

Determinación de la frecuencia de linfocitos T reguladores y efectores en pacientes con oftalmopatía de Graves

Dra. Cynthia García-Jiménez, Dr. José L. Tovilla-Canales, Dra. Maria C. Jiménez-Martínez

RESUMEN

Objetivo: Determinación de células T CD57+ y CD4+CD25+FOXP3+ en pacientes con orbitopatía de Graves en diversos estadios clínicos.

Métodos: Quince pacientes se dividieron en tres grupos: grupo A con diagnóstico de orbitopatía de Graves inactiva (I), grupo B con orbitopatía de Graves activa sin tratamiento (AST), grupo C con actividad con tratamiento (ACT). Se extrajeron células mononucleares de sangre periférica utilizando anticuerpos contra CD4, CD8, CD25, CD57 y FOXP3. Se analizó mediante citometría de flujo y T de Student para análisis estadístico.

Resultados: En pacientes del grupo C el porcentaje de células CD4+ fue similar al grupo A y 1.1 veces menor que el grupo B. Observamos 1.9 veces más células CD4+CD25+ en el grupo B que en el A. Ambos tipos de células CD57+ (CD4+ y CD8+) con incremento en el grupo C que en el grupo B. Células CD4+CD25+ mostraron incremento 3.4 veces más en el grupo C que el grupo B. La expresión de FOXP3 en células CD4+CD25+ fue similar en los tres grupos.

Conclusiones. Es posible que la regulación de la enfermedad de Graves dependa de más de un tipo celular. Se requieren de estudios funcionales para establecer el papel que tienen cada una de éstas en la orbitopatía de Graves.

Palabras clave: Células T reguladoras, orbitopatía de Graves.

SUMMARY

Purpose: To determine CD57+T cells and CD4+CD25+FOXP3T cells in patients with different clinical-stages of ocular Graves' disease.

Methods: Patients (n=15) were divided into 3 groups: Group A with diagnosis of inactive Graves disease (I), Group B with active Graves disease without treatment (AST), Group C with active Graves disease with treatment (ACT). Peripheral blood mononuclear cells were obtained and were labeled with fluorescent antibodies against CD4, CD8, CD25, CD57, and FOXP3. Results were analyzed by flow-cytometry and T test used for statistical analysis.

Results: In ACT patients the percentage of CD4+T cells was similar to I patients and was diminished 1.1 times in contrast to AST patients. We observed 1.9 times more percentage of CD4+CD25+ Tcells in AST patients than in I patients. Both subsets of CD57+ Tcells, CD4+ and CD8+T cells were significantly increased in ACT patients than in AST patients. CD4+CD25+T cells were increased 3.4 times more in ACT patients than in AST patients. FOXP3 expression on CD4+CD25+T cells was similar in all groups.

Conclusions: It is possible that the regulation of Graves' hyperthyroidism depends on more than one regulatory T cell subset. Functional studies are needed to know the real function of these T cells in Graves' disease.

Key words: Regulatory T cells, Graves' ophthalmopathy.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Graves (EG) es una patología común con una incidencia anual en mujeres de 1 en 100 000. En condiciones de hipertiroidismo, el involucro ocular clínicamente significativo se presenta en 25 a 50% de los pacientes con EG.

La incidencia anual de oftalmopatía de Graves (OG) en mujeres es de 16 en 100 000 y en hombres es de 3 en 100 000 (1, 2).

Contrariamente a la mayoría de enfermedades autoinmunes, los pacientes con OG tienden a estabilizarse y tener una remisión espontánea de la enfermedad dentro de los 18 meses del inicio de la misma (2).

Fundación Conde de Valenciana. México D.F. México.

Correspondencia: Dra Cynthia García Jiménez. Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana. Chimalpopoca 14, Col. Obrera, C.P. 06800, México D.F. México. e-mail: cygaji@hotmail.com, Tel. +525554421700 ext. 3712, Fax +525554421700.

El presente trabajo fue patrocinado por el Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología CONACYT-SALUD 14108 y CONACYT-SALUD C01-71291.

En pacientes con manifestaciones severas, la respuesta al tratamiento es insatisfactoria y las recaídas y secuelas comunes, lo que disminuye de forma importante la calidad de vida (3).

La clasificación clínica de la OG que se considera práctica y permite tomar decisiones terapéuticas en el momento de ver al paciente en la consulta es la clasificación VISA propuesta por Dolman y cols. (4), la cual incluye parámetros objetivos como la visión, datos inflamatorios, motilidad ocular y la apariencia de la superficie, así como la impresión subjetiva del paciente en términos del curso del padecimiento. El objetivo de la clasificación VISA es establecer si la enfermedad está en una fase activa o no activa y cuantificar la severidad de la misma, de tal forma que nos permita formular diferentes planes terapéuticos de acuerdo con el resultado (4).

