

BIOLOGIA MOLECULAR DE LES MALALTIES REUMÀTIQUES AUTOIMMUNITÀRIES

JAUME PALAU, NÚRIA DURANT, MONTSERRAT BACH I
ESTANISLAU NAVARRO

U.E.I. Biofísica i Biologia Molecular
Institut de Biologia de Barcelona (C.S.I.C.)

Introducció

La idea de que la malaltia és conseqüència del funcionament incorrecte dels propis sistemes que asseguren i permeten les funcions vitals en els éssers vius, té una llarga tradició en el pensament mèdic i ha permès en aquest segle l'aproximació experimental a la fisiologia i als fenòmens patològics que afecten a l'ésser humà. No és la nostra intenció, en aquestes planes que segueixen, la de fer un repàs exhaustiu de totes les malalties que han estat descrites en termes fisiològics o moleculars, i més que això ens agradaria de fer esment de certes malalties reumàtiques de tipus autoimmune en les que la convergència de la Immunologia i de la Biologia Molecular a més d'incrementar els seus propis cossos de coneixements i les tècniques necessàries per a fer més fiables i senzills el diagnòstic i seguiment dels malalts.

De tots és sabut, que les malalties reumàtiques afecten un percentatge important de la població i que els seus costos socials són elevats tant per les despeses assistencials que comporten com per les hores de treball perdudes. Entre les malalties reumàtiques hom hi enclou una sèrie de desordres sistèmics del teixit connectiu caracteritzats per la presència de fenòmens d'autoimmunitat, i que són, entre altres, el Lupus Eritematós disseminat (LED), la connectivopatia mixta (MCTD), l'esclerodermia (Sc1) la polimiositis (PM), etc.

Des que el 1895, Osler el va descriure per primer cop, el Lupus Eritematós disseminat s'ha considerat com el model de malaltia autoimmunitària. Caracteritzat com a malaltia inflamatòria sistèmica crònica, generalment de curs lent però amb exacerbacions i remissions espontànies, poden presentar-se greus complicacions dels sistemes nerviós central i renal que en el cas d'aquestes últimes arriben a causar la mort. És per això que la diagnosi acurada i a temps és important pel correcte desenvolupament del procés terapèutic.

El problema està, però, en que el LED pot presentar tan diverses manifestacions, que el diagnòstic basat tan sols en dades clíniques pot ésser confús. És per això que l'Associació Americana de Reumatisme (ARA) ha promulgat una llista de 14 criteris per a facilitar el diagnòstic, requerint-se que un pacient compleixi 4 o més criteris

per a ser diagnosticat de Lupus. Posteriorment s'han establert nous criteris addicionals que aprofiten el desenvolupament de proves de laboratori més sensibles i específiques, però la diagnosi diferencial del LED, i sobre tot en les etapes més inicials de la malaltia, continua plantejant problemes en la pràctica clínica¹.

Autoimmunitat, el lupus com a malaltia autoimmunitària

Un dels conceptes bàsics de la immunologia, descrit ja els anys 20, era que els animals produeixen anticossos contra agents estranys, com a mecanisme de defensa en front d'agressions externes, però no ho fan contra els seus propis constituents cel·lulars.

En el LED una de les primeres alteracions d'origen immunològic detectades va ser el fenomen de les cèl·lules LE, produïdes per la reacció d'anticossos i complexos de DNA i histones com els que es troben dins del nucli cel·lular. Aquests anticossos (del tipus IgG) reaccionen amb els nuclis de cèl·lules trencades presents al torrent circulatori canviant el grau d'estructuració del material nuclear. Els complexos immunes així formats poden ser posteriorment fagocitats per leucòcits per tal d'originar una cèl·lula amb una gran inclusió de color característic dita cèl·lula LE.

En el sèrum de pacients de LED s'han anat trobant anticossos que presenten altres activitats (vegeu taula I) i que permeten definir i classificar subgrups de malalts amb diferents pronòstics. Així, la presència d'anticossos contra ADN natiu quasi sempre indica la severitat de pronòstic i una alta probabilitat de patir problemes renaals, mentre que entre aquells pacients que presenten anticossos contra l'antigen nuclear dit RNP és notable la manca de patologia renal significativa².

