

SECCIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS ORIGINALES

Determinación de anticuerpos séricos contra proteínas de choque térmico en pacientes con glaucoma*

Dra. Celia Elizondo-Olascoaga**, Dr. Juan Carlos Cancino-Díaz***, Dr. Andres Morales-González**

RESUMEN

Objetivo: Determinar los niveles de anticuerpos séricos contra dos proteínas de choque térmico bacterianas de 60k en pacientes con glaucoma y sujetos sanos.

Métodos: Se realiza análisis comparativo de niveles de anticuerpos séricos contra las proteínas de choque térmico de 60 k de *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* en 22 pacientes con glaucoma crónico de ángulo abierto, 21 con glaucoma de tensión normal y 22 sujetos sanos, mediante método indirecto del análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas.

Resultados: Los pacientes con glaucoma presentaron niveles más altos de anticuerpos contra las proteínas de choque térmico de 60k comparados con sujetos sanos, siendo estadísticamente significativo.

Conclusiones: En pacientes mexicanos con glaucoma existen niveles mayores de anticuerpos contra proteínas de choque térmico bacterianas de 60k. Se requieren estudios complementarios para evaluar su relación en el mecanismo fisiopatológico del glaucoma.

Palabras clave: glaucoma, proteínas de choque térmico 60k, anticuerpos contra HSP

SUMMARY

Purpose: To determine serum antibody levels for bacterial heat shock proteins 60 kd in patients with glaucoma and healthy subjects.

Methods: We performed comparative analysis of serum antibody levels for two different bacterial heat shock proteins 60k in 22 patients with chronic open angle glaucoma, 21 in normal-tension glaucoma and 22 healthy subjects using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Patients with glaucoma had higher levels of antibodies against bacterial heat shock proteins compared with healthy subjects, this being statistically significant.

Conclusions: Mexican patients with glaucoma present higher levels of bacterial heat shock proteins. We require additional research in order to evaluate their relationship with the pathophysiologic mechanisms of glaucoma.

Key words: Glaucoma, heat shock proteins 60k, antibodies HSP60K.

INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. El mecanismo preciso de la neuropatía óptica glaucomatosa no es del todo conocido. En varias publicaciones se ha sugerido que en algunos pacientes un mecanismo autoinmune no completamente identificado puede estar

involucrado en el desarrollo y/o progresión de esta neuropatía óptica (1). Cartwright y cols. reportaron una asociación epidemiológica de enfermedades inmunorelacionadas en 30% de pacientes con glaucoma de tensión normal en un estudio de casos y controles (2). Se ha buscado la presencia de autoantígenos en retina y nervio óptico que desencadenen una alteración en la tolerancia inmunológica en los pacientes

*Trabajo presentado en el XXVI Congreso Mexicano de Oftalmología, Veracruz, 7 a 11 de agosto de 2004.

**Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, México, DF. Chimalpopoca 14, Centro. CP 06800 México, D.F. Tels: 55 88 46 00 ext 713, 57 75 52 50, Fax: 55 78 97 48

***Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México, DF.
Correspondencia: Dra. Celia Elizondo-Olascoaga. E-mail: celiaelizondo@hotmail.com

con glaucoma y se ha reunido evidencia de que las proteínas de choque térmico (HSP) están dentro de los más significativos en estos pacientes (3).

Las proteínas de choque térmico son un grupo de proteínas altamente conservado que se expresan en las células bajo condiciones fisiológicas normales y de manera más importante en estados de estrés celular como calor, anoxia y exposición a citocinas. Estas proteínas facilitan la regeneración celular al participar en los eventos de maduración proteica como plegamiento o translocación a través de membranas (4). Tezel y cols. han propuesto que la expresión aumentada de HSP en ojos glaucomatosos sirve inicialmente para protección de la muerte celular pero que seguidamente el reclutamiento de la respuesta inmune ante estas proteínas altamente antigénicas contribuye a la progresión de la enfermedad (5). Estos autores demostraron experimentalmente que la aplicación de anticuerpos contra HSP27, proteína de bajo peso molecular, puede inducir la muerte neuronal por apoptosis en las células retinianas al inactivar o atenuar la habilidad de la HSP27 de estabilizar el citoesqueleto celular así como influir en la activación de proteasas (6). Documentado por otros autores, se ha observado que los anticuerpos contra HSP60 pueden mediar una toxicidad endotelial en la vasculatura humana (7). En consecuencia, los títulos elevados de anticuerpos contra proteínas de choque térmico que se han determinado en pacientes con glaucoma se han tratado de relacionar con una pérdida de la protección de la muerte celular por apoptosis (3).

