



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

TÍTULO:
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE SUBPOBLACIONES
DE LINFOCITOS T EN PACIENTES CON
MIOPATÍA INFLAMATORIA IDIOPÁTICA

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA
P R E S E N T A

DR. HECTOR FABRICIO ESPINOSA ORTEGA

TUTOR:

DR. JORGE ALCOCER VARELA

MÉXICO, D.F. 2012





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.

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIDAD

Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela

DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez
Jefe de Enseñanza

Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela
Jefe del Departamento de Inmunología y Reumatología

ASESOR DE TESIS

Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela

Asesor Titular de la Tesis

Dra. Diana Gómez Martín

Co-Asesora de Tesis

Dra. Karina Santana De Anda

Asesor Metodológico

DEDICATORIA

A mi familia Mónica y Bruno
Por siempre comprender mis ausencias y
apoyarme en cada reto

A mis padres y hermano
Por enseñarme a competir conmigo mismo para superarme
y darme herramientas para lograrlo

Al Dr Jorge Alcocer, Dra Diana Gómez y Dra Karina Santana
Por el gran apoyo incondicional y
creer en mí desde el principio

A mi maestro y colega, Dr. Alejandro Arce
Por enseñarme el camino de la Medicina

ÍNDICE

I.	Resumen.....	7
II.	Introducción.....	8
III.	Justificación.....	13
IV.	Objetivos.....	14
V.	Hipótesis.....	15
VI.	Metodología.....	16
VII.	Análisis Estadístico.....	20
VII.	Aspectos Éticos.....	20
VIII.	Resultados.....	21
IX.	Discusión.....	26
X.	Conclusiones.....	29
XI.	Anexos.....	30
XII.	Referencias.....	32

RESUMEN

Análisis cuantitativo de subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con Miopatía Inflamatoria Idiopática

Introducción

El papel de las células T en las miopatías inflamatorias idiopáticas aun no es claro. Se han reportado alteraciones en subpoblaciones de linfocitos T a nivel tisular (músculo); sin embargo, la frecuencia de dichas subpoblaciones celulares no ha sido estudiada en sangre periférica de pacientes con esta patología.

Objetivo

Cuantificar las subpoblaciones celulares denominadas T reguladoras, TH17, CD28null y foliculares en sangre periférica de pacientes con miopatía inflamatoria idiopática.

Métodos

Se incluyeron 19 pacientes (16 dermatomiositis/ 3 polimiositis) y 19 controles sanos pareados por edad y sexo. A partir de sangre venosa periférica se aislaron células mononucleares por gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque). Se realizó tinción de superficie e intracelular con anticuerpos monoclonales para caracterizar, mediante citometría de flujo, definiéndose las siguientes subpoblaciones celulares: reguladoras (CD4+CD25high+FOXP3; CD8+CD25highFOXP3), Cooperadoras TH17 (CD4+IL17A+), CD28null (CD4+CD28-CD244+), así como foliculares periféricas (CD4+CXCR5+) y subclases de éstas (foliculares TH1 (CXCR3+CCR6-), TH2 (CXCR3-CCR6-) y TH17 (CXCR3+CCR6+). Se obtuvieron los porcentajes, números absolutos e intensidad media de fluorescencia para cada subpoblación. Se analizaron frecuencias, números absolutos e intensidad media de fluorescencia.

Resultados

Se analizaron 16 pacientes con dermatomiositis (DM) y 3 con polimiositis (PM); 6/16 del grupo con DM y 1/3 con PM se encontraban vírgenes a tratamiento. Se compararon pacientes vs controles y pacientes sin tratamiento vs pacientes con tratamiento. La edad promedio de los pacientes fue de 43.7 ± 12.68 años. La media del tiempo de evolución para aquellos pacientes en tratamiento fue de 4 años. Se encontró linfopenia en los pacientes respecto a controles; y en pacientes activos sin tratamiento, ésta fue más profunda respecto a los ya tratados. No se encontraron diferencias entre las poblaciones de células reguladoras, TH17 ni foliculares en sangre periférica, sin embargo se observó una tendencia a un aumento en la población de células TH17 en los pacientes sin tratamiento vs con tratamiento ($p=0.079$). Los pacientes con miopatía inflamatoria mostraron un incremento en la frecuencia de células CD4+CD28null en comparación al grupo control (4.16 vs 0.72%, $p = 0.032$).

Conclusiones

El perfil cuantitativo de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de pacientes con miopatía inflamatoria se caracteriza por un incremento en la frecuencia de células CD4+ CD28null en sangre periférica en comparación con controles sanos.