D'altra banda, l'origen d'aquests autoanticossos és encara desconegut. La teoria de la selecció clonal postulada per en Burnet el 1949 no permetria explicar les observacions realitzades a partir d'experiments d'inducció d'autoimmunitat i la detecció, en persones normals, de petites quantitats d'anticossos circulants dirigits

TAULA I. *Autoanticossos trobats en malalts de LED. Es clasifiquen per l'antigen reconegut (1) i (2)*
ANTIGENS

Citoplasmàtics	Nuclears	Àcids nucleics
Ribosoms	Histones	DNA natiu o cadena doble (DNAs)
Mitocondris	Antigen RNP	DNA desnaturalitzat (DNAss)
Lisosoms	Antigen SM	o cadena senzilla
Antigen SS-A	Deoxirribonucleoproteïnes (DNP)	RNA ds
Antigen SS-B		RNA ss
		Oligonucleòtids
Cèl·lules	Altres antigens	
Linfòcits	Factors reumatoides	
Eritròcits	Anticoagulants circulants	
Neurotròfics		
Plaquetes		

contra molècules del propi organisme. Els coneixements que s'han anat adquirint posteriorment sobre la complexa trama cel·lular que regula la resposta immune han portat a plantejar el problema en termes d'una disfunció dels limfòcits T (reguladors) que portaria a l'activació d'una reduïda població de limfòcits B (els productors d'anticossos)⁴. No obstant això, l'estímul original que porta cap a la producció d'autoanticossos, sigui o no mitjançant un desajust en l'equilibri limfocitari, roman desconegut i s'han proposat diverses hipòtesis que implicarien des de factors genètics fins a influències virals, modificació d'antigens amb reactivitat creuada, administració de drogues, etc. Probablement, però, la producció d'anticossos dependria de diversos d'aquests factors més que d'un sol i el problema principal, el de si aquest estímul original resulta d'una presentació poc usual d'un antígen nuclear o és tan sols una alteració del mateix sistema immunitari, roman sense solució.

Possibles causes de l'aparició d'autoanticossos

1. Administració de drogues

La producció d'autoanticossos antinuclears i el desenvolupament d'una síndrome similar al LED és relativament freqüent en pacients tractats amb procainamida, hidralazina, isoniàcida i clorpromacina. Entre els mecanismes per als que aquestes drogues, o els seus metabòlits, poden induir autorreactivitat podem citar els següents:

- Per unió a una macromolècula. Funcionant com haptè, reaccionarien de manera creuada amb antígens nuclears. Encara que químicament la hidralazina és molt semblant a les bases púriques i s'ha demostrat la reactivitat creuada d'anticossos anti-adenilat amb la hidralazina, i d'anticossos anti-hidralazine, amb el DNA desnaturalitzat⁵, roman la dificultat d'explicar la reacció contra el DNA natiu (en el que les bases no estan exposades) i contra les histones.

- Per unió a una molècula nuclear i posterior transformació d'aquesta en immunogènica.

- Causant l'alliberament de continguts cel·lulars en forma immunogènica.

- Estimulant directament els limfòcits B.

- Eliminant poblacions de cèl·lules supressores i deixant així limfòcits B derregulats i lliures per a produir productes autoreactius.

2. Infeccions virals

Les infeccions virals poden induir la formació d'autoanticossos per associació d'antígens virals i autoantígens, formant noves unitats immunogèniques, o bé per l'estímul de la proliferació i producció d'anticossos per les cèl·lules B tal i com s'ha demostrat per alguns virus com el d'Epstein Barr. Es coneix, a més, que pot haver-hi un intercanvi d'antígens entre el virus i el seu hoste de forma que lípids de membrana es poden incorporar a les càpsides de certs virus, i antígens vírics aparèixer en les cèl·lules de l'hoste. Els treballs de Strand i August¹⁹ varen permetre demostrar la presència de proteïnes de la càpsida (les p30 i p70) dels virus tipus C en pacients de LED, i posteriorment s'ha demostrat la presència d'antígens tipus C en diversos teixits (placenta, ronyó, melsa) de pacients de LED.

3. *Degradació i accessibilitat d'autoantigens*

El dany cel·lular podria tenir un important paper en els processos autoimmunes en presentar antigens, o determinants antigènics normalment amagats, als limfòcits T i B. Seria el cas de la mielina en l'encefalomielitis autoimmune o de diversos components dels espermatozous després de vasectomies repetides.

