-237
9. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, y cols. HIV-specific CD8⁺ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in non-progressors. *Nat Immun* 2002; 3; 1061-1068

10. Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, y cols. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo. Proof-of-concept study. *Lancet* 2005; 366: 549-555
11. Groux H, Torpier G, Monté D, y cols. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; 175: 331-340
12. Borovikova LV, Ivanova S; Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 6785