

Artículo original

Alteración de los niveles séricos del sistema enzimático antioxidante en pacientes con Síndrome de Sjögren primario y su relación con los autoanticuerpos anti-M3

Alteration of serum levels of the anti-oxidant enzyme system in patients with primary Sjögren's Syndrome and its relation with the anti-M3 autoantibodies

Luciana Dománico¹, Silvia Reina² y Marcelo Rodríguez³

¹Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón (Morón, Buenos Aires, Argentina).

²Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de las Misiones (Posadas, Misiones, Argentina).

³Laboratorio de Terapia Génica, Universidad Austral (Pilar, Buenos Aires, Argentina).

Manuscrito recibido: 19 de julio de 2017; aceptado para publicación: 22 de marzo de 2018

Autor de contacto: Lic. Luciana Dománico.

Universidad de Morón. Machado 914, (1708) Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

domanico.luciana@gmail.com

Resumen

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune crónica, de etiología desconocida, que afecta las glándulas exocrinas, cuya manifestación principal es la xeroftalmía y la xerostomía. Existen dos formas clínico-patológicas del SS, una de ellas es la primaria (SSp), que aparece sin asociarse con otra enfermedad, y la otra es la asociada (SSa), que aparece ligada a otras enfermedades autoinmunes. En este trabajo nos propusimos determinar la presencia de autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes con SSp capaces de reconocer los receptores muscarínicos colinérgicos (mAChR) del subtipo M₃ en glándulas salivales aisladas de ratas normales; a continuación realizamos ensayos utilizando como antígeno el péptido sintético correspondiente a la secuencia del segundo dominio extracelular del mAChR del subtipo M₃ humano para de esta manera, determinar si este es el epítope específico reconocido en las glándulas salivales de rata. También evaluamos el papel del sistema oxidativo a través de la medición de dos enzimas antioxidantes: la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en sueros de pacientes con SSp. Los resultados de las pruebas han demostrado que los anticuerpos anti M₃ reconocen y se unen a los mAChR de la glándula salival de rata. También hay evidencias de que los pacientes con SS poseen en su suero anticuerpos del tipo IgG anti-M₃, que en contacto con las membranas sensibilizadas de rata disparan mediadores intracelulares, que interaccionan con diferentes estructuras, desencadenando la disfuncionalidad glandular. En cuanto al estudio de las enzimas antioxidantes, los resultados denotan deficiencia tanto de SOD como de CAT, no pudiendo hacer frente al estrés oxidativo y reflejando pérdida en la plasticidad.

Palabras clave: Síndrome de Sjögren, autoinmunidad, receptores muscarínicos colinérgicos, enzimas antioxidantes, estrés

oxidativo.

ABSTRACT

Sjögren's Syndrome (SS) is a chronic autoimmune disease of unknown etiology, which affects the exocrine glands, whose principal manifestations are xerophthalmia and xerostomia. There are two clinical-pathological forms of SS, one of them is the primary (SSp), which appears without association with another disease, and the other one is the associated (SSa), which appears linked to other autoimmune diseases. In this work we aimed to determine the presence of autoantibodies present in the serum of patients with SSp capable of recognizing the cholinergic muscarinic receptors (mAChR) the subtype M_3 in salivary glands isolated from normal rats, then we performed tests using as antigen the peptide Synthetic sequence corresponding to the sequence of the second mAChR extracellular domain of the human M_3 subtype in order to determine if this is the specific epitope recognized in the rat salivary glands. We also evaluated the role of the oxidative system by measuring two serum anti-oxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in serum from SS patients. Test results have shown that anti- M_3 antibodies recognize and bind to mAChR from the rat salivary gland. We also showed that patients with SS have in their serum IgG anti- M_3 antibodies, which in contact with rat sensitized membranes trigger intracellular mediators, which interact with different structures, triggering gland dysfunction. As for the study of the anti-oxidant enzymes, the results show a deficiency of SOD and CAT, being unable to face the oxidative stress and reflecting loss in the plasticity.

Keyword: Sjögren's syndrome, autoimmunity, cholinergic muscarinic receptors, antioxidant enzymes, oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Sjögren (SS) es un trastorno autoinmunitario crónico de etiología desconocida, que se caracteriza por infiltración linfoplasmocitaria de las glándulas exocrinas con destrucción epitelial (Angelino, 2003). Posee como síntomas cardinales la sequedad de mucosas, principalmente oral (xerostomía) y ocular (xeroftalmía), debido a la disminución o ausencia de secreciones glandulares (Talal *et al.*, 1992). La hiposecreción glandular es el resultado de mecanismos tanto de interacción celular (infiltrado linfoplasmocítico) como humoral (autoanticuerpos y mediadores inflamatorios solubles).

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos, ausencia de un agente etiológico conocido, y por sus características histopatológicas. Teniendo esto en cuenta, para caracterizar a un paciente con SS se debe confirmar el carácter inflamatorio de la reseca mediante el análisis histopatológico de las glándulas salivares.

El SS es considerado actualmente una epitelitis autoinmune, dado que el epitelio de las glándulas exocrinas es el blanco de la respuesta inflamatoria (Moutsopoulos, 1994).

El SS puede observarse asociado a otra enfermedad

autoinmune, que puede ser sistémica, como la artritis reumatoidea (AR) o lupus eritematoso sistémico (LES), órgano específico (cirrosis biliar primaria, tiroiditis autoinmune, entre otras) o a infecciones víricas crónicas (VIH, hepatitis C), en estos casos se lo denomina SS asociado (SSa) o puede presentarse aisladamente como entidad única, tratándose de SS primario (SSp).

Histológicamente el SS se caracteriza por hiperplasia linfoide con presencia de células plasmáticas e histiocitos en glándulas salivales y lagrimales con pérdida progresiva de las estructuras acinares y fibrosis en estadios tardíos, conduciendo estas alteraciones a los trastornos funcionales glandulares (Villalon *et al.*, 2009).