En este estudio se realiza la determinación de los niveles de anticuerpos séricos contra proteínas de choque térmico de 60 kd de origen bacteriano en pacientes mexicanos con dos tipos de glaucoma (glaucoma crónico de ángulo abierto y glaucoma de tensión normal) y se comparan con los niveles séricos en un grupo control de sujetos sanos. Además, se correlacionan estos niveles de anticuerpos con la presencia de la enfermedad de acuerdo al daño en la campimetría automatizada que presentan los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 22 pacientes con diagnóstico de glaucoma primario de ángulo abierto (44 ojos) y 21 de glaucoma de tensión normal (42 ojos) del departamento de glaucoma del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, de noviembre de 2003 a enero de 2004; así como un grupo control de 22 pacientes sanos. El criterio diagnóstico para glaucoma de tensión normal (GTN) fue la presencia de un ángulo iridocorneal abierto, sin evidencia de presión intraocular mayor de 23 mmHg en las diversas mediciones, cambios glaucomatosos en los campos visuales y nervio óptico con excavación glaucomatosa; y para el diagnóstico de glaucoma crónico de ángulo abierto (GCAA) fueron similares criterios que para el GTN excepto que la presión intraocular se haya detectado mayor de 23 mmHg por lo menos en una ocasión. Se excluyeron aquellos pacientes con glaucoma de ángulo estrecho, evidencia de glaucoma secundario, trauma ocular,

cualquier cirugía ocular previa y/o falta de consentimiento por escrito.

El daño campimétrico por glaucoma se clasificó en leve, moderado y severo de acuerdo con los siguientes criterios:

A. Daño leve: no extenso ni cercano a la fijación; la desviación media (DM) menor a -6dB; en gráfica de desviación del modelo, menos de 25% de los puntos deprimidos por debajo de 5% y menos de 10 puntos por debajo de 1%; y en gráfica de valores crudos ningún punto de los 5° centrales con sensibilidad menor a 15dB.

B. Daño moderado: DM menor a -12 dB; menos de 50% de puntos deprimidos debajo de 5% y menos de 20 puntos debajo de 1%; ningún punto de 0 dB en los 5° centrales, solamente un punto en un hemisocampo con sensibilidad menor de 15 dB en los 5° de fijación.

C. Daño severo: DM mayor a -12 dB; más de 50% de puntos deprimidos debajo de 5% y más de 20 puntos debajo de 1%; uno o más puntos de 0 dB en los 5° centrales y puntos con sensibilidad menor de 15 dB en los 5° centrales en ambos hemisocampos.

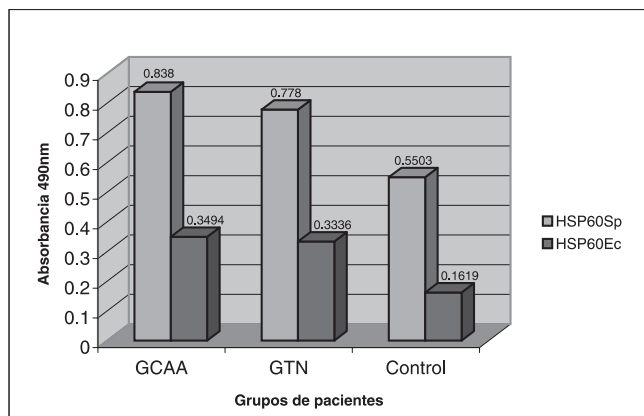
Se realizó toma de muestra sanguínea en vena periférica en todos los pacientes, previo consentimiento informado por escrito, colectando el suero y almacenándolo a -70°C hasta su utilización. Los genes que codifican para las proteínas de choque térmico de 60 Kda de *Escherichia coli* (Rhsp60Ec) y *Streptococcus pyogenes* (Rhsp60Sp) fueron clonados por reacción en cadena de la polimerasa, usando el DNA de cada bacteria. Se efectuó radioinmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto a cada muestra para determinar los niveles de anticuerpos séricos contra cada proteína de choque térmico. Los pozos fueron cubiertos con 0.5 µg de proteínas recombinantes e incubados toda la noche a 4°C. Posterior a lavado de los mismos, se agregaron las muestras problema (dilución 1:100) en cada pozo e incubados una hora a 37°C. Posterior a lavado, se efectuó incubación con 100µL de anticuerpo IgG por una hora seguido de la adición del sustrato ortofenildiamina (OPD) y deteniéndose la reacción con ácido sulfúrico. La absorbancia se midió a 492 nm.