INTRODUCCIÓN

Las miopatías inflamatorias son un grupo de enfermedades adquiridas tanto agudas, subagudas como crónicas del músculo esquelético. Tienen en común la presencia de debilidad moderada a severa e inflamación a nivel muscular.¹ Las manifestaciones musculares pueden acompañarse de hallazgos extra-musculares a nivel cutáneo, gastrointestinal, cardíaco, y pulmonar. Las tres principales entidades son: dermatomiositis, polimiositis, miopatía por cuerpos de inclusión y la emergente miopatía necrotizante autoinmune. Todas estas se diferencian unas de otras con base en hallazgos clínicos, histológicos y electrofisiológicos.

La baja frecuencia de estas entidades así como su heterogeneidad ha limitado el entendimiento de su etiopatogenia y genética así como la estandarización en el diagnóstico y tratamiento. Las estimaciones epidemiológicas se basan en viejas propuestas clasificatorias y van de 0.6- 1.0/100,000 hasta 2-10/1,000,000 personas.²

El diagnóstico se sustenta con elevación de enzimas musculares (e.g. CPK, aldolasa, etc), hallazgos electromiográficos compatible con patrón miopático (e.g. actividad espontánea con fibrilaciones, unidades polifásicas de baja amplitud y corta duración, etc) pero el estándar de oro es la biopsia de músculo donde las características son particulares de las subclases.

PATOGENESIS

Tres mecanismos efectores principales han sido propuestos como importantes para el desarrollo de inflamación muscular³:

- efectos directos de leucocitos infiltrantes, principalmente células T y macrófagos en células musculares (e.g. citotoxicidad)
- efectos indirectos de moléculas del sistema inmune (citoquinas y otras) sobre el metabolismo muscular y su función
- involucro de microvasculatura y microcirculación alterada, que podría llevar a alteraciones adquiridas del metabolismo y por lo tanto función muscular reducida.

La presencia de linfocitos T en tejido muscular en la mayoría de los pacientes con miositis y la frecuentemente detectada presencia de autoanticuerpos indican que mecanismos inmunes están involucrados en la patogenia de estos desórdenes y que tanto linfocitos B y T pueden tener un papel patogénico.

FISIOPATOGENIA

Respuesta inmune humoral

Hasta 80% de los pacientes tienen presencia de anticuerpos antinucleares o contra antígenos específicos⁴. Algunos de estos anticuerpos están asociados a fenotipos particulares (e.g. Mi-2 muestran gran asociación con DM)⁵. En este sentido, algunos anticuerpos generan sobreexpresión de moléculas de adhesión vascular (e.g. VCAM-1)⁶ incrementando la diapédesis de células linfocitarias a tejido muscular periendomisial y endomisial.

Respuesta inmune celular (Papel de linfocitos T)

Las miopatías inflamatorias idiopáticas son clasificadas como autoinmunes bajo el hecho de que existen anticuerpos contra antígenos específicos (e.g. Jo-1) y por la presencia de linfocitos T en tejido muscular. Existen dos patrones distintos de presentación, localización y subclases de linfocitos: uno está dominado por células B, células CD4+, macrófagos, células plasmáticas y dendríticas que se presenta principalmente, pero no de manera exclusiva, en DM⁷; el otro compuesto por macrófagos, células dendríticas, linfocitos T CD4+ y CD8+ distribuidos en fibras endomisiales y ocasionalmente invadiendo fibras no necróticas, característico de polimiositis.⁸ De acuerdo a estas observaciones se ha propuesto la existencia de dos vías diferentes.

La distribución celular también se encuentra alterada en sangre periférica. En dermatomiositis activa, se han descrito frecuencias disminuidas de linfocitos T CD3+ y CD8+ y disminución en la expresión de IFN- γ por linfocitos CD4+ y CD8+, mientras que existe un incremento en la frecuencia de linfocitos B y linfocitos T CD4+ productores de IL-4.

En polimiositis se ha observado que existen alteraciones sustanciales en el repertorio de células T en sangre periférica, debidas a la expansión oligoclonal de células T CD8+; la mayoría de las expansiones clonales observadas en sangre corresponden a las observadas en el músculo⁹ por lo que probablemente resultan de la recirculación de estas células que muestran un fenotipo de memoria, expresan perforina intracelular y responden a estimulación con IL-2.¹⁰

En algunos pacientes, los linfocitos T se encuentran presentes en tejido muscular aun tratados con glucocorticoides e inmunosupresores. En este contexto, una subclase de células T es de particular interés: CD28^{null}. Se ha visto que estas células se encuentran clonalmente expandidas tanto en sangre periférica en otras entidades autoinmunes (e.g. AR) así como en biopsias musculares de pacientes con miositis y las funciones atribuibles son sobreexpresión de receptores activadores de células NK y producción de citoquinas inflamatorias, como IFN- γ y TNF α . A pesar de la asociación de estas células con actividad en miositis, aún no se define su papel en los mecanismos de enfermedad.

