

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Nuevos autoantígenos en el síndrome de Sjögren

Autor: Ferraz Amaro, Iván

**Directores: Pablo Martín Vasallo
y Tomás González García**

Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría



DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA, DERMATOLOGÍA Y
PSIQUIATRÍA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

TESIS DOCTORAL

NUEVOS AUTOANTÍGENOS EN EL SINDROME DE SJÖGREN

*Memoria para obtener el grado de Doctor por la Universidad de La Laguna
que presenta*

Iván A. Ferraz Amaro

La Laguna, 2002

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA



DON PABLO MARTÍN VASALLO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, Y DON TOMÁS GONZÁLEZ GARCÍA, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CERTIFICAN: Que D^o IVAN ALEJANDRO FERRAZ AMARO ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación que se incluyen en la memoria titulada "NUEVOS AUTOANTÍGENOS EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN", y que se presentan para la obtención del título de Doctor en Medicina.

Revisa la presente memoria estimamos que corresponde con los objetivos propuestos y resultados obtenidos y en consecuencia autorizamos su presentación como tesis doctoral para defensa pública ante el tribunal que sea designado a tal efecto.

Y para que así conste, expiden la presente certificación en junio de 2002.

Fdo. Dr. Pablo Martín Vasallo

Fdo. Dr. Tomás González García

A mis padres y hermanos

Agradecimientos

A los Dres. Pablo Martín Vasallo y Tomás González García por la oportunidad que me han brindado de realizar esta tesis doctoral y por el estímulo científico y académico que he recibido de ellos durante estos años.

A Mari Francis Arteaga, María del Valle Machargo, Irene Cózar y Elisa Acosta por la paciencia, afecto y ayuda que me han demostrado en las largas horas que hemos compartido en el laboratorio. A Julio Ávila por sus sabios consejos y por su ejemplo de profesionalidad.

A mis adjuntos del Servicio de Reumatología, Sagrario Bustabad, Marian Gantes, Elisa Trujillo y Federico Díaz por la comprensión, apoyo y estímulo profesional que me han inculcado durante mis cuatro años de residencia. A Arántzazu Arteaga y a Charo Dionis por el afecto y cariño que siempre les he tenido.

A mis compañeros de residencia durante estos cuatro años, María José Rodríguez, Rosa Ros, Ana López, Adolfo Vérguez y María del Mar Alonso porque ellos han sido lo mejor de esta etapa de mi vida y por el cariño y afecto que siempre me han mostrado.

A Carlos Enrique Romero por todos estos años de amistad.

A todos mis compañeros del Hospital Universitario de Canarias, mi segunda casa, en los servicios por los que he rotado, a todos los enfermeros, enfermeras, auxiliares y a todos los pacientes que he atendido en estos años que han supuesto la mejor etapa de mi vida.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	16
1. Síndrome de Sjögren.....	17
Historia y clasificación.....	17
Prevalencia.....	20
Patogénesis.....	21
Factores genéticos.....	22
Infección vírica.....	23
Virus de Epstein-Barr.....	23
Retrovirus	24
Virus de la hepatitis C.....	26
Citoquinas	26
Autoanticuerpos.....	29
Mecanismos efectores.....	29
2. Autoinmunidad.....	34
Bases genéticas.....	34
Bases ambientales.....	35
Bases celulares.....	37
3. Proteína tau.....	41
La molécula de tau.....	43
Modificaciones de la proteína tau.....	45
Proteínas que interaccionan con tau.....	45
Localización subcelular de la proteína tau.....	46
Función de tau.....	47
Tau en procesos patológicos.....	47
Taupatías.....	49
4. Proteína humana tipo Hesb.....	50

MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
1. Transformación de microorganismos.....	56
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	57
Para bacterias.....	57
Para fagos.....	58
3. Preparación y análisis de DNA.....	60
DNA plasmídico.....	60
DNA de fago.....	61
DNA genómico.....	61
Digestión de DNA.....	62
Elaboración de construcciones.....	63
Transformación de extremos protuberantes en romos.....	63
Defosforilación.....	64
Electroforesis de DNA.....	65
Purificación de DNA.....	66
Marcaje de sondas y oligonucleótidos.....	67
Southern-blots.....	68
Secuenciación.....	70
Análisis y secuenciación.....	71
4. Preparación y análisis de proteínas.....	73
Extracción de proteínas.....	73
Electroforesis de proteínas.....	73
Western-blots.....	74
5. Inducción de síntesis proteica y purificación de la proteína a estudio	76
6. Western blots de las proteínas a estudio y análisis de bandas.....	77
7. Análisis estadístico.....	78
RESULTADOS.....	79
1. Análisis de las secuencias de los cDNAs obtenidos en el muestreo..	80
2. Obtención de las proteínas tau y hHesB.....	84
3. Pacientes.....	86

4. Screening de sueros de enfermos con SS.....	92
DISCUSIÓN.....	100
1. NeuroSjögren.....	101
2. Proteína tau.....	104
3. Proteína hHesB.....	108
4. Autoanticuerpos y enfermedad autoinmune.....	110
5. Epílogo.....	113
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	118

INTRODUCCIÓN

1. Síndrome de Sjögren

Historia y clasificación

La primera descripción del Síndrome de Sjögren (SS) se atribuye a Johann Mikulicz el cual en 1888 describió el caso de un varón de 42 años con tumefacción bilateral de parótidas y glándulas lacrimales asociado con la presencia en cortes histológicos de infiltrados de células pequeñas. Aunque posteriormente hubieron otras citas, no fue hasta 1933 que un oftalmólogo danés, Henrik Sjögren, describió con detalle las características clínicas e histológicas de 19 mujeres, 13 probablemente con artritis reumatoide, con sequedad bucal y ocular¹.

El primer intento de clasificación se produjo en 1956², se definió SS como la presencia de al menos dos de las siguientes características: queratoconjuntivitis sicca, xerostomía y enfermedad del tejido conectivo. La distinción entre SS primario y secundario³ no se produjo hasta 1978, refiriéndose el término de secundario a aquellos casos que ocurrían concomitantemente a la presencia de una enfermedad sistémica, mientras que se reservaba primario cuando se excluía la presencia de ésta. La enfermedad sistémica más frecuentemente asociada al SS es la artritis reumatoide, ya que aproximadamente el 15% de los pacientes con artritis reumatoide desarrollan queratoconjuntivitis seca. Una relación similar pero estadísticamente inferior puede verse en el lupus eritematoso sistémico,

enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerodermia, cirrosis biliar primaria y dermatomiositis.

No obstante, a pesar de los intentos a tal efecto, en la actualidad no existe una definición concreta de SS, recurriéndose en los estudios de investigación a términos que combinen síntomas subjetivos, pruebas objetivas de función glandular, histología de glándula salivar y evidencia de producción de anticuerpos. Han existido, por tanto, varios sistemas de clasificación con diferentes criterios diagnósticos elaborados, la mayoría de ellos, en la década de los 80.

Tabla 1. Criterios Europeos para el diagnóstico del Síndrome de Sjögren

Se requieren 4 de 6 de los siguientes. Criterios de exclusión: linfomas, SIDA y enfermedad injerto contra huésped
Síntomas oculares (1 si más de una respuesta es positiva):
- ¿Tiene Ud. desde hace más de 3 meses sequedad de ojos de forma diaria?
- ¿Tiene Ud. de forma recurrente sensación de arenilla en los ojos?
- ¿Usa Ud. lágrimas artificiales más de 3 veces al día?
Síntomas orales (1 si más de una respuesta es positiva):
- ¿Ha tenido sensación de boca seca durante más de 3 meses?
- ¿Ha tenido de forma recurrente y persistente sensación de tumefacción parotídea?
- ¿Bebe Ud. de forma frecuente líquidos para digerir de forma más fácil la comida?
Signos oculares:
- Test de Schimmer <5 mm/5 min.
- Rosa de Bengala >4 en van Bijsterveld Score
Hallazgos histopatológicos:
- En biopsia de glándulas salivares menores > 1 foco, > 50 mononucleares en 4 mm ² de tejido
Glándulas salivares patológicas:
- Gammagrafía
- Sialografía parotídea
- Flujo salivar estimado < 1,5 ml/15 min.
Autoanticuerpos:
- Autoanticuerpos Ro/SSA o La/SSB
- Anticuerpos antinucleares
- Factor reumatoide

En 1993 se crearon los Criterios Diagnósticos Europeos del Síndrome de Sjögren⁴ que se hallan en vigor y se señalan en la tabla 1. En dichos criterios diagnósticos se incluyen diversos factores clínicos y biológicos que se resumen a continuación. En lo referente a la sequedad ocular tenemos: el *Test de Schimmer* referente a la medición de la secreción lacrimal colocando un pequeño papel estéril a tal efecto, considerando como patológico la humidificación inferior a 5 mm en 5 minutos; la determinación del daño epitelial conjuntival y corneal por medio de la aplicación de Rosa de Bengala; la medición de la rotura de la película lacrimal y la medición de la osmolaridad de la secreción lacrimal como medida de la evaporación de la superficie ocular. En lo que se refiere a la secreción salivar se utiliza el *test de Saxon* que consiste en la introducción de una esponja en la boca del paciente, se mastica esta durante 5 minutos y posteriormente se pesa, con lo cual se obtiene de forma aproximada la cantidad de saliva que el paciente ha producido. Otros criterios diagnósticos incluyen la gammagrafía de glándulas salivares⁵, sialografía⁶, ecografía⁷ de glándulas salivares e incluso la resonancia magnética⁸.

Pero sin duda, la obtención de tejido glandular mediante biopsia es la clave diagnóstica en la mayoría de los casos, aceptándose hoy en día como el método diagnóstico más específico para confirmar el diagnóstico⁹. Se considera positiva cuando se obtiene la presencia de más de un foco de tejido linfóide de 50 o más linfocitos por 4 mm²¹⁰. Por medio de técnicas de

inmunohistoquímica se sabe que dichos linfocitos son T CD4¹¹ y que con otras técnicas de inmunohistoquímica cuantitativa de medición del fenotipo linfocitario la especificidad diagnóstica puede incrementarse de forma importante¹².

Prevalencia

No se conoce exactamente la prevalencia del SS en la población general, sin embargo, se pueden hacer varias aseveraciones. Los síntomas sicca son muy frecuentes durante la vejez, lo cual se debe en parte a atrofia tisular relacionada con la edad pero también a otras causas tales como fármacos o neoplasias. Por ejemplo, se estima que aproximadamente el 35% de los ancianos refieren sequedad ocular o bucal, pero de ellos solo el 10% presenta de forma objetiva disminución de la secreción glandular ocular o salivar¹³, cumpliendo solo del 0.04 al 2.7% criterios diagnósticos de SS^{14,15}. Se desconoce si estos síntomas sicca en la vejez son un estadio dentro del espectro clínico del SS o si representan hallazgos independientes. Por otro lado, diferentes estudios usando los criterios europeos estiman una prevalencia en torno al 3.3% de la población general¹⁶.

En lo que se refiere a la distribución geográfica de la enfermedad, parece que esta es universal, sin diferencias étnicas, presentando los enfermos, independientemente de su ubicación, las mismas características

clínicas e incluso los mismos autoanticuerpos dirigidos contra los mismos epítomos independientemente de que tengan un diferente HLA clase II.

Patogénesis

Es mucho lo que sugiere un origen autoinmune del SS, ya que, al igual que otras enfermedades autoinmunes existen características tales como predominio en el sexo femenino, relación con determinados HLA, asociación familiar, producción de autoanticuerpos y manifestaciones clínicas similares a otras enfermedades como artritis, Raynaud, serositis,...

El principal hallazgo histopatológico en el SS es un infiltrado linfocitario que generalmente es común a todos los órganos afectados¹⁷. Los cúmulos linfocitarios consisten en agregados locales de linfocitos, generalmente superiores a 50, que empiezan en los conductos y se extienden por todo el lóbulo. Aunque algunos lóbulos se destruyen completamente, la arquitectura global de la glándula suele conservarse con otros lóbulos completamente normales. A estos hallazgos suele asociarse hiperplasia del epitelio ductal que junto con el infiltrado linfocitario provoca el aumento de tamaño de la glándula. No obstante, generalmente suele haber una discordancia entre los hallazgos anatomopatológicos y la secreción glandular, es decir, parece que el descenso en la producción salivar o lacrimal es mayor al que cabría esperar en relación al daño histológico. Esto

hacer pensar que deben de haber otros mecanismos por medio de los cuales disminuye dicha secreción independientemente del daño tisular.

Mediante estudios de inmunohistología se sabe que el 75% de los linfocitos que forman el foco inflamatorio son de la clase T CD4¹⁸ y expresan niveles altos de moléculas coestimuladoras de HLA-DR y B7, sobre todo en áreas de intensos infiltrados inflamatorios. Este hallazgo se podría interpretar como si hubiera una presentación de antígenos desconocidos a este nivel mediante moléculas HLA de clase II. El 10% restante de células en los cúmulos linfocitarios son células B, estando las células natural killer ausentes.

Numerosos factores parecen intervenir en la patogénesis del SS, estos son:

a) *Factores genéticos.* Existen claros casos de cúmulos familiares de la enfermedad, e incluso se sabe que en parientes de primer grado son más frecuentes otras enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en una serie se describió un 4,4% de incidencia de la enfermedad en familiares de primer grado¹⁹ e incluso parece que los familiares también tenían tendencia a presentar autoanticuerpos de forma más frecuente. Parece que el mejor marcador genético de la enfermedad reside en el complejo mayor de histocompatibilidad, así por ejemplo, en caucasianos el SS primario está asociado al HLA-DR3²⁰, concretamente en el haplotipo HLA-DR3, B8, DQ2 y

C4A, hallándose este haplotipo en el 50% de los casos. También se han descrito asociaciones con determinados polimorfismos del promotor de la IL-10²¹.

b) *Infección vírica*. El papel de la infección vírica en la patogénesis del SS viene dado por varias observaciones: algunos virus como el virus de Epstein Barr infectan frecuentemente las glándulas salivares y quizás tengan la propiedad de permanecer latentes de forma crónica con reagudizaciones cíclicas, además, el VEB tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune mediada por células T; el antígeno La se conoce que está implicado en el procesamiento del RNA viral y; al menos, tres virus tales como el HTLV-1, VIH y virus de la hepatitis C se asocian a manifestaciones clínicas similares al SS.

- Virus de Epstein-Barr. Inicialmente se puso atención en el virus de E-B, citomegalovirus y en el virus herpes 6²², pero los estudios realizados para determinar alguna implicación etiológica son de difícil interpretación dada la elevada frecuencia de seroconversión en población sana, de tal forma que algunos estudios han hallado relación con la enfermedad^{23,24}, mientras que otros no la han demostrado^{25,26}. De forma similar, se puede detectar material genético del virus de Epstein-Barr en tejido salivar de enfermos con SS pero estos hallazgos también se han demostrado en población sana. Por tanto, dado que ha sido difícil determinar una relación

causal entre estos virus y la enfermedad, se ha prestado atención a otros aspectos tales como la detección de genomas víricos no habituales o a la posibilidad de respuestas inmunes atípicas del huésped ante la infección vírica. Por ejemplo, un estudio ha demostrado la presencia de ADN vírico de VEB que contenía deleciones inusuales en comparación al ADN vírico normal²⁷, por lo cual es posible que el VEB detectado en enfermos con SS sea diferente estructural y antigénicamente al de los controles o que algunos sujetos tengan alguna incapacidad mediada por moléculas HLA para eliminar el VEB y que por tanto esto predisponga a infecciones persistentes por dicho virus²⁸.

- Retrovirus. Los retrovirus son capaces de alterar el sistema inmune mediante la infección de células encargadas de la inmunidad, posiblemente llevando a la supresión, destrucción o estimulación de células T, aumento de producción de autoanticuerpos y al desarrollo de enfermedades malignas tales como linfomas. Al menos se conocen dos retrovirus, VIH y HTLV-1, capaces de causar síndromes Sjögren-like^{28,29}. Dos grupos, independientemente el uno del otro, han confirmado la presencia de genoma de HTLV-1 en tejido de glándula salivar de pacientes con SS^{30,31}, con la característica de que estos pacientes con infección por HTLV-1 no presentaban anticuerpos contra dicho virus, en contra de lo que se creía inicialmente. Otro hallazgo crucial es la demostración que ratones transgénicos infectados con HTLV-1 (con presencia del gen tax) desarrollan

espontáneamente sialoadenitis caracterizadas por proliferación de células epiteliales ductales e infiltrados linfocíticos en las glándulas salivares mayores y menores. Un subgrupo de pacientes con infección VIH se ha visto que desarrollan una entidad conocida como *linfocitosis infiltrativa difusa*, cuadro prácticamente indistinguible de la xerostomía, queratoconjuntivitis seca e inflamación parotídea bilateral que presentan los enfermos con SS. Este cuadro difiere del SS en que el infiltrado anatomopatológico que presentan es predominantemente linfocitos T CD8+, no suele acompañarse de presencia de autoanticuerpos, suele afectar más a varones y se relaciona con diferentes HLA (DR5 y DR6)³².

- Virus de la hepatitis C. Al virus de la hepatitis C se le está reconociendo cada vez más un papel como causa de síndrome Sjögren-like³³. Es frecuente en enfermos con infección por VHC la presencia de una sialoadenitis leve e incluso pueden detectarse infiltrados linfocíticos inflamatorios en dichas glándulas³⁴, pudiendo encontrarse hallazgos de crioglobulinemia tipo II y positividad para factor reumatoide. Por tanto, más que un factor etiológico del SS, la infección por VHC debe considerarse como parte del diagnóstico diferencial del mismo, especialmente en enfermos con ausencia de anticuerpos anti-Ro y anti-La.

En resumen, ningún virus está claramente implicado en la patogénesis del SS. Diferentes virus pueden detectarse pero no suelen estar

presentes a títulos altos en los tejidos implicados aunque es posible que pequeños niveles de los mismos sean suficientes para producir alguna alteración en la tolerancia de autoantígenos.

c) *Citoquinas*. Las citoquinas son polipéptidos mediadores de la inflamación producidos por linfocitos T, macrófagos y otras células inmunes. Las células epiteliales salivares son capaces de producir gran variedad de ellas incluyendo IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , interferón γ y TGF β ³⁵. El interferón γ parece jugar un papel importante lo cual viene dado por diferentes hallazgos tales como que en técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de dicho IFN y que a su vez se sabe que dicha expresión guarda relación con el HLA-DR³⁶. Del mismo modo, se ha visto que en cultivos de glándulas salivares tratados con IFN γ aumenta la expresión citoplasmática del autoanticuerpo La, y que, del mismo modo, esta expresión disminuye con la adición de anticuerpos anti IFN γ .

d) *Autoanticuerpos*. Para el desarrollo de esta tesis doctoral es crucial el estudio del papel etiopatogénico de los autoanticuerpos en la enfermedad de Sjögren. El SS se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos, concretamente, antiRo/SSA y antiLa/SSB, pero también de otros anticuerpos como anticuerpos anti receptor de la acetilcolina, anticuerpos anti glándula salivar (hallados a bajo título y sugiriendo quizás un papel secundario como

respuesta al tejido dañado primariamente) y anticuerpos antinucleares detectados por inmunofluorescencia en células Hep-2.

Los anticuerpos anti-Ro se hallan presentes en el 70-90% de los pacientes con SS y en el 35-50% de los enfermos con lupus eritematoso sistémico³⁷. Estos anticuerpos son predominantemente de la subclase IgG1 y reconocen al menos 2 proteínas relacionadas con el RNA: una de 52 KD (475 aminoácidos) y otra de 60 KD (525 aminoácidos). Los anticuerpos anti-52 KD se encuentran más frecuentemente en el SS que en la AR o LES, mientras que los anti-60 KD son más prevalentes en el SS asociado con el LES. Ambos antígenos se localizan predominantemente en el núcleo pero también se pueden expresar en el citoplasma y en la superficie celular. Por otro lado, los anticuerpos anti-Ro detectados en la cirrosis biliar primaria suelen estar dirigidos contra un epítipo de la proteína de 52 KD diferente al del SS primario.

Los anticuerpos anti-La se encuentran en el 50% de los pacientes con SS, estos anticuerpos reconocen una proteína fosforilada de 47 KD asociada a una RNA polimerasa. El gen que codifica dicha proteína tiene la característica de que tiene dos promotores que codifican dos mRNAs diferentes, lo cual podría implicar ciertas connotaciones etiológicas³⁸.