Se realizó análisis estadístico para la comparación entre los grupos de nivel sérico de anticuerpos se utilizó la prueba t Student y para observar la asociación de los niveles de anticuerpos y la presencia de la enfermedad se utilizó la relación de momios.

RESULTADOS

Los niveles séricos de anticuerpos detectados contra proteínas de choque térmico bacterianas *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* de 60 kda en los grupos estudiados se muestran en la gráfica 1, se expresan las medias de las lecturas ópticas del análisis de radioinmunoensayo en cada grupo con su desviación estándar. Se encontró que para ambas HSP60 los valores en los grupos de pacientes con glaucoma fueron mayores en comparación con el grupo control de sujetos sanos con diferencia estadísticamente significativa (en HSP60Sp GCAA vs sanos con $p=0.002$, GTN vs sanos $p=0.007$;

Gráfica 1. Niveles de anticuerpos séricos contra HSP60Sp y HSP60Ec en pacientes sanos y con glaucoma

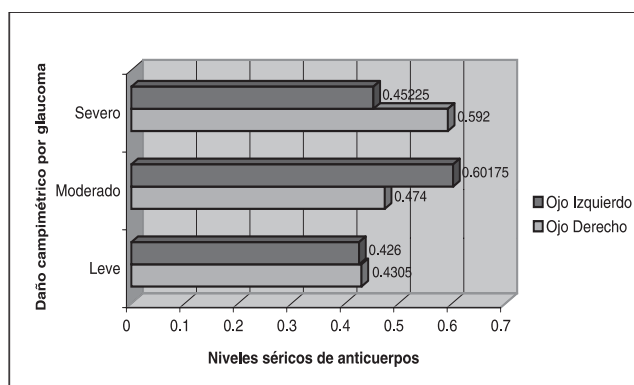


en HSP60Ec GCAA vs sanos con $p=0.016$, GTN vs sanos $p=0.031$). Sin embargo, la comparación de los niveles de anticuerpos entre los dos grupos de pacientes con glaucoma no mostró una diferencia significativa en ambas proteínas de choque térmico (HSP60Sp GCAA vs GTN $p=0.746$ y HSP60Ec GCAA vs GTN $p=0.874$).

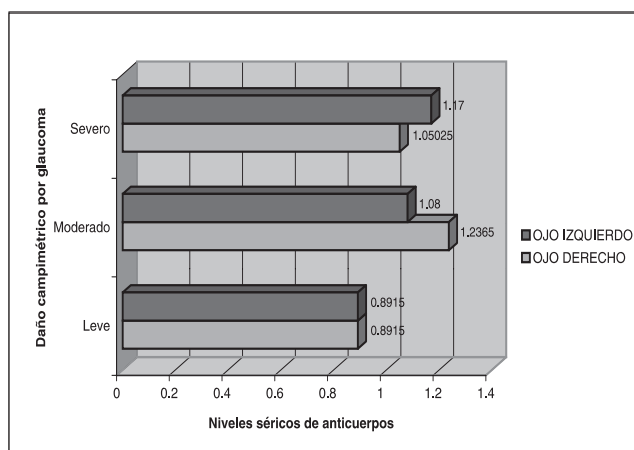
Para determinar el grado de asociación entre la respuesta inmune humoral a las HSP60Sp y HSP60Ec y la presencia de glaucoma en los pacientes, se calculó la relación de momios considerando arbitrariamente A492nm mayor de 0.75 (A492 media + 1 DS del grupo control) en el grupo de HSPSp y A492nm mayor de 0.32 en el grupo de HSPEc como positivos para la enfermedad y valores menores a éstos como resultados negativos. Se observó en ambos grupos de glaucoma una mayor proporción de pacientes con relación positiva entre la presencia de los anticuerpos y la enfermedad en comparación con el grupo control pero sólo para la HSP60 de *Streptococcus pyogenes*.