En la fisiopatología de la OG existen factores que contribuyen a la etiología de la misma, como la participación de la respuesta inmunológica a través del brazo efector celular y humoral que ha sido reconocida como mecanismo de daño desde hace mucho tiempo (5). Se sabe que el edema de los tejidos periorbitarios es atribuido a la secreción excesiva de glicosaminoglicanos (GAGs) por los fibroblastos los cuales, *in vitro*, responden a varias citocinas producidas por infiltrado linfocitario en la órbita. Este infiltrado está compuesto predominantemente por linfocitos T CD4+ y CD8+ y linfocitos B. La afinidad de los linfocitos T por la órbita es facilitada por la expresión de HLA-DR y moléculas de adhesión en las células endoteliales y fibroblastos orbitarios, lo cual es facilitado por Interleucina I (IL-1- α), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interferón (IFN)- γ e IgG.

Estos hallazgos indican que el blanco del ataque autoinmune en OG son los fibroblastos (6, 7). De éstos, se sabe que tienen dos subpoblaciones fenotípicamente diferentes, la primera puede producir altas cantidades de ácido hialurónico y prostanoides inflamatorios que se localizan sobre todo en el tejido conectivo que rodea a los músculos extraoculares, y la segunda, de fibroblastos preadipocitos, se diferencian en adipocitos maduros y se localizan en el tejido orbitario. Estas diferencias explican la presentación clínica tan diversa en pacientes con OG (1).

Se ha observado que el receptor de TSH (TSHR) se expresa en los fibroblastos preadipocitos estimulados de los pacientes con OG. Todo lo anterior sugiere que los pacientes con OG tienen una adipogénesis aumentada a nivel orbitario y que, secundario a esto, hay una sobre-expresión de TSHR, el cual funge como un autoantígeno (1, 6). Se han implicado sobre todo IL-4 e IL-10 a nivel tiroideo, lo que conlleva una respuesta auto-inmune Th2 hacia TSHR para el desarrollo de la OG (6).

Lo que se sabe hasta el momento es que predomina la respuesta Th1 en fases tempranas de la OT y en fases tardías la respuesta Th2 (6).

La deficiencia de linfocitos T reguladores (Treg), ha sido un factor poco estudiado que se cree tiene un papel primor-

dial en la susceptibilidad para padecer enfermedades autoinmunes como la OT (6). Los estudios hasta ahora realizados al respecto han sido en modelos experimentales y no se conoce el comportamiento celular en humanos con esta patología.

Se ha observado que en enfermedades tiroideas autoinmunes las células supresoras o reguladoras tienen una respuesta disminuida a antígenos irrelevantes pero una respuesta normal a antígenos relevantes. En una persona sana la respuesta es igual con ambos antígenos (7).

Se sabe que las Treg juegan un papel importante en el balance de la respuesta inmune, de tal manera que se mantiene la tolerancia periférica a antígenos múltiples, incluyendo autoantígenos y alérgenos. Se caracterizan por su habilidad para suprimir linfocitos T efectores con fenotipo tanto Th1 como Th2 y por expresar moléculas CD4+CD25+ de superficie y citocinas supresoras como IL-10 (Th1) y TGF- β 1 (Th3). Debido a lo anterior hay evidencia de que las Treg tienen un papel preponderante para el desarrollo de anomalías en la tolerancia periférica como la que hay en enfermedades autoinmunes como la OG. Estos padecimientos se controlan con tratamientos inmunosupresores, los cuales serían mejor utilizados de conocerse los mecanismos por los cuales regulan las Treg (8, 9).

Normalmente los linfocitos T CD4+CD25+ reguladores (Tregs) representan la mayor parte de la población linfocitaria encargada del control de la respuesta autoinmune y la tolerancia inmunológica en general (11). En ratones, la población de células Tregs CD4+CD25+ representan 1 a 10% de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica, en humanos es de menos de 3% (12, 13). Fenotípicamente Treg CD4+CD25+ son Foxp3+ y estas células suprimen la proliferación de las células T CD4+ efectoras (14).

Recientemente se ha propuesto que el desequilibrio entre linfocitos T efectores y reguladores es crucial en la patogénesis de la enfermedad de Graves murina. En humanos se ha reconocido que los linfocitos T CD57+ actúan como células efectoras de memoria (14).