Aunque no existe evidencia clara acerca de la capacidad patogénica de estos anticuerpos, si parece que pudieran desempeñar cierto papel a este

nivel, así por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de los mismos es mayor en presencia de luz ultravioleta, lo cual podría tener relevancia a la hora de interpretar la fotosensibilidad en el LES. Pero la mayor evidencia del papel patogénico de anti-Ro y anti-La viene dada por la capacidad de producir bloqueo cardiaco en recién nacidos con lupus neonatal. Ambos anticuerpos se hallan en el 80-90% de las madres de hijos con lupus neonatal, y son abundantes en el tejido fetal cardiaco de niños afectados por lo que parece que IgG anti-Ro y anti-La pueden cruzar la placenta y producir dicho bloqueo cardiaco³⁹.

Dado que Ro y La también se han hallado presentes en otras enfermedades del tejido conectivo como el LES, se han intentado identificar autoanticuerpos específicos del SS. Una posibilidad serían los anticuerpos contra alfa-fodrin⁴⁰, en un reciente estudio 41 de 43 enfermos con SS primario fueron positivos, 5 de 8 enfermos con SS secundario y en ninguno de 21 enfermos con LES, 14 con AR y 15 controles.

Por otro lado, también se han detectado anticuerpos anti receptor de acetilcolina en enfermos con SS que quizás tengan algún papel en el bloqueo de la transmisión neuroglandular y por tanto en el complejo sicca⁴¹. Parece que estos autoanticuerpos se hallan tanto en el SS primario como secundario⁴².

e) *Mecanismos efectores*. En el SS se han identificado dos vías por las cuales tiene lugar la actividad citotóxica linfocitaria. La primera de ellas es la vía Fas-FasL. Fas (CD95, APO-1) es un miembro de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral cuyo ligando FasL se cree desempeña un papel en mantener la autotolerancia. La unión de Fas y FasL es capaz de provocar tanto una señal de muerte apoptótica como una señal coestimuladora estando la expresión de FasL inducida por la interacción de moléculas MCH de clase II y de antígenos con células Th1 o citotóxicas T CD8+. Se ha demostrado la expresión de Fas en células ductales epiteliales de pacientes con SS, sobre todo en áreas de importante actividad inflamatoria^{43,44}. Una segunda vía de dicha citotoxicidad sería la secreción de gránulos citolíticos que contengan perforin u otras citotoxinas⁴⁵.

2. Autoinmunidad

El sistema inmune humano se ha desarrollado para defendernos de infecciones de microorganismos potencialmente dañinos. Esta respuesta depende, fundamentalmente, del reconocimiento específico de dichos microorganismos por linfocitos B y T. Las células T se caracterizan por la presencia en su superficie del receptor TCR (T cell receptor) y reconocen antígenos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o por células presentadoras de antígenos. Las células B, por el contrario, se caracterizan por la presencia en su superficie

de inmunoglobulinas que actúan como BCR (B cell receptor). Los repertorios BCR y TCR son extremadamente amplios y diversos (10^8), de forma que estos son capaces de responder o reconocer un número ilimitado de antígenos extraños. Sabemos que estos linfocitos no responden, en circunstancias normales, ante antígenos de tejidos del propio organismo, denominándose a esta ausencia de respuesta a antígenos propios *autotolerancia*. A esta se le atribuye un papel crucial en el sistema inmune y cuando falla, la reacción autoinmune que se desarrolla podría ser la base de determinadas enfermedades dentro de las cuales cabrían las enfermedades reumáticas.

Estas enfermedades autoinmunes comprenden un grupo heterogéneo de entidades en las que parece que el reconocimiento de autoantígenos por linfocitos del propio individuo juega un papel crucial, pudiendo incluso llevar a daño tisular. Pero no todas las alteraciones tisulares que se producen por mecanismos inmunes tienen que ser autoinmunes en sí. Así por ejemplo, el daño tisular que se produce en la hepatitis B viene mediado por la respuesta inmune que se desarrolla frente a dicho virus pero no por autoantígenos que existan en el hígado. Por otro lado, en la fiebre reumática, inicialmente la respuesta inmune se produce frente a un agente infeccioso pero la respuesta inmune posterior es autoinmune por naturaleza.

Así pues, las enfermedades autoinmunes pueden dividirse en dos amplias categorías: organoespecíficas y sistémicas. Los mejores ejemplos de enfermedades autoinmunes sistémicas son ciertas enfermedades reumáticas tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren y polimiositis. Ejemplos de las organoespecíficas serían la tiroiditis, en la que el daño de las células tiroideas lleva a hipotiroidismo; diabetes tipo I, en la que se produce destrucción de las células beta pancreáticas secretoras de insulina; o la esclerosis múltiple en la que la mielina del sistema inmune es destruida. Hay una enfermedad autoinmune casi para cada órgano (tabla 2). A su vez, las enfermedades autoinmunes pueden dividirse en función de que estén mediadas por autoanticuerpos o por células T autoreactivas. Es decir, en la miastenia gravis los anticuerpos contra el receptor colinérgico son los responsables de la degradación del mismo y de su disfunción, lo cual lleva a las manifestaciones clínicas de la enfermedad; en la enfermedad de Graves los autoanticuerpos que se crean se unen al receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSH) y causan por tanto hipertiroidismo. En contra, en la esclerosis múltiple y en la diabetes mellitus tipo I se produce un daño en la mielina y en las células beta respectivamente, por medio de células T, que parecen ser responsables de dicho daño de forma primaria⁴⁶.

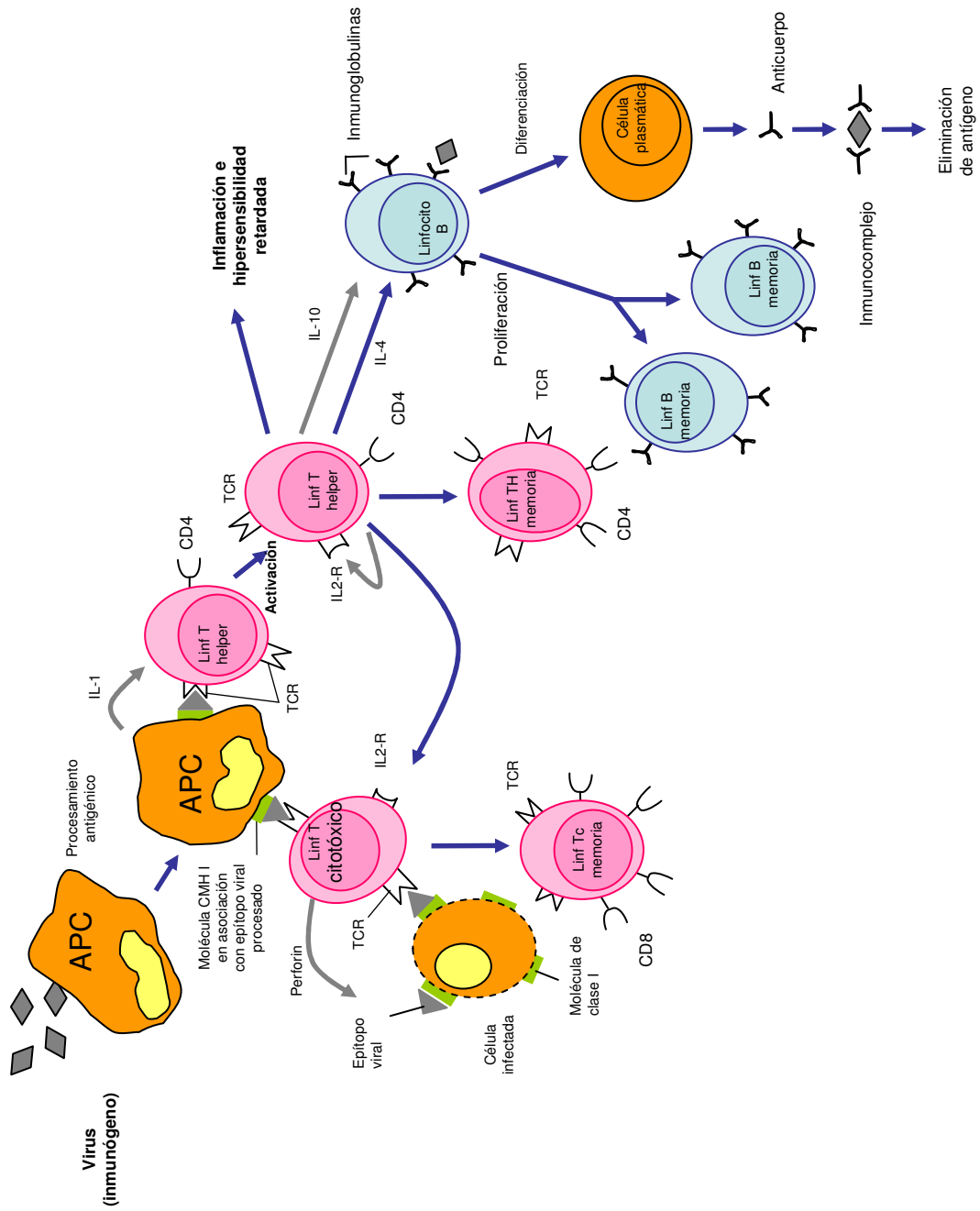


Figura 1. Respuesta inmunológica

<i>Órgano</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Autoantígeno</i>	<i>Respuesta patogénica autoinmune</i>
Suprarrenales	Enfermedad de Addison	Citocromo P450	Autoanticuerpos
Cerebro	Esclerosis múltiple	Proteína básica mielina	Linfocitos T
Ojo	Uveítis	Antígenos uveales	Linfocitos T
Gastrointestinal	Anemia perniciosa	H ⁺ /ATPasa, FI	Autoanticuerpos
Estómago	Enfermedad celiaca	Transglutaminasa	
Int delgado	Enfermedad de Crohn	Desconocido	
Int grueso	Colitis Ulcerosa		
Corazón	Fiebre reumática	Miosina	Autoanticuerpos
Sist. Hematológico			
Plaquetas	Purpuratrombocitopénica	Glicoproteínas IIb-IIIa	Autoanticuerpos
Hematíes	Anemia hem autoinmune	Proteínas memb celular	
Neutrófilos	Neutropenia autoinmune	Proteínas memb celular	
Riñón, pulmón	Síndrome Goodpasture	Colágeno IV cadena 3 α	Autoanticuerpos
Hígado	Cirrosis biliar primaria	Complejos mitocondriales	Ambas
	Hepatitis autoinmune	Citocromo P-450IID6	
Músculo	Miastenia gravis	Receptor acetilcolina	Autoanticuerpos
Cels pancreáticas	Diabetes tipo 1	Glutámico decarboxilasa	Linfocitos T
Piel	Pénfigo	Desmogleina	Autoanticuerpos
Testes, ovarios	Orquitis	Desconocido	Ambas
Tiroides	Hashimoto, Graves	Tiroglobulina, receptor TSH	Ambas

Tabla 2. Ejemplos de enfermedades autoinmunes organoespecíficas (modificado de Kelley, 2001)

En los sistemas inmunes de mamíferos existen células autoreactivas de estirpe B o T de forma fisiológica, formando parte éstas de la respuesta normal del sistema inmune. Algunas de ellas son potencialmente patogénicas, por lo cual deben de ser eliminadas, mientras que otras juegan un papel fisiológico desconocido. De hecho, en experimentos en modelos animales se ha visto que la ausencia de estas células autoreactivas puede llevar en si mismo a una respuesta anómala, y por tanto, patogénica, del sistema inmune. Es más, se han constatado

inmunoglobulinas en personas sanas que están dirigidas contra antígenos propios, a estas inmunoglobulinas se las ha llamado *autoanticuerpos naturales*⁴⁷. La mayoría de estos autoanticuerpos son de clase Ig M, se unen a antígenos propios con baja afinidad y presentan reacción cruzada con múltiples diferentes antígenos. Como ya hemos dicho antes, parece que estos autoanticuerpos juegan un papel crucial en el sistema inmune normal y las células B con estas autoespecificidades generalmente son seleccionadas positivamente durante su desarrollo. Se propone que quizás estos autoanticuerpos jueguen un papel en la eliminación de células o constituyentes celulares senescentes o que quizás contribuyan a la supresión de complejos inmunes.

Bases genéticas

Existen considerables evidencias de que la mayoría de las enfermedades autoinmunes tienen una fuerte predisposición genética. Esta evidencia viene dada por estudios epidemiológicos que sugieren esta posibilidad así como por estudios que comparan gemelos monocigóticos con aquellos que no lo son y que han hallado unas mayores tasas de concordancia en los primeros. No obstante, esta predisposición genética no viene dada por un simple mecanismo mendeliano sino que probablemente múltiples genes determinen parcialmente una determinada enfermedad, y que ningún gen en particular sea ni necesario ni suficiente para ella. La

mayoría de los estudios genéticos se han enfocado en la relación de éstas enfermedades con diferentes haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad pero también se ha encontrado relación con genes no MCH. Por ejemplo, se ha relacionado el lupus eritematoso sistémico con alelos determinados del sistema del complemento, del receptor Fc, de las citoquinas IL-10 y TNF- α o con los del TCR.

Bases ambientales

Parece obvio que determinados aspectos ambientales pueden interactuar e influir en sujetos predispuestos genéticamente a padecer enfermedades autoinmunes (figura 2). Sin embargo, el papel de dichos factores ambientales ha sido difícil de definir. Los agrupamientos geográficos que no se explican por factores genéticos es probable que tengan su causa en efectos ambientales. El hecho de que en algunos estudios la discordancia entre gemelos monocigóticos ha sido del 75% se ha usado a favor de los argumentos de una base ambiental.

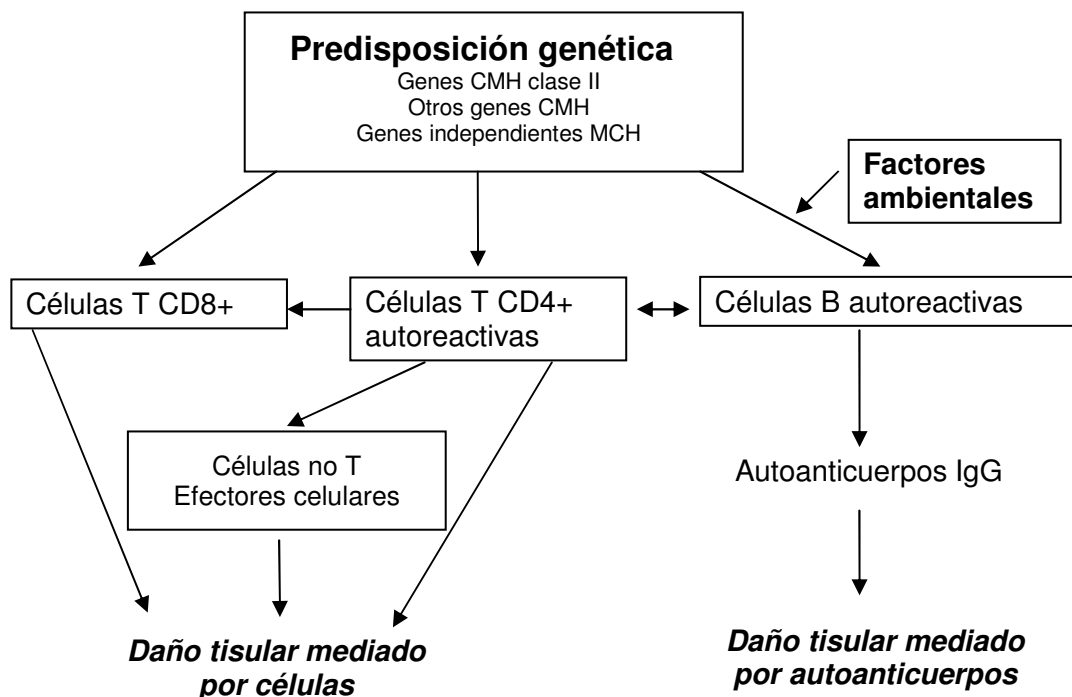


Figura 2. Etiopatogenia de la autoinmunidad

Los factores ambientales a los que se le ha atribuido un mayor papel se refiere a los virus. La infección por determinados agentes en diferentes tejidos puede llevar a que se expresen antígenos que de otro modo estarían ocultos o determinadas citoquinas inflamatorias pueden provocar que se presenten nuevas proteínas como neoautoantígenos que tendrían reacción cruzada con algún autoantígeno fisiológico. Así por ejemplo, en lo que se refiere al lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide la etiología vírica ha sido propuesta de forma vigorosa. Un agente que continúa despertando interés, tal y como comentamos anteriormente, es el virus de Epstein-Barr⁴⁸, habiendo múltiples estudios que demuestran por ejemplo que en el lupus infantil hay más prevalencia de

infección con dicho virus que en controles⁴⁹ o que determinadas células T CD8+ están dirigidas contra proteínas del VEB en la artritis reumatoide⁵⁰.

Del mismo modo, factores como el sol se conoce que exacerban el lupus eritematoso sistémico, también lo hacen las infecciones víricas o bacterianas, determinados factores hormonales exógenos o endógenos y tratamientos con determinados fármacos pueden producir cuadros lupus-like.

Bases celulares

Existe amplia evidencia de que se precisa de células T en la patogenia de la mayoría de las enfermedades autoinmunes. Varios modelos animales de LES u otras enfermedades han demostrado que si se bloquean con anticuerpos monoclonales los linfocitos T, la enfermedad mejora o se previene. De la misma forma, en humanos se puede argumentar esto mismo en base a la presencia de infiltrados de linfocitos T en tejidos dañados, en base al patrón de autoanticuerpos en aquellas enfermedades autoinmunes que están mediadas por los mismos, por el repertorio del receptor TCR que posee expansiones oligoclonales en estas enfermedades, en base a que se sabe que determinados alelos del gen que codifica el TCR predispone a padecer determinadas enfermedades autoinmunes y por la mejoría de estas enfermedades con terapias que bloquean los linfocitos T o sus productos⁵¹.

Como sabemos, el repertorio TCR depende solamente del azar en que se expresen los genes que codifican dicho receptor. Por este motivo, en

el timo tienen lugar dos procesos que modifican en cierta manera este repertorio. Uno de ellos selecciona positivamente aquellos linfocitos con TCR que demuestren una relativa afinidad por antígenos propios permitiéndoles crecer y llegar a ser células que reconocerán antígenos extraños. El otro proceso consiste en la eliminación mediante muerte celular programada de aquellos linfocitos con TCR que muestren alta afinidad de autoreconocimiento de antígenos propios. Posteriormente, estos timocitos emigran a tejidos linfoides periféricos donde maduran pero conservando sus características de superficie que adquirieron en el timo. Se ha propuesto que en enfermedades como el lupus, existe algún defecto en esta autotolerancia que tiene lugar en el timo. De hecho, se ha visto que modelos animales que se someten a timectomía en estadios precoces de la vida desarrollan enfermedades autoinmunes.

Como ya se ha comentado anteriormente, se sabe que en individuos sanos existen linfocitos T capaces de reconocer antígenos propios que por razones desconocidas no llegan a producir enfermedad ni representan ningún tipo de alteración significativa. Esto se cree que ocurre por diferentes mecanismos pero el más importante reside en el hecho de que estos linfocitos autoreactivos se mantienen en un estado de *ignorancia inmunológica*, lo que viene a representar que de alguna forma se evita que se activen o que nunca lleguen a tomar contacto con el antígeno contra el que están diseñados. Cuando esto no ocurre, ya sea porque se liberan

antígenos de forma inapropiada que antes no lo estaban, porque se producen antígenos aberrantes de alguna forma o porque estas células se activan por alguna infección, tendría lugar, según esta hipótesis, la enfermedad autoinmune.

Otro mecanismo a tener en cuenta sería el papel que desempeña el CMH en las enfermedades autoinmunes. Como sabemos, las células T CD4⁺ reconocen péptidos unidos a moléculas clase II del CMH que se hayan en células presentadoras de antígenos, por tanto, quizás alteraciones en estas proteínas del CMH podrían llevar a desregulaciones de la respuesta inmune, haciendo que esta sea anómala. Acaso las moléculas CMH que se relacionan con enfermedades sean capaces de presentar autoantígenos mientras que las que no se asocian a las mismas no sean capaces de hacerlo. Por ejemplo, en estudios de la asociación del DRB1 en la artritis reumatoide se ha confirmado que la estructura de este epítipo permite la presentación de determinados péptidos artritogénicos⁵². También se ha propuesto que las moléculas CMH de clase II que se encuentran en el timo pudieran jugar algún papel en la medida en que alterasen o modificaran de algún modo el repertorio inmunológico del TCR.