NUEVAS VÍAS EN RESPUESTA CELULAR

Las células T reguladoras (Treg) son células reguladoras/supresoras y representan el 5% de los linfocitos CD4+CD25+. CD25+ ha mostrado ser esencial para el mantenimiento de las Treg en el sistema inmune. La función supresora y de regulación es desencadenada por FOXP3 (Forkhead box P3), un factor de transcripción que se expresa casi exclusivamente en linfocitos CD4+, y algunos CD8+, tanto de manera innata como adquirida¹¹. La implicación en enfermedades autoinmunes se ha observado en modelos murinos y humanos deficientes de células Treg.¹² La expresión de estas células en biopsias de músculo de pacientes con MII, correlaciona con el grado de actividad y es reflejada como se ha reportado en algunos trabajos, con la expresión en sangre periférica.¹³

Se ha observado que en músculo de pacientes con miopatía inflamatoria existe expresión local de múltiples citoquinas, de las que resaltan IL1 α , IL1 β , TNF α e INF γ . Este medio inflamatorio pudiera ser el responsable de la sobreexpresión de IL6 y de moléculas tipo I del CPH. En este marco, la IL17 ha sido identificada por inmunohistoquímica en músculo de estos pacientes. Esta citoquina participa en la inmunidad innata contra infecciones por bacterias y hongos, tiene la capacidad de producir IL6 e IL8 entre otras; sin embargo, su papel en miopatías inflamatorias aún no ha sido precisado.

Las células cooperadoras foliculares (Tfh) han probado ser un subgrupo distintivo basado en un fenotipo característico de superficie celular y un perfil de citoquinas (IL, IL10, IL21), así como un programa transcripcional propio (bcl-6). Tras su activación, sobre-regulan la expresión del receptor de quimiocina-CXC 5 (CXCR5), el cual es responsable de la domiciliación a los folículos linfoides cuya localización ha sido ubicada como característica de esta población¹⁴. Esta subclase ha sido identificada como distintiva en proveer las necesarias para influir en los linfocitos B para el cambio de isotipo dentro de los centros germinales. Sin embargo, a pesar de que varios estudios han sugerido que la sobreexpresión de estas células está asociado al desarrollo de enfermedades autoinmunes en modelos murinos, esto no ha sido estudiado en patologías autoinmunes humanas.

A pesar de que algunos abordajes sistemáticos pudieran ser requeridos para conocer el papel de las Tfh, su obtención a partir de ganglios linfáticos o bazo de manera rutinaria o longitudinal aun es un reto. Por lo que existe una fuerte necesidad de establecer estrategias subrogadas para determinar la calidad de las respuestas Tfh humanas. A este respecto, el análisis de las células cooperadoras CD4+ circulantes que expresan CXCR5 pueden apoyar estos estudios ya que correlacionan muy bien con las células foliculares. En enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso generalizado o artritis reumatoide, despliegan una gran cantidad de autoanticuerpos de alta afinidad mutados somáticamente sugiriendo el involucro de las Tfh en la patogénesis; incluso se ha observado incrementada en sangre periférica en el de pacientes con LEG¹⁵.

En miopatías inflamatorias existe muy poca información al respecto. Morita y colaboradores estudiaron su distribución en dermatomiositis juvenil; ellos encuentran que no existe diferencia en frecuencia de esta línea celular, sin embargo, existe un sesgo de la subpoblación folicular TH2 y TH17 (CXCR3- CCR6- / CXCR3- CCR6+, respectivamente), lo que correlaciona con actividad de la enfermedad y la diferenciación de plasmablastos¹⁶ hacia estas vías lo que pudiera contribuir a la vía de autoinmunidad en estas entidades. Sin embargo, esto no ha sido replicado en otros estudios.

Por lo que a pesar de diversas observaciones en la distribución de éstas subpoblaciones celulares, no existe algún estudio que haya determinado un perfil incorporando integralmente la cuantificación de todas las subclases de linfocitos descritos previamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El papel de las células T reguladoras, Th17, así como las células T Foliculares circulantes y células CD28^{null} en la inducción y mantenimiento de diversas patologías autoinmunes se ha demostrado previamente tanto en modelos murinos como en humanos.

Específicamente en miopatías inflamatorias se han evaluado algunas de estas subpoblaciones, documentando alteraciones a nivel del tejido muscular. Sin embargo no han sido evaluadas en sangre periférica, lo cual podría ser de utilidad para ampliar el modelo fisiopatogénico de las miopatías inflamatorias.

Actualmente se desconoce cuál es el perfil cuantitativo de estas subpoblaciones celulares en sangre periférica de pacientes adultos con miopatía inflamatoria idiopática.

OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar cuantitativamente las subpoblaciones de linfocitos denominadas células T reguladoras, Th17, Tfh y CD28^{null} en sangre periférica de pacientes con miopatía inflamatoria idiopática y controles sanos.

SECUNDARIO

Establecer si existe asociación entre el perfil cuantitativo de las subpoblaciones de linfocitos T ya mencionadas y el tipo y actividad de la miopatía inflamatoria.