El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de células T efectoras y reguladoras en pacientes con OG en sus diferentes estadios clínicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 10 individuos (2 de sexo masculino, 8 de sexo femenino), edad media 52 años (rango 39-75) diagnosticados con OG. El estadio clínico se determinó de acuerdo con la clasificación VISA y se dividieron en tres grupos: pacientes con OG activa sin tratamiento (AST), pacientes con OG con tratamiento (ACT) y pacientes inactivos (I). Se utilizaron 15 pacientes sanos como controles (3 sexo masculino, 12 sexo femenino), edad promedio 48 años (rango 39-75). Todos los participantes con consentimiento informado. Este estudio fue realizado de acuerdo con las normas de la Declaración

de Helsinki y fue aprobado por el comité de Bioética e Investigación Médica de nuestro instituto.

Anticuerpos monoclonales y reactivos

Se utilizaron anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) IgG contra CD25 así como contra CD57 (FITC) adquiridos en BD PharMingen (San Diego, CA, USA). Además se utilizaron mAbs anti-CD8 y anti-CD4 así como para FOXP3 de e-Biosciences (San Jose, CA, USA). El Lymphoprep (densidad de Ficoll 1.077) se obtuvo de Nycomed Pharma (Nyegaard, Oslo, Norway). Saponina, brefeldina-A y sales fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA).

Células mononucleadas en sangre periférica (PBMCs)

Se diluyó sangre total heparinizada 1:2 (vol/vol) en PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7.2. Se separaron las PBMCs en ficoll por medio de centrifugación a 1700 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, posterior a la cual se separan las células de la interfase lavándose dos veces y contándolas utilizando el hemocitómetro por medio de tinción azul de tripano.

Inmunofluorescencia de marcadores de superficie

Se realizó doble tinción en las PBMC por medio de inmunofluorescencia directa utilizando mAbs PE-Cy5 dirigido hacia CD4 y CD8 así como mAbs FITC contra anti-CD57. En resumen, se suspendieron 2×10^5 células en 20 μ l de PBS con 0.2 % de albúmina bovina sérica y 0.2% de azide de sodio (PBA). Se incubaron con mAb fluorocromo por 30 min a 4°C. Posterior a la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBA, fijadas con formaldehído al 1 % para su análisis con citómetro de flujo.

Inmunofluorescencia de proteínas intracelulares

Las PBMC aisladas fueron lavadas con PBA y teñidas con mAbs PECy5 fluorescente contra CD4 así como mAbs PE contra CD25 por 30 minutos. Posterior a su lavado, las células fueron fijadas con p-formaldehído al 4 % en PBS por 10 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y permeabilizadas con buffer de saponina agitándolas gentilmente por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con mAbs FITC contra FOXP3. Posterior a 30 minutos las células fueron lavadas con PBS, fijadas nuevamente en p-formaldehído al 1% para su análisis con citómetro de flujo.

Análisis de citometría de flujo

Todas las células fueron analizadas adquiriendo 5000 eventos y utilizando Citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) y con software CellQuest Pro. Para analizar la marca de superficie se dibujó una ventana alrededor de la población linfocitaria basada en sus propiedades físicas y una segunda ventana fue dibujada basada en la unión del anticuerpo para CD4 o CD8. Para analizar la tinción intracelular, la fluorescencia negativa o positiva para células FOXP3+ fue determinada manualmente basada en la

distribución de la tinción celular. Los datos fueron presentados como histogramas bidimensionales.

Análisis estadístico

Se utilizaron las pruebas de Kurtosis y Kolmogorov-Smirnov para evaluar si la distribución fue simétrica o asimétrica. Dependiendo de la distribución normal o anormal se usaron las pruebas de T o Wilcoxon (Mann-Whitney) para detectar diferencias significativas.

Para evaluar la correlación entre el coeficiente y las variables analizadas se utilizó el test de Pearson o Spearman. El análisis fue realizado con los softwares Sigma-Stat 3.1^{MR} y el Sigma-Plot 10.0^{MR}. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando la p fue menor de 0.05.

RESULTADOS

Frecuencia de linfocitos en sangre periférica de pacientes con OG

Determinamos el porcentaje de linfocitos en sangre periférica en pacientes con OG. Encontramos que la frecuencia de células T CD4+ fue 1.2 veces más alta en pacientes AST que en pacientes ACT ($p=0.04$), y 1.1 veces más alta en ambos, pacientes inactivos ($p=0.03$) y en sanos ($p=0.01$). En contraste con lo anterior, la frecuencia de células T CD8+ fue 1.3 veces más alta en ambos, pacientes AST ($p=0.04$) y en pacientes ACT ($p=0.04$) que en pacientes inactivos.