Ya clásica es la hipótesis de que determinadas infecciones pueden provocar respuestas autoinmunes porque el agente infeccioso comparte con el huésped determinados epítipos (*mimetismo molecular*⁵³),

de tal forma que, tras la infección, se produce una respuesta inmune de células T contra tejidos del huésped. En estudios animales se pueden usar ciertos péptidos víricos para causar enfermedades en ratones o incluso, ratones modificados genéticamente para expresar una proteína vírica pueden desarrollar enfermedad tras la infección provocada por dicho agente⁵⁴. Existe amplia evidencia del papel del mimetismo molecular como puede ser en queratitis por el virus herpes tipo 1 en las que se ha visto que una de sus proteínas de la cápside puede provocar el mismo cuadro sin requerir la infección del virus per se; en la enfermedad cardíaca por *Chlamydia* en base a mimetismo de ésta con la α -miosina; en la artritis crónica de la enfermedad de Lyme, etc.

No obstante, la hipótesis del mimetismo molecular se sustenta en otro hecho de extrema relevancia, que se conoce como *epitope spreading*. Esto se refiere a que aunque la respuesta inmune comienza en base al reconocimiento de un péptido común al agente infeccioso y al huésped, la reacción inmunitaria posterior es capaz de implicar a otros determinantes antigénicos presentes en la proteína inicial.

En cuanto a las células B, éstas, al contrario que las T, pueden modificar sus BCRs en los tejidos linfoides periféricos, esto permite que la respuesta inmunitaria secundaria tenga mayor especificidad pero por el

contrario, tiene el inconveniente de que podría permitir que se desarrollaran células B autoreactivas.

Como conclusión podríamos decir que el desarrollo de una enfermedad autoinmune es un proceso complejo. Aunque nuestros conocimientos referentes a la inmunopatogénesis de estas enfermedades, relacionados sobre todo con modelos animales, son mucho mayores actualmente, todavía carecemos de información clave al respecto. Las alteraciones celulares inmunológicas que están implicadas en el inicio y perpetuación de estas enfermedades precisan de una mayor definición ya que el conocimiento de estos procesos llevará a nuevas perspectivas en lo que a profilaxis y tratamiento se refiere. Este es el propósito de esta tesis.

3. Proteína Tau

En nuestro laboratorio se ha encontrado, en una tesis doctoral realizada previamente por la Dra. Irene Cózar Castellano, expresión de anticuerpos anti-tau en un enfermo con síndrome de Sjögren. Dado que para la comprensión de este trabajo es necesario entender las diferentes características de esta proteína, pasamos a comentarlas.

El citoesqueleto es la estructura celular responsable de la morfología neuronal. Los microtúbulos son componentes esenciales del citoesqueleto y tienen una gran importancia en la formación de axones y dendritas y de sus contactos específicos. Entre otros factores, la estabilidad

y el dinamismo del ensamblaje de los microtúbulos lo facilitan las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). La proteína tau es una de estas MAP y participa en el ciclo de asociación-disociación de los microtúbulos ayudando a conferir dinamismo a los mismos. De hecho, la proteína tau se purifica de ciclos de polimerización-despolimerización de los microtúbulos *in vitro*⁵⁵. En geles de electroforesis la proteína tau aparece como una serie de diferentes polipéptidos. Estas diferentes isoformas se generan por procesamiento alternativo de un solo ARN o por diferentes niveles de fosforilación⁵⁶. El ARN de tau se traduce desde el gen de tau localizado en el cromosoma 17, un gen que al menos contiene 16 exones. El gen contiene una región 5', que no se traduce y que se ha descrito como una región de unión para diferentes factores de transcripción⁵⁷. Recientemente, se ha descrito próximo a esta región un promotor que confiere especificidad neuronal al gen de tau.

La expresión de las diferentes isoformas de tau por procesamiento alternativo varía en los diversos organismos, depende del estado de desarrollo de los mismos y, además, es diferente según la localización en el sistema nervioso. De esta manera, las isoformas de tau que se encuentran en el sistema nervioso periférico no se expresan en el sistema nervioso central.

La molécula de tau

En la molécula de tau que se encuentra en el sistema nervioso central se han identificado cuatro regiones diferentes: región aminoterminal, región rica en prolina, región de unión a tubulina y región carboxiterminal.

La región aminoterminal contiene secuencias ácidas y su tamaño es variable, ya que contiene exones adicionales: los exones 2 y 3, y el exón 4, que sólo está presente en la molécula de tau del sistema nervioso periférico. La región ácida de la molécula de tau podría implicarse en la unión de cationes, para lo cual se ha propuesto un posible motivo como sitio de unión a metales. Esta región aminoterminal también contiene un motivo con la secuencia KKXK, que se ha propuesto como un posible sitio de unión a heparina. Como se ha indicado previamente, los exones 2 y 3 no están presentes en todas las isoformas de tau. De hecho, estos exones sólo se transcriben en las isoformas alternativas de tau en tejido nervioso de adulto. El exón 4, que está en tau del sistema nervioso periférico, parece evitar la autoagregación de tau.

La región rica en prolinas contiene una gran cantidad de residuos que son potencialmente capaces de fosforilarse, algunos de ellos seguidos de un residuo de prolina y otros dentro de los motivos PPXXP o PXXP, secuencias relacionadas con las interacciones de tau y proteínas de dominio

SH₃. Esta región rica en prolinas parece que desempeña un papel importante en la actividad de tau para unir microtúbulos⁵⁸ (Fig. 3).

La región de unión a microtúbulos contiene tres o cuatro copias de una repetición de 31-32 residuos similares, pero no idénticos. Estas repeticiones se componen de una secuencia altamente conservada de 18 residuos aminoacídicos y de una secuencia menos conservada de 13-14 residuos, conocida como la región interrepeticiones. Una de estas repeticiones de unión a tubulina, la segunda, sólo se expresa en el cerebro adulto. En esta región de unión a microtúbulos se ha sugerido la presencia de un sitio adicional de unión a heparina⁵⁹ y se ha identificado un motivo presente en la proteína: serpina. Se ha sugerido que la proteína tau presenta una estructura plegada al azar, con una forma terciaria no globular. Sin embargo, también se ha propuesto la existencia de una región con posible estructura en β lámina en la región de unión a microtúbulos⁶⁰.

Finalmente, la región carboxiterminal de la proteína tau también presenta una región rica en prolinas con residuos que pueden fosforilarse y una región ácida hacia la zona carboxiterminal. Además, la región C-terminal contiene un motivo similar al que aparece en la subunidad β de la piruvato deshidrogenasa.

Modificaciones de la proteína tau

Algunas cinasas y fosfatasas modulan el grado y patrón de fosforilación de la molécula tau. Se ha aceptado ampliamente que tau es una fosfoproteína que puede modificarse por muchas proteínas cinasas como las proteínas cinasas dirigidas a prolinas (PDPK) y las no dirigidas a prolinas (PKA, MARK cinasa o PKC). Esta fosforilación tiene lugar principalmente en la región rica en prolinas y en la región C-terminal.

Modificaciones de tau por algunas de estas proteínas cinasas disminuyen la afinidad de tau por los microtúbulos. Además, la fosforilación por PDPK puede favorecer la dimerización de tau.

En resumen, la fosforilación de tau en diferentes regiones puede afectar no sólo su interacción con los microtúbulos, sino también su capacidad para agregarse o interactuar con otras proteínas.

Proteínas que interaccionan con tau

Además de la tubulina, existen otras proteínas a las que puede unirse tau, como la espectrina⁶¹ y la proteínofosfatasa 1 (PPI)⁶². Existen, no obstante, otras múltiples proteínas que también se unen a tau, entre las que se encuentran algunas proteínas asociadas a membranas con lo cual es probable que éstas faciliten la unión de tau a la membrana celular. Recientemente se ha visto que la chaperona prolin isomerasa-1 que se une a

fosfoproteínas que contienen fosfoserina o treonina seguidas de prolina, se une a tau fosforilado a través de su región rica en prolinas, aumentando su afinidad para unirse a microtúbulos⁶³.

Localización subcelular de la proteína tau

Como cabría esperar, ya que tau es una proteína asociada a microtúbulos, su localización subcelular es citoplasmática. Sin embargo, también se ha observado que la proteína tau podría unirse a la membrana citoplasmática a través de la mitad N-terminal de la molécula y que la fosforilación de tau en la región rica en prolinas lograría prevenir dicha asociación. Esta asociación podría tener lugar a lo largo de la membrana plasmática axonal y, particularmente, en los conos de crecimiento.

Además, se ha observado una reacción del anticuerpo tau-1 con un antígeno nuclear, aunque la posibilidad de que tau tenga alguna función en el núcleo requiere más estudios.

En neuronas maduras tau está principalmente presente en el axón, aunque también se encuentra una pequeña cantidad de tau en compartimentos somatodendríticos. Como se indicó anteriormente, parte de la proteína tau podría unirse a microtúbulos y otra parte podría estar asociada a la membrana celular.

Función de tau

La búsqueda de diferentes factores que afectan el ensamblaje de los microtúbulos ha llevado al descubrimiento de que tau es una importante proteína asociada a microtúbulos. De hecho, se ha visto que tau promueve la polimerización de los microtúbulos *in vitro* y puede suprimir la dinámica de los microtúbulos estabilizando el ensamblaje de los mismos. Utilizando técnicas de cultivos celulares se ha visto que tau está implicada en la estabilización de los microtúbulos en la neuritogénesis, observaciones que se han demostrado con experimentos de oligos 'antisentido', que inhibieron la polarización neurítica en cultivos primarios celulares⁶⁴. Sin embargo, en contraposición con los resultados citados anteriormente, el ratón deficiente para la expresión de tau generado por *gene targeting* es viable y no muestra un fenotipo muy diferente del ratón salvaje que expresa tau⁶⁵. Para explicar esta aparente paradoja se ha propuesto que otras proteínas asociadas a microtúbulos, como MPA1A, estarían sobreexpresadas en el ratón deficiente para tau, como un fenómeno compensatorio en el desarrollo.

Tau en procesos patológicos

La proteína tau forma agregados aberrantes en algunas enfermedades neurodegenerativas, como en la enfermedad de Alzheimer y en un grupo recientemente descrito de enfermedades conocido como *taupatías*. En la enfermedad de Alzheimer hay dos estructuras patológicas

importantes, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. La proteína responsable de la formación de las placas seniles es la proteína precursora del amiloide (APP), por otro lado, los ovillos neurofibrilares se componen de filamentos helicoidales apareados, siendo éstos polímeros de tau en una forma modificada. La presencia de ovillos neurofibrilares se ha correlacionado con el grado de demencia. La patología de tau se ha correlacionado con la fosforilación de la proteína, la pérdida de capacidad de unión a microtúbulos y la formación de ovillos neurofibrilares.

En cerebros *post mortem* con enfermedad de Alzheimer se ha visto que la fosforilación de tau se incrementa principalmente, aunque no exclusivamente, por algunas proteínas cinasas dirigidas por prolinas. Un resultado de esta hiperfosforilación de tau en diferentes residuos es el cambio conformacional que ocurre en la molécula lo cual puede llevar a que tau se ensamble con la tubulina, también puede provocar una resistencia a su proteólisis o quizás implique un descenso en la unión de tau a microtúbulos lo cual llevaría a una desestabilización del citoesqueleto microtubular^{66,67}. Esto a su vez, llevaría quizás a alteraciones en otras estructuras subcelulares tales como la mitocondria o los lisosomas, y consecuentemente a un daño celular.

Taupatías

Se sabe, desde hace tiempo, que los ovillos neurofibrilares son un factor prominente de la neuropatología del SNC en un grupo de enfermedades, aparte de la enfermedad de Alzheimer. Más recientemente, se ha visto que, en todas ellas, tau está presente en estos ovillos neurofibrilares, en una forma de agregados y con un alto nivel de fosforilación. Estas enfermedades se conocen actualmente como *taupatías*. Entre las taupatías se encuentran la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal y la demencia frontotemporal con Parkinson unida al cromosoma 17. Las taupatías muestran diferencias en sus factores moleculares y patológicos; entre estos factores se encuentran las distintas características de los filamentos ensamblados, las isoformas de tau que componen los filamentos y las regiones del SNC que se afectan.

Una de las taupatías más estudiadas ha sido la demencia frontotemporal con parkinsonismo unida al cromosoma 17 en la cual se ha visto una clara correlación de la patología con mutaciones en el gen de tau. Se han descrito en esta enfermedad mutaciones que afectan a exones de regiones de unión a microtúbulos o de regiones de autoensamblaje de la proteína tau⁶⁸ lo cual confirma el papel etiopatogénico de esta proteína en las taupatías.

Por tanto, aunque tau es aparentemente una proteína asociada a microtúbulos no indispensable para el correcto funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso, su presencia en el SNC de forma modificada puede tener unos efectos patológicos importantes en las neuronas. Los efectos tóxicos de tau parecen deberse a las modificaciones que se producen en la misma. Así, los factores implicados en las modificaciones de tau pueden promover una patología motivada por esta proteína.

4. Proteína humana tipo HesB

Del mismo modo que tau, se ha identificado previamente en nuestro laboratorio, por la Dra. Irene Cózar Castellano, la presencia en un enfermo de SS de autoanticuerpos circulantes contra el producto del gen humano HesB. A tal efecto, suero de una paciente con SS que había tenido manifestaciones neurológicas fue testado en una genoteca de screening de cDNA (se comentará más adelante en *Material y Métodos*).

Dicha proteína fue denominada inicialmente hHesB (human HesB) porque al comienzo de su estudio, mediante la comparación de su secuencia, mostró homología con diferentes proteínas denominadas *de tipo HesB*. Estas proteínas tienen conservado entre ellas un dominio denominado de esa misma forma y que parece relacionado con diferentes procesos de transporte de electrones. Inicialmente se describieron vinculadas a la fijación de nitrógeno en determinadas bacterias, pero posteriormente, esta proteína

ha sido identificada en bacterias que no desarrollaban esta función de fijar nitrógeno, por lo que se demostró que participaban en la formación y reparación de grupos o *clusters* hierro-azufre. Dichos *clusters* son unidades en las que hierro y sulfuro se coordinan de diferentes maneras para unirse a apoproteínas, a través de la molécula sulfuro y un residuo de cisteína, para intervenir en reacciones de transferencia de electrones. Estos *clusters* se forman en la mitocondria celular por medio de diversos procesos enzimáticos y parecen existir en la mayoría de los organismos vivos.

El producto del gen de hHesB ha mostrado homología con las proteínas Isa1p e Isa2p de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El dominio hHesB fue descrito originalmente en relación con el operón *nif* de *A. Vinelandii*, el cual está implicado en la síntesis y maduración de una nitrogenasa encargada de fijar nitrógeno⁶⁹, por lo cual la hipótesis inicial ha sido que la función de dicha proteína está relacionada con la biogénesis de *clusters* de Fe/S.

El gen de rata de HesB presenta una *orf* de 387 nucleótidos que codifica una proteína de 129 aminoácidos y 15,5 KDa de peso molecular. La homología de dicha proteína con la humana es de un 97%. Posteriores estudios acerca de la expresión en humanos de su mRNA mostró que éste tiene 2,8 kb y que su expresión es abundante en cerebro y riñón, siéndolo menos en corazón e hígado.

Así pues, la proteína humana de tipo HesB es de pequeño peso molecular, 15,5 kDa, y según los patrones de Kyte y Doolittle, y Argos, no presenta zonas intermembrana ni hidrofóbicas, por lo que se deduce que es una proteína soluble con alta movilidad. Por la predicción de la localización subcelular su localización más probable parece ser la mitocondria. Respecto a su estructura secundaria, no presenta ningún dominio de unión a DNA y tiene una estructura secundaria sencilla y repetitiva. El dominio que caracteriza a esta proteína es el HESB, con dos cisteínas (C_{121} y C_{123}) conservadas, además de una tercera en la posición C_{57} , la presencia de estas tres cisteínas pueden dar lugar a enlaces de coordinación estables con el hierro II, quedando un par de electrones disponibles para un enlace de coordinación de tipo dativo. Su pequeño tamaño y su solubilidad le permiten amplia movilidad en la matriz mitocondrial o espacio intermembrana, teniendo facilidad para manejar este metal y transportarlo desde un lugar a otro.

Al comparar la secuencia de la proteína tipo HesB con las secuencias de las *orf* ortólogas, sabemos que fundamentalmente se encuentran conservadas las dos cisteínas (C_{121} y C_{123}), que se ha visto que son indispensables para la función de dichas proteínas^{70,71}, ya que el cambio de cualquiera de estos residuos por serina, provoca una disfunción en la proteína. Lo mismo ocurre con la C_{57} que se encuentra en el denominado motivo ISAI, esta cisteína parece fundamental para la función de estas

proteínas y también se encuentra conservada en todas las especies estudiadas.

En concordancia con la hipótesis de que las cisteínas conservadas podrían ser la base funcional de las proteínas Isa1/Isa2, se ha purificado la región que incluye estas tres cisteínas (denominada “*IsaA-like region*”), y se ha comprobado que *in vitro* se une a dicho metal. La conservación de esta zona a lo largo de las especies nos da un indicio de que la función de la proteína de tipo HesB y sus ortólogas pueda ser intervenir en alguno de los pasos del ensamblaje de los complejos Fe/S como donadores de hierro.

La conservación de la estructura de esta proteína desde los procariontes a los eucariotes superiores está en concordancia con lo descrito para la maquinaria *isc* como universal para la biogénesis de los grupos Fe/S en la mayor parte de las especies⁷². La comparación entre las secuencias humana y de rata cumple la ley de evolución, ya que la homología de las secuencias proteicas es de porcentaje superior a la homología de las secuencias de DNA.

Aunque la función de Isa1p/Isa2p no se conoce con claridad, se sabe que intervienen en la maduración y formación de los grupos Fe/S, con el resto de la maquinaria *isc*, ya que cuando se muta uno de estos genes, se pierde la actividad de las enzimas ferro-sulfuradas y se produce una

acumulación de hierro en la mitocondria⁷³. Esto nos llevó a la hipótesis de que en la mitocondria de las células humanas, la proteína de tipo HesB interviene junto a otras proteínas de la maquinaria *isc* y con un transportador de tipo ABC, en la maduración y formación de los grupos Fe/S necesarios para gran cantidad de enzimas mitocondriales y del citoplasma. Sus tres cisteínas conservadas podrían estar relacionadas con la unión a hierro.

Así pues, no conocemos en su totalidad la posible funcionalidad de esta proteína. El único indicio que tenemos de que esta proteína puede intervenir en la biogénesis de los grupos Fe/S viene dado por la homología estructural con las proteínas de este tipo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Transformación de microorganismos

La transformación de bacterias por choque térmico así como la preparación de células competentes se llevó a cabo según el protocolo descrito por Hanahan⁷⁴.

Para la obtención de células competentes *E. coli XL1-Blue* se tomaron varias colonias de una placa de SOB con tetraciclina y se inoculó 1 mL en medio SOB. Tomando este mililitro como preinóculo se inocularon 100 mL de SOB con tetraciclina. Se creció el cultivo a 37°C hasta una $DO_{600} = 0,4-0,6$ para incubarse entonces el cultivo en hielo durante 45 min, seguido de una centrifugación durante 10 min, 4°C, a 1000xg. A continuación las células se resuspendieron en 1/3 del volumen inicial (66 mL) de tampón RF1 frío, incubándose en hielo durante 30 min.

Tampón RF1: RbCl 100 mM; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mM; Acetato potásico 30 mM; Glicerol (Sigma) 15% (p/v); Ajustado a pH 5,8 con ácido acético 0,2M.

Se recogieron las células por centrifugación como anteriormente se indicó, y se resuspendieron en 1/2 del volumen inicial (16 mL) de tampón RF2.

Tampón RF2: RbCl 10 mM; $Ca Cl_2 \cdot 2H_2O$ 75 mM; MOPS 10 mM; Glicerol 15% (p/v); Ajustado a pH 6,8 con NaOH 10 N.

Tras incubar 15 min en hielo, se distribuyeron en alícuotas de 200 μL y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación se añadió a las células descongeladas el DNA (5 μL para una ligación o 1 μL para DNA plasmídico) y se incubó en hielo durante 10 min. A continuación la mezcla se sometió a choque térmico durante 90 s a 42°C , pasándolo a hielo durante 2 min. A la mezcla de transformación se le añadió 800 μL de LB y se incubó durante 45 min. a 37°C . Por último las bacterias se sembraron en placas de LB agar con los antibióticos adecuados.

