

Rol de la IgA Salival en la Etiopatogenia del Síndrome de Sjögren

A. BERRA♦, S. REINA•, L. STERIN-BORDA♦•

♦Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y
•Cátedra de Farmacología de la Facultad de Odontología,
Universidad de Buenos Aires y *Consejo Nacional
de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República
Argentina (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

resumen

Los autoanticuerpos tipo IgA presentes en la saliva, dirigidos contra el receptor muscarínico del subtipo M₃ de la glándula parótida de rata, podrían ser nuevos marcadores para el diagnóstico del Síndrome de Sjögren. La saliva proveniente de pacientes con Síndrome de Sjögren primario y/o secundario reconoce por ELISA (inmunoensayo) a las membranas purificadas de glándulas parótidas (antígeno) y a un péptido sintético correspondiente al segundo dominio del receptor muscarínico tipo M₃ humano. Asimismo, la IgA inhibe la estimulación del carbachol sobre la secreción de proteínas. Los autoanticuerpos tipo IgA presentes en la saliva de pacientes con Síndrome de Sjögren podrían ser considerados como un factor implicado en la patofisiología de la "boca seca" y podrían también ser considerados como "nuevos marcadores" para diferenciar la boca seca no correspondiente al Síndrome de Sjögren.

PALABRAS CLAVES: Anticuerpos - Síndrome de Sjögren - Glándula Parótida - Saliva

abstract

Saliva IgA autoantibodies against M₃ muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) could be a new marker for the diagnosis for Sjögren syndrome (SS) dry mouth. Saliva IgA from dry mouth primary SS (pSS) or secondary SS patients tested by ELISA recognized membrane parotid gland acinar cell antigens and the synthetic 25-mer peptide corresponding to the second extracellular loop of human M₃ mAChRs. In addition, the IgA prevented carbachol stimulation of protein secretion by the parotid gland. IgA autoantibodies against mAChR may be considered among the immunoglobulin factors implicated in the pathophysiology of the development of pSS dry mouth and could be a new marker for differentiating SS dry mouth from non-SS dry mouth.

KEY WORDS: antibodies - Sjögren syndrome - parotid gland - saliva

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune de las glándulas exócrinas¹. Esta enfermedad puede estar asociada con otras enfermedades del tejido conectivo (SS secundario – SSs) o en su defecto se puede presentar también el síndrome en ausencia de enfermedades del tejido conectivo (SS primario – SSp)². La activación de las células B y su linfoproliferación son el resultado de dos importantes mecanismos patogénicos: producción de autoanticuerpos circulantes e infiltración linfocítica de las glándulas exócrinas³. Ambos procesos pueden ser responsables de las manifestaciones clínicas e inmunológicas que median la destrucción de las glándulas lagrimales⁴ y salivales⁵ provocando la pérdida de la función de las mismas⁵. Tanto la queratoconjuntivitis seca como la xerostomía han sido atribuidas a la infiltración y a la destrucción de las glándulas antes mencionadas por los linfocitos T⁵. La severidad de estos síntomas provoca una disminución en la función de las células acinares y ductales provocando alteraciones en la liberación de diferentes mediadores químicos conduciendo crónicamente a una disfunción parasimpática. La acetilcolina actuando sobre los receptores muscarínicos del subtipo 3 glandular controlan la secreción de proteínas⁶. El carbachol estimula la secreción proteica glandular actuando sobre los receptores muscarínicos de las células basolaterales del acino⁷ y estos receptores son los responsables de mediar por estimulación parasimpática el fluido salival, electrolitos, proteínas y diferentes productos que forman la saliva⁸. Nosotros proponemos que los pacientes con SS producen autoanticuerpos capaces de fijarse en estos receptores y ser la causa de la disfunción glandular⁹. Basado en estas observaciones, consideramos importante investigar si la IgA salival proveniente de pacientes con SS actuaría sobre los receptores muscarínicos del subtipo M₃ glandular y si estos son capaces de inter-