En los pacientes que presentaron una relación positiva de la enfermedad y los anticuerpos séricos contra ambas HSP60 se buscó una asociación entre el nivel de esos anticuerpos y el daño campimétrico por glaucoma que presentaban (gráfi-

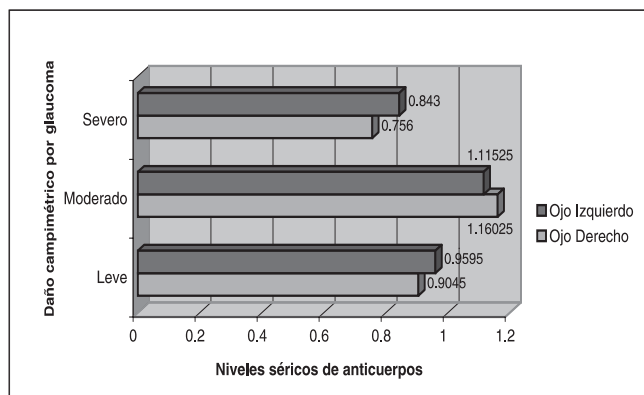
Gráfica 3. Niveles de anticuerpos séricos contra HSP60Ec relacionados con el daño campimétrico por GCAA



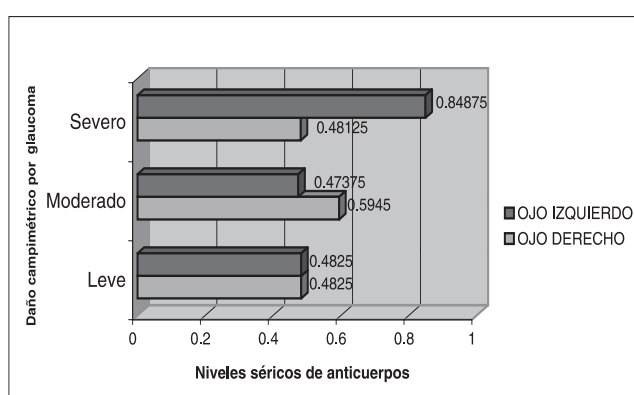
Gráfica 4. Niveles séricos contra HSP60Sp relacionados con el daño campimétrico en pacientes con GTN



Gráfica 2. Niveles de anticuerpos séricos contra HSP60Sp relacionados con el daño campimétrico en pacientes con GCAA



Gráfica 5. Niveles de anticuerpos séricos contra HSP60Ec relacionados con el daño campimétrico en pacientes con GTN



cas 2-5). En el grupo de GCAA y anticuerpos contra HSP60Sp se encontró que los niveles séricos mayores se presentaban en los pacientes con un daño campimétrico moderado tanto en ojo derecho como en ojo izquierdo seguido por los de daño leve y severo (gráfica 2). En este mismo grupo de pacientes, los niveles de anticuerpos contra HSP60Ec fueron mayores en los pacientes con daño campimétrico severo para el ojo derecho y con daño moderado en el ojo izquierdo (gráfica 3). Los anticuerpos séricos contra ambas HSP60 fueron mayores en los pacientes con GTN que presentaban daño moderado en la campimetría automatizada en el ojo derecho y con daño severo en el ojo izquierdo (gráficas 4, 5). Se asume, con base en estos resultados, que el grado de daño campimétrico que muestran los pacientes en ambos tipos de glaucoma no se correlaciona de manera lineal en este estudio con los niveles de anticuerpos séricos encontrados.