Una biopsia de las glándulas salivales permite valorar la estructura glandular y la infiltración inflamatoria. El infiltrado linfocitario está formado por linfocitos T CD4 (50%), CD8 (10–20%) y linfocitos B (20–35%), localizándose en ductos y acinos, afectando a la mayoría de las glándulas, llegando a reemplazar los acinos normales (Diez Morrondo *et al.*, 2010).

El SS, como toda enfermedad autoinmune, se caracteriza

por la presencia de autoanticuerpos, siendo algunos de ellos de importancia clínica y diagnóstica. El suero de los pacientes con SS posee diversos autoanticuerpos. Los más frecuentemente estudiados son los autoanticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B que se encuentran en el suero del 60-70 % de los pacientes con SSp (von Bultzingslowen *et al.*, 2007). Los anticuerpos anti-Ro/SS-A también pueden ser detectados en otras enfermedades autoinmunes como AR y el LES, por esta razón, los anticuerpos anti-La/SS-B se consideran más específicos del SS (Nakamura *et al.*, 2006). Es común observar resultados positivos para estos anticuerpos, como también para anticuerpos antimuscarínicos M_3 glandulares, estando presentes en un 90% de los pacientes (Reina *et al.*, 2007). Un receptor de acetilcolina (AChR) es una proteína integral de membrana que responde a la unión del neurotransmisor acetilcolina (ACh), el cual se encuentra principalmente en las terminaciones neuromusculares y tanto en el sistema nervioso central como el periférico. Estos receptores muscarínicos poseen cinco subtipos, de los cuales los M_3 (y en menor medida los M_1) son los estudiados en este trabajo, por estar presentes en las glándulas salivales.

El principal estímulo para la producción de saliva es proporcionado por la ACh a través de sus receptores (mAChR) de los cuales el receptor M_3 es el principal responsable de la producción de la misma (Proctor & Carpenter, 2007). La secreción de fluidos salivales es casi totalmente regulada por la liberación de ACh de los nervios parasimpáticos.

Esta relación entre los nervios y las células hace el proceso de secreción vulnerable a la disrupción entre la liberación y la unión del neurotransmisor, causada, por ejemplo, por la acetilcolinesterasa (AChE), o por anticuerpos anti-mAChR (Dawson *et al.*, 2006). La existencia de autoanticuerpos contra mAChR M_3 de glándulas salivales producidos en el SS (Bacman *et al.*, 1998), impide la conexión entre los nervios eferentes y las células glandulares, resultando una disminución en la producción de saliva (Fox & Stern, 2002). Se ha identificado en el suero de los pacientes con SS la presencia de anticuerpos dirigidos contra mAChR. Estos anticuerpos reconocen al mAChR de glándulas salivares y lagrimales y, actuando como “agonistas similares”, inducen una disfunción primaria órgano específica (Bacman *et al.*, 1994).

Los anticuerpos anti-mAChR en el SS, son capaces de modificar las diferentes señales intracelulares acopladas a los diferentes subtipos de mAChR, especialmente por su capacidad de activar el óxido nítrico sintasa (NOS), enzima que induce la expresión del óxido nítrico (NO). Es posible que la estimulación crónica de los receptores por los anticuerpos con actividad mAChR, al comportarse como agonistas similares, pueda conducir a la acumulación de NO, con disfunción o daño del tejido por formación de radicales libres. Asimismo, la fijación crónica de dichos anticuerpos a los mAChR puede conducir a su desensibilización o internalización, fenómeno que lleva a un bloqueo del mAChR, provocando el ojo y la boca seca, signos clásicos de SS (Bacman *et al.*, 2001).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Las ROS son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres, los peróxidos y óxido nítrico (NO) entre otras.

Al ser especies reactivas las ROS pueden producir efectos dañinos sobre las células tales como daños en el ADN, entre otros. Para evitar estos daños, las células tienen varios mecanismos de eliminación y transformación de las ROS como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y sustancias antioxidantes como el glutatión o la vitamina C que se encargan de reducir las ROS.

La alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ROS, en favor de la producción, origina el estado de estrés oxidativo en la célula. Además de provocar daños celulares, este influye en la regulación de ciertos genes habiéndose involucrado en la aceleración de los procesos de envejecimiento, en la activación de rutas de apoptosis y en la activación de distintas respuestas de defensa. Otra consecuencia es la aparición de inflamación generalizada que afecta a todos los tejidos del organismo y muy especialmente a los ojos y boca.

Este estrés ha sido reportado en la fisiopatogenia de numerosas patologías de la mucosa bucal, esta alteración es causada por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de degradar rápidamente los reactivos intermedios y reparar el daño resultante.

La actividad antioxidante se ve disminuida en pacientes con SS, llevando a los cambios destructivos en las membranas basales de las células acinares.

La SOD representa la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo. La actividad SOD está implicada como defensa esencial frente a la toxicidad potencial del oxígeno.

Las CAT también forman parte de la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo. Catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, transformándolo en agua y oxígeno.

Hipótesis y Objetivos

La hipótesis de trabajo se basa en que los anticuerpos contra receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) están involucrados en la etiopatogenia de la disautonomía del SS. De caracterizarse la calidad de estos anticuerpos, los mismos podrían ser utilizados como marcadores diagnóstico y pronóstico del SS.

El objetivo del presente trabajo es determinar y analizar la presencia de los autoanticuerpos anti M₃ de tipo inmunoglobulina G (IgG) presentes en el suero de pacientes con SSp capaces de reconocer y unirse a los mAChR glandulares del subtipo M₃ y su capacidad de modular la función glandular normal, tomando como modelo a las glándulas submaxilares aisladas de ratas normales, además se identifican los epítopes de los receptores de acetilcolina capaces de interactuar con los anticuerpos del tipo IgG y por otro lado se estudia el sistema oxidativo a través de la medición de dos enzimas antioxidantes a nivel sérico, la SOD y la CAT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y sueros:

Los pacientes fueron mujeres de entre 35 y 55 años, sin recibir tratamiento por seis meses, con 5 a 15 años de diagnóstico.