ferir el efecto biológico del carbacol causando una disfunción autonómica parasimpática glandular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y pruebas serológicas: Este estudio se realizó en mujeres cuya edad oscilaba entre los 35 y 55 años de edad, libres de tratamiento mínimo por 6 semanas y con 5 a 15 años de haberle diagnosticado el Síndrome de Sjögren. Las mismas viven en el área metropolitana de la Ciudad de Buenos Aires. Estas pacientes se dividieron en 4 grupos: grupo I, 16 pacientes con SSp con boca seca; grupo II, 18 mujeres son SSs con boca seca y con artritis reumatoidea (AR); grupo III, 21 mujeres post-menopáusicas sin SS, y grupo IV, 20 mujeres normales como control. El diagnóstico de SS se realizó siguiendo los criterios de Vitale y colaboradores¹⁰. Por otra parte, se realizaron las siguientes pruebas serológicas: anticuerpos anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B; factor reumatoideo y anticuerpos antinucleares (Cuadro 1). Todos los individuos que participaron de los estudios firmaron su consentimiento y dichos estudios fueron conducidos de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki.

Preparación de membranas microsomaes de glándula parótida: Las glándulas parótidas de rata fueron homogenizadas en soluciones tamponadas de fosfatos a pH 7,4. El homogenato fue centrifugado y el sedimento fue

resuspendido en la misma solución tamponada y se usó como antígeno para el ensayo de ELISA. El resto de los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a técnicas ya publicadas previamente¹¹.

Purificación de la IgA de la saliva: La fracción IgA de 10 pacientes de los grupos I, II y III y 10 individuos normales (grupo IV) fueron independientemente purificadas por técnicas cromatográficas. Todos los procedimientos se hicieron de acuerdo a métodos ya descritos¹².

Inmunoensayo (ELISA): Se utilizaron como antígenos las membranas purificadas de glándulas parótidas y un péptido sintético correspondiente al segundo dominio de los receptores muscarínicos del subtipo M₃ para sensibilizar la placa de ELISA. Luego, se procedió a bloquear dicha placa con los sueros y la IgA proveniente de los grupos experimentales antes mencionados. Todos los procedimientos para efectuar el ensayo de ELISA se hicieron de acuerdo a técnicas convencionales.

Pruebas en saliva: La saliva recolectada (dos horas después de haber comido o estimulada con agonistas colinérgicos) se utilizó para detectar: flujo salival basal; flujo salival estimulado; lisozima y concentración de IgA contenida en dichas muestras. Para ello se utilizaron "kits" comerciales (Kallstad Diagnostics).

Drogas utilizadas: El péptido sintético M₃ (25 péptidos) (K-R-T-V-P-D-N-Q-C-F-I-Q-F-L-S-N-P-A-V-T-F-G-T-A-I) correspondiente al segundo dominio del receptor humano muscarínico colinérgico M₃ fue sintetizado

CUADRO 1. Pruebas serológicas realizadas en los diferentes grupos.

Pruebas serológicas	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
ANA	12/16 (75%)	15/18 (83,3%)	1/21 (4,8%)	1/20 (5%)
Anti Ro (SS-A)	7/16 (43,7%)	7/18 (38,9%)	0/21 (0%)	0/20 (0%)
Anti La (SS-B)	6/16 (37,5%)	7/18 (38,9%)	0/21 (0%)	0/20 (0%)
RF	5/16 (31,6%)	15/18 (83,3%)	1/21 (4,8%)	1/20 (5%)

CUADRO 2. Flujo salival, lisozima y contenido de IgA en los diferentes grupos.

Grupo	Flujo salival basal (ml/15 min)	Flujo salival estimulado (ml/15 min)	Lisozima (mg/ml)	IgA (mg/dl)
I	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,3	3,0 ± 0,9	35,7 ± 14,4
II	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,4	3,4 ± 1,2	32,8 ± 10,7
III	3,8 ± 2,1	14,3 ± 1,4	8,7 ± 1,5	40,1 ± 12,5
IV	10,1 ± 3,6	16,1 ± 1,2	9,1 ± 1,7	35,8 ± 11,8

Los valores expresados en este cuadro son los valores medios ± el error estándar de la media de 10 pacientes provenientes de los grupos I, II y III y 10 individuos normales del grupo IV.

como previamente fuera descripto¹³. Además, se usó carbacol, atropina y 4-DAMP adquiridos en Laboratorios SIGMA. Todas las soluciones se prepararon en el día que se usaron.