2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para bacterias

El medio de crecimiento utilizado de forma rutinaria fue el medio LB (Luria Bertani). En la preparación de células competentes se utilizó el medio SOB para su crecimiento, mientras que en la incubación de éstas, después de la transformación se utilizó medio SOC. Para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* se usó el medio LB. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave, excepto las disoluciones de cloruro magnésico y sulfato magnésico que fueron filtradas. La temperatura de crecimiento fue de 37°C .

Medio LB: Bacto-Triptona (Difco) 1% (p/v); Extracto de levadura (Difco) 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v), pH 7 (ajustado con NaOH).

Medio SOB: Triptona 2% (p/v); Extracto de levadura 0,5% (p/v); NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM.

Medio SOC: Igual que el medio SOB, pero añadiendo glucosa 20 mM.

NOTA: Todas las sales y los disolventes orgánicos utilizados en este trabajo son de MERCK con grado analítico de pureza, si por algún motivo se ha utilizado un producto de otra casa comercial, se indica entre paréntesis.

En el caso de medios sólidos se usó Bacto-Agar (Difco) 2% (p/v). Los antibióticos se añadieron a las siguientes concentraciones: Ampicilina: 50-100 μg/mL; Tetraciclina: 34 μg/mL; Cloranfenicol: 25 μg/mL; Kanamicina: 75 μg/mL. Todos los antibióticos son de Sigma.

La determinación del crecimiento se realizó midiendo la densidad óptica a 600nm.

Para fagos

Los fagos derivados de λ_{gt11} y *Uni-ZAP® XR* se crecieron en *E. coli* Y1090 y *XL1-Blue MRF'* respectivamente, en medio LB, maltosa 0,2%, MgSO₄ 10 mM, a 37°C. Se mantuvieron en tampón de fago SM a 4°C

durante todo el período de su utilización, también se congeló una reserva con DMSO 7% (v/v) a -80°C .

Para la obtención y purificación de los fagos positivos derivados de $\lambda_{\text{gt}11}$, en cantidad suficiente para extraer su DNA y manipularlo enzimáticamente, se utilizó el siguiente protocolo, basado en el descrito por Sambrook y cols⁷⁵, al que denominamos “miniprep de fagos” :

- De un cultivo de *Y1090*, crecido toda la noche a 37°C , centrifugado y resuspendido en MgSO_4 10mM, se tomaron 200 μL y se inocularon con una calva de fago positivo de una placa de LB-agar. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y durante 15 min a 37°C .
- A continuación se añadieron 15 mL de LB y se incubó a 37°C en agitación, hasta que el cultivo bacteriano se lisó. La lisis se completó añadiendo 200 μL de cloroformo e incubando 15 min a 37°C con agitación.
- El cultivo lisado se trató con DNasa 2 $\mu\text{g/mL}$, RNasa 1 $\mu\text{g/mL}$ durante 15 min. a temperatura ambiente, y a continuación con NaCl 1M durante 1 h a 4°C . Los restos celulares se retiraron mediante una centrifugación de 10 min. a 11000 $\times g$ a 4°C .
- Finalmente se precipitaron los fagos añadiendo polietilenglicol 8000 (PEG8000) 10% (p/v) (Sigma) e incubando 12 h a 4°C , tras una

centrifugación de 10 min. a 11000xg, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 600 μ L de SM.

Tampón de fago SM: NaCl 100mM; MgSO₄ 10 mM; Tris-HCl (USB) 50 mM pH 7,5; Gelatina (Merck) 0,01% (p/v).

3. Preparación y análisis de DNA

DNA plasmídico

La preparación de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli* crecidos toda la noche en medio líquido LB con los antibióticos de selección adecuados.

Se utilizó el método de lisis alcalina según Sambrook⁷⁵ para obtener DNA plasmídico. Se centrifugan 1,5 mL de cultivo durante 20 s a 17000xg y, tras desechar el sobrenadante, se resuspende el sedimento en 150 μ L de disolución I. A continuación se añaden 300 μ L de disolución II (preparada en el momento de su uso). Se mezcla suavemente hasta que el sedimento adquiere una consistencia mucosa, dejándolo a temperatura ambiente durante 5 min. Después de añadir 225 μ L de disolución III y agitar vigorosamente 10 s, se recupera el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico previa centrifugación, durante 10 min. a 12000xg. El DNA plasmídico se obtiene precipitando el sobrenadante con 0,6 vol. de isopropanol y centrifugación durante 15 min. a 12000xg y posterior lavado

con etanol 70% (v/v) a -20°C. Se resuspende el DNA precipitado en 20 µ L de agua. Para eliminar el RNA se añade RNAsa a una concentración final de 40 µ g/mL y se incuba durante 15 min. a 37°C.

Disolución I: Tris-HCl 25 mM, pH 8; Glucosa 50 mM; EDTA 10 mM.

Disolución II: NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v).

Disolución III: Acetato potásico 3 M; Ácido acético 11,5 % v/v.

DNA de fago

La extracción del DNA, se hace a partir de fagos que han sido precipitados con PEG8000 de una “miniprep de fagos”, y resuspendidos en SM. Para la extracción del DNA se sigue el protocolo descrito por Sambrook y cols⁷⁵, que consiste en una extracción con cloroformo, y un tratamiento con EDTA 20 mM, Proteinasa-K 50 µ g/mL, SDS 0,5% (p/v) a 65°C durante 1 h. A continuación se somete la muestra a una extracción de fenol/cloroformo, y se precipita el DNA con acetato sódico 0,3 M y 2 vol de etanol 100% (v/v) frío.

DNA genómico.

El DNA genómico para hacer los experimentos de “*primer extension*” se obtuvo a partir de sangre humana mediante un procedimiento con proteinasa-K y sales de guanidinio, tal y como se describe:

A 3 mL de sangre que hemos pasado a un tubo de 50 mL, le añadimos 30 mL de tampón de lisis hemática, se incuba 15 min. a 4°C y se centrifuga 10 min. a 1000xg a 4°C. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se lava con 5 mL de tampón de lisis tantas veces como fuera necesario. A continuación se resuspende el sedimento en 1 mL de disolución de lavado, y se le añade 0,1 mL de sarcosil 10% (p/v) y 30 μL de proteinasa-K 10 mg/mL, incubándose entre 15-120 min. a 60°C, o bien 12 h a 37°C. Se añaden 3 mL de tiocianato de guanidinio 70,9% (p/v) y se incuban durante 15 min. a 60°C. Para precipitar el DNA se añade 10 mL de etanol frío y se agita durante 5 min. hasta que aparecen las hebras de DNA, que se lava con etanol 70%, se centrifuga y el sedimento se resuspende en un volumen de agua que depende del tamaño del sedimento, incubándose a 37°C hasta que se resuspenda.

Tampón de lisis hemática: NH₄Cl 155 mM; NH₄HCO₃ 10 mM; EDTA 0,1 mM.

Disolución de lavado: TrisHCl pH 8, 50 mM; NaCl 10 mM; EDTA 10 mM.

Digestión de DNA.

El DNA se digirió a la temperatura requerida por la endonucleasa de restricción, en un volumen de reacción de 20-100 μL, con una concentración de DNA=25-100 ng/μL, 1 U de la endonucleasa de restricción por μg de DNA

y el tampón específico para cada enzima 1x. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo a 37°C durante 2h.

Elaboración de construcciones.

El vector e inserto fueron digeridos y purificados. El ligamiento del vector y el inserto se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 10µ L. Se aplicó una relación vector:inserto 1:3 para extremos cohesivos y romos. Se partió de manera habitual de 150-200 ng de vector.

Para extremos romos se usó tampón ligasa con PEG8000 5% (p/v) y la mezcla de reacción se incubó a 22°C durante 2h y a continuación a 14°C durante toda la noche. Para extremos cohesivos, se usó el mismo tampón pero sin PEG8000, y la reacción se realizó de la misma manera.

Tampón ligasa 5x: Tris-HCl 0,25 mM, pH 7,6; MgCl₂ 50 mM; ATP 5 mM; DTT 5 mM; PEG8000 25% (p/v).

Transformación de extremos protuberantes en romos.

Para rellenar extremos 3' no protuberantes se utilizó la actividad polimerasa del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Promega) en presencia de los dNTPs apropiados. Finalizada la digestión (en un volumen de 20 µ L) con la endonucleasa de restricción apropiada y tras inactivación de la misma (según recomendaciones del fabricante) se añadió 1µ L dNTPs 1 mM y Klenow 1U/µ g de DNA digerido.

Se incubó la reacción durante 15 min a temperatura ambiente. Se inactivó la enzima calentando la mezcla de reacción a 75°C durante 10 min y se sometió a electroforesis en gel de agarosa y posterior purificación del fragmento de interés.

Cuando se hizo necesario hacer romos los extremos 3' protuberantes se utilizó la T4 DNA polimerasa según Sambrook⁷⁵.

Finalizada la digestión con la endonucleasa de restricción apropiada y tras inactivación de la misma (según recomendaciones del fabricante) se añadió 1 µL dNTPs 2mM y T4 DNA polimerasa 1-2 U/µg de DNA. Si la digestión se realizó en un volumen superior al indicado, los volúmenes de dNTPs y T4 DNA polimerasa se mantuvieron proporcionales.

La reacción se incubó durante 15 min a 12°C, la enzima se inactivó durante 10 min a 75°C, y la mezcla de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa y posterior purificación del fragmento de interés.

Defosforilación.

La defosforilación se llevó a cabo según Sambrook⁷⁵. Después de someter el plásmido a digestión con la endonucleasa de restricción adecuada, inactivar la enzima y precipitar el DNA, se defosforiló el vector en una mezcla de reacción de 100 µL, con tampón de defosforilación 1x y fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) según se indica.

Si los extremos originados por la digestión enzimática del plásmido fueron 5´ protuberantes, se usó fosfatasa alcalina a 1U/100pmol DNA y se incubó la reacción durante 30 min. a 37°C.

Si los extremos fueron romos o bien 3´ no protuberantes, se usó fosfatasa alcalina a 1U/2 pmol DNA. La reacción transcurrió a 37°C durante 15 min. y entonces se añadió otra alícuota de enzima y continuó la reacción a 55°C durante 45 min.

Finalizada la reacción se inactivó la enzima a 75°C durante 10 min. con EDTA 5mM.

Electroforesis de DNA.

La separación de DNA se realizó en geles de agarosa SeaKem (FMC Bioproducts) sumergidos. Éstos se prepararon a la concentración adecuada (0,8-1,5% (p/v)) según el tamaño de los fragmentos de DNA a separar, en tampón TAE 1x. La agarosa se fundió calentándola en un microondas sin dejar hervir. Se aplicaron por pocillo entre 5-20 µ L de muestra mezclada con 1:6 vol de tampón de carga 6x.

Las electroforesis se realizaron a diferencia de potencial constante de 75-100V hasta que la migración del azul de bromofenol alcanzó $\frac{3}{4}$ partes de la longitud del gel. El DNA se tiñó mediante inmersión en una disolución de bromuro de etidio (0,5 µ g/mL en agua) durante 15 min. Para reducir la

fluorescencia de fondo, el gel se lavó durante 5 min en agua. Las bandas se visualizaron mediante un transiluminador de luz ultravioleta de 312 nm y se fotografiaron.

Tampón TAE 50x: Tris 2 M; Ácido acético glacial pH 8, 5,7% (v/v); EDTA 50mM.

Tampón de carga 6x: Azul de bromofenol (Sigma) 0,25% (p/v); Xilencianol FF (Sigma) 0,25% (p/v); Glicerol 30% (p/v).

Purificación de DNA.

Los fragmentos de DNA se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Tras teñir el DNA y recortar la banda de interés con un bisturí estéril, se extrajo el DNA de la agarosa por el sistema Ultrafree DA (Millipore) según instrucciones del fabricante. El DNA eluido se precipitó con acetato amónico 2,5 M, pH 7 y 2 vol de etanol durante 1 h a temperatura ambiente, y se resuspendió en un volumen adecuado de agua.

El DNA plasmídico para ser secuenciado, en lugar de ser obtenido por el método descrito anteriormente, se extrajo con el kit Qiaprep (Qiagen) según indicaciones del fabricante.

Marcaje de sondas y oligonucleótidos.

Con digoxigenina.

El marcaje con digoxigenina se llevó a cabo con el “DIG DNA labeling kit”, (Boehringer Mannheim) siguiendo indicaciones del fabricante. El DNA marcado se precipitó con 1/10 vol LiCl 4M y 3 vol EtOH 100%, y se resuspendió en un volumen adecuado de agua. Para estimar la cantidad de sonda marcada se goteó sobre una membrana de nitrocelulosa diluciones seriadas de la sonda y de un DNA control marcado. El proceso de revelado de esta membrana después de unir el DNA covalentemente por luz UV, consiste en bloquear 30 min. con tampón maleico más 1% (p/v) leche e incubar 30 min. con esta misma disolución con anticuerpo anti-DIG conjugado a AP (Boehringer Mannheim) a 1:5000. Después de tres lavados de 10 min se revela con NBT/BCIP, de la misma manera que se indica en el revelado del southern-blot, que se expone más adelante. La cantidad de sonda marcada se estimó por comparación de la señal de la sonda con el DNA control.

Con γ -ATP.

El método utilizado para el marcaje es el descrito por Ausubel⁷⁶ el cual consiste en mezclar los siguientes componentes en el orden indicado, hasta un volumen final de 10 μ L: 1) 2,5 μ L de H₂O; 2) 1 μ L T4 tampón polinucleótido kinasa 10x (Promega); 3) 1 μ L DTT 0,1 M; 4) 1 μ L

espermidina 1mM; 5) 1 μ L primer 50-100 ng/ μ L; 6) 3 μ L [γ -³²P] ATP 10 uCi/ μ L (ARC: ARP-102C); 7) 0,5 μ L T4 polinucleótido kinasa 20-30 U/ μ L (Promega). Se incuba la mezcla durante 1 h y se para la reacción añadiendo 2 μ L de EDTA 0,5 M y 50 μ L de tampón TE. Se incuba durante 5 min. a 65°C. Para purificar la fracción de oligonucleótidos que ha sido marcada, se pasa la mezcla de reacción por una columna de exclusión molecular de Sephadex G-25 (Pharmacia), siguiendo el método descrito por Sambrook y cols, 1989.

El porcentaje de sonda marcada, se calcula comparando la radiactividad presente en 1 μ L de la reacción antes y después de pasar por la columna de exclusión.

Southern-blots.

El DNA se separa en geles de agarosa, y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) siguiendo el protocolo descrito por Sambrook⁷⁵. Este método se basa en la desnaturalización *in situ* del DNA con NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M, seguido de una neutralización con Tris-HCl 1 M pH 7,4 y NaCl 1,5 M, y la transferencia por capilaridad del DNA a la membrana en presencia de 10x SSC. La transferencia se realiza durante más de 16 horas. El DNA se une covalentemente a la membrana de nitrocelulosa mediante luz ultravioleta (1200 mJ/cm²). La membrana se prehibrida durante al menos 2 horas a 42°C en una disolución de

prehibridación. A continuación se añade la sonda marcada con digoxigenina (5ng/ μ L), previamente desnaturalizada al calentarla durante 10 min. a 100°C en la disolución de prehibridación. La hibridación se desarrolla a 42°C durante 14 h. El exceso de sonda se elimina mediante dos lavados de 5 min. cada uno, con SSC 2x, SDS 0,1% (p/v) a temperatura ambiente. La membrana se lava durante 15 min. con SSC 0,2x, SDS 0,1% (p/v) a 55°C y un último lavado de 15 min. con SSC 0,1x, SDS 0,1% (p/v) a 65°C; ambos lavados son para eliminar la sonda hibridada inespecíficamente. Se hace un lavado de 5 min. con tampón maleico. Se incuba 30 min. con un bloqueo preparado con la misma disolución y 1% (p/v) leche desnatada (Regilait). Se incuba 30 min. con la disolución de bloqueo y anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a AP (Boehringer Mannheim) a concentración 1:5000. Se hacen dos lavados de 15 min. cada uno con la disolución de maleico, y un lavado de 5 min para equilibrar con el tampón de detección para AP. Sobre un papel de filtro saturado con el tampón de detección y NBT/BCIP (0,33 mg/mL / 0,17 mg/mL), se coloca la membrana y se incuba en la oscuridad hasta que aparezcan las bandas.

SSC 20x: NaCl 17,53% (p/v); Citrato sódico 8,82% (p/v); Ajustar con HCl hasta pH 7.

Disolución de prehibridación: Formamida 50% (p/v); SSC 5x; Denhardt 2x; SDS 0,1% (p/v).

Tampón maleico: Ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM; Ajustar el pH a 7,5.

Tampón de detección para AP: Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5; NaCl 0,1 M.

NBT(Boehringer Mannheim): 75 mg/mL en dimetilformamida 70% (v/v) y se guarda a 4°C.

BCIP(Boehringer Mannheim): 25 mg/mL en dimetilformamida 100% (v/v) y se guarda a 4°C.

Secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el kit Sequenase® (USB), según indicaciones del fabricante. Las reacciones se cargaron en un gel de acrilamida/urea, que se pre-corrió durante 1 h, y la electroforesis tuvo lugar a 60-80W, teniendo cuidado de que el gel no supere los 55°C. El tampón usado para la electroforesis fue TBE 1x.

Gel de urea/acrilamida 1x: Acrilamida (Serva) 5,7%; Bisacrilamida (Serva) 0,3%; Urea (USB) 42%; TBE 1x; TEMED (Serva) 2µL/mL disolución; APS (Serva) 20 µ L/mL de disolución.

TBE 10x: Tris 10,8% (p/v); Ácido bórico 5,5% (p/v); EDTA 0,02 M.

La secuenciación de los clones positivos del muestreo sobre las genotecas se hizo en Sistemas Genómicos S.L. Para secuenciar estas

muestras, los distintos tipos de DNA se purificaron con los siguientes kit, siguiendo las indicaciones de cada uno de los fabricantes:

- Wizard DNA Clean-Up system (Promega)
- Microcon PCR (Millipore)
- Qiaprep (Qiagen)

Análisis y comparación de secuencias.

Para manipular, identificar y caracterizar las distintas secuencias resultantes de los clones positivos obtenidos de los muestreos con las tres genotecas se utilizaron los siguientes programas:

OMIGA: Para ordenar y almacenar todas las secuencias obtenidas, así como para buscar las pautas de lectura abierta (*orf*) de cada secuencia de cDNA y estudiar en las zonas 5´UT y 3´UT, las secuencias consensus de promotor mínimo y de terminación de la transcripción respectivamente.

PSORTII, MITOPROT: Para estudiar las presecuencias de señalización a mitocondria.

<http://psort.nibb.ac.jp/>

<http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>

NPS@-PBIL: Para estudiar el perfil físico-químico de la secuencia primaria de la proteína (patrones de hidrofiliicidad/hidrofobicidad, flexibilidad, antigenicidad, etc.) y las posibles estructuras secundarias deducidas de la secuencia de aminoácidos.

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html

NCBI-BLAST: Para comparar las secuencias de cDNA con todas las secuencias de DNA y proteínas de los bancos de datos⁷⁷.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

NCBI-ENTREZ GENOME: Para localizar los genes en los cromosomas humanos⁷⁸.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/page.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs>

CLUSTALW: Para comparar las secuencias de DNA o proteína, señalando puntualmente las homologías.

<http://bio.lundberg.gu.se/index.html>

EBI-PPSEARCH (Prosites): Para estudiar las secuencias consensus de dominios funcionales de proteínas, así como la familia de proteínas que lo contienen.

<http://www2.ebi.ac.uk/ppsearch.html>

4. Preparación y análisis de proteínas

Extracción de proteínas.

La cuantificación de las proteínas se hizo en unos casos por tinción con azul de Coomasie de las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, y en otros casos según Bradford⁷⁹.

LSB 3x (tampón de carga para proteínas): Tris HCl 62 mM, pH 6,8; Glicerol 3,33% (p/v); SDS 0,67% (p/v); β -mercaptoetanol 1,67% (p/v); Azul de bromofenol 4×10^{-4} % (p/v).

Electroforesis de proteínas.

Las proteínas se separaron en un sistema de geles discontinuos de poliacrilamida-SDS (Laemli, 1970) al 10%, 12,5% y 15% (p/v) dependiendo del tamaño de las proteínas que se quieren separar. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas conocidas, que han sido preteñidas con azul de Coomasie (Sigma). Las electroforesis se llevaron a cabo en dos tipos de cubetas: Hoefer SE600 y Miniprotean de BioRad, en ambos casos con un potencial de 200V y a temperatura ambiente hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

Tampón de cámara 10x: Tris 0,25M; Glicina 2M; SDS 0,035M.

Western-blots.