Los sueros de los pacientes con SSp fueron provistos, estudiados y clasificados clínicamente por el Área de Reumatología del CEMIC. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo con las reglas clínicas y de laboratorios nacionales e internacionales vigentes para el SSp. Se estudiaron 16 pacientes con SSp y 16 sujetos sanos tomados como controles del presente estudio. Todos los

individuos que participaron en este estudio firmaron un Consentimiento Informado y fueron tratados de acuerdo con las reglas que establece la Declaración de Helsinki. Todos ellos cumplieron los requisitos éticos establecidos por el Comité de Ética del CEMIC (Argentina).

Péptidos:

Se trabajó con péptidos sintéticos cuya secuencia aminoacídica corresponde al segundo dominio extracelular del mAChR M₃ humano.

El péptido fue sintetizado por amino-F-moc, utilizando la estrategia HOBt/DOC (Lbenzo Hidróxidotriazol/Deciclohexilcarbonido) (Reina *et al.*, 2006).

Animales:

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar adultas (*Rattus norvegicus*) entre 110-220 g de peso. Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires de acuerdo con lo establecido en la Disposición del ANMAT N° 6344. A los animales se les suministró alimento balanceado, con una administración de agua sin restricciones. La ventilación, la temperatura y la humedad ambiente se mantuvieron constantes. La intensidad de luz utilizada fue la reglamentada, con ciclos luz/oscuridad de doce horas cada uno regulados automáticamente (Borda *et al.*, 1999).

Glándulas salivales:

Las glándulas submaxilares fueron obtenidas de ratas machos Wistar anestesiadas y posteriormente se practicó eutanasia con ketamina 100 mg/kg, pentotal 100 mg/kg. Una vez extraídas las glándulas, se disecaron el tejido adiposo y conectivo, y los nódulos linfoides, y se las colocó en un medio tamponado de Krebs-Ring-bicarbonato (KRB) bajo una atmósfera de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) a un pH de 7.4 y mantenido a 37 °C de temperatura (Bacman *et al.*, 1994; Borda *et al.*, 1996). Las glándulas aisladas de la rata, fueron homogenizadas en ultraturax en 1ml de buffer PBS 1X, en presencia de inhibidores de proteasas (aprotinina 1 nM, leupeptina 1 mM, EDTA 1 mM), a 4 °C. Posteriormente, los homogeneizados fueron centrifugados a 4°C, a diferentes velocidades: 3.000 g por 10 minutos,

10.000 g por 20 minutos y 40.000 g por una hora. En los dos primeros casos, se descartaron los pellets, mientras que, en el último caso, se resuspendió el pellet en 100 μ l de buffer fosfato 5 mM en presencia de inhibidores de proteasas.

La concentración proteica se determinó mediante el método de Lowry.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA):

Se utilizaron como antígenos las membranas purificadas de glándulas submaxilares y un péptido sintético correspondiente al segundo dominio de los receptores muscarínicos del subtipo M_3 para sensibilizar la placa de ELISA. Luego, se procedió a bloquear dicha placa con los sueros provenientes de los grupos experimentales antes mencionados. Todos los procedimientos para efectuar el ensayo de ELISA se hicieron de acuerdo con técnicas convencionales

Medición de enzimas productoras de ROS:

Los sueros de los dos grupos estudiados fueron ensayados en los kits comerciales para la medición de SOD y CAT.

Los sueros fueron ensayados a diferentes diluciones siguiendo las especificaciones de los fabricantes. La mejor dilución que presentó resultados que se encontraron dentro de la curva fueron las de 1/5. Una vez sembradas las muestras y los patrones, se procedió al ensayo bioquímico. En las muestras para la medición de SOD, el buffer consistió en HEPES 20 mM, con glucosa 210 mM, EGTA 1 mM, la dilución del suero fue centrifugada 15.000 g por 5 minutos. En el caso de CAT, se utilizó buffer fosfato 50 mM más EDTA (1mM) y la centrifugación se realizó a 10.000 g por 15 minutos.

Los resultados fueron transpolados de acuerdo con la curva de calibración administrada por el fabricante.

Análisis estadísticos:

Los valores de corte (*cut-off*) en los ensayos de ELISA fueron calculados como ± 2 DS (donde corresponde a la media de la densidad óptica (D.O.) para los sujetos normales). Para determinar el grado de significación se utilizó la prueba de "t" de Student para valores no apareados. Mientras que para comparar las frecuencias se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (X^2). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados

como significativos.

RESULTADOS

Inmunoreactividad de los sueros contra las membranas glandulares

Se determinaron la distribución y la importancia clínica de los anticuerpos anti- M_3 mediante el desarrollo de diferentes ensayos. Quisimos conocer si los sueros de los pacientes con SSp reconocen las membranas purificadas de la glándula submaxilar aislada de la rata. Para ello, sensibilizamos placas de enzimoimmunoensayo (ELISA) con las membranas purificadas de la glándula submaxilar de rata y las presentamos a los sueros de los pacientes con SSp y de sujetos controles. Mediante los procedimientos descritos en Materiales y Métodos se obtuvieron los resultados expresados en D.O. En la **Fig. 1**, se observa que el reconocimiento de las glándulas salivales de rata por los sueros de los pacientes con SSp estudiados, resultó significativamente elevado respecto al grupo control ($p < 0.01$). Demostrándose la presencia de IgG sérica capaz de reconocer estructuras proteicas glandulares. Si bien, el antígeno reconocido corresponde a ratas, se conoce una alta conservación de estructuras, funciones y secuencias entre los humanos y ratas.