Análisis estadístico: Todos los análisis se consideraron significativos cuando el valor de p fue igual o mayor a 0,05. Se aplicaron diferentes pruebas según los resultados a analizar.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra la inmunoreactividad de la saliva de los diferentes grupos antes mencionados dirigidos contra las membranas purificadas de glándula parótida. Podemos ver que los valores de densidad óptica para la saliva del grupo I (SSp) y del grupo II (SSs) fue similar. La saliva del grupo III (no SS) muestra valores de densidad óptica que no difieren de los de aquellos obtenidos en el grupo IV (individuos normales).

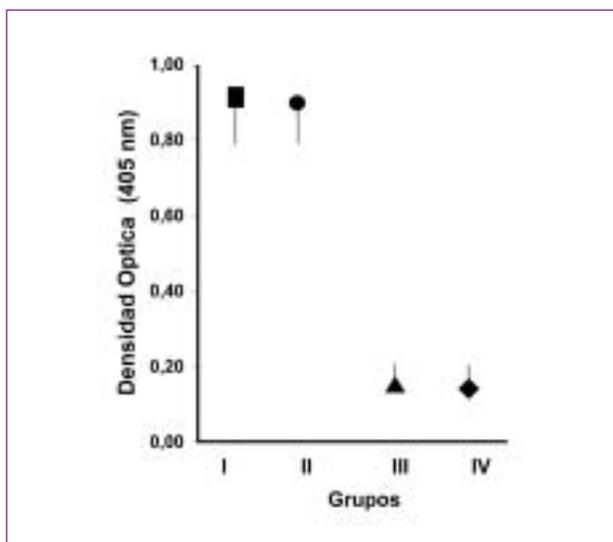


Figura 1. Inmunoreactividad de los anticuerpos antimembrana de la glándula parótida de diferentes grupos: ■ 16 pacientes SSp (grupo I); ● 18 pacientes SSs (grupo II); ▲ 21 pacientes con AR sin SS posmenopáusicas (grupo III) y ◆ 20 individuos normales (control, grupo IV). La saliva (en una dilución de 1/50) fue ensayada sobre microplacas sensibilizadas con 50 µg/ml de membranas purificadas de glándula parótida. Los valores son las medias ± el error estándar * $p < 0,001$ versus grupo III o IV.

Los valores de densidad óptica para cada uno de los 75 individuos estudiados se muestra en la Figura 2. La inmunoreactividad de la saliva de los pacientes con Sjögren fue similar tanto para el tipo primario como para el secundario y fue significativamente mayor que la saliva perteneciente a los grupos III y IV ($p < 0,0005$). La densidad óptica de la saliva de los grupos I y II fue siempre 3 desviaciones estándar mayor que la saliva de los individuos normales.