Tras la electroforesis, el gel se equilibró durante 15 min. en el tampón de electrotransferencia y las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluorado (PVDF, Immobilon-P, Millipore), previamente hidratada con metanol y equilibrada en tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron:

- Cubeta Hoefer: 400 mA, 4°C, durante toda la noche.
- Cubeta BioRad: 100 V, 4°C, 1 hora.

Tampón de electrotransferencia: Tris 20mM; Glicina 132 mM; Metanol 20% (v/v). El tampón queda a pH 8,3-8,4.

Una vez finalizada la transferencia se lavó la membrana varias veces en PBS-T y se bloqueó durante una hora en PBS-T con 5% (p/v) de leche desnatada (Regilait).

Para la elección de los sueros humanos que se utilizaron en el muestreo de la genoteca de expresión, éstos se utilizaron a distintas diluciones y procedían de enfermos afectados de Síndrome de Sjögren. Estos sueros fueron cedidos por el Servicio de Reumatología del HUC, siguiendo la normativa correspondiente.

Los sueros se diluyeron en PBS-T con 0,5% (p/v) de leche desnatada y se incubaron con las membranas durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min cada uno, con PBS-T, se aplicó el anticuerpo secundario correspondiente:

- Sueros humanos: Anti-IgG humano unido a POD (Boehringer Mannheim) a 1:100 000; o (Amersham) a 1: 60 000.
- Sueros de conejo: Anti-IgG de conejo unido a POD (Amersham) a 1:10 000; o (Amersham) a 1:100 000.

El anticuerpo secundario se diluyó en la misma disolución que el anticuerpo primario, y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con PBS-T. La actividad peroxidasa se reveló mediante quimioluminiscencia con el sistema ECL Plus (Amersham) y se detectó con una película de rayos X (Fuji RX) durante tiempos de exposición variables.

PBS-T: NaCl 13,7mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,8mM, ajustado a pH 7,4; Tween[®] 20 (Sigma) 0,1% (p/v) .

Reciclaje de membranas.

Las membranas de PVDF se reutilizaron eliminando el anticuerpo unido mediante tratamiento con una disolución: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7; SDS 2%; β-mercaptoetanol 100 mM.

Se trató durante 30 min a 50°C. Para eliminar los restos de la disolución de reciclaje se hicieron cuatro lavados de 15 min cada uno con PBS-T.

5. Inducción de síntesis proteica y purificación de la proteína a estudio por afinidad con matriz Ni-NTA

Las cepas de *E. Coli BL21* seleccionadas se crecieron con los antibióticos apropiados durante la noche en un volumen de 5 ml de LB. Tras esto se procedió a medir la densidad óptica de los cultivos y se tomaron alícuotas para un volumen de 100 ml de LB a densidad óptica 600 nm 0,01. Cuando la densidad óptica de los cultivos fue de 0,5-1 se indujeron con IPTG 1 M y cuatro horas después se recogió el pellet del cultivo tras centrifugación del mismo.

El pellet de bacterias obtenido tras inducción se sometió a *buffer de lisis* Tris 50mM pH8, EDTA 1mM, NaCl 100 mM, 3ml de dicho buffer por gramo de pellet, posteriormente se añadió complete 25X, lisozima 80 µl/gr y ácido desoxicólico 10 µg/ml. Una vez realizado esto se completó con DNAasa 30 µl/gr y se procedió a incubación a 37° durante 30 minutos. Tras centrifugación a 11000 rpm durante 15 minutos a 4° se recogió el pellet obtenido y se sometió de nuevo a buffer de lisis 10mM EDTA Triton x100 0,5% y nueva centrifugación en las mismas condiciones descritas.

La matriz de níquel se equilibró inicialmente con *buffer de lisis* Tris 20 mM Urea 6M pH8, con 3 centrifugaciones a 5000 rpm descartando el sobrenadante. Posteriormente se incubó la muestra con la matriz en movimiento durante 1 hora a 4°C. Una vez transcurrida esta hora la matriz se sometió a 3 lavados cada uno, con *buffer de lisis* 5mM Imidazol y 200 mM Imidazol respectivamente, este último con inhibidor de proteasas complete.

En el caso de hHesb el proceso fue similar salvo que tras correr la muestra en gel de acrilamida, la banda a estudio se cortó y la proteína de interés se obtuvo mediante *electroelución*.

6. Western blots de las proteínas a estudio y análisis de intensidad de bandas.

Las proteínas tau y hHesb se sometieron a sondaje con 19 sueros de enfermos de SS y 19 controles sanos, cedidos por el Servicio de Reumatología y el Banco de Sangre del Hospital Universitario de Canarias según la normativa vigente. Para tau se utilizaron dichos sueros a una dilución de 1/1000 y para hHesb a 1/2000 utilizando como secundario Ig anti-human (Amersham) a 1/60000. Las bandas obtenidas tanto en enfermos como controles fueron analizadas con el software NCI-Image según instrucciones del mismo.

7. Análisis estadístico

La hipótesis nula del estudio se determinó como que no había diferencias entre los pacientes y controles en lo que se refiere a los niveles de anticuerpos anti-tau y anti-hHesB. La potencia estadística requerida a priori exigía el estudio de 80 pacientes como mínimo para conseguir una representabilidad poblacional adecuada, no obstante, aunque esta no se consiguió, ya que se estudiaron un número inferior de pacientes, nuestros datos suponen una aproximación inicial a los datos que se discuten.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS utilizando la prueba de Mann-Whitney y otros estadísticos adecuados para cada análisis. Los valores extremos fueron depurados de la sábana de datos promedio al análisis estadístico con la sustitución de estos valores por el valor correspondiente a la media más 2,5 desviaciones estándar.

RESULTADOS

1. Análisis de las secuencias de los cDNAs obtenidos en el muestreo.

Tal y como se ha comentado en *Material y Métodos*, tras seleccionar mediante el método SEREX los clones autorreactivos en una genoteca de cerebro humano con diferentes sueros de enfermos con SS, estos fueron secuenciados mediante su envío a centro de referencia para tal fin (*Sistemas genómicos, Valencia*). Las secuencias obtenidas de cada uno de ellos fueron comparadas con las secuencias conocidas de DNA y proteínas publicadas en los bancos de datos, a las que accedimos por los programas del NCBI-BLAST.

Identificamos en primer lugar una proteína como autoantígeno ya conocida: **proteína tau**; y otra desconocida, cuya caracterización corrió a cargo de otra tesis desarrollada en nuestro grupo de investigación, el **producto del gen humano hHesB**. El objeto de esta tesis es el análisis de ambas proteínas en lo que se refiere a su relación como autoantígenos en el SS.

No obstante, en nuestra línea de trabajo se obtuvieron otros clones, dentro de los cuales se hallaban proteínas conocidas y asociadas al SS y proteínas conocidas pero no asociadas al SS. Entre las ya relacionadas con el SS tenemos: proteína La/SS-B, implicada en la transcripción de la RNA polimerasa III; proteína NA-14, proteína nuclear identificada recientemente; PDC-E2 (dihidrolipoamida acetil transferasa), proteína de 70

kDa componente E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa relacionada con la cirrosis biliar primaria; autoantígeno del centrómero CENP-B relacionada con la esclerosis sistémica y; macromolécula no proteica rRNA 28s relacionada con el lupus eritematoso sistémico. Entre las no relacionadas previamente con el SS figuran: proteína tau, cuya estructura y papel molecular ya ha sido comentado; proteína WAVE, proteína relacionada en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto celular implicada en la patogenia del síndrome de Wiskott-Aldrich y; proteína hHesB que también ha sido ya descrita.

Una vez obtenidos los clones de tau y hHesB, proteínas escogidas para determinar su relación con el SS, los insertos de interés fueron subclonados en diferentes plásmidos de expresión según conveniencia y en función de las pautas de lectura abierta (*ORF: open reading frame*) que se estudiaron mediante el programa OMIGA, de tal forma que ambas secuencias de cDNA para tau y hHesB fueron insertadas en sendos plásmidos pRSET B, ya que estas construcciones permitían obtener las secuencias de aminoácidos de síntesis esperadas.

Para el caso de tau, al plásmido que contenía su inserto se le denominó: PIF1 (pREST B + inserto tau). Fue digerido con la enzima de restricción *Pvu II*. Esta enzima digería al inserto en un lugar asimétrico y al plásmido en dos sitios de restricción, de tal forma que se podrían obtener, tal y como se indica en la figura 4, dos fragmentos del inserto correspondientes a 588 y 489 pares de bases, o dos fragmentos de 691 y 380 pares de bases.

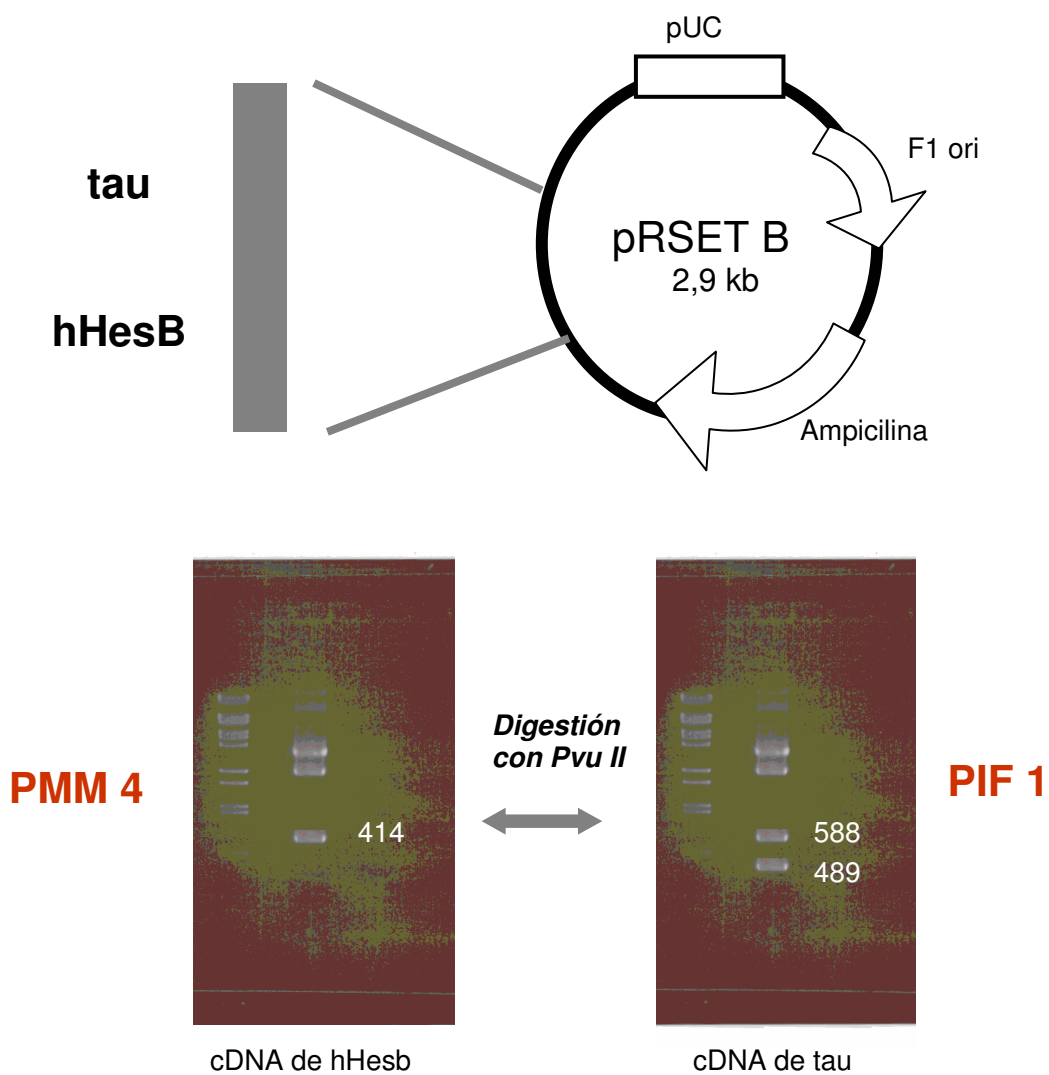


Figura 4. Digestión del cDNA de tau y hHesB para conocer orientación correcta en pRESET B

Se eligieron aquellos clones en los que se obtenía la primera combinación de pares de bases, ya que esta correspondía a la disposición del inserto en la pauta de lectura requerida para la síntesis de la proteína tau.

En lo que se refiere a hHesB este fue subclonado de tal forma que al plásmido que lo contenía se le denominó PMM 1 (pRESET B + inserto hHesB). En este caso la digestión con enzimas de restricción se realizó igualmente con *Pvu II*, la cual permitía la obtención de dos combinaciones de fragmentos, una de ellas con dos fragmentos de 3311 y 212 pares de bases, y otra con dos fragmentos de 3109 y 414. También en este caso se escogieron aquellos clones cuya digestión nos permitió conocer la pauta de lectura adecuada que sintetizaría la proteína a estudio.

Posteriormente dichos plásmidos, PIF 1 y PMM1, fueron transformados para su inducción proteica en bacterias *BL21 (DE3) plys S*. Esta se llevo acabo para el inserto tau mediante columnas de níquel de afinidad y para hHesB mediante electroelución tal y como se comenta en *Material y métodos*.

Tras la transformación se procedió a comprobar que las bacterias contenían la construcción a estudio. Para este fin, a diferentes clones se les extrajo sus plásmidos y se corrieron en geles de agarosa y se asumió que aquellos que tenían un peso superior al del plásmido sin inserto eran los clones que contenían a éste (figura 5).

2. Obtención de las proteínas tau y hHesB

Las bacterias BL21 fueron sometidas a crecimiento en medios de cultivo adecuados tal y como se ha descrito anteriormente y a inducción proteica. Para tau se obtuvo una proteína de aproximadamente 17 kDa y para hHesB de aproximadamente 15 kDa tal y como se observa en la figura 6 que representa un gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie.

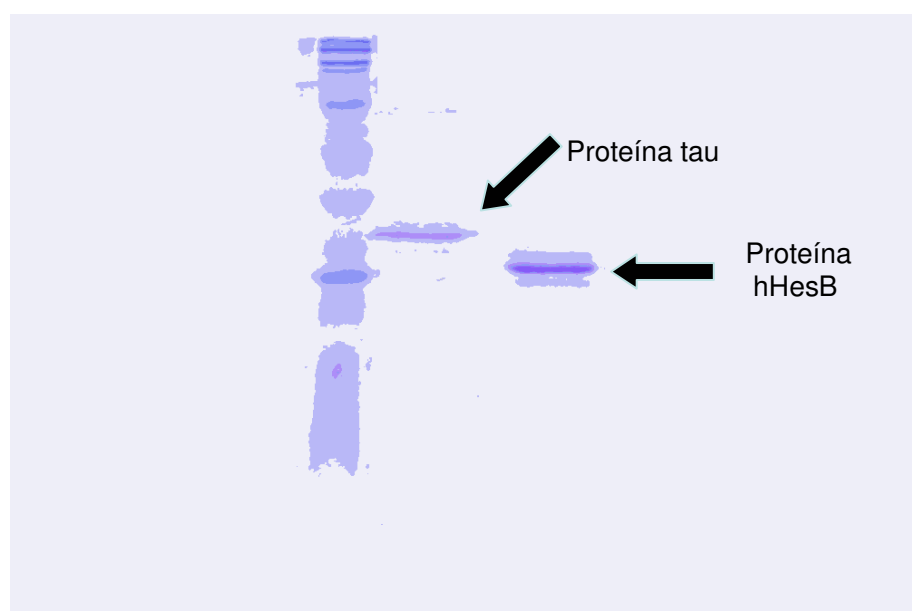


Figura 6. Gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie que representa las proteínas tau y hHesB obtenidas

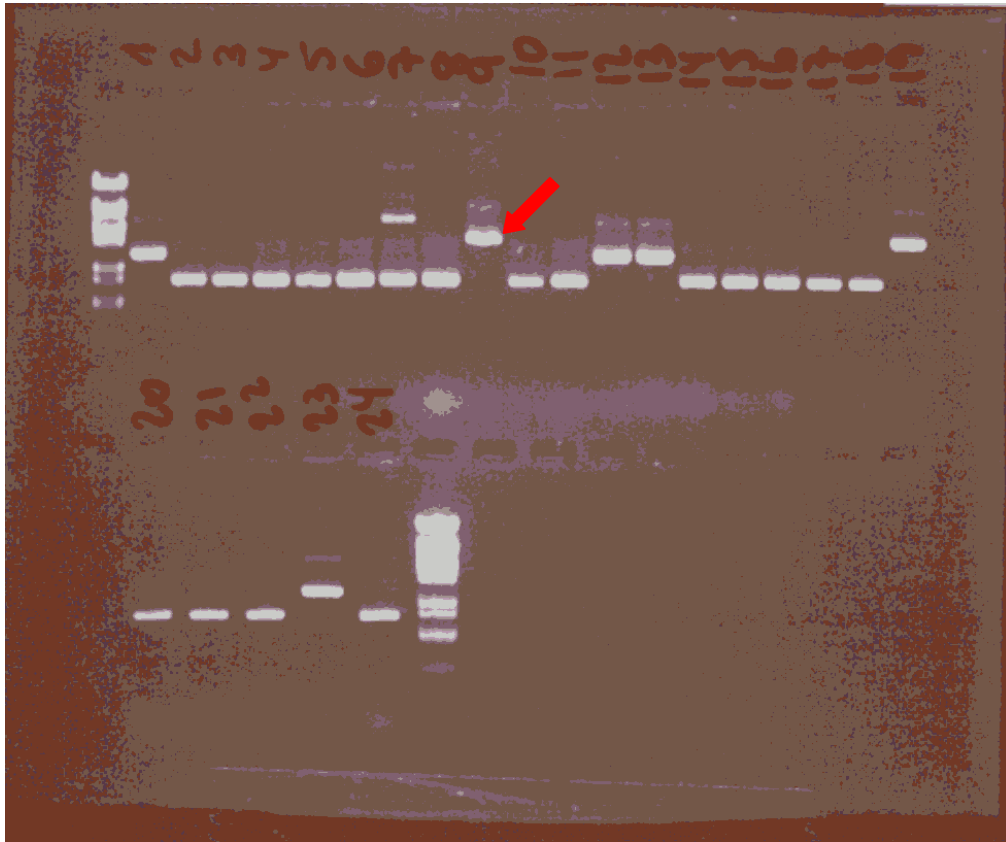


Figura 5. Clones de tau y hHesB tras transformación en bacterias BL21.

Para comprobar que habíamos obtenido las proteínas que buscamos se realizó western blot de la proteína tau enfrentándola con el suero original del que se había obtenido y también con anticuerpos anti-tau cedidos por el Dr. Jesús Ávila. El resultado obtenido fue que tanto el suero de la paciente de la que se había obtenido el clon a estudio como los anticuerpos anti-tau reconocían nuestra proteína por lo cual podemos afirmar que habíamos obtenido la proteína a estudio. En lo referente a hHesB esta también se enfrentó en western blot con el suero de la misma enferma de la que se obtuvo, el resultado también fue positivo: el suero de la paciente reconocía la proteína estudiada. En este último caso, obviamente, no

disponíamos de anticuerpos anti-hHesB por lo que no se pudieron utilizar para su comprobación ulterior.

Para tau, tal y como podemos observar en la figura antes mencionada, se obtuvieron dos bandas en torno a 17 kDa, pensamos que ambas bandas corresponden a la proteína fosforilada y no fosforilada, si bien no se realizó defosforilización de la misma por motivos técnicos y porque su síntesis fue dificultosa técnicamente y con bajo rendimiento en lo que se refiere a la cantidad de proteína que se obtenía.

3. Pacientes

Se obtuvo suero de 19 enfermos con SS, dichos sueros fueron cedidos por el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Canarias según normativa vigente al respecto. De la misma forma, 19 sueros de donantes sanos del Banco de Sangre del mismo hospital se utilizaron como grupo control. Pasamos a continuación a describir las características clínicas de los pacientes con SS en los que se testaron las proteínas a estudio (todos los enfermos eran mujeres, se correlacionan de 2 a 20, asumiendo que el paciente o suero 1 corresponde a un control).

Paciente 2 (suero 1.23): Síndrome de Sjögren diagnosticado a los 38 años. La paciente no ha desarrollado afectación visceral de ningún tipo. En lo que se refiere a sus datos analíticos destaca positividad para La, no así para Ro, con negatividad para factor reumatoide.

Paciente 3 (suero 1.84): Diagnóstico a la edad de 51 años, historia previa de hipotiroidismo subclínico autoinmune sin otros datos de interés. No ha presentado afectación neurológica ni de otro tipo salvo el hipotiroidismo asociado. Se ha realizado biopsia de glándulas salivares con confirmación anatomopatológica del diagnóstico. La paciente presenta positividad para anti-Ro y anti-La, no así para factor reumatoide.