Inmunorreactividad de los sueros contra los péptidos sintéticos

Continuando con el estudio de la inmunorreactividad de los sueros, se realizaron ensayos de ELISA utilizando como antígeno el péptido sintético correspondiente a la secuencia del segundo dominio extracelular del mAChR del subtipo M_3 humano. Lo cual se llevó a cabo para determinar el epítipo específico reconocido en las glándulas salivales de rata. Analizando el siguiente gráfico (**Fig. 2**), se puede observar que los sueros de los pacientes con SSp mostraron valores significativamente más elevados a los correspondientes controles ($p < 0.001$). Mostrando de esta manera, la presencia de IgG capaz de reconocer a una secuencia específica del mAChR, cuya homología entre humanos y ratas es de mayor del 95%.

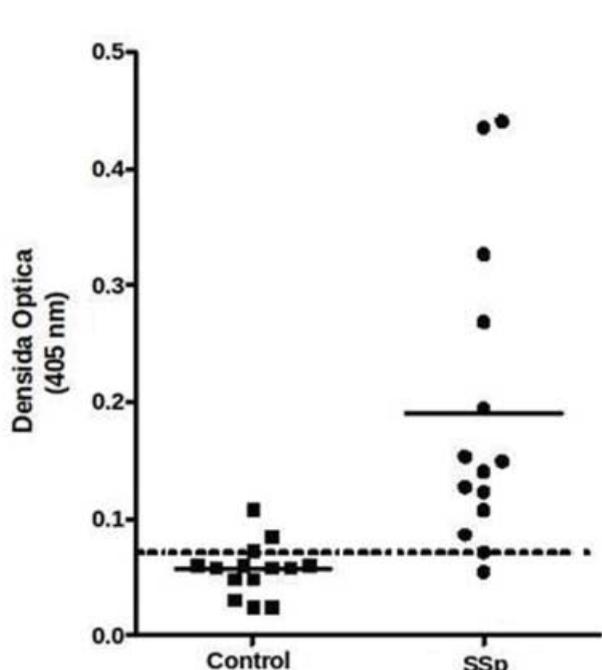


Figura 1. Escaterograma mostrando la inmunoreactividad de los sueros de pacientes sanos (control) (■) y de los de pacientes con SSp (●) sobre la membrana de la glándula submaxilar aislada de la rata siendo utilizadas estas como antígeno. Se observa en el suero de los pacientes con SSp mayor cantidad de anticuerpos anti-M₃, por lo cual se denota una mayor D.O; a diferencia de los pacientes control, en los que prácticamente hay ausencia de estos anticuerpos. Los sueros fueron presentados a las membranas glandulares aisladas en una dilución de 1/20, y mediante el revelado con avidina y biotina, se obtuvieron lecturas expresadas en densidad óptica a 405nm. Las líneas llenas representan el valor medio de cada grupo (SSp: 0.199 ± 0.01; control: 0.048 ± 0.004) y la línea de puntos representa al punto de corte (cut-off) correspondiente al valor obtenido a la media ± 2DS del grupo control. SSp: Síndrome de Sjögren primario.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que en las glándulas salivales se encuentran mAChR de los subtipos M₃ y M₁, realizamos el mismo ensayo de ELISA, y utilizando como antígeno la secuencia del segundo dominio extracelular del mAChR del subtipo M₁ humano. Pudimos observar que los sueros provenientes de los pacientes con SSp se comportaron de manera similar a los resultados antes

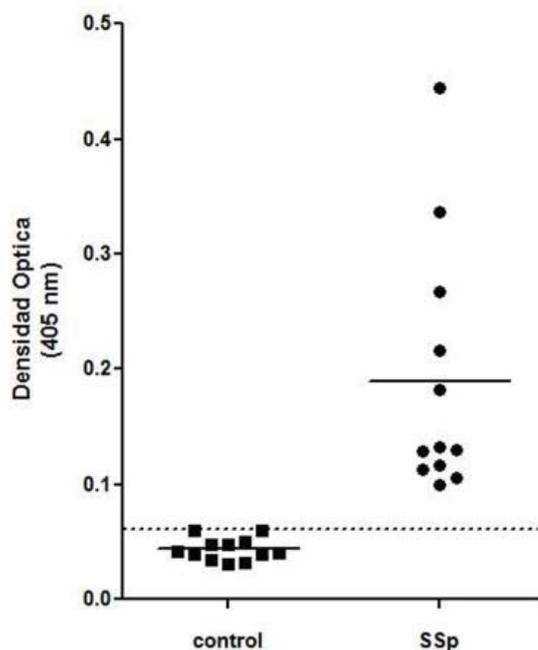


Figura 2. Escaterograma representando la distribución de los sueros estudiados: Sueros provenientes de pacientes con SSp (●), y sueros aislados de individuos sanos (control) (■). Se realizó un enzimoimmunoensayo contra la secuencia aminoacídica correspondiente al segundo dominio extracelular del mAChR del subtipo M₃ humano, utilizado como antígeno. Se observa en el suero de los pacientes con SSp mayor cantidad de anticuerpos anti-M₃, por lo cual se denota una mayor D.O; a diferencia de los pacientes control, en los que prácticamente hay ausencia de estos anticuerpos. Los sueros fueron presentados a las membranas glandulares aisladas en una dilución de 1/20, y mediante el revelado con avidina y biotina, se obtuvieron lecturas expresadas en densidad óptica a 405nm. Las líneas llenas representan el valor medio de cada grupo (SSp: 0.199 ± 0.01; control: 0.048 ± 0.004) y la línea de puntos representa el punto de corte (cut-off) correspondiente al valor obtenido a la media ± 2DS del grupo control. SSp: Síndrome de Sjögren primario.

descriptos; con una media: SSp: 0.15 D.O. ± 0.02; y para los controles: 0.045 DO ± 0.03; siendo el valor de p < 0.001; demostrándose de esta manera una diferencia significativa entre los grupos estudiados.