HIPÓTESIS NULA

Los pacientes con miopatía inflamatoria no presentan diferencias cuantitativas de células T_{regs}, Th17, Tfh y CD28^{null} en comparación con controles sanos.

HIPÓTESIS ALTERNA

Los pacientes con miopatía inflamatoria tienen un menor número de células T_{regs} y un mayor número de células Th17, Tfh y CD28^{null} (diferencia de 3%) en comparación con controles sanos.

PACIENTES Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional, comparativo y transversal.

POBLACIÓN

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de Miopatía Inflamatoria Idiopática (polimiositis y dermatomiositis) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Sujetos mayores de 18 años sin importar género.
2. Diagnóstico de miopatía inflamatoria idiopática probable o definitiva de acuerdo a los criterios de Bohan & Peter (4,5):
 - Debilidad simétrica de los músculos de la cintura pélvica y flexores del cuello que progresa en semanas o meses, con o sin disfagia y afección de la musculatura respiratoria.
 - Biopsia muscular con necrosis de fibras tipo I y II, fagocitosis, regeneración con basofilia, atrofia con distribución perifascicular, variación en el tamaño de las fibras musculares e infiltrado inflamatorio.
 - Elevación de enzimas musculares (CPK, aldolasa, AST, ALT y/o DHL)
 - Triada electromiográfica: Unidades motoras cortas, pequeñas y polifásicas, fibrilaciones; ondas agudas positivas con irritabilidad de inserción; descargas repetitivas de alta frecuencia.
 - Exantema cutáneo: discromía de los párpados superiores (heliotropo), edema periorbitario; dermatitis eritematosa y descamativa sobre el dorso de las manos, especialmente sobre las articulaciones IF y MCF (Gottron)
 - **Polimiositis definitiva:** Criterios A, B, C y D.
 - **Polimiositis probable:** al menos tres de los primeros 4 criterios.
 - **Dermatomiositis definitiva:** al menos tres de los primeros cuatro criterios + E;
 - **Dermatomiositis probable** al menos dos de los primeros cuatro criterios + E.

3. Que presenten actividad de reciente inicio (sin tratamiento) o bien, con reactivación de enfermedad independientemente del tratamiento.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con evidencia de enfermedad del sistema nervioso a la cual sea atribuible la debilidad.
2. Pacientes con historia sugerente de distrofia muscular (historia familiar de debilidad muscular, debilidad muscular de curso lento y progresivo, pseudohipertrofia de la pantorrilla).
3. Pacientes con endocrinopatías no controladas al momento del diagnóstico (e.g. hipotiroidismo, tirotoxicosis, hiperparatiroidismo y síndrome de Cushing)
4. Pacientes con historia sugerente de miositis infecciosa.
5. Pacientes con uso de drogas con toxicidad muscular conocida (e.g. inhibidores de la HMG-CoEnzima A reductasa, D-penicilamina, alcohol).
6. Pacientes con síndrome de sobreposición con miositis.
7. Pacientes con proceso infeccioso sistémico concomitante a la actividad.

GRUPO CONTROL

Por cada paciente con diagnóstico de Miopatía Inflamatoria Idiopática se eligió 1 paciente sano pareado por edad y género sin antecedentes familiares de enfermedad autoinmune.

MÉTODOS

Una vez identificados los pacientes se le invitó a participar en el estudio, se dio lectura a un documento donde se explicaron detalles sobre el proyecto de investigación y firmaron un consentimiento informado (ver **Anexo**)

El registro de los datos demográficos, clínicos, historial médico, parámetros de laboratorio, electrofisiología y biopsia muscular se realizó en un formato prediseñado (ver **Anexo**). Se clasificó al paciente con base en su actividad (ver **Anexo**) y se asignó como:

Polimiositis

Dermatomiositis

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

1. Se obtuvieron 20cc de sangre venosa periférica por medio de venopunción
2. Se realizó separación de células mononucleares mediante gradiente de densidad (Ficoll Hypaque), en relación 1:1 de Lymphoprep:Sangre venosa. Se centrifugaron a 2500 rev/min y se recuperaron las células mediante aspiración controlada.
3. Se realizaron tinciones de superficie mediante anticuerpos monoclonales específicos mediante:

- **Células T Reguladoras:**

- CD 4+: anti-CD4PECy5

- anti-CD25 FITC

- CD 8+: anti-CD8 PECy5

- Anti-CD25 FITC

Posterior a la tinción de superficie, se incubaron a 37°C durante 20 min. Se resuspendieron en 500µl de PBS y Suero Bovino Fetal al 2% + PBS (Buffer) y se realizó lavado a 1500 RPM durante 10min. Las células se permeabilizaron mediante el kit Citofyx/Cytoperm 200µl y se incubaron a -4°C durante 20min. Se realizó el marcaje intracelular con 5µl anti-FOXP3 PE y se incubaron en -4°C durante 20min. Se realizó lavado con Buffer. Se retiró el sobrante y se fijaron las células en 200µl de Paraformaldehído.