Paciente 4 (suero 1.38): Debut de la enfermedad a los 36 años con artralgias y positividad para anticuerpos antinucleares a título alto. No ha presentado afectación neurológica ni de otro tipo. Esta paciente no presenta positividad para Ro y La, pero tanto la clínica como los hallazgos anatomopatológicos confirman el diagnóstico según los criterios europeos descritos en la *Introducción* de esta tesis doctoral.

Paciente 5 (suero 2.47): Diagnóstico a los 42 años tras debutar con queratitis bilateral motivo por el cual fue remitida a nuestro servicio ante la sospecha de síndrome seco. La paciente presentó anticuerpos antinucleares moteado a título alto junto con positividad para anti-Ro y anti-La así como biopsia de glándulas salivares compatible. No ha desarrollado afectación neurológica ni de otro tipo.

Paciente 6 (suero 84/95): Diagnóstico a la edad de 47 años con positividad para anti-La (no para anti-Ro) y anemia hemolítica autoinmune que requirió esplenectomía por severidad de la misma. La paciente ha presentado cuadro parkinsoniano no filiado junto con deterioro cognitivo

objetivándose en pruebas de imagen (resonancia magnética nuclear) hiperintensidad en sustancia blanca de ambos centros semiovais y coronas radiatas especialmente en lóbulos frontales en relación con áreas de gliosis de probable origen isquémico. La paciente ha sido catalogada de probable NeuroSjögren y se halla en control por nuestro servicio.

Paciente 7 (suero 1.96): Diagnóstico tras inicio de alteración de pruebas de función hepática que pusieron en evidencia positividad para anticuerpos antimúsculo liso y diagnóstico de hepatitis autoinmune. Fue remitida a nuestro servicio en el Hospital Universitario de Canarias donde se objetivó ojo seco junto con positividad para anti-Ro y factor reumatoide. No ha desarrollado afectación visceral de otro tipo.

Paciente 8 (suero 802.94): Diagnóstico a los 50 años de edad, presentando la paciente positividad para Ro y La, cirrosis biliar primaria y cuadro de deterioro cognitivo en control y seguimiento por el servicio de Neurología de nuestro hospital. El cuadro ha sido interpretado como en relación con su enfermedad de base con evidencia de deterioro de la memoria, cálculo, memoria, lenguaje y juicio.

Paciente 9 (suero 154/95): SS diagnosticado a la edad de 65 años con positividad para anticuerpos antinucleares y antimitocondriales, anti-La positivo y anti-Ro negativo. La paciente durante su evolución ha presentado complicaciones menores tipo osteoporosis multifactorial pero hace aproximadamente 6 años presentó episodio deficitario neurológico que se

interpretó como probable ictus isquémico versus manifestación neurológica de su enfermedad de base con imagen en resonancia magnética nuclear compatible con lesión isquémica o vasculítica. La paciente no ha vuelto a presentar manifestaciones neurológicas de ningún tipo pero el cuadro ha sido interpretado como en probable relación con su síndrome de Sjögren.

Paciente 10 (suero 560/93): Síndrome de Sjögren diagnosticado a los 45 años en base a debut con clínica articular y positividad de anticuerpos antinucleares junto con anti-Ro positivo. La paciente como antecedentes de interés presentaba una diabetes mellitus tipo 1 desde la infancia pero no había presentado afectación visceral de ningún tipo relacionada con su SS.

Paciente 11 (suero 1/99): Paciente mujer que debuta a los 32 años con poliartralgias inflamatorias, junto con síndrome seco y anticuerpos antinucleares. No presentaba anti-Ro ni anti-La, factor reumatoide negativo, biopsia diagnóstica de glándulas salivares.

Paciente 12 (suero 4.80): Debut a los 56 años con síndrome seco, antecedentes personales de hipertensión arterial. Presentaba anti-Ro y La positivo, factor reumatoide positivo y no tenía hallazgo alguno de afectación visceral.

Paciente 13 (suero 531/95): Diagnóstico de la enfermedad a los 65 años de edad. Ha presentado negatividad para anti-La y anti-Ro, diagnóstico de cirrosis biliar primaria con positividad para anticuerpos antimitocondriales

y anti-músculo liso e hipotiroidismo autoinmune en tratamiento sustitutivo. No ha tenido manifestaciones neurológicas.

Paciente 14 (suero 3.52): Paciente con diagnóstico de SS a los 43 años. Sin afectación visceral secundaria a su enfermedad de base. Anticuerpos antinucleares positivos con anti-La y Ro.

Paciente 15 (suero 739.93): SS diagnosticado a los 51 años. Antecedentes personales sin interés salvo fenómeno de Raynaud severo que precisaba tratamiento con calcioantagonistas. Positividad para anti-La, no para anti-Ro. No datos de afectación visceral de ningún tipo.

Paciente 16 (suero 1183/96): SS primario diagnosticado a las edad de 60 años, la paciente presentaba del mismo modo otros antecedentes personales como hipertensión arterial, miocardiopatía hipertrófica, diabetes mellitus tipo 2, glaucoma y carcinoma intraductal mama izquierda intervenido. Durante su evolución presentó varias complicaciones en relación a su enfermedad de base, tales como, anemia hemolítica, neumopatía intersticial secundaria y neuropatía del trigémino. También se realizó biopsia de glándulas salivares con diagnóstico anatomopatológico compatible y presentaba anticuerpos antinucleares positivos con presencia de anti-Ro y anti-La junto con factor reumatoide positivo.

Paciente 17 (suero 98/87065): Diagnóstico a los 17 años de edad con positividad para anti-Ro, factor reumatoide y presentando parálisis facial y tiroiditis autoinmune.

Paciente 18 (suero 1178/96): SS diagnosticado a la edad de 14 años, 10 años de evolución de la enfermedad. Como único hallazgo clínico ha presentado sintomatología articular sin otro tipo de afectación visceral. Ha tenido anti-Ro y La positivo, factor reumatoide positivo, biopsia de glándulas salivares con infiltrados linfocitarios sugestivos de SS, gammagrafía de glándulas salivares también compatible y tests oftalmológicos (Schimmer, Rosa de Bengala) patológicos

Paciente 19 (suero 198/95): Diagnóstico a los 33 años con debut en base a artralgias, Raynaud y leucopenia. No ha presentado ni anti-Ro ni anti-La. No afectación visceral de ningún tipo hasta el momento actual.

Paciente 20 (suero 559/93): SS diagnosticado a los 39 años de edad. No ha presentado afectación visceral de ningún tipo. Anti-Ro y anti-La positivos.

Así pues, nuestros 19 pacientes, en resumen presentaban las siguientes características clínicas y analíticas. Cinco pacientes presentaron afectación neurológica a lo largo de la evolución de su enfermedad. Una de ellas en forma de cuadro parkinsoniano y deterioro cognitivo con resonancia magnética nuclear patológica. En el segundo caso, la paciente presentó un episodio deficitario con imagen en RMN también patológica, llama la atención la ausencia de otros factores de riesgo para presentar un ictus isquémico, por lo cual, el cuadro fue interpretado en relación con su enfermedad de base. La tercera paciente también ha desarrollado un cuadro

de deterioro cognitivo en relación con su enfermedad de base. La cuarta y quinta pacientes con manifestaciones neurológicas presentaron manifestaciones neurológicas referidas al sistema nervioso periférico, tales eran, neuropatía del trigémino y parálisis facial.

En lo que se refiere a manifestaciones clínicas de otro tipo, 4 pacientes (21%) tenían manifestaciones tiroideas, siendo las cuatro en relación a hipotiroidismo, 2 de ellos diagnosticados previamente al SS, y los otros dos con posterioridad. Tres pacientes tuvieron manifestaciones hematológicas mayores, siendo las tres del tipo de anemia hemolítica autoinmune. Una sola paciente desarrolló afectación pulmonar, en relación ésta con neumopatía intersticial difusa que requirió tratamiento inmunosupresor. Dos pacientes desarrollaron afectación hepática, una de ellas en forma de cirrosis biliar primaria y la otra como hepatitis autoinmune. Dos pacientes presentaron positividad para anticuerpos antimitocondriales, una fue la antes mencionada que padecía una cirrosis biliar primaria y en otro caso fue sin enfermedad hepática conocida.

En lo que se refiere a los datos analíticos de nuestros 19 pacientes, doce (63%) presentaron positividad para factor reumatoide, y 10 (52%) y 11 (57%) pacientes presentaron anti-Ro y anti-La respectivamente.

4. Screening de sueros de enfermos con SS

Para el *screening* de los sueros se realizaron western blot a tal efecto. Las bandas obtenidas fueron analizadas según el programa *NIH Scion Image*. Para *tau* los anticuerpos primarios (sueros de los pacientes) se usaron a 1:1000 y el secundario a 1:60 000, para hHesB se utilizaron a 1:2000 y 1: 60 000 respectivamente.

Las figuras 7 y 8 muestran las bandas de las proteínas tau y hHesB según los pesos moleculares esperados halladas en enfermos y controles. En la parte inferior de dichas figuras se muestran las curvas de densidad óptica obtenidas tras análisis de las bandas con el programa NIH Image para PC obtenido del U.S. National Institutes of Health y disponible en internet en la dirección <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>. Para que el análisis fuera lo más fidedigno posible las condiciones de escaneado de los geles se cuidaron para que fueran exactamente las mismas para todas las imágenes. El procesamiento digital y la obtención de las curvas de densidad óptica para las bandas también se realizaron teniendo en cuenta que no todas las imágenes presentaban el mismo fondo. Los resultados obtenidos y mostrados en la figura 9 son, por tanto, totalmente comparables entre sí en lo que se refiere a enfermos y controles. El programa NIH Image está avalado por los Institutos Nacionales de Salud de EEUU, donde ha sido creado, su uso es rutinario y de gran valor en el análisis de bandas de geles de diferentes tipos y en imágenes obtenidas tras western blot.

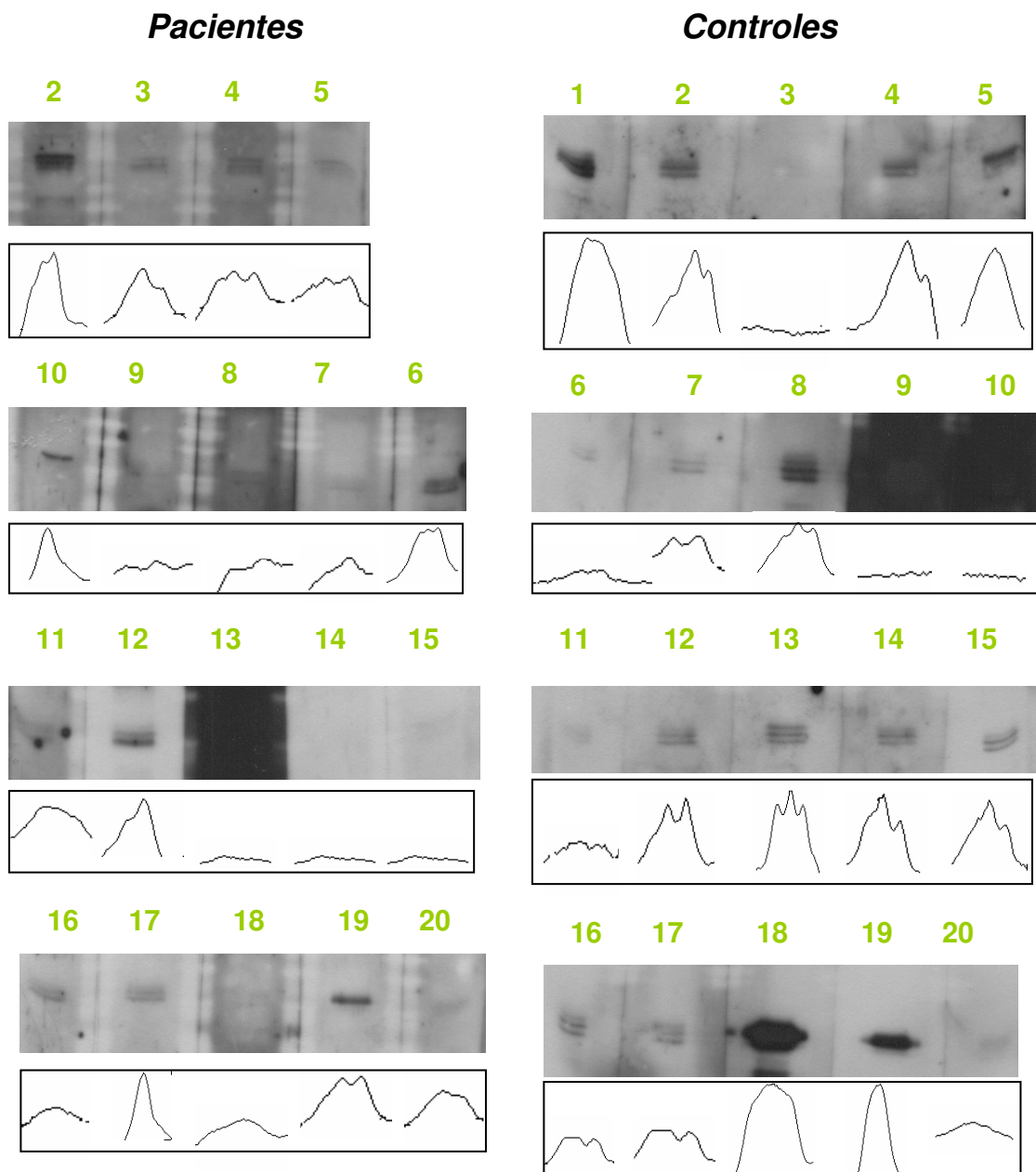


Figura 7. Proteína hHesB. Western blot para enfermos y controles y medición de bandas con el programa NIH Image

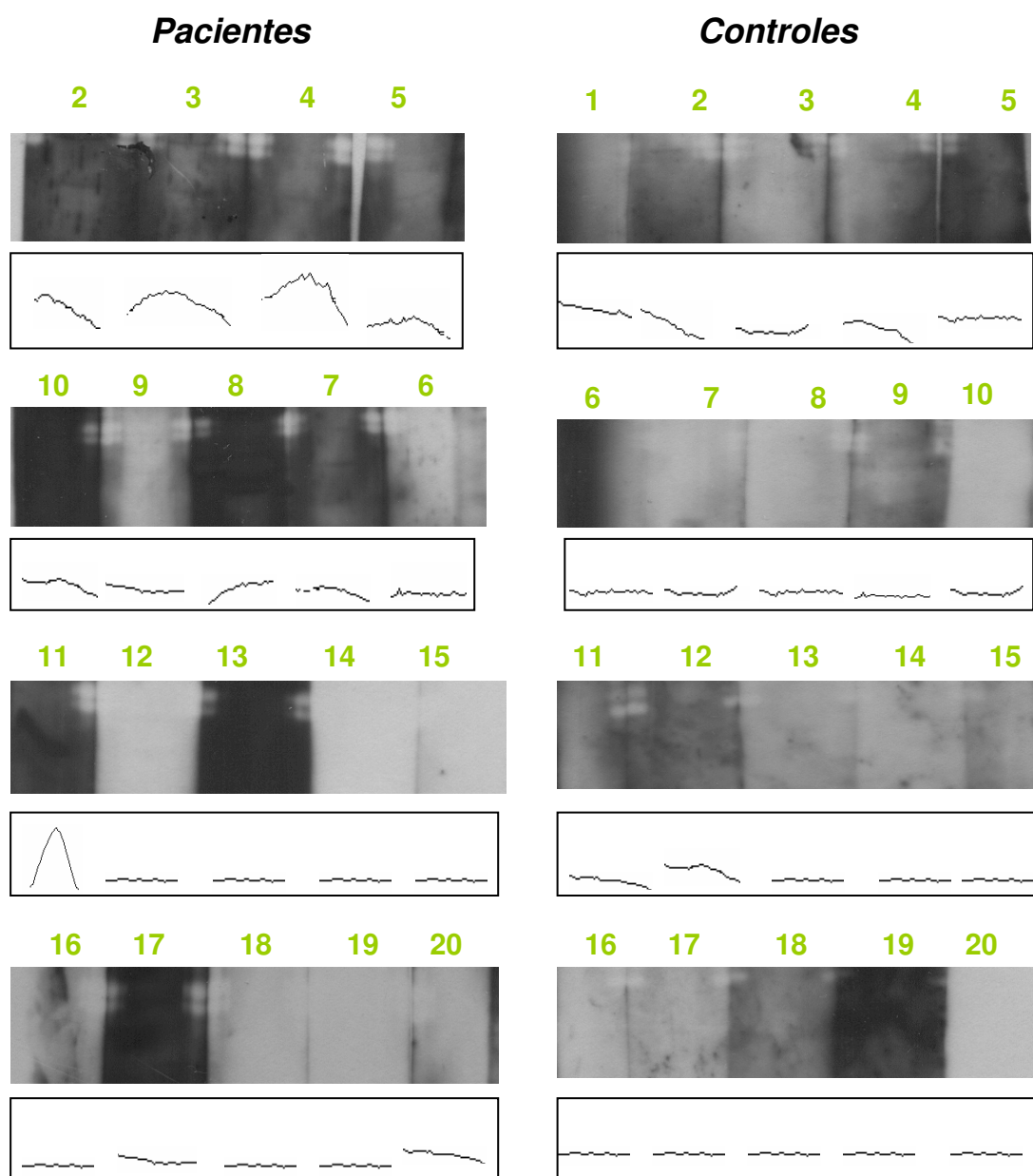


Figura 8. **Proteína tau. Western blot para enfermos y controles y medición de bandas con el programa NIH Image**

Así pues, la figura 9 muestra los resultados divididos en los que representan las densidades ópticas para tau, en enfermos y controles, y los de la proteína hHesB también para enfermos y controles.

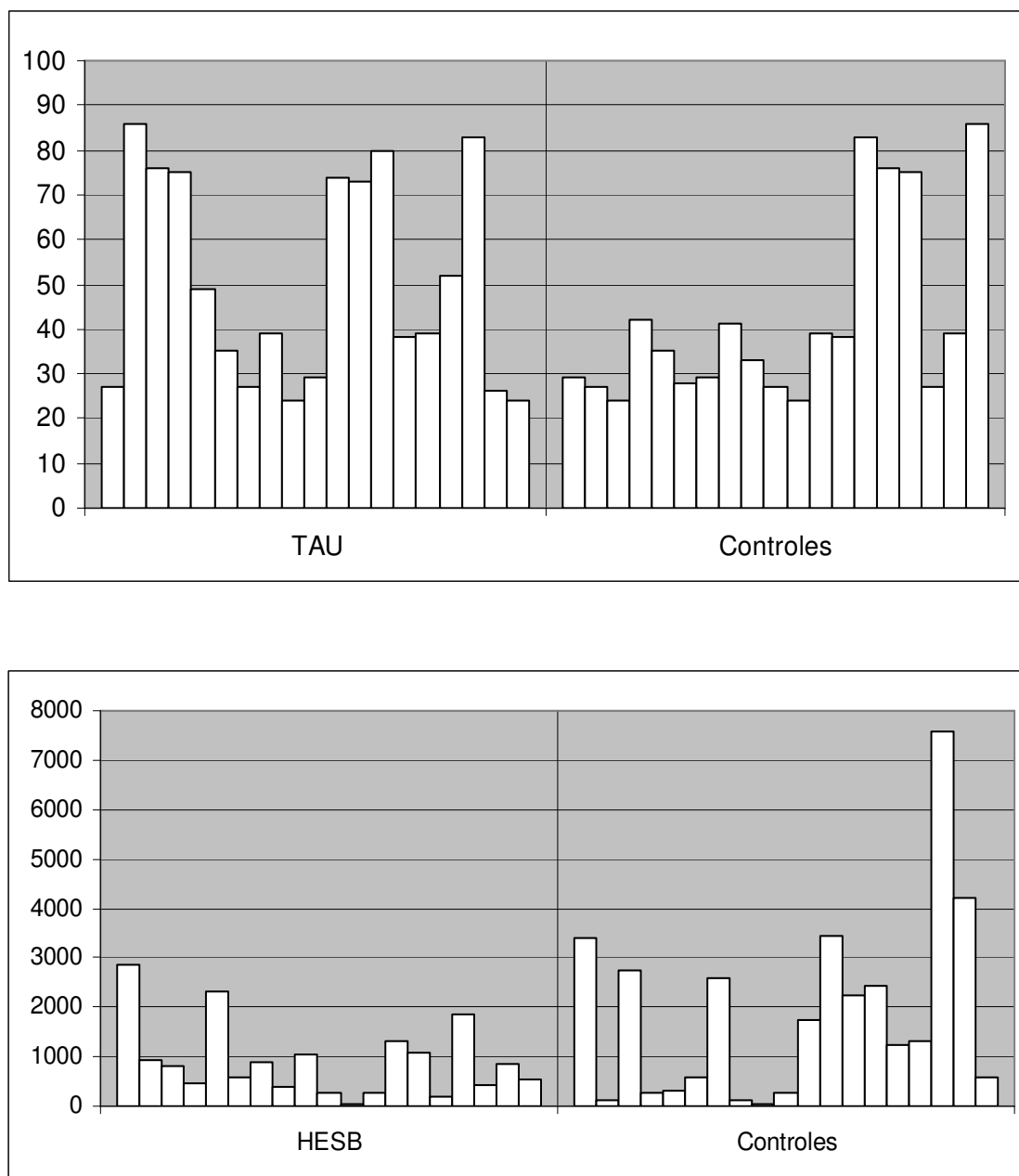


Fig 9. Diferencia entre controles y enfermos para resultados según densidad óptica para las proteínas tau y HesB.