De esta manera, los sueros de los pacientes con SSp, con capaces de reconocer a los mAChR de los subtipos M₃ y M₁ humanos, representados, en este caso, por los péptidos

sintéticos utilizados como antígenos.

Los dos resultados previos muestran la presencia de IgG séricas en pacientes con SSp capaces de reconocer estructuras glandulares, específicamente el mAChR del subtipo M₃, y en más detalle, el segundo dominio extracelular.

Inmunorreactividad de las IgG séricas

De acuerdo con los resultados anteriores, decidimos aislar la fracción de la IgG de los sueros de los dos grupos estudiados para corroborar que el reconocimiento observado fuera por la acción directa de la IgG presente en los sueros y no una reacción inespecífica de algún/algunos factores presentes en los sueros. Para ello estudiamos diferentes diluciones de la IgG y las presentamos a placas sensibilizadas con las membranas purificadas de la glándula submaxilar y el péptido sintético mAChR M₃ humano, y detectamos ese reconocimiento mediante el ensayo de ELISA.

En la **Tabla I** se observa que el reconocimiento de las membranas submaxilares purificadas por las IgG de los pacientes con SSp resultó significativamente mayor ($p < 0.001$) con respecto al grupo control en una dilución de 1/20.

Tabla I. Inmunorreactividad de las IgG séricas.

Anticuerpos	SSp	Grupo Control
IgG antimembrana	14 /16 (93%)	1/16 (15%)
IgG anti-M	15/16 (95%)	0 /16 (0%)

Estudio del Proceso Oxidativo

Para reconocer el grado de estrés oxidativo que presentan los pacientes con SSp, a continuación, estudiamos dos enzimas marcadoras del mantenimiento de los ROS en niveles no tóxicos. De esta manera, queremos mostrar el estado clínico general de los pacientes estudiados, ya que el desbalance de las enzimas responsables del mantenimiento del estrés oxidativo a nivel sérico denota un deterioro general de paciente.

Medición de la Súper Óxido Dismutasa (SOD)

Debido a que la SOD es una enzima importante que actúa como defensa antioxidante en la mayoría de las células

expuestas al oxígeno, y protege de las reacciones dañinas estudiamos su expresión en sueros de pacientes con SS y pacientes normales.

Analizando la **Fig. 3** se puede observar que los valores séricos en los pacientes con SSp resultaron muy por debajo respecto al grupo control ($p < 0.001$), denotando incapacidad de los pacientes de hacer frente a la degradación del superóxido, molécula hiperreactiva para la producción de metabolitos de oxígenos altamente oxidantes, como el oxígeno, capaz de producir daños irreversibles.

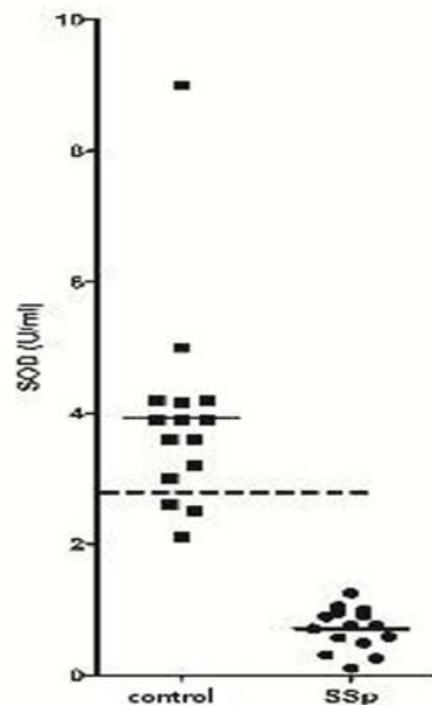


Figura 3. Escaterograma representado la distribución de los sueros estudiados. Se muestran sueros provenientes de pacientes con SSp (•) y sueros aislados de individuos sanos (control) (■). Se midió la actividad de la enzima SOD, mediante un kit comercial. Se observa que los valores de SOD se encuentran marcadamente disminuidos en pacientes con SSp, a diferencia de los pacientes control, los cuales tienen una actividad enzimática mayor. Se utilizaron 10 ml de cada suero, y mediante una curva provista por el fabricante, se pudo calcular la actividad de la enzima SOD, expresada en U/ml. Las líneas llenas representan el valor medio de cada grupo y la línea de puntos representa el punto de corte (cut-off) correspondiente al valor obtenido a la media \pm 2DS del grupo control. SSp: Síndrome de Sjögren primario.

Medición de la Actividad de la Catalasa (CAT)

Al igual que SOD, la deficiencia de actividad de CAT conlleva al estrés oxidativo celular. Es por ello que también estudiamos la expresión de la CAT en sueros de pacientes con SSp y normales.

La **Fig. 4** muestra una importante deficiencia de los valores de esta enzima antioxidante, repitiéndose el resultado respecto a los valores de SOD.

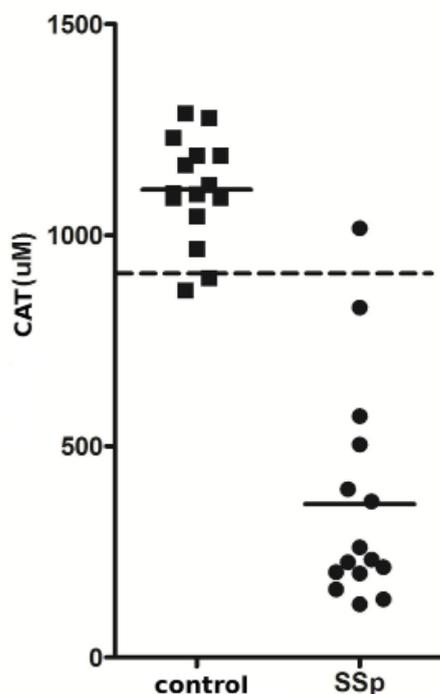


Figura 4. Escaterograma representando la distribución de los sueros estudiados. Sueros provenientes de pacientes con SSp (●) y sueros aislados de individuos sanos (control) (■). Se midió la actividad de la enzima CAT, mediante un kit comercial. Se observa que los valores de CAT se encuentran marcadamente disminuidos en pacientes con SSp, a diferencia de los pacientes control, los cuales tienen una actividad enzimática mayor. Se utilizaron 10 ml de cada suero, y mediante una curva provista por el fabricante, se pudo calcular la actividad de la enzima CAT, expresada en mM. Las líneas llenas representan el valor medio de cada grupo y la línea de puntos representa el punto de corte (cut-off) correspondiente al valor obtenido a la media \pm 2DS del grupo control. SSp: Síndrome de Sjögren primario.