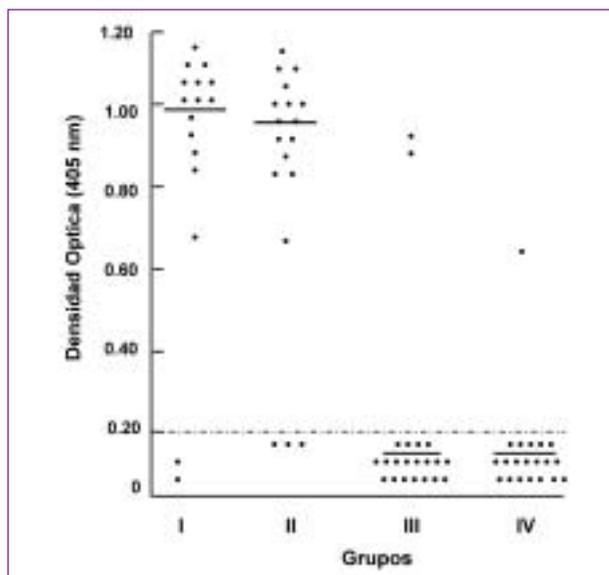


Figura 2. El diagrama muestra la inmunoreactividad de los anticuerpos tipo IgA contra el segundo dominio extracelular de los receptores muscarínicos subtipo M_3 testeados por ELISA. Los puntos representan los valores de densidades ópticas individuales para cada muestra de saliva (dilución 1/80) proveniente del grupo I (16 pacientes), grupo II (18 pacientes), grupo III (21 pacientes) y grupo IV (20 individuos sanos). La línea punteada es la línea de corte cuyo valor es de 0,204 y las líneas llenas representan el valor de la media. $p < 0,001$ entre grupo I o grupo II y grupo III o grupo IV.

La Figura 3 muestra que cuando se preincuba la IgA de los pacientes con SS por 30 minutos antes del agregado de carbacol, se inhibe el incremento en la secreción de proteínas desencadenada por el agonista colinérgico. La IgA normal no produce este efecto.

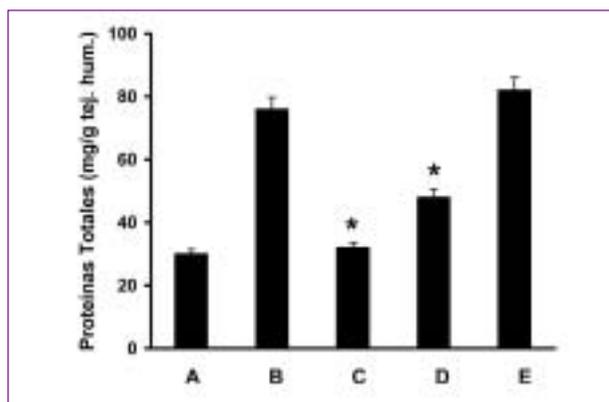


Figura 3. Efecto de la IgA de saliva de los pacientes con SSp sobre la acción del carbacol liberando proteínas por la glándula parótida de rata. A: valores basales; B: efecto del carbacol 1×10^{-6} M; C: acción de 1×10^{-6} M carbacol en presencia de 1×10^{-5} M 4-DAMP; D: acción de 1×10^{-6} M carbacol en presencia de 1×10^{-7} M SSp saliva IgA y E: acción de 1×10^{-6} M carbacol en presencia de 1×10^{-7} M IgA de saliva normal. Los valores son las medias ± el error estándar de 8 pacientes representativas en cada grupo. * $p < 0,001$ versus carbacol solo (columna B).

Cuando se realizaron las pruebas salivales de los diferentes grupos (Cuadro 2) mostraron que tanto el flujo salival basal como el estimulado están disminuidos, y acompañando a este resultado también disminuye la lisozima y en los grupos I y II comparados con el grupo III y IV. Por otro lado, no se encuentran diferencias en la concentración total de IgA en la saliva total (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Hemos demostrado que los pacientes con SSp o SSs producen autoanticuerpos en la saliva con capacidad de interactuar con los receptores muscarínicos de la glándula salival del subtipo M₃ provocando interferencias en el sistema de neurotransmisión parasimpático. Tanto la saliva como la IgA de estos pacientes son capaces de abolir la secreción de proteínas por parte de la glándula salival en respuesta al carbachol. La alta prevalencia de estos autoanticuerpos en los pacientes con SSp y/o SSs proporciona una nueva evidencia de un mecanismo patogénico en lo referente a la boca y ojo seco con la disfunción del sistema autonómico parasimpático.

La posibilidad de que los autoanticuerpos antimuscarínicos del tipo IgG jueguen un rol en la génesis del ojo seco del SS ha sido propuesto⁹. La presencia de autoanticuerpos tipo IgG contra los receptores muscarínicos en el suero de los pacientes con SS desencadena un efecto biológico mediado por la activación de los receptores parasimpáticos⁹. Aquí hemos demostrado que la saliva de los pacientes con SS tiene autoanticuerpos tipo IgA que reconocen y activan al receptor muscarínico del subtipo M₃ de la glándula parótida.