5. Análisis estadístico

Para determinar la fuerza estadística que queríamos obtener en esta tesis doctoral, inicialmente, y asumiendo que el criterio de significancia (alfa) escogido era 0,05, se asumió que se deberían estudiar 80 enfermos para tener una fuerza estadística del 80,4%. Esto viene dado porque se asume que, por ejemplo, para los valores resultados de tau, con una media de 1.375 unidades de densidad óptica y una desviación estándar de 1.580, se calcula que 80 pacientes permitirían detectar el mínimo efecto importante de relevancia, en el sentido que diferencias inferiores a este valor no serían de interés clínico o de significado estadístico sustancial. Se asume, del mismo modo, que el tamaño de esta muestra de 80 pacientes sería razonable para hacer comparaciones en lo que se refiere a una población general.

Obviamente, tal y como hemos comentado, nuestra muestra consistió en 19 pacientes, esto viene dado por la dificultad de obtener sueros de enfermos y también porque hicimos especial hincapié en las manifestaciones neurológicas del SS, que son de presentación inusual. Por tanto, aunque nuestra potencia estadística, por el tamaño de nuestra muestra, no es la adecuada, nuestros datos sí que son relevantes a la hora de relacionar de forma inicial o como introducción un nuevo hallazgo inmunológico en una enfermedad concreta. Obviamente, nuestro siguiente paso será aumentar la serie de pacientes a estudio para conseguir la potencia estadística comentada.

En lo que se refiere a la proteína tau, nuestras 19 enfermas no han demostrado una diferencia estadísticamente significativa en lo que se refiere a la presencia de anticuerpos anti-tau ($p=0,65$). Del mismo modo, tampoco hemos encontrado que en los enfermos con manifestaciones neurológicas sea estadísticamente más frecuente la presencia de dichos anticuerpos ($p=0,75$). Igualmente, ninguna manifestación clínica (enfermedad hematológica, tiroidea, pulmonar o hepática) o analítica (presencia de factor reumatoide, anti-Ro o anti-La) se correlacionó con la presencia o ausencia de anticuerpos anti-tau (prueba de Mann-Whitney).

Los datos referentes a la proteína hHesB testada en enfermos y controles mostraron los siguientes resultados. Se detectó que los enfermos de SS mostraron niveles estadísticamente diferentes a los controles, siendo los niveles de anti-hHesB significativamente inferiores en enfermos en comparación a sanos ($p=0,002$). Del mismo modo, los valores en controles mostraron una variabilidad mayor que en enfermos, esto es, los valores en sanos tenían una desviación standard mayor mientras que en enfermos esta era menor. Tampoco en este caso, los niveles de hHesB mostraron asociación de ningún tipo con la presencia de enfermedad neurológica, tiroidea, hematológica o hepática o con la presencia o ausencia de anticuerpos anti-Ro, anti-La o factor reumatoide.

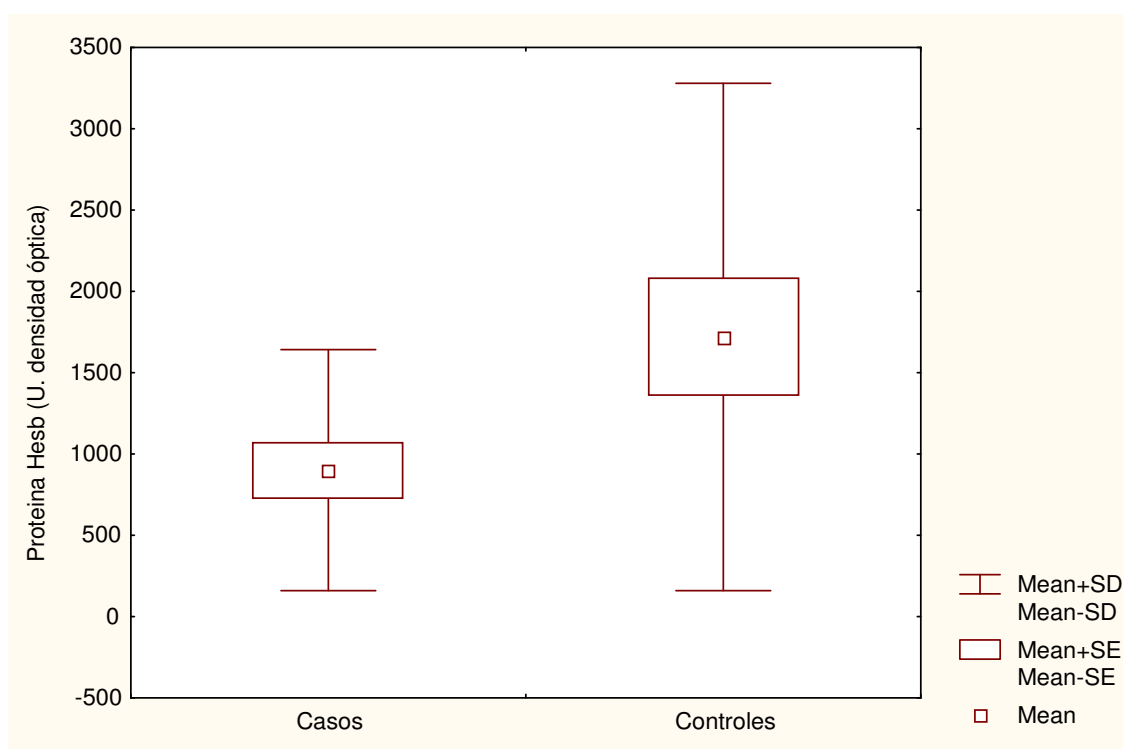


Fig 10. Intervalos de confianza y medias de los resultados obtenidos para hHesB

Como hemos comentado, independientemente de que estadísticamente hemos hallado una relación, un dato a resaltar, es que los valores en enfermos tienden a agruparse, es decir, su variabilidad disminuye con respecto a controles. Esto tiene cierta importancia, ya que determinados valores biológicos tienen este comportamiento, es decir, los valores “se agrupan” en determinadas condiciones patológicas. El hecho de que los pacientes sanos tengan valores superiores y de mayor rango que los enfermos, y que estos últimos presenten valores inferiores y más agrupados es de importancia a la hora de interpretar estos resultados.

DISCUSIÓN

1. NeuroSjögren

Las enfermedades autoinmunes son un grupo heterogéneo de enfermedades entre cuyos mecanismos fisiopatológicos parece que la autoinmunidad, entendida esta como el reconocimiento de estructuras propias como autoantígenos, juega un papel crucial. El síndrome de Sjögren es una enfermedad cuyas características clínicas y etiopatogénicas son de especial interés para los reumatólogos y constituye una excelente base en la que podemos adentrarnos con el fin de intentar comprender cómo determinados mecanismos moleculares desencadenan y producen una determinada enfermedad. El SS, ya descrito en la *Introducción* de esta tesis, consta de diferentes características entre las que figuran las de tipo clínico, anatomopatológico o analítico, es este último aspecto en el que hemos intentado profundizar ya que los autoanticuerpos entendidos como *marcadores* de enfermedad son de extrema importancia a la hora de reconocer a una determinada enfermedad o incluso a la hora de monitorizar la actividad de un proceso patológico. En esta tesis, por tanto, hemos intentado identificar nuevos marcadores o autoanticuerpos en el SS y más concretamente en lo que se refiere a las manifestaciones neurológicas del mismo o neuro-Sjögren, ya que este aspecto de la enfermedad es bastante desconocido y carece de claros identificadores que permitan su diagnóstico.

Así pues, el SS es un trastorno autoinmune sistémico caracterizado por sequedad ocular y oral debido a la infiltración linfocítica de los tejidos glandulares exocrinos. En el SS primario pueden tener lugar múltiples manifestaciones extraglandulares que afectan a nivel pulmonar, renal, hepático así como a nivel del sistema nervioso central. La afectación de dicho sistema nervioso central puede ser de varios tipos^{80,81} incluyendo manifestaciones focales como epilepsia, hemiparesias o déficit hemisensitivos, y manifestaciones difusas tales como cefalea, disfunciones cognitivas o anormalidades psiquiátricas.

La frecuencia de afectación del sistema nervioso en el SS ha sido objeto de controversia⁸², no obstante, es importante conocer su presencia ya que algunas de estas manifestaciones pueden tratarse de forma satisfactoria con fármacos inmunosupresores. Varios estudios sugieren que entre el 20 y 25% de los pacientes con SS primario tienen manifestaciones clínicas atribuibles a afectación del sistema nervioso central, incluyendo éstas manifestaciones desde demencia o lesiones focales a cuadros que remedan manifestaciones similares a las de la esclerosis múltiple. Por el contrario, otros grupos han encontrado prevalencias inferiores a la antes citada, siendo de especial interés la relación entre los hallazgos obtenidos en resonancia magnética nuclear (afectación de la sustancia blanca cerebral) y la propia enfermedad, ya que en ocasiones es difícil de interpretar dichos hallazgos como propios de la enfermedad. Otros motivos para la discrepancia existente

en lo que se refiere a la prevalencia de las manifestaciones neurológicas en el SS podrían ser los diferentes criterios diagnósticos utilizados o el propio entusiasmo con que se buscan dichas manifestaciones en los enfermos.

Cualquier parte del cerebro o de la medula espinal puede afectarse, siendo el patrón más frecuente la presencia de episodios recurrentes multifocales, generalmente separados por largos periodos de ausencia de manifestaciones, lo cual lleva, en ocasiones, a un déficit neurológico de curso progresivo e insidioso.

Generalmente, las lesiones focales desencadenan déficits motores o sensitivos, clínica comicial o síndromes cerebelosos. Las lesiones difusas, por el contrario, pueden manifestarse como encefalopatía, meningitis aséptica o alteraciones psiquiátricas que pueden oscilar desde leves alteraciones del comportamiento como alteraciones en la memoria o defectos de concentración, a franca demencia. Los síndromes depresivos también parece que son más frecuentes en los enfermos con SS^{83,84}, es más, aquellos enfermos con depresión y enfermedad cerebral difusa pueden mostrar lesiones subcorticales con aumento de intensidad en la resonancia magnética nuclear o áreas de menor flujo cerebral en SPET cerebrales. Estos hallazgos en diferentes pruebas pueden sugerir que estos procesos cognitivos relacionados con el SS tengan presumiblemente una naturaleza vasculítica. En lo que se

refiere a la médula espinal, se pueden producir cuadros de mielitis aguda transversa o mielopatías degenerativas.

Los cuadros de demencia se caracterizan por deterioro cognitivo progresivo que llega a ser tan severo que produce un daño importante en lo que se refiere al desarrollo de las normales funciones sociales y ocupacionales del individuo. Esto suele acompañarse de cambios en la personalidad junto con síntomas de deterioro del lenguaje, memoria, cálculo, juicio, etc.... El diagnóstico de demencia debe hacerse con precaución y las características descritas deben de estar presentes como mínimo 6 meses antes del diagnóstico. Las demencias más frecuentes son la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular, siendo su diagnóstico en ocasiones difícil de realizar. Ninguno de nuestros pacientes fue diagnosticado de forma alguna de demencia, no obstante, tres de ellos presentaron cuadros de deterioro cognitivo no filiado con evidencia de daño cerebral de tipo vascular por resonancia magnética, en una de ellas fue en la que se detectó al inicio del estudio la proteína tau como autoantígeno.

2. Proteína tau

El papel patogénico de la proteína tau ha sido descrito, como ya hemos comentado, en diferentes cuadros de demencia como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva o

degeneración corticobasal. *Hasta el momento actual no había sido descrita en relación con el síndrome de Sjögren.*

En nuestra serie de enfermos había 5 pacientes afectados de SS que habían presentado a lo largo de su evolución manifestaciones neurológicas de diferente índole. En el momento actual no se conocen marcadores para las manifestaciones neurológicas del SS, en cambio, en otras enfermedades como en el lupus eritematoso sistémico determinados marcadores, como los anticuerpos P antirribosomales, han demostrado cierta asociación con los cuadros neuropsiquiátricos tipo psicosis o depresión^{85,86}, estando también descritas asociaciones con los anticuerpos antineuronales⁸⁷ y antiganglósidos⁸⁸ en esta patología.

En lo que se refiere al líquido cefalorraquídeo, su examen en las manifestaciones neurológicas de las diferentes enfermedades autoinmunes no parece aportar especial interés, tampoco se han hallado en él marcadores de ningún tipo que apoyen el diagnóstico. Sólo la presencia de anticuerpos anti DNA, complejos autoinmunes e interleuquina 6 se han descrito en pacientes con manifestaciones neurológicas en el LES o Sjögren⁸⁹.

Así pues, nuestros 5 enfermos con SS y manifestaciones neurológicas representan un subtipo de enfermos de especial interés. En el análisis estadístico no hemos hallado mayor prevalencia de anticuerpos anti-tau en estos enfermos, pero creemos que es de especial relevancia el hecho

de que se describa por primera vez la asociación de la proteína tau con estas manifestaciones neurológicas en el SS. Recordemos que fue en una enferma que presentaba manifestaciones claras de neuroSjögren donde por primera vez se detectaron dichos anticuerpos y que aunque la asociación no ha sido demostrada estadísticamente, quizás esto se pudiera deber al bajo número de enfermos con manifestaciones neurológicas (cinco) que han sido testados. De todos es conocido, del mismo modo, la infrecuencia de las manifestaciones neurológicas del SS, por lo que la obtención de sueros de enfermos en los que testar estos anticuerpos no resulta fácil en nuestro medio y no se ha alcanzado la potencia estadística requerida.

Tampoco hemos encontrado relación de los niveles de proteína tau con manifestaciones en determinados órganos o sistemas y no hemos constatado, por tanto, especificidad en lo que se refiere a la presencia de los mismos en manifestaciones hepáticas, endocrinas o pulmonares de la enfermedad. Sí existen autoanticuerpos organoespecíficos en otras enfermedades pero quizás el hecho de que la proteína tau sea una proteína ubicua en la mayoría de los tejidos humanos dificulte su relación patogénica con un determinado órgano o sistema.

Así pues, dado que tanto en el SS como en otras enfermedades como la enfermedad de Alzheimer se carece de marcadores biológicos de interés, pudiera parecer especialmente relevante establecer nuevos

indicadores que permitan determinar la presencia de enfermedad. El diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se puede realizar *postmortem* mediante el análisis de tejidos cerebrales y la demostración de hallazgos diversos entre los que se cuentan la presencia anómala tanto en cantidad como en estructura de la proteína tau. No obstante, esta posibilidad generalmente no existe, ya que la obtención de tejido cerebral *premortem* no suele justificar el fin diagnóstico que persigue. A tal efecto, se ha demostrado la presencia de proteína tau en líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad de Alzheimer y que estos niveles son mayores que en otras condiciones o patologías^{90,91}.

Por tanto, la existencia o no de marcadores biológicos en estas enfermedades es de relevancia ya que, si éstos existieran, se podrían identificar causas tratables de demencia, identificar condiciones de comorbilidad que acompañan a las enfermedades reumáticas, ayudar en el diagnóstico diferencial y, quizás, permitir la monitorización de la progresión de la enfermedad.

En un reciente estudio⁹², se ha testado la presencia de proteína tau en epitelio de mucosa oral obtenido tras cepillado de dicha mucosa. Utilizando un kit para detección de proteína tau en líquido cefalorraquídeo, en este estudio se ha demostrado que esta proteína se halla en mayor cantidad en epitelio oral de enfermos con Alzheimer en relación a controles, pero no

hubo relación en lo que se refería a la severidad de la demencia con los niveles de dicha proteína. Este hallazgo quizás tenga especial relevancia en lo que se refiere a los enfermos con SS, ya que aunque la proteína tau es ubicua en todas las estirpes celulares, la demostración de que se halla también alterada en cantidad y estructura en células de mucosa oral podría aclarar algo más sobre su presencia en el SS. Así pues, futuros estudios sobre la presencia de tau en tejido glandular de enfermos con SS quizás aporten datos de interés a este respecto.

3. Proteína hHesB

El gen humano y el producto de dicho gen hHesB es, como ya se ha dicho anteriormente, una proteína no conocida en mamíferos en general que ha sido descrita por primera vez en nuestro grupo de investigación. Ha recibido este nombre porque la comparación de su secuencia proteica presenta homología con muchas proteínas del grupo "HesB". Estas proteínas presentan un dominio denominado HesB y parecen estar relacionadas con procesos conectados con el transporte de electrones tales como la fijación de nitrógeno o formación y reparación de grupos Fe/S necesarios para gran cantidad de enzimas mitocondriales y del citoplasma. Tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kDa sin zonas intramembrana o hidrofóbicas por lo que parece que debe ser una proteína soluble con alta movilidad.

No conocemos, obviamente, de forma exacta, su función, por lo que es difícil hacer interpretaciones en lo que se refiere a su interés en patología en la población humana derivada de su ausencia, hiperfunción o bloqueo de anticuerpos dirigidos contra ella.

En nuestro análisis hemos encontrado una relación estadística en que los enfermos presentan niveles inferiores de autoanticuerpos anti-hHesB en comparación a los controles. También es de resaltar que los controles presentan valores con variabilidad y rangos mayores que los sanos. Por lo cual, parece que en enfermos con SS estos valores tienden, de forma estadísticamente significativa, a ser inferiores y a agruparse.

Este hecho es de difícil interpretación y quizás constituya simplemente un epifenómeno. Un razonamiento que podría hacerse es que los anticuerpos anti-hHesB tienen una alta prevalencia en población sana, representando esto un hallazgo sin relación alguna con patología de ningún tipo y que, por un mecanismo no claro, sus valores descienden en enfermos con SS. También podría explicarse como que los casos presentaban niveles inferiores de esta proteína por que esta se hallaba disminuida en los enfermos, hecho improbable, más aun cuando desconocemos la función exacta que desempeña la proteína en mamíferos. De todas formas, se necesitarán nuevos estudios en poblaciones mayores para conocer la verdadera interpretación que implica la presencia de esta alta frecuencia de positividad de sueros de

enfermos y sanos ante la proteína hHesB. Del mismo modo, futuros estudios arrojarán luz a cerca del verdadero papel de esta proteína y los diversos procesos moleculares que desarrolla en humanos.

4. Autoanticuerpos y enfermedad autoinmune

Si definimos enfermedad autoinmune como la consecuencia de una respuesta autoinmune, podríamos asumir que esta respuesta viene dada por la presencia de anticuerpos o células T autoreactivas. En términos prácticos, la demostración de células T que reaccionen contra antígenos propios no es fácil de demostrar y se halla fuera de las posibilidades de la mayoría de los laboratorios. Afortunadamente, en ninguna enfermedad autoinmune se han hallado células autoreactivas en ausencia de autoanticuerpos, por lo cual, la presencia de estos últimos constituye el mejor método que permite determinar de forma indirecta la presencia de una respuesta autoinmune.

No obstante, tal y como hemos comentado, existen de forma universal autoanticuerpos de forma fisiológica en ausencia de una enfermedad constatable. Los mecanismos por los que esto ocurre también se desconocen y se sabe que estos anticuerpos se hallan a bajo título, tienen poca afinidad por su antígeno correspondiente y generalmente corresponden a la clase IgM. Así pues, para que un determinado autoanticuerpo pueda ser relacionado con una determinada enfermedad se requiere cierta capacidad de poder emitir un

razonamiento empírico acerca de su posible papel patogénico. En lo que se refiere a la proteína tau esta posibilidad podría acometerse de una forma relativa ya que su papel patogénico ha sido definido en otras enfermedades, por lo cual, también podría desempeñar de forma teórica un papel etiopatogénico en el SS. Por el contrario, en lo referente a la proteína hHesB esta posibilidad es más remota, el desconocimiento de su verdadero papel fisiológico dificulta plantear hipótesis como las referidas para la proteína tau en lo referente a su relación con el SS.