Los resultados anteriores denotan deficiencia en dos

enzimas antioxidantes importantes en el mantenimiento de los niveles de ROS, reflejando pérdida en la plasticidad de los pacientes con SSp de responder al estrés oxidativo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación propone la inclusión de autoanticuerpos anti-M₃ como marcadores serológicos que podrían complementar a los parámetros serológicos que resultarían no ser específicos de la enfermedad, ya que son compartidos con otras enfermedades autoinmunes. Por otro lado, podría ayudar a evitar o disminuir la necesidad de una biopsia invasiva de labio para el diagnóstico del SS, y de esta manera, convertirse en una herramienta diagnóstica de esta enfermedad autoinmune.

Los mAChR M₃ controlan la secreción de fluidos en las células acinares glandulares y la presencia de anticuerpos anti-M₃ hace que cumplan un rol crítico en la disfunción secretora de pacientes con SS. A pesar de las funciones significativas mostradas anteriormente de los anticuerpos anti-M₃, actualmente no son aceptados como marcadores de la enfermedad (Reina *et al.*, 2007).

En este trabajo pudimos evidenciar que los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con SSp pueden interaccionar molecularmente con las placas sensibilizadas con membranas de glándulas salivales de rata.

La detección de autoanticuerpos anti-mAChR M₃ en el suero de los pacientes con SSp, fue demostrada por el grupo de trabajo de Borda en el año 1998, quienes propusieron un rol bloqueante de los autoanticuerpos anti-mAChR M₃, que al interferir en la unión de la ACh a los receptores colinérgicos muscarínicos M₃ glandulares permite explicar las bases de la hipofunción secretora, y algunas manifestaciones extraglandulares del SS.

Los pacientes con SS poseen en su suero anticuerpos del tipo IgG anti-M₃ y M₁ que en contacto con las membranas sensibilizadas de rata disparan mediadores intracelulares, que interaccionan con diferentes estructuras, desencadenando la apoptosis (Reina *et al.*, 2007). Se ha demostrado que IgG de los pacientes con SSp es capaz de provocar una disfunción secretora a través de una unión específica a la mAChR subtipo M₃ (Robinson *et al.*, 1998).

Mediante el ensayo de ELISA se demostró que en los sueros de los pacientes con SSp se encuentran anticuerpos

(IgG) capaces de reconocer a las membranas glandulares aisladas de la rata, por otro lado, tienen la capacidad de unirse específicamente a los mAChR M_1 y M_3 , a través del reconocimiento de los péptidos sintéticos cuya secuencia corresponde al segundo dominio extracelular de los mAChR M_3 y M_1 .

Posiblemente, en el SS los anticuerpos anti M_1 y M_3 podrían causar daño tisular, en primera instancia comportándose como bloqueantes de los mAChR de los subtipos M_1 y M_3 glandulares, y, por otro lado, a través de la generación de óxido nítrico, prostaglandinas y otros mediadores inflamatorios, y su acumulación, con un efecto adverso sobre las glándulas salivales (Reina et al., 2015). La generación inmunológica de óxido nítrico podría tener efectos citotóxicos en la célula, a través de la producción de radicales libres, que lleven a la destrucción de tejido glandular (Reina *et al.*, 2015). Aunque se reconoce el papel vasodilatador del óxido nítrico en el proceso de secreción, así como su liberación en la saliva normal después de la estimulación parasimpática; la acumulación de NO no parece garantizar la función glandular normal.

Las ROS se producen en las glándulas salivales bajo estrés oxidativo. El sistema antioxidante enzimático endógeno es importante para proteger al organismo contra la alta concentración de ROS que ha sido detectada en enfermedades sistémicas patogénicamente asociadas con el estrés oxidativo. Este sistema se compone principalmente de las enzimas SOD y CAT que escinden ROS. En condiciones normales, los antioxidantes se equilibran con la formación de ROS en diversos tejidos y fluidos. Esto ocurre a un nivel en el que estos compuestos pueden desempeñar su papel fisiológico sin ningún efecto tóxico. En las glándulas oculares normales y en las glándulas salivales también hay un balance prooxidante/antioxidante en la superficie ocular y oral. El peligro para el ojo y la boca aparece cuando se altera este equilibrio.

Se cree que en las glándulas salivales expuestas al suero de pacientes con SSp, se observa una disminución de las enzimas antioxidantes tanto de SOD como de CAT, encargadas de la reducción de componentes reactivos del oxígeno. Esta reducción evidencia una disfuncionalidad de las glándulas salivales.

En el caso de los sueros de individuos sanos, las enzimas

SOD y CAT no sufren cambios.

En este estudio, pudimos demostrar que en el suero de los pacientes con SSp los niveles de las enzimas SOD y CAT, se encuentran significativamente disminuidas respecto al grupo control. Estos resultados ponen en evidencia que la alteración y específicamente la disminución en los niveles de estas dos enzimas en la regulación de los ROS denota una disminución en la capacidad de respuesta al estrés oxidativo por parte de estos pacientes. Es importante destacar, que las ROS al encontrarse en altos niveles, ya sea en sangre o tejidos, generan modificaciones del pH fisiológico y alteración de los movimientos de iones, todo ello en su conjunto hace la generación de un desbalance que se refleja en las funciones fisiológicas de las diferentes células y tejidos.