Llama la atención que se observó una correlación significativa de células T CD4+ en pacientes AST cuando estuvieron asociados con linfocitos T CD8+ ($r=0.68$, $p=0.02$). No se encontró correlación en linfocitos de pacientes ACT ni en pacientes inactivos o controles sanos (Cuadro 1).

Frecuencia de células efectoras o de memoria (linfocitos T CD57) en sangre periférica de pacientes con OG

Linfocitos CD4. Se encontró que la frecuencia de linfocitos CD57 fue 1.9 veces menor en pacientes inactivos que en los controles sanos y 1.52 veces menor en AST que en sanos. En contraste, la frecuencia fue de 1.22 veces más en ACT que en sanos, 1.26 veces más en AST que en inactivos, 2.35 veces más en ACT que en inactivos y 1.83 veces más en ACT que en AST (Cuadro 1).

Linfocitos CD 8

Se encontró que la frecuencia de linfocitos CD57 fue 2.22 veces mayor en pacientes inactivos que en los controles sanos y 1.55 veces mayor en AST que en sanos. La frecuencia fue de 1.19 veces más en ACT que en sanos, 1.43 veces más en AST que en inactivos, 2.67 veces más en ACT que en inactivos y 1.85 veces más en ACT que en AST (Cuadro 1).

Frecuencia de linfocitos Treg en sangre periférica de pacientes con OG

Se encontró que la frecuencia de células Treg fue 3.48 veces mayor en pacientes inactivos que en los controles sanos y

Cuadro 1

	AST (n = 4)		ACT (n = 3)		I (n = 3)		HC (n = 15)	
	Media ± DS	[median (min-max)]	Media ± DS	[median (min-max)]	Media ± DS	[median (min-max)]	Media ± DS	[median (min-max)]
CD4	42 ± 4.3	[41.9 (36.5-50.1)]	37.8 ± 5.8	[35.9 (29.4-49.6)]	33.8 ± 36.7	[27.1 (18.4-45.4)]	34.4 ± 8.5	[34 (18.7-48)]
CD8	23.4 ± 8.9	[22.3 (7.4-34.7)]	22.3 ± 6.1	[24.9 (12-29.4)]	16.8 ± 6.8	[19.3 (5.5-23.3)]	18.9 ± 9.0	[19.2 (4.1-31.5)]
CD4CD57	3.8 ± 3.3	[2.3 (0-9.2)]	7.1 ± 3.2	[6.3 (1.7-12)]	3.0 ± 3.3	[6.07 (0-6.07)]	5.8 ± 5.3	[4 (1-18.2)]
CD8CD57	24.9 ± 13.2	[26.9 (0-40.5)]	46.3 ± 15.9	[55 (21.3-62)]	17.3 ± 15.6	[16.2 (0-38.5)]	38.6 ± 21.7	[31.16 (7.8-72.3)]
CD4CD25	36.6 ± 26.6	[42.3 (5.3-72.3)]	11 ± 5.6	[9.3 (3.8-20.9)]	18.7 ± 15.4	[13.8 (2-42.4)]	5.4 ± 9.1	[2.4 (0.2-37.2)]
CD25+FOXP3	46.8 ± 37.3	[61.8 (0-87.5)]	55 ± 18.2	[48 (25.9-80)]	61.4 ± 36.9	[65.3 (3.4-100)]	17.6 ± 19.9	[9.1 (0-52.6)]

2.65 veces mayor en AST que en sanos. La frecuencia fue de 3.12 veces más en ACT que en sanos, 1.31 veces más en inactivos que en AST, 1.11 veces más en inactivos que en ACT y 1.17 veces más en ACT que en AST (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

La orbitopatía de Graves representa una reacción órgano-específica en la que existe un desequilibrio inmunológico desencadenado por varios mecanismos. Aunque poco estudiadas en esta patología, se cree que las células Treg tienen un papel crucial en la modulación de la tolerancia inmunológica. Inclusive se ha propuesto que el desequilibrio entre células efectoras y reguladoras pudiera estar relacionado con la severidad en la presentación clínica en la enfermedad de Graves (15).