También es de mencionar que la mayoría de los autoanticuerpos no son, probablemente, causa inmediata de la enfermedad. La mayoría se interpretan como *marcadores* más que como agentes patológicos per se.

Otro aspecto a tener en cuenta en lo que se refiere a los resultados obtenidos en esta tesis es que la presencia de autoanticuerpos no implica necesariamente enfermedad autoinmune, es decir, el establecimiento de una enfermedad autoinmune implica información adicional que la sustente. Por tanto, tal y como se indica en la tabla 4 se puede hablar de *evidencia directa*, *evidencia indirecta* o *evidencia circunstancial* de que los autoanticuerpos sean responsables de una determinada enfermedad. La *evidencia directa* de enfermedad vendría dada si ese anticuerpo autorreactivo fuera la causa inmediata del daño o la disfunción que se produce, si se demuestra la presencia de autoanticuerpos en el tejido dañado (como tal o

como inmunocomplejos) o si existiera evidencia de que la misma enfermedad se produce si se transfieren esos anticuerpos a otro animal. Hablaríamos de *evidencia indirecta* cuando, por ejemplo, se reproduce la enfermedad a estudio mediante técnicas de inmunización experimental como sería inyectar el antígeno responsable a otro animal o sujeto y ver si se producen las mismas lesiones. Nos referimos a *evidencia circunstancial* cuando los anticuerpos a estudio se encuentran en ausencia de otra causa definible que los justifique. Este tipo de evidencia es la más frecuente en lo que se refiere a patología humana ya que son pocas las enfermedades en las que se ha constatado una evidencia directa o indirecta de que los autoanticuerpos son responsables de una determinada enfermedad. Generalmente los autoanticuerpos como armas diagnósticas en relación con una enfermedad concreta derivan más de una dependencia estadística o epidemiológica que de estos tres tipos de evidencias que hemos comentado.

En lo referente a nuestros dos autoanticuerpos asociados por primera vez con el síndrome de Sjögren, evidentemente, no podemos hablar ni de evidencia directa ni evidencia indirecta. Su asociación con el SS sería de base experimental, estadística en el caso de hHesB y por la mera presencia de autoanticuerpos en el caso de tau.

<p>1. Evidencia directa</p> <p>A. Mediada por autoanticuerpos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Autoanticuerpos circulantes <ul style="list-style-type: none"> destrucción o secuestro de la célula diana interacción con receptor interacción con hormonas o enzimas 2. Autoanticuerpos localizados <ul style="list-style-type: none"> demonstración de autoAc o inmunocomplejos en lugar lesión reproducción de lesiones por eluidos de inmunoglobulinas 3. Inmunocomplejos localizados en el lugar de la lesión 4. Reproducción de la enfermedad por transferencia pasiva materno-fetal <ul style="list-style-type: none"> transferencia a animales de experimentación demonstración <i>in vitro</i> de daño de células diana <p>B. Mediada por células</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Proliferación de células T <i>in vitro</i> en respuesta a autoantígenos 2. Transferencia de células T a ratones inmunodeficientes 3. Citotoxicidad <i>in vitro</i> de células T expuestas a células diana <p>2. Evidencia indirecta</p> <ol style="list-style-type: none"> A. Reproducción de una enf. autoinmune por inmunización experimental. B. Reproducción de una enf. autoinmune por redes idiotípicas. C. Modelos espontáneos en animales de experimentación. D. Modelos animales producidos por disregulación del sistema inmune <p>3. Evidencia experimental</p> <ol style="list-style-type: none"> A. Presencia de autoanticuerpos B. Asociación con otras enfermedades autoinmunes C. Asociación con haplotipos CMH D. Infiltración linfocítica de órganos diana E. Respuesta favorable a la inmunosupresión

Tabla 4. Criterios de enfermedad autoinmune

5. Epílogo

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune frecuente en nuestro medio y con una alta morbilidad por las limitaciones a las que puede llevar a lo largo de su evolución. Como el resto de las enfermedades autoinmunes, desconocemos muchos aspectos referentes a su etiología y mecanismos de producción, más si cabe en lo que tiene que ver con sus

mecanismos moleculares de producción. Esta tesis doctoral intenta proyectar algo de luz en estos aspectos y en lo referente a sus manifestaciones neurológicas, pretendiéndose del mismo modo, asociar la presencia de nuevos autoanticuerpos como marcadores de esta enfermedad.

Esta tesis es sólo un intento inicial de comprender más profundamente esta enfermedad que apasiona a la mayoría de los reumatólogos y que supone todo un reto en la labor diaria que desempeñamos con nuestros pacientes.

CONCLUSIONES

1. Hemos llevado a cabo muestreos seriados de una genoteca de expresión de cerebro humano utilizando como sonda sueros de pacientes afectos de síndrome de Sjögren y hemos clonado los cDNAs que codifican las siguientes proteínas que se comportan como autoantígenos: La, autoantígeno relacionado con el síndrome de Sjögren; proteína PDC E2 vinculada con la cirrosis biliar primaria; rRNA 28s ya ligada al lupus eritematoso sistémico; proteína tau, relacionada con determinadas enfermedades neurodegenerativas; proteína WAVE, descrita en el síndrome de Wiskott-Aldrich; proteína NA-14 asociada por primera vez con el Síndrome de Sjögren recientemente y la proteína hHesB. De ellas, La, PDC E2 y rRNA 28s eran ya conocidas como autoantígenos de esta enfermedad, y las restantes, WAVE, NA-14, tau y hHesB han sido descritas durante el desarrollo de esta línea de trabajo.

2. De los cDNAs que codifican las proteínas anteriormente citadas hemos seleccionado los correspondientes a las proteínas tau y hHesB para ser expresados como péptidos utilizando pRSET como vector de expresión en la cepa BL21 D3 plys S de *Escherichia coli*. Así hemos obtenido los péptidos de tau y hHesB, 129 aminoácidos y 15,5 kDa, y 208 aminoácidos y 17 kDa respectivamente. Dichos péptidos han sido utilizados como blancos (dianas) en la valoración de su carácter antigénico contra sueros de pacientes que padecen síndrome de Sjögren y sujetos control.

3. Hemos encontrado un carácter prevalente de la proteína tau y hHesB como autoantígenos tanto en la población control como en la formada por pacientes afectos de síndrome de Sjögren.

4. Hemos encontrado un agrupamiento con una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,002$) entre el nivel de anticuerpos contra la proteína hHesB en los enfermos con síndrome de Sjögren con respecto al grupo de controles.

5. Los pacientes afectos de síndrome de Sjögren presentan unos niveles de anticuerpos contra las proteínas tau y hHesB no significativamente diferentes del grupo de controles, sin embargo, y dado el carácter prevalente de este antígeno dicha asociación podría no haberse hallado dado el reducido número de pacientes estudiados y porque la potencia estadística deseada no ha podido ser conseguida.

6. La presencia de autoanticuerpos en las enfermedades reumáticas está sujeta a debate dado que no están claras sus implicaciones fisiopatológicas, modo de aparición así como si simplemente constituyen un epifenómeno; no obstante su utilidad clínica en el diagnóstico y clasificación las hace insuperables en el estudio de estas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

¹ Paul Creamer, Marc C Hochberg. Classification and diagnosis of Sjogren's syndrome. Uptodate 9.2 2001

² Bloch, KJ, Buchanon, WW, Woho, MJ, et al. Sjögren's syndrome: A clinical, pathological and serological study of 62 cases. *Medicine (Baltimore)* 1956;44:187.

³ Frost-Larsen, K, Isager, H, Manthorpe, R. Sjögren's syndrome treated with bromhexine: A randomised clinical study. *Br Med J* 1978;1:1579.

⁴ Vitali, C, Bombardieri, S, Moutsopoulos, HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993;36:340.

⁵ Aung, W, Yamada, I, Umehara, I, et al. Sjögren's syndrome: comparison of assessments with quantitative salivary gland scintigraphy and contrast sialography. *J Nucl Med* 2000;41:257.

⁶ Gonzalez, L, Mackenzie, AH, Tarar, RA. Parotid sialography in Sjögren's syndrome. *Radiology* 1970;97:91.

⁷ Salaffi, F, Argalia, G, Carotti, M, et al. Salivary gland ultrasonography in the evaluation of Primary Sjögren's Syndrome. Comparison with minor salivary gland biopsy. *J Rheumatol* 2000;27:1229.

⁸ Makula, E, Pokorny, G, Kiss, M, et al. The place of magnetic resonance and ultrasonographic examinations of the parotid gland in the diagnosis and follow-up of primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:97.

⁹ Daniels, TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome: Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984;27:147.

¹⁰ Greenspan, JS, Daniels, TE, Talal, N, Sylvester, RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;37:217.

- ¹¹ Adamson, T, Fox, R, Frisman, D, et al. Immunohistological analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983;130:203.
- ¹² Bodeutsch, C, de Wilde, PC, Kater, L, et al. Quantitative immunohistologic criteria are superior to the lymphocytic focus score criterion for the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1992;35:1075.
- ¹³ Hochberg, MC, Schein, OD, Munoz, B, et al. The prevalence of dry eye, dry mouth, autoimmunity and primary Sjögren's syndrome in the general population (abstract). *Arthritis Rheum* 1996;39(Suppl):S66.
- ¹⁴ Strickland, RW, Tesar, J, Berne, BH, et al. The frequency of sicca syndrome in an elderly population. *J Rheumatol* 1987;14:766.
- ¹⁵ Hochberg, MC, Schein, OD, Munoz, B, et al. The prevalence of dry eye, dry mouth, autoimmunity and primary Sjögren's syndrome in the general population (abstract). *Arthritis Rheum* 1996;
- ¹⁶ Thomas, E, Hay, EM, Hajeer, A, Silman, AJ. Sjögren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998;37:1069.
- ¹⁷ Daniels, TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome: Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984;27:147.
- ¹⁸ Adamson, T, Fox, R, Frisman, D, et al. Immunohistological analysis of lymphoid infiltrates in primary Sjögren's syndrome using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983;130:203.
- ¹⁹ Foster, H, Walker, D, Charles, P, et al. Association of DR3 with susceptibility to and severity of primary Sjögren's syndrome in a family study. *Br J Rheumatol* 1992;31:309.
- ²⁰ Foster, H, Stephenson, A, Walker, D, et al. Linkage studies of HLA and primary Sjögren's syndrome in multicase families. *Arthritis Rheum* 1993;36:473.
- ²¹ Hulkkonen, J, Pertovaara, M, Anttonen, J, et al. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 2001;44:176.

- ²² Miyasaka, N, Yamaoka, K, Tateishi, M, et al. Possible involvement of Epstein-Barr virus (EBV) in polyclonal B-cell activation in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun* 1989;24:427.
- ²³ Shillitoe, EJ, Daniels, TE, Witcher, JP, et al. Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjögren's syndrome, as determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 1982;25:260.
- ²⁴ Biberfeld, P, Petren, AL, Eklund, A, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6, HBLV) in sarcoidosis and lymphoproliferative disorders. *J Virol Methods* 1988;21:49.
- ²⁵ Venables, PJ, Ross, MG, Charles, PJ, et al. A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. *Ann Rheum Dis* 1985;44:742.
- ²⁶ Venables, PJ, Ross, MG, Charles, PJ, et al. A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. *Ann Rheum Dis* 1985;44:742.
- ²⁷ Gan, YJ, Shirley, P, Zeng, Y, et al. Human oropharyngeal lesions with a defective Epstein-Barr virus that disrupts viral latency. *J Infect Dis* 1993;168:1349.
- ²⁸ Fox, RI. Epidemiology, pathogenesis, animal models, and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1994;6:501.
- ²⁹ Vernant, JC, Buisson, G, Magdeleine, J, et al. T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis and Sjögren's syndrome (letter). *Lancet* 1988;1:177.
- ³⁰ Sumida, T, Yonaha, F, Maeda, T, et al. Expression of sequences homologous to HTLV-1 tax gene in the labial salivary glands of Japanese patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 7:545.
- ³¹ Mariette, X, Agbalika, F, Daniel, MT, et al. Detection of human T lymphotropic virus type 1 tax gene in salivary gland epithelium from two patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993;36:1423.

- ³² Kordossis, T, Paikos, S, Aroni, K, et al. Prevalence of Sjogren's-like syndrome in a cohort of HIV-1-positive patients: descriptive pathology and immunopathology. *Br J Rheumatol* 1998;37:691.
- ³³ Mariette, X, Zerbib, M, Jaccard, A, et al. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1993;36:280.
- ³⁴ Haddad, J, Deny, P, Munz-Gotheil, C, et al. Lymphocytic sialadenitis of Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992;339:321.
- ³⁵ Sun, D, Emmert-Buck, MR, Fox, PC. Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity* 1998;28:125.
- ³⁶ Oxholm, P, Daniels, TE, Bendtzen, K. Cytokine expression in labial salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity* 1992;12:185.
- ³⁷ Harley, JB, Alexander, EL, Bias, WB, et al. Anti SS-A/Ro and anti SS-B/La in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1986;29:196.
- ³⁸ Troster, H, Metzger, TE, Semsí, I, et al. One gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögren's syndrome. *J Exp Med* 1994;180:2059.
- ³⁹ Alexander, E, Buyon, JP, Provost, TT, et al. Anti-Ro/SS-A antibodies in the pathophysiology of congenital heart block in neonatal lupus syndrome: An experimental model. *Arthritis Rheum* 1992;35:176.
- ⁴⁰ Haneji, N, Nakamura, T, Takio, K, et al. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 1997;276:604.
- ⁴¹ Robinson, CP, Brayer, J, Yamachika, S, et al. Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Igm^u null mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7538.

- ⁴² Waterman, SA, Gordon, TP, Rischmueller, M. Inhibitory effects of muscarinic receptor autoantibodies on parasympathetic neurotransmission in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000;43:1647.
- ⁴³ Nakamura, H, Koji, T, Tominaga, M, et al. Apoptosis in labial salivary glands from Sjogren's syndrome (SS) patients: comparison with human T lymphotropic virus-I (HTLV-I)-seronegative and -seropositive SS patients. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:106.
- ⁴⁴ Humphreys-Beher, MG, Peck, AB, Dang, H, Talal, N. The role of apoptosis in the initiation of the autoimmune response in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999;116:383.
- ⁴⁵ Alpert, S, Kang, HI, Weissman, I, Fox, RI. Expression of granzyme A in salivary gland biopsies from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:1046.
- ⁴⁶ Kotzin BL. Autoimmunity. Kelley's Textbook of Rheumatology. Vol 1. Sixth Edition
- ⁴⁷ Hayakawa K, Asano M, Shinton SA et al. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science* 1999;285:113
- ⁴⁸ Vaughan JH. Viruses and autoimmune disease (editorial). *J Rheumatol* 1996;23:1831
- ⁴⁹ James JA, Kaufman KM, Farris AD et al. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997;100:3019
- ⁵⁰ Scotet E, David-Ameline J, Peyrat MA et al. T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1996;184:1791
- ⁵¹ Falta MT, Kotzin BL. T cells as primary players in rheumatoid arthritis. *In* T cell in arthritis, 1998, 210
- ⁵² Nepom GT. Major histocompatibility complex-directed susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 1998;68:315
- ⁵³ Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50:819

- ⁵⁴ Basten A. Basis and mechanisms of self-tolerance. The autoimmune diseases, 3rd ed San Diego, 1998.
- ⁵⁵ Fellous A, Francon J, Lennon AM, Núñez J. Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur J Biochem* 1977;78:167-74
- ⁵⁶ Garcia de Ancos J, Correas J, Ávila J. Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms. *J Biol Chem* 1993;268:7976-82
- ⁵⁷ Andreadis A, Wagner BK, Broderick JA, Kosik KS. A tau promoter region without neuronal specificity. *J Neurochem* 1996;66:2257-63
- ⁵⁸ Kanai Y, Chen J, Hirokawa N. Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J* 1992;11:3953-61
- ⁵⁹ Arrasate M, Pérez M, Valpuesta JM, Ávila J. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* 1997;151:1115-22
- ⁶⁰ Von Bergen, Friendhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7129-34
- ⁶¹ Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA. Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 1984;66:305-11
- ⁶² Liao H, Li YR, Brautigan DL, Gundersen GG: Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* 1998;273:21901-8
- ⁶³ Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase Pin 1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 1999;399:784-8
- ⁶⁴ Caceres A, Kosik KS. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 1990;343:461-3

- ⁶⁵ Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T et al. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 1994;369:488-91
- ⁶⁶ Sanchez MP, Alvarez-Tallada V, Avila J. La proteína tau en enfermedades neurodegenerativas. *Taupatías. Rev Neurol* 2001;33(2):169-77
- ⁶⁷ Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:298-303
- ⁶⁸ Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *TINS* 1998;21:428-33
- ⁶⁹ Huang TC, Lin RF, Chu MK, Chen HM. *Microbiology* 1999;145:743-53
- ⁷⁰ Kaut A, Lange H, Diekert K, Kispal G, Lill R. Isa 1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* 2000;275:15955-61
- ⁷¹ Jensen LT, Culotta VC. Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* 2000;20:3918-27
- ⁷² Lill R, Kispal G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biol Sci* 2000;25:352-6
- ⁷³ Pelzer W, Mühlhoff U, Diekert K, Siegmund G, Kispal G, Lill R. Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Letters* 2000;476:134-9
- ⁷⁴ Hanahan D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA cloning*. Vol 1, 121-127. DM Glover. IRL Press, Oxford, 1986
- ⁷⁵ Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 1989

- ⁷⁶ Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1994
- ⁷⁷ Altschul SF, Madden TL, Schäfer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 1997;25:3389-402
- ⁷⁸ Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleid Acid Res* 1997;25:3389-402
- ⁷⁹ Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;7:248-54
- ⁸⁰ Provost TT, Vasily D, Alexander E. Sjögren's syndrome: cutaneous, immunologic and nervous system manifestations. *Neurol Clin* 1987;5:405-26
- ⁸¹ Alexander EL. Neurological disease in Sjögren's syndrome: mono-nuclear inflammatory vasculopathy affecting central/peripheral nervous system and muscle. *Rheum Dis Clin North Am* 1993;19:869-912
- ⁸² Moutsopoulos HM, Sarmas JH, Talal N. Is central nervous system involvement a systemic manifestation of primary Sjögren's syndrome?. *Rheum Dis Clin North Am* 1993;9:909
- ⁸³ Hietaharju A, Yli-Kerttula U, Hakkinen V et al. Nervous system manifestations in Sjögren's syndrome. *Acta Neurol Scand* 1990; 81:144
- ⁸⁴ Valtysdottir ST, Gudbjornsson B, Lindqvist U et al. Anxiety and depression in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2000; 27:165
- ⁸⁵ Bonfa E; Golombek SJ; Kaufman LD; Skelly S; Weissbach H; Brot N; Elkon KB. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987 Jul 30;317(5):265-71
- ⁸⁶ Nojima Y; Minota S; Yamada A; Takaku F; Aotsuka S; Yokohari R. Correlation of antibodies to ribosomal P protein with psychosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1992 Sep;51(9):1053-5

- ⁸⁷ West SG. Neuropsychiatric lupus. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:129-58
- ⁸⁸ Galeazzi M; Annunziata P; Sebastiani GD; Bellisai F; Campanella V; Ferrara GB; Font J; Houssiau F; Passiu G; De Ramon Garrido E; Fernandez-Nebro A; Bracci L; Scorza R; Puddu P; Jedryka-Goral A; Smolen J; Tincani A; Carcassi C; Morozzi G; Marcolongo R. Anti-ganglioside antibodies in a large cohort of European patients with systemic lupus erythematosus: clinical, serological, and HLA class II gene associations. *European Concerted Action on the Immunogenetics of SLE. J Rheumatol* 2000 Jan;27(1):135-41
- ⁸⁹ Hirohata S; Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum* 1990 May;33(5):644-9
- ⁹⁰ Kanai M, Matsubara E, Isoe K et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β 1-40, and A β 1-42 in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol* 1998;44:17-26
- ⁹¹ Tato RE, Frank A, Hernanz A. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59:280-3
- ⁹² Hattori H, Matsumoto M, Iwai K et al. The τ protein of oral epithelium increases in Alzheimer's disease. *Journal of Gerontology* 57;1:64-70