DISCUSIÓN

La respuesta humoral con anticuerpos tipo IgG a las proteínas de choque térmico de 60kd de origen bacteriano se detectó aumentada en los grupos de pacientes con glaucoma aquí estudiados. Las proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés), descritas desde 1974, son un grupo de proteínas filogenéticamente conservado que se expresan en todas las especies y que por varios años se pensó eran sólo moléculas intracelulares con funciones citoprotectoras que sólo se liberaban durante la necrosis celular (4, 8). Actualmente se reconoce que estas moléculas tienen múltiples actividades inmunoregulatorias a nivel extracelular y que la respuesta del organismo ante su expresión es una respuesta fisiológica que regula el desarrollo y progresión de la inmunidad proinflamatoria.

Las HSP se clasifican en familias de acuerdo con su peso molecular, como de 90kd, 70kd, 60kd y las pequeñas de 25 a 30kd. Estas proteínas tienen un alto grado de homogeneidad en su secuencia entre las proteínas de origen bacteriano y las de los mamíferos (residuos idénticos hasta en un 60% en la familia de las HSP60). Se ha estimado que la reactividad ante estas proteínas puede sucederse por el reconocimiento de los epítomos conservados o a través de un mecanismo de mimetismo molecular (4). Así, las HSP se identifican como moléculas altamente antigénicas y la respuesta inmune ante ellas puede tener un potencial protector y patogénico (9).

La expresión de las HSP en pacientes y modelos animales con glaucoma se ha documentado en varios estudios (5, 10-14). Tezel y cols. determinaron, a través de inmunotinción de cortes histológicos en ojos postmortem de pacientes con glaucoma que las HSP60 se expresan en mayor proporción en las células ganglionares, fotorreceptores y células astrogiales de la lámina cribosa del nervio óptico en comparación con ojos postmortem de pacientes sin glaucoma. Al igual encontraron que existe mayor expresión de HSP27 en la cabeza del nervio óptico y de los vasos retinianos (5).

El interés de algunos autores en determinar una relación entre la respuesta inmune y la neuropatía óptica glaucomatosa

se fundamenta inicialmente en encontrar diferentes mecanismos de daño neuronal en pacientes con glaucoma de tensión normal en los cuales se estima que la teoría mecánica descrita en esta neuropatía no constituye el principal factor de daño, además de su asociación con otros estados de autoinmunidad; sin embargo, en los diversos estudios se observó que la respuesta ante la expresión de las HSP se produce también en los pacientes con GCAA determinando que los títulos mayores de anticuerpos contra HSP no son dependientes del nivel de presión intraocular exclusivamente (15, 16).

Wax y cols. han acumulado evidencia de que las HSP se encuentran entre los autoantígenos más significativos en los pacientes con glaucoma (1). La relación entre el glaucoma y las HSP se encuentra fundamentada por la conocida expresión de estas proteínas en situaciones de isquemia, la cual ya sea de manera global o focal está presente en los pacientes con glaucoma por una perfusión vascular disminuida (7), expresión a través de la cual se contribuye a la protección para la supervivencia celular. Pero ¿en qué momento la expresión de las HSP puede continuar ahora la progresión de esta neuropatía? Tezel y cols. suponen una pérdida de la tolerancia inmunológica en los pacientes con glaucoma al ser estimuladas las células gliales —que se sabe son células presentadoras de antígenos— en retina y nervio óptico convirtiendo a estas moléculas en antígenos que desencadenen la producción de autoanticuerpos que, a su vez, inactivan la función inicial de las HSP en la protección contra la apoptosis (5).

En modelos experimentales de glaucoma se ha documentado que la muerte neuronal es por apoptosis (17), tanto en glaucoma crónico de ángulo abierto como en el de tensión normal; sin embargo, lo que es hipotético es cómo se producen los autoanticuerpos contra antígenos retinianos que provoquen apoptosis (3). Es reconocido en otras series que los pacientes con glaucoma presentan títulos elevados de anticuerpos contra HSP comparados con sujetos sanos (15), asimismo que los autoanticuerpos pueden entrar a las células vivas y alterar su función (provocar apoptosis) (18) y, según estudios de inmunotinción (3), se ha sugerido la unión externa de los anticuerpos, su internalización mediante endocitosis y la siguiente unión intracelular. Se ha detectado específicamente con anticuerpos contra HSP27 la inactivación de esta proteína para estabilizar el citoesqueleto de la célula y la activación también de proteasas celulares (6).