- **Células Cooperadoras Th 17.** Previo a la inmunotinción de superficie se preparó medio para estimulación de células mononucleares con PBS 297 μ l + 3 μ l anti-CD3 y se dividió 50% para células de control y 50% células de paciente, en placas de 16 pozos. Se mantuvo la preparación de la placa en incubación a 37°C durante 1.5h, tras lo cual se agregó 1 millón de células mononucleares en 1cc de medio suplementado (Medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%) adicionando 2.5 μ l de anticuerpo anti-CD28 por cada mililitro de medio y se incubaron durante 1h a 37°C. Posteriormente se realizó inhibición selectiva de tránsito celular mediante 0.66 μ l de Monesina por cada millón de Células en Medio y se incubó durante 30min a 37°C. Se realizó tinción de superficie con anticuerpos anti-CD4 FITC y se incubaron a 37°C durante 20min. Se lavaron en Buffer con 500 μ l y centrifuga a 1500rev/min por 10 min. Se realizó mismo procedimiento de permeabilización que para Células Reguladoras (ver antes) y se realizó marcaje intracelular con anticuerpo anti-IL17A acoplado a PE. Posteriormente se fijaron las células en 200 μ l de paraformaldehído.
- **Células CD28^{null}:** Se realizó procedimiento de inmunotinción de superficie (antes descrito) para marcaje con anti-CD4 PeCy5, anti-CD28 FITC y anti-CD244 PE.
- **Células T Foliculares circulantes:** Se realizó procedimiento de inmunotinción de superficie (antes descrito) para marcaje con anti-CD4 FITC, anti-CXCR5 PeCy5, anti-CCR6 APC, anti-CXCR3 PE.

El análisis de inmunotinción se realizó mediante citometría de flujo (FACS Calibur BD) y las frecuencias del porcentaje, números absolutos e Intensidad media de fluorescencia con el programa CellQuestPro.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó mediante el paquete estadístico Prism GraphPath. Se empleó estadística descriptiva, se analizaron las variables desenlace comparando medianas entre dos grupos independientes utilizando prueba U de Mann-Whitney (estadística paramétrica). Se tomó como estadísticamente significativa p menor o igual a 0.05.

ASPECTOS ÉTICOS

Todo el estudio se desarrolló de acuerdo a los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado para su inclusión en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto (**Anexos**).

RESULTADOS

Se incluyeron 19 pacientes, 16 con diagnóstico definitivo de Dermatomiositis (DM) y 3 con Polimiositis (PM). Los pacientes tuvieron una edad promedio de 43.7 ± 12.68 años. El 81% (13/16) de pacientes con DM y el 33% (1/3) con PM fueron mujeres. (Tabla 1)

Dentro del grupo de DM, 6 (30%) pacientes se encontraban con enfermedad de reciente inicio sin tratamiento; la duración promedio de enfermedad en el grupo con tratamiento fue de 4.6 años. Del grupo con DM, 3/15 tenían actividad cutánea únicamente sin elevación de enzimas, pero con cuadro clínico compatible (debilidad muscular). Sólo una paciente con DM, tenía antecedente de Neoplasia (carcinoma de mama, en remisión). El manejo farmacológico era con corticosteroides (75%) y otros inmunosupresores (100%) (metotrexate, azatioprina, hidroxicloroquina). (Ver Tabla 1).

La determinación de creatininfosfocinasa (CPK) del grupo de pacientes en promedio fue de 1119 ± 573 mg/dL. No se encontró diferencia en los niveles promedio de leucocitos totales entre pacientes y controles (6404 vs 8688 cels/mm³; p 0.36), sin embargo, sí se observó una disminución significativa en la cuenta de linfocitos totales en el grupo de pacientes (1696 vs 2353 cels/mm³; p 0.0071) en comparación con los controles.

No encontramos diferencia significativa en la cuenta linfocitaria entre subtipos de enfermedad (dermatomiositis vs polimiositis), aunque existió tendencia a una menor cuenta celular en pacientes con DM (1290 vs 2102 cels/mm³, p 0.09). Sin embargo, al comparar los pacientes sin tratamiento (n=6) vs con tratamiento (n=9) observamos mayor frecuencia de linfopenia en el grupo sin tratamiento (684 vs 1357 cels/mm³; p = 0.012).

La comparación entre pacientes y controles (n=9) no mostró diferencia entre el porcentaje, número absoluto celular ni en Intensidad Media de Fluorescencia de células T reguladoras CD4+ (CD4+ CD25high FOXP3+), T cooperadoras 17 (TH17) ni foliculares circulantes (CD4+ CXCR5+); tampoco hubo diferencia significativa (n=18) en las células T reguladoras CD8+ (CD8+ CD25high FOXP3+). (Ver tablas 3 - 7). Sin embargo, se encontró un incremento de la subpoblación CD 28^{null} (CD4+ CD28^{null}, CD244+) en pacientes en comparación a sujetos sanos (4.16 vs 0.72%, p 0.032).