4. *Factors genètics*³

La influència dels factors genètics en diverses malalties autoimmunes s'ha estudiat a diferents nivells:

a) Estudis epidemiològics. El LED és més freqüent en les dones que en els homes, la qual cosa sembla suggerir una influència de factors hormonals. En estudis fets als E.U.A. la incidència era més gran en individus de raça negra que de raça blanca i en zones rurals més que en zones urbanes. La incidència del LED entre els familiars de primer ordre dels malalts és molt superior a la incidència dins de la població total, però un altre cop sembla que els factors ambientals tenen quelcom a veure donat que s'ha demostrat també una alta incidència de la malaltia entre individus no consanguinis però que conviuen amb els malalts.

b) Estudis de la predisposició associada a deficiències en la resposta immune. Els estudis realitzats per correlacionar determinades deficiències en distints components de la resposta immune amb la predisposició a patir LED, demostren una elevada incidència de la manca d'IgA. El fet de què els anticossos antinuclears apareixen freqüentment entre individus deficients en IgA és una altra evidència en favor del paper d'aquesta manca d'IgA com a factor de predisposició a patir LED.

c) Estudis de la predisposició associada als antigens d'histocompatibilitat. S'ha demostrat que certes malalties, l'Espondiliti com exemple, estan fortament correlacionades amb la presència de l'antigen d'histocompatibilitat B27. Altres estudis realitzats amb pacients de LED indiquen que si hi ha associacions, aquestes són febles i majoritàriament amb els antigens de la sèrie HLA. D'altre banda, s'han fet diversos estudis per a determinar la presència d'associacions amb determinats factors immunològics i s'ha pogut correlacionar la presència d'anticossos anti DNA amb els antigens DR3 i DR7, la presència d'anticossos anti-Sm amb el antigen DR7, etc. La diversitat de marcadors genètics associats a diferents característiques clíniques i immunològiques sembla suggerir que la combinació de diversos gens podria ser responsable d'aquestes malalties.

Anticossos anti-DNA i glomerulonefritis

Posteriorment al descobriment del fenomen de la cèl·lula LE s'ha detectat una gran varietat d'autoanticossos, alguns d'ells presentant una distribució selectiva en diverses malalties i considerats com d'utilitat en el diagnòstic i pronòstic. Els anticossos contra el DNA han resultat ser els més específics del LED trobant-se uns nivells alts en pacients amb la forma activa de la malaltia. És tal la seva importància i utilitat, que actualment la seva presència s'accepta com un dels criteris de diagnòstic per l'A.R.A., encara que no siguin un grup homogeni i que se'ls classifiqui en 4 subgrups segons l'estructura antigènica que reconeixen:

1. Anticossos reactius contra les bases nitrogenades i que reconeixen sols el

DNA desnaturalitzat i les regions de cadena senzilla que es puguin trobar en el DNA natiu. És possible induir experimentalment l'aparició d'aquests anticossos immunitzant animals amb DNA desnaturalitzat acomplexat amb albúmina sèrica metilada o amb conjugats de nucleòsids o nucleòtids amb proteïnes. La unió d'aquests anticossos a l'antigen és inhibida «in vitro» per la presència de oligonucleòtids, pentanucleòtids o hexanucleòtids, grandària que semblaria correspondre al d'un determinant antigènic⁶.

2. Anticossos reactius contra la cadena sucre-fosfat, i que reconeixen tant l'ADN natiu com el desnaturalitzat. Alguns d'ells donarien reacció creuada amb els grups fosfodièster de les cardiolipines⁷.

3. Anticossos reactius contra l'estructura helicoidal normal del DNA, que reconeixen específicament fragments de DNA natiu d'una grandària mínima d'uns 20 parells de bases i regions estructurades en el DNA desnaturalitzat⁸. La grandària d'aquests fragments, més gran que el descrit anteriorment com a determinant antigènic, és requerit per a estabilitzar l'estructura helicoidal reconeguda pels anticossos⁶.

A més, l'existència d'anticossos contra el DNA de doble cadena en el sèrum de malalts de LED planteja el problema del seu origen, donat que el DNA natiu pur no és immunogen i únicament DNAds modificats químicament poden induir la síntesi d'anticossos en animals experimentals, però amb l'antigenicitat restringida a les estructures modificades⁵.

4. Anticossos reactius contra la conformació levògira del DNAds (la dita forma «Z»). Aquests anticossos recentment descrits⁹ es poden classificar en dos grups, aquells que reaccionen amb el DNAz i el DNA desnaturalitzat alhora, i que semblarien reconèixer les bases nitrogenades exposades al medi degut a l'especial conformació que adopta la superfície de l'hèlix-Z, i aquells específics del DNAz i que reconixerien un determinant antigènic en el que la conformació de la cadena sucre-fosfat tindria un paper fonamental⁹.

La importància dels anticossos antiDNA no està sols en què siguin els més específics del LED, es puguin utilitzar per detectar «in vivo» zones de DNAz o com a sondes per a detectar canvis conformacionals del DNA. Clínicament tenen gran importància en el desenvolupament de les glomerulonefritis per immunocomplexes, una de les greus complicacions que poden afectar els malalts de LED i que estan causades pel dipòsit de complexos compostos per DNA i anticossos anti-DNA sobre la membrana basal glomerular. El mecanisme és encara desconegut, però sembla ser que la fixació del complement per part dels complexos antigen-anticòs és un pas fonamental en la patologia inflamatòria. Així, en sèrum de malalts de LED s'han trobat nivells baixos de varis dels components del sistema del complement, altres components, concretament el C1q, el C3 i el C4, s'han identificat en les lesions renals i s'ha demostrat també la major incidència d'anticossos antinuclears amb capacitat fixadora del complement en pacients amb nefritis activa que en pacients amb altres formes de LED o altres malalties associades amb anticossos antinuclears⁹.