La pérdida de plasticidad de la respuesta al estrés oxidativo hace blanco a los pacientes con SSp a sufrir daños tisulares o funcionales en mayor proporción a los individuos sanos.

El mAChR M_3 predomina en las glándulas lagrimales mientras que en las salivales hay receptores de tipo mAChR M_1 y M_3 . Los primeros también están presentes en los vasos y contribuyen con la vasodilatación dependiente de NO en las glándulas sudoríparas, intestino, tracto urinario, esfínter del iris y otros órganos bajo control del sistema nervioso autónomo.

Es importante hacer notar la asociación entre la presencia de autoanticuerpos presentes en pacientes con SSp con su capacidad de reconocer a los mAChR M_3 y M_1 , el cual está mayormente implicado en el proceso de secreción glandular en respuesta a estímulos parasimpáticos (Nakamura *et al.*, 2004).

En este trabajo describimos que el 93% de los pacientes con SSp presentan anticuerpos del tipo IgG sérica capaces de reconocer las membranas de la glándula submaxilar, así como los péptidos sintéticos cuya secuencia corresponde al segundo dominio de los mAChR de los subtipos M_1 y M_3 humanos.

La conservación de las secuencias de los diferentes subtipos de mAChR entre especies a lo largo de la evolución, permitió sintetizar los péptidos correspondientes al segundo dominio extracelular de los subtipos de mAChR M_1 , M_3 y M_4 humanos, los cuales han sido propuestos como región antigénica (Fu *et al.*, 1993). Estas secuencias presentan

más del 90% de homología con respecto a la secuencia de los receptores de la rata. De esta manera, utilizándolos como antígenos en ensayos de ELISA, pudimos demostrar que los anticuerpos IgG de pacientes con SS pueden interaccionar molecularmente con esta región de un modo específico.

Estos hallazgos sugieren que en el SS existen autoanticuerpos dirigidos a los mAChR de las glándulas salivales que podrían estar involucrados en la patogénesis de este complejo síndrome. Es posible que la interacción crónica de los anticuerpos dirigidos contra los mAChR de las glándulas lacrimales y salivales se comporte de manera similar a un agonista, produciendo la estimulación continua y permanente del mAChR. Como la unión entre el anticuerpo y el receptor resulta irreversible, se produciría una estimulación crónica en la célula acinar, que con el tiempo llevaría a la desensibilización del mAChR (Freedman *et al.*, 1996), un proceso que se caracteriza por la pérdida en la capacidad de señalizar tras una sostenida exposición al ligando. Producto de ello, se genera el proceso de internalización del complejo anticuerpo-mAChR mediante vesículas recubiertas por clatrina (Perry *et al.*, 2002). A partir de este momento, se pueden seguir dos caminos, uno de ellos es el retorno del receptor a la membrana plasmática (reciclaje del receptor), o este puede ser degradado proteolíticamente. Esto dependerá del tipo de ligando unido al receptor y si el receptor fue fosforilado o no (Perry *et al.*, 2002).

En el caso de que se una un anticuerpo al receptor, se forma un complejo de gran tamaño en la superficie celular. Este complejo anticuerpo-receptor, posiblemente es internalizado y posteriormente se produciría la degradación proteolítica en los lisosomas celulares de los receptores junto con los anticuerpos, sin ocurrir un reciclaje del receptor (Perry *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que la unión de los anticuerpos al receptor produce un cambio en su conformación, alterándose o bloqueando la acción del agonista endógeno. Estos cambios pueden indirectamente alterar la respuesta de la secreción al neurotransmisor, que, a largo plazo, llevaría a la desensibilización del receptor.

De modo tal, nuestros resultados indicarían que los autoanticuerpos dirigidos contra los mAChR glandulares, al unirse a estos receptores, provocarían crónicamente una desensibilización y una pérdida de dichos receptores

en la superficie celular, con la consiguiente disminución en la secreción salival y lagrimal. También, a esto se sumaría una formación continua de anticuerpos anti-mAChR, ya que estos al lesionarse por la unión irreversible del anticuerpo, actuarían como “antígenos específicos”, perpetuando así la cronicidad de la respuesta. Todo ello, en última instancia, llevaría a una disfunción parasimpática periférica del tejido glandular (salival y lagrimal) con la consiguiente disminución en su función secretoria.

Conclusiones

Las representaciones gráficas de nuestras conclusiones se pueden observar en el esquema de neurotransmisión glandular (Fig. 5).

- Concluimos que los anticuerpos anti M_3 reconocen y se unen a los mAChR de la glándula salival y producen una disautonomía glandular.
- Proponemos que los pacientes con SS poseen en su suero anticuerpos del tipo IgG anti- M_3 , que en contacto con las membranas sensibilizadas de rata disparan mediadores intracelulares, que interaccionan con diferentes estructuras, desencadenando la disfunción.
- El suero es reactivo frente a los receptores muscarínicos del subtipo M_3 , específicamente con el segundo dominio extracelular del mAChR.
- El suero de los pacientes con SSp disminuye la actividad de SOD y CAT, promoviendo un ambiente oxidativo que estimula el incremento de la disfunción glandular.