Otro hallazgo muy importante de este artículo relacionado a la naturaleza autoinmune del SS es la presencia de una IgA secretoria en la saliva que, actuando sobre los receptores antes mencionados, provoca una disfunción primaria órgano-específica. Posiblemente, la IgA reconociendo a un péptido correspondiente al segundo dominio extracelular del receptor humano colinérgico M₃ induzca daño tisular impidiendo, de ese modo, la actividad normal del neurotransmisor parasimpático (acetilcolina) sobre su respectivo receptor. Es importante destacar también que estos receptores en la glándula salival no sólo median la actividad secretomotora, sino que también regulan la secreción de proteínas, electrolitos y agua¹⁴. El hecho que la IgA de los pacientes con SS inhiba la secreción de proteínas inducida por carbachol señala la posibilidad de que la boca y el ojo secos sean de naturaleza autoinmune, provocados por la fijación crónica del anticuerpo IgA al receptor muscarínico acinar del subtipo M₃.

Finalmente, hemos mostrado también una asociación entre la existencia del anticuerpo IgA antimuscarínico y

la presencia de xerostomía acompañada por una disminución en el flujo salival, lisozima y secreción de proteínas. De este modo, la IgA secretoria junto con los autoanticuerpos detectados en SS hacen que los autoanticuerpos tipo IgA sean marcadores de gran valor para la boca seca asociada al SS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires (UBACyT) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET). Asimismo, se agradece a las Sras. Elvita Vanucchi y Fabiana Solari por su experta asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Moutsopoulos HM, Talal N. Immunologic abnormalities in Sjögren's Syndrome. In: Talal N, Moutsopoulos HM, eds. Sjögren's Syndrome, clinical and immunological aspect, Springer, Verlag, Berlin, pp. 258-261, 1987.
- 2) Binder A, Maddinson PJ, Skinner P, Kurtz A, Isenberg DA. Sjögren's Syndrome: association with type 1 diabetes mellitus. *Br J Rheumatol* 28, 518-521, 1989.
- 3) Speight PM, Jordan R. The molecular pathology of Sjögren's Syndrome. In: Isenberg DA, Horsfall AC, eds. Autoimmune diseases focus on Sjögren's Syndrome, BIOS Scientific Publishers Ltd, St Thomas House, Oxford, UK, pp. 25-42, 1994.
- 4) Strand V, Talal N. Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's Syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull Rheum Dis* 92, 212-226, 1980.
- 5) Fox PC, Speight PM. Current concepts of autoimmune exocrinopathy: immunologic mechanism in the salivary pathology of Sjögren's Syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 7,144-158, 1996.
- 6) Herman G, Busson S, Ovtracht I, et al. Regulation of protein discharge in two exocrine glands: rat parotid and exorbital lacrimal glands. *Biol Cell* 31, 255-264, 1978.
- 7) Dartt DA. Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion: a review. *Curr Eye Res* 8, 619-636, 1989.
- 8) Parod RJ, Putney JW. Stimulus-permeability coupling in rat lacrimal gland. *Am J Physiol* 239, G106-G109, 1980.
- 9) Bacman S, Berra A, Sterin-Borda L, Borda E. Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 321-327, 2001.
- 10) Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 36, 340-347, 1993.
- 11) Goin JC, Perez Leiros C, Borda E, Sterin-Borda L. Human chagasic IgG and muscarinic cholinergic receptor interaction: pharmacological and molecular evidence. *Mol Neuropharmacol* 3, 189-193, 1994.
- 12) Roque Barreira MC, Campos Nieto A. Jacalin: an IgA binding lectin. *J Immunol* 134, 1740-1743, 1985.
- 13) Bacman S, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R, Borda E. Autoantibodies against lacrimal gland M₃ muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 151-156, 1998.
- 14) Nakamura M, Tada Y, Akaishi T, Nakata K. M₃ muscarinic receptor mediates regulation of protein secretion in rabbit lacrimal gland. *Curr Eye Res* 16, 614-619, 1997.