Al comparar las células CD8+ reguladoras de pacientes con dermatomiositis vírgenes de tratamiento con pacientes previamente tratados, no se encontraron diferencias significativas. Tampoco hubo diferencia al comparar por subtipos de enfermedad. (Tabla 8)

No se encontró diferencia en el porcentaje (n=9) de sub-clases de células T foliculares circulantes TH1, TH2 y TH17 (ver tabla 9)

Tabla 1. Características demográficas					
Edad (años)	Género	Diagnóstico	Duración de enfermedad (años)	Tipo de actividad	Tratamiento
43.7±12.68	13 M 5 H	15 DM / 3 PM	4.6	6/15 sólo cutánea	PDN75% Otros 100%

Tabla 2. Características paraclínicas						
	CPK (mg/dL)	Leucocitos (cels/mm3)	p	Linfocitos (cels/mm3)	p	Anticuerpos antinucleares (% positivos)
Pacientes	1119±573	6404±2550	NS	1696±738	0.0071	87.5%
Controles	ND	8688±1118		2353±1124		ND

Tabla 3. T reguladoras CD4						
	CD4+ CD25High FOXP3+					
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Pacientes n=9	0.12	NS	107	NS	2032	NS
Controles n=9	0.06		251		998	

Tabla 4. T reguladoras CD8						
	CD4+ CD25High FOXP3+					
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Pacientes n=18	0.08	NS	6.54	NS	2269	NS
Controles n=18	0.32		4.26		1356	

Tabla 5. T reguladoras CD8						
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Virgenes n=18	0.55	0.079	4.47	NS	1806	NS
Tratados n=18	0.96		7.78		2547	

Tabla 5. TH17						
	CD4+ IL17A+					
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Pacientes n=9	9.17	NS	151	NS	64	NS
Controles n=9	9.36		179		75	

Tabla 5. TH17						
	CD4+ IL17A+					
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Virgenes n=9	6.83	NS	45	0.059	84.9	NS
Tratados n=9	10.7		216		54.2	

Tabla 6. CD28 ^{null}						
	CD4+ CD28- CD244+					
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Pacientes n=9	4.16	0.032	67	0.094	40.2	0.098
Controles n=9	0.72		15		45.3	

Tabla 7. T Foliculares circulantes						
	CD4+ CXCR5+					
	%	p	# absol.	p	IMF	p
Pacientes n=9	11.27	NS	183	NS	43.2	NS
Controles n=9	7.6		202		56.18	

Tabla 7. Subclases de T Foliculares (CD4+ CXCR5+)						
	CxCR3+CCR6- (TH1)		CxCR3-CCR6- (TH2)		CxCR3+CCR6+ (TH17)	
	%	p	%	p	%	p
Pacientes n=9	75	NS	8.21	NS	2.79	NS
Controles n=9	69		5.2		3.79	

DISCUSION

El papel preciso de las células T en la patogénesis de las miopatías inflamatorias aún no está claro y a pesar de que su participación en el desarrollo de estas entidades ha sido estudiado *in situ* en piezas musculares de pacientes afectados, éstas no han sido evaluadas a detalle en sangre periférica.

El presente estudio demuestra que los pacientes con miopatía inflamatoria idiopática muestran disminución significativa de las cuentas de linfocitos comparación a sujetos sanos. En este sentido, al analizar los pacientes con dermatomiositis, aquellos que se encontraban vírgenes a tratamiento, mostraban linfopenia significativa en comparación a los que mantenían actividad clínica pero sobre tratamiento previo.

Al comparar las subpoblaciones supresoras, TH17 y foliculares circulantes, no existieron diferencias entre pacientes con sus respectivos controles. Tampoco existió diferencia al comparar las células T reguladoras CD8+ y TH17 entre pacientes con tratamiento y sin él, aunque en ésta última sí existió una tendencia a mayor porcentaje en los pacientes (p 0.09).

En un trabajo retrospectivo, Vilguier *et al* encontraron que los pacientes con miositis inflamatoria se encontraban con linfopenia variable en comparación con sujetos sanos (media 888cels/mm³ [4000-4070]), y estos pacientes mostraban mejoría tras el manejo con esteroides en un periodo entre 6 a 9 meses tras el inicio de la terapia. En este sentido, los resultados del nuestro trabajo muestran tendencias similares a los hallazgos descritos, con linfopenia notable en los pacientes (1696±738 cels/mm³) lo cual constituye un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones potencialmente mortales¹⁷. Sin embargo, en dicho reporte no se analizan subclases anormales en sangre de dichos pacientes.