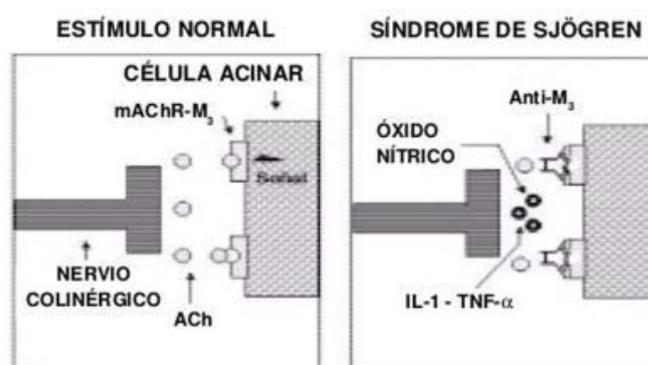


Figura 5. Esquema de la neurotransmisión glandular normal y en pacientes con Síndrome de Sjögren. Se observa el mecanismo de neurotransmisión glandular normal a la izquierda y el mecanismo hipotético en pacientes con Síndrome de Sjögren, a la derecha.

Referencias bibliográficas

- Angelino, G., Frydenlund, S., Maison, N., Ramirez, E., Zanone, L. (2003). Síndrome de Sjogren, Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina, 123, 18-21.
- Bacman, S., Berra, A., Sterin-Borda, L., & Borda, E. (2001). Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjogren syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci (42), 32132
- Bacman, S., Perez Leiros, C., Sterin-Borda, L., Hubscher, O., Arana, R., & Borda, E. (1998). Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. Invest Ophthalmol Vis Sci (39), 151-6.
- Bacman S., Sterin-Borda L., Camuso J. (1996). Circulating Antibodies Against Rat Parotid Gland M₃ Muscarinic Receptors in Primary Sjögren's Syndrome. Clin Exp Immunol. 104, 454-9.
- Bacman, S., Sterin-Borda, L., Camusso, J., & Borda, E. (1994). Circulating Antibodies Against Neurotransmitter Receptor Activities in Children with Congenital Heart Block and their Mothers. FASEB J(8), 1170-6.
- Borda, E., Camusso, J., Pérez-Leirós, C., & Sterin-Borda, L. (1996). Circulating Antibodies Against Neonatal Cardiac Muscarinic Acetylcholine Receptor in Patients with Sjögren's Syndrome. Mol Cell Biochem (163/164), 335-41.
- Busamia B. (2010). Cambios salivales y bucales como posibles marcadores de diagnóstico del síndrome de Sjögren. MS. Tesis Doctoral Universidad Nacional de Córdoba.
- Correia, P., Carpenter, G., Paterson, K., & Proctor, G. (2010). Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands. Rheumatology (Oxford) 49(1), 48-56.
- Dawson, L., Fox, P., Smith, P. (2006). Sjogrens syndrome, the non apoptotic model of glandular hypofunction. Rheumatology (Oxford)(45), 792-8.
- Diez Morrondo, C., Lema Gontad, J., Álvarez Rivas, N., Atanes Sandoval, A., De Toro Santos, F., Pinto Tasende, J., Galdo, F. (2010). Aspectos actuales del síndrome de Sjögren: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. 11(2), 70-6.
- Fox, R. & Stern, M. (2002). Sjogren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. Scand J Rheumatol Suppl (116), 3-13.
- Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1996). Desensitization of G Protein-coupled Receptors. Recent Prog. Horm. Res. 51, 319-51.
- Fu, L., Magnunson, Y., Berger, C., Liljeovisc, A., Waagstein, F., Hjalmarson, A., Hoebeke, J. (1993). Localization of Functional Autoimmune Epitopes on the Second Extracellular Loop of Human Muscarinic Receptor M2 in Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. J Clin Invest. 91, 1964-9.
- Moutsopoulos HM. (1994) Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. 14(1), 73-95.
- Nakamura, H., Kawakami, A., & Eguchi, K. (2006). Mechanisms of autoantibody production and the relationship between autoantibodies and the clinical manifestations in Sjogren's syndrome. Transl Res (148), 281-8.
- Nakamura, T., Matsui, M., Uchida, K., Futatsugi, A., Kusakawa, S., Matsumoto, N. (2004). M₃ muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. J Physiol (558), 561-75.
- Perry, S.J., Lefkowitz, R.J. (2002). Arresting Developments in Heptahelical Receptor Signaling and Regulation. Trends Cell Biol. 12, 130-8.
- Proctor GB., Carpenter GH. (2007) Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. Autonomic neuroscience: basic and clinical, 133(1), 3-18.
- Reina S., Rodriguez M., Stranieri G., Borda E. (2015). Action of Anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor IgG of primary Sjögren's syndrome on the enzymatic antioxidant system in rat submandibular gland. Journal of oral pathology and medicine, 44(10), 876-83.

- Reina S & Enri B. (2014) Autoantibodies against Muscarinic Acetylcholine Receptor on Exocrine Glands in Sjogren Syndrome. *Dentistry* 4, 265. doi: 10.4172/2161-1122.1000265
- Reina S., Orman B., Anaya JM., Sterin-Borda L., Borda E. (2007) Cholinoreceptor autoantibodies in Sjögren syndrome. *J Dent Res.* 86(9), 832-6.
- Reina S., Orman B., Sterin-Borda L., De Couto Pita A.(2007) Anti-brain cholinergic autoantibodies from primary Sjögren syndrome sera modify simultaneously cerebral nitric oxide and prostaglandin biosynthesis. *International immunopharmacology*, 7(12), 1535-43
- Robinson, C., Brayer, J., Yamachika, S. (1998). Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 7538-43.
- Talal N. (1992). Sjogren's syndrome: historical overview and clinical spectrum of disease. *Rheum Dis Clin NA*; 18: 507-16.
- Villalon, L., Mamani, M., Romanini, F., Pellet, A., Berra, A. (2009). Síndrome de Sjögren primario: expresión del factor NF- κ B en glándula salival menor. *Reumatología clínica*, 6(6), 292-5. doi: 10.1016/j.reuma.2009.10.009.
- Von Bultzingslowen, I., Sollecito, T., Fox, P., Daniels, T., Jonsson, R., Lockhart, P. (2007). Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* (103), 1-15.