Independientemente del promedio encontrado de células T CD4 y CD8 en los tres grupos de pacientes, nuestros resultados revelaron un incremento en las células CD4+CD57+ y CD25+FOXP3 en pacientes ACT comparados con los AST, lo cual nos habla de la regulación inmunológica a la que conlleva la utilización de esteroides en este tipo de pacientes. Lo anterior ya fue descrito por Xin Chen y cols. cuyos resultados muestran que la utilización de dexametasona conlleva a una polarización hacia TH2, induce la generación de IL-10 y promueve la función supresora de células Treg CD4+CD25+ (16). Coincidimos con otros autores como Ohki y cols. en que la depleción de CD4+CD 25+ pudiese implicar mayor susceptibilidad a padecer una presentación clínica más severa de OG (15).

De acuerdo con nuestros resultados las células T CD4+CD57+ se elevan en pacientes ACT por lo que es posible que en estos casos su función sea de regulación.

Los linfocitos T CD8+CD57+ pudieran tener una función bimodal dependiendo del microambiente, por ejemplo en pacientes inactivos como efectoras y en pacientes AST como supresoras. En pacientes ACT faltaría determinar si su estado está cambiando de efectoras a supresoras.

Ya se ha comprobado que la depleción de linfocitos CD4+CD25+ favorece la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto así como el incremento en la severidad de éstas (15). Hasta el momento no existen estudios acerca de los niveles de Treg en humanos y su relación con la presentación clínica de OG. Sabemos que el control inmunológico de estos pacientes es impredecible y que los niveles séricos de anticuerpos antitiroideos y otros marcadores son de ayuda aunque no muy específicos. De acuerdo con nuestros resultados, es posible que se pueda predecir el curso clínico de estos pacientes antes y durante el tratamiento, así como identificar fases subclínicas. Es posible que los niveles séricos de Treg pudieran predecir recaídas. Un ejemplo de lo anterior son pacientes con pobre respuesta al tratamiento habitual con esteroide cuyos linfocitos Treg no se elevan.

CONCLUSIONES

Puesto que es posible que la regulación específica en OG sea dependiente de más de un grupo de células T reguladoras, se requerirán estudios funcionales para saber el papel real de este tipo de linfocitos en dicha patología así como establecer si hay o no correlación con anticuerpos antitiroideos.

REFERENCIAS

1. Garrity J A, Van R S. Pathogenesis of Graves Ophthalmopathy: Implications for Prediction, Prevention, and Treatment. *Am J Ophthalmol* 2006; 142:147-153.
2. Pérez Moreiras JV, Coloma Bockos JE, Sánchez P. Orbitopatía Tiroidea (Fisiopatología, Diagnóstico y Tratamiento). *Arch Soc Esp Oftalmol* 2003; 78:407-432.
3. Cockram CS. Mixing modalities: exploring the options for Graves Ophthalmopathy. *Hong Kong Med J* 2005; 11(5).
4. Dolman P, Rootman J. VISA Classification for Graves Orbitopathy. *Opthal Plast Reconstr Surg* 2006; 22(5):319-324.
5. Prabhakar B, Bahn R, Smith T. Current Perspective on the Pathogenesis of Graves' Disease and Ophthalmopathy. *Endocrine Rev* 2003; 24:802-835.
6. Wiersinga & Prummel. Pathogenesis in Grave's Ophthalmopathy-Current Understanding. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 86(2):501-503.
7. Volper R. The Pathogenesis in Grave's Disease. *Endocr Pract* 1995; 1(2):103-115.
8. Karagiannis CH, Akdis M, Holopainen P, Woolley N, Hense G y cols. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1425-1433.
9. Barrat F, Cua D, Boonstra A, Richards D, Crain Ch y cols. In Vitro Generation of Interleukin 10-producing Regulatory CD4+ T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper type 1 (Th1)-and Th2-inducing Cytokines. *J Exp Med* 2002; 195(5) 603-616.
10. Bartanella L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' Ophthalmopathy: Reality and Perspectives. *Endocr Rev* 2000; 21:168-199.
11. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)cd25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001; 31:1247-1254.
12. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naïve CD4 T regs. *J Clin Invest* 2005; 115: 1953-1962.
13. Huelman MT, Stojadinovic A, Storrer CE y cols. Levels of circulating regulatory CD4+CD25+ T cells are decreased in breast cancer patients after vaccination with a HER2/neu peptide (E75) and CM-CSF vaccine. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98:17-29.
14. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 531-562.
15. Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves' Hyperthyroidism with Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in a Mouse Model. *Endocrinology* 2006; 147:2417-2422.
16. Chen X, Murakami T, Oppenheim J, Howard OM. Differential response of murine CD4+ CD25+ and CD4+CD25+ cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* 2004; 34:859-869.