Las células T cooperadoras 17 tienen un papel descrito en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes y éstas han sido identificadas en tejido muscular inflamado de pacientes con miositis. Éstas células son la fuente principal de interleuquina 17, una potente citoquina inflamatoria que juega un papel importante en artritis reumatoide. Ésta, junto con IL-1, otra citoquina importante en miositis inflamatoria, pueden inducir la expresión IL-6 en mioblastos cultivados y puede tener un papel en el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, la frecuencia de tal subclase celular nunca ha sido evaluada en sangre de pacientes. El hallazgo de una tendencia a una mayor expresión de este grupo celular, sugiere que el cambio de las células T cooperadoras hacia un fenotipo proinflamatorio es dirigido probablemente por la expresión anormal de estímulos *in situ*. Sin embargo, se requiere una mayor muestra para evaluar esta hipótesis y correlación con biopsias con inmunohistoquímica específica para este efecto.

El conocimiento de la participación de células T reguladoras en miositis es pobre; Banica *et al*¹⁸ reportan que existe una disminución significativa de éstas células circulantes en comparación a sujetos sanos, sin embargo, éste hecho no ha sido replicado y sólo ha sido evaluado en otros estudios *in situ*; respecto a las T reguladoras CD8, no existe ningún trabajo que evalúe su papel en miositis, y su cuantificación sanguínea en otras enfermedades autoinmunes tiene resultados inconsistentes tanto por la homogeneidad en la incorporación de pacientes como el número, ya que varios trabajos incluyen pacientes con síndromes de sobreposición autoinmune, lo que pudiera generar resultados espurios; en este sentido, el presente trabajo no encuentra una diferencia en el número de estas células.

A pesar de no existir diferencias cuantitativas de células supresoras, cooperadoras TH17 ni foliculares, un defecto funcional (e.g. disminución de producción de citoquinas anti-inflamatorias o mayor producción espontánea de citoquinas inflamatorias [e.g. IL17] en un medio propicio) pudiera explicar su participación en la fisiopatogenia de las miopatías o que éstas células fácilmente emigran a los tejidos afectados pues se ha descrito que expresan altos niveles de moléculas de adhesión vascular.

En el presente trabajo sí se encontró un aumento significativo de la población CD4+CD28^{null} respecto a controles sanos, acorde a lo observado por Fasth *et al*²¹ El número total de linfocitos circulantes en sangre y la distribución de sus subclases se encuentra bajo un estricto control homeostático; sin embargo, un reto antigénico constante puede conducir a la fenotipificación aberrante de células. En este contexto, los linfocitos T CD28^{null} son de particular interés pues son longevas, resistentes a la apoptosis y son francamente proinflamatorias. Esta población inusual de células T CD4+ están caracterizadas por una gran proliferación clonal, pérdida de molécula de superficie, producción de grandes cantidades de INF γ , perforina y granzima B. Éste hecho ha sugerido que estas células están relacionadas a las NK (Natural Killer) y representan un linaje híbrido de tal grupo celular.

Como ya se ha descrito en sinovia de pacientes con artritis reumatoide¹⁹ y en granulomatosis con poliangiitis²⁰, existen escasos infiltrados in situ de este grupo celular pero con un gran porcentaje de células circulantes. En apoyo a esta hipótesis se ha encontrado que las células CD4+CD28^{null} expresan receptores de la superfamilia de Ig que reconocen moléculas MHC clase I, las cuales se hallan anormalmente expresadas en células musculares de pacientes con miositis y, finalmente, éstas células carentes de moléculas CD28 han sido encontradas en biopsias musculares de pacientes con miositis inflamatoria y correlacionan con la actividad de la enfermedad y con antecedente de infección por citomegalovirus²¹ lo que sugiere que un estímulo antigénico aun no identificado (probablemente de origen viral) genera el viraje de células T hacia CD28null y éstas pudieran dirigir el proceso inflamatorio primario en el músculo obteniendo subsecuentemente un incremento en la circulación sanguínea de las mismas.

CONCLUSIONES

El perfil cuantitativo de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de pacientes con miopatía inflamatoria se caracteriza por un incremento en la frecuencia de células CD4+ CD28null en sangre periférica en comparación con controles sanos.

ANEXOS

ANEXO I HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Hoja de Registro de Características del Paciente NÚMERO ID _____

Nombre: _____ Edad: _____

Género: _____ Numero Telefónico _____

Antecedente familiar de enfermedad autoinmune: SI NO ¿Cuál? _____

Fecha de inicio de síntomas: _____ Fecha de diagnóstico: _____

Cuadro clínico inicial: _____

Exploración física

Grupos Musculares

(Medición de la fuerza acorde a la *Medical Research Council*)

1. Flexores de cuello _____
2. Abductores del brazo (deltoides) _____
3. Extensores del codo _____
4. Flexores del codo (bíceps) _____
5. Extensores de la muñeca _____
6. Extensores de cadera _____
7. Abductores de cadera _____
8. Flexores de cadera _____
9. Extensores de rodilla _____
10. Flexores dorsales del pie _____