Por lo anterior, la detección de niveles elevados de anticuerpos contra proteínas de choque térmico en pacientes con glaucoma y que en experimentos *ex vivo* estos anticuerpos faciliten la apoptosis celular hace suponer una relación entre estas moléculas y la enfermedad. En este estudio, como en otros, no se logró documentar una relación entre el nivel de anticuerpos séricos y la estadificación del daño campimétrico en los pacientes estudiados, lo cual apoya lo descrito por Wax y cols. en población estadounidense y japonesa, donde no se encontró relación con los parámetros morfométricos del nervio óptico, considerándose no se trata de un fenómeno inicial sino una variable que perpetúa la lesión glaucomatosa (15).

En conclusión, los grupos de pacientes mexicanos con glaucoma crónico de ángulo abierto y de tensión normal estudiados presentan niveles mayores de anticuerpos séricos contra proteínas bacterianas de choque térmico en comparación con el grupo control de sujetos sanos sin evidencia de una relación de los niveles de anticuerpos con la progresión de la enfermedad. Lo anterior sugiere que en nuestra población también habrá que considerar la expresión de estas moléculas en el mecanismo fisiopatológico del glaucoma, necesitando mayor evidencia para aclarar su preciso papel y ampliar la perspectiva en las estrategias de tratamiento del glaucoma.

REFERENCIAS

1. Wax MB, Tezel G, Saito I. Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock proteins antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1998; 125(2):145-57.
2. Cartwright MJ, Grajewski AL, Friedberg ML y col. Immune-related disease and normal-tension glaucoma. A case-control study. *Arch Ophthalmol* 1992; 110:500-2.
3. Tezel G, Seigel GM, Wax MB. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(12):2277-87.
4. Pockley G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? Expert reviews in molecular medicine. Fuente: URL:<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>
5. Tezel G, Hernandez R, Wax MB. Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(4):511-8.
6. Tezel G, Wax MB. The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J Neurosci* 2000; 20(10):3552-62.
7. Schett G, Xu Q, Amberger A y col. Autoantibodies against hsp60 mediates endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest* 1995; 96:2569-2577.
8. Nicchitta CV. Re-evaluating the role of heat shock protein-peptide interactions in tumour immunity. *Immunology* 2003; 3:427-432.
9. Young RA, Elliott TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 1989; 59:5-8.
10. Sakai M, Sakai H, Nakamura Y. Immunolocalization of heat shock proteins in the retina of normal monkey eyes and monkey eyes with laser-induced glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 2003; 47(1):42-52.
11. Kitazawa Y. Open-angle glaucoma clinical presentation and management. *Nippon Ganka Gakkai Zashi* 2001; 105(12):828-42.
12. Salvador-Silva M, Ricard CS, Agapova OA. Expression of small heat shock proteins and intermediate filaments in the human optic nerve head astrocytes exposed to elevated hydrostatic pressure in vitro. *J Neurosci Res* 2001; 66(1):59-73.
13. Lutjen-Drecoll E, May CA, Polansky JR. Localization of the stress proteins alpha B-crystallin and trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein in normal and glaucomatous trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39(3):517-25.
14. Tamm ER, Russell P, Johnson OH. Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(12):2402-13.
15. Wax M, Tezel G, Kawase K. Serum autoantibodies to heat shock proteins in glaucoma patients from Japan and the United States. *Ophthalmology* 2001; 108:296-302.
16. Park K, Cozier F, Ong O y col. Induction of heat shock proteins 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1522-1530.
17. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA y col. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:774-786.
18. Alarcon-Segovia D, Ruiz-Argüelles A, Llorente L. Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. *Immunol Today* 1996; 17:163-164.

Cita histórica:

Francesco Maurolico (1494-1575), de Mesina, matemático, publica en 1575 *Photismi de lumine et umbra*, en donde trata de prismas, espejos, lentes y sistema dióptrico del ojo. Establece que una lente convexa hace confluír los rayos en un punto focal y sugiere que el ojo puede funcionar como tal. Explica que la miopía se da por mayor convexidad del cristalino.