Cutáneo

- Signo de Shawl _____
- Exantema en heliotropo _____
- Signo de Gottron _____
- Exantema en V del cuello _____

LABORATORIOS

Enzimas musculares

CPK _____ Aldolasa _____ AST/ALT _____ / _____ DHL _____

Biometría Hemática

Leucocitos totales _____ Linfocitos _____

Anticuerpos

Anticuerpos antinucleares _____ Anticuerpos asociados a miopatías _____ (e.g. Jo1)

Electromiografía / Velocidad de conducción nerviosa

Biopsia de músculo

Diagnóstico

Carta de Consentimiento Informado
Análisis de la expresión subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con
Miopatía Inflamatoria idiopática

Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela, Dr. Fabricio Espinosa Ortega, Dra. Diana Gómez Martin,
Dra. Karina Santana da De Anda
Departamento de Inmunología y Reumatología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran

Se me ha explicado ampliamente y por escrito sobre la naturaleza y objetivos de este estudio. Se han atendido en el momento pertinente las dudas que tenía y han sido resueltas. Conozco los beneficios y responsabilidades derivadas de participar en este estudio.

Otorgo mi consentimiento para proporcionar _____ muestra (s) de sangre. De ella(s) se obtendrán monocitos, con el fin de estudiar diferentes subpoblaciones de linfocitos T mediante marcajes de superficie e intracelulares. Las muestras sólo se emplearán para el propósito mencionado.

Acepto participar de manera voluntaria, seguro (a) de que se garantiza la confidencialidad de la información. Estoy enterado(a) de que podré retirarme del estudio en el momento que yo desee, sin perder ninguno de mis derechos de paciente del INCMNSZ o ser penalizado al hacerlo.

Fecha: _____

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Nombre y firma del investigador: _____

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet*. 2003;362:971-82.
- ² Patrick M, Buchbinder R, Jolley D, et al: Incidence of inflammatory myopathies in Victoria, Australia, and evidence of spatial clustering. *J Rheumatol* 1999; 26:1094-1100.
- ³ Rider L, Giannini E, Harris-Love H, Galen J, Isenberg D, et al. for the International Myositis Assessment and Clinical Studies Group. Defining Clinical Improvement in Adult and Juvenile Myositis. *J Rheumatol* 2003;30:603–17.
- ⁴ Nagarju K, Lundberg I. Polymyositis and dermatomyositis: pathophysiology. *Rheum Dis Clin N Am*, 2011;37:159–17.
- ⁵ Love LA, Leff RL, Fraser DD, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991;70:360–74.
- ⁶ Barbasso Helmers S, Englund P, Engstrom M, et al. Sera from anti-Jo-1-positive patients with polymyositis and interstitial lung disease induce expression of intercellular adhesion molecule 1 in human lung endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2009;60:2524–30
- ⁷ Greenberg SA, Bradshaw EM, Pinkus JL, et al. Plasma cells in muscle in inclusion body myositis and polymyositis. *Neurology* 2005;65:1782–7.
- ⁸ Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:199–208.
- ⁹ Dimitri D, Benveniste O, Dubourg O. Shared blood and muscle CD8+ T-cell expansions in inclusion body myositis. *Brain* 2006; 129:986-995.
- ¹⁰ Benveniste O, Cherin P, Maisonobe T, Merat R, et al. Severe Perturbations of the Blood T Cell Repertoire in Polymyositis, But Not Dermatomyositis Patients. *Journal Immunol*. 2001; 167: 3521-3529.

-
- ¹¹ Campbell D, Koch M. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T Cells. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11:119-130.
- ¹² Buckner J. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010. 10: 849-859.
- ¹³ Waschbisch A, Schwab N, Ruck T. FOXP3+ T regulatory cells in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuroimmunol*. 2010. 225:137-142.
- ¹⁴ Gómez-Martin D, Díaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology. *Autoimmun Rev* 2011 (10), 325-330.
- ¹⁵ Simpson N, Gatenby PA, Wilson A et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2010;62:234-44.
- ¹⁶ Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR+CD4+ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011;34:108-121.
- ¹⁷ Marie I, Hachulla E, Chèrin P et al. Opportunistic infections in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2005; 53:155-65.
- ¹⁸ Banica L, Besliu A, Pistol G, et al. Quantification and molecular characterization of regulatory T cells in connective tissue diseases. *Autoimmunity*, January 2009; 42(1): 41–49
- ¹⁹ Warrington K, Takemura S, Goronzy J et al. CD4+, CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum* 2001;44:13-20.

²⁰ Morgan M, Pachnio A, Begum J et al. CD⁺CD28⁻ T cell expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) is driven by latent cytomegalovirus infection and is associated with an increased risk of infection and mortality. *Arthritis Rheum* 2011;63:2127-37.

²¹ Fath A, Dastmalchi M, Lundberg IE, et al. T Cells infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28^{null} T cells. *J Immunol*, 2009;183:4792-4799.