Pel que fa a la composició, els treballs de Sano i col., Morimoto¹⁰ sobre la part antigènica han permès determinar que el DNA aïllat dels immunocomplexes circulants no és homogeni, i es pot classificar en tres grups depenent de la seva grandària:

1. Fragments de DNA d'uns 30-40 parells de bases i una composició del 55 % de parells guanina-citosina (la composició mitjana del genoma humà és del 38 % de parells G-C).

2. Fragments de DNA d'uns 150-200 parells de bases i una composició del 45 % de parells guanina citosina.

3. Fragments de DNA d'uns 300 parells de bases.

Els mateixos autors han demostrat que la severitat de la malaltia es pot relacionar amb la quantitat de DNA present en els immunocomplexos, que en els casos més greus pot arribar als 400 ng/ml de sèrum, i que les variacions en la quantitat de DNA present en els immunocomplexos circulants es pot correlacionar també, al menys en els casos estudiats, amb l'evolució clínica del pacient.

L'origen (víric, bacterià o de les pròpies cèl·lules del pacient) d'aquest DNA lligat a immunocomplexos circulants no es coneix i tan sols s'ha especulat en la seva possible conformació levògira o «Z» basat en el relatiu enriquiment en parells G-C. La hipòtesi no deixa de ser atractiva ja que aquesta conformació és immunogènica, a l'igual que els DNA vírics amb bases modificades i al contrari que el DNA natiu.

D'altre banda, tampoc no es coneixen els efectes que les característiques físiques de l'antigen (mida, composició de bases, conformació) tenen sobre la gènesi i estabilitat dels complexos i la seva capacitat patogènica. Al mateix temps, el fet de que les manifestacions clíniques puguin dependre del tamany dels complexos¹¹ i del tipus d'immunoglobulines que l'integren (IgG o IgN)¹² introdueix nous graus de complexitat al problema.

El sistema RNP i SM

Fins ara hem presentat algunes dades ja conegudes sobre les malalties reumàtiques autoimmunes, sobre tot del LED que hem considerat com a model de les mateixes. Podria semblar que el que les fa dignes d'estudi és l'arribar a esbrinar el seu origen, la causa de l'aparició dels autoanticossos i el paper que poden jugar en la variada simptomatologia que breument hem descrit. Això, però, no és cert del tot, i no ho és perquè el biòleg molecular ha trobat en aquests autoanticossos una eina fonamental per a estudiar alguns dels processos de regulació de l'expressió genètica.

Així, en el sèrum de malalts de LED i connectivopatia mixta es troben anticossos que reaccionen específicament contra els antigens dits RNP i Sm. Mentre que els anticossos anti-Sm són marcadors bastant específics de LED, els que reaccionen contra el RNP apareixen en les dues i, menys freqüentment, en altres malalties reumàtiques².

Els antigens RNP i Sm són en realitat complexos ribonucleoproteics nuclears (Small nuclear RNP particles o snRNP) compostats per un RNA de mida petita i el seu complement proteic. S'en coneixen 6 d'aquests RNA (dits «U» pel seu enriquiment relatiu en uridina) que defineixen sis partícules diferents, d'elles, cinc són reconegudes pels anticossos anti-Sm (les U1/U2/U4/U5/U6 RNP) mentre que els anticossos anti-RNP sols reconeixen la U1-RNP. La U3-RNP es troba al nucliòl, a diferència de la resta de les U-RNP que són nuclears, i no és reconegut per cap dels dos anticossos.

Els U-RNA són de mida petita, entre 90 i 400 nucleòtids, d'una vida mitjana equivalent a un cicle cel·lular, sintetitzats per l'RNA polimerasa II, conservats al llarg de l'evolució i el seu extrem 5' és modificat a el que s'en diu CAP¹³. El seu complement proteic el componen, en el cas de l'U1-RNP, nou polipèptids de diferent pes molecular entre els quals hom hi troba de comuns amb els altres U-RNP i d'específics del dit U1-RNP, mentre que un altre polipèptid es troba tan sols en els U2-U6 RNP¹⁴. De

tots aquests polipèptids, solament alguns són antigènics, cas del 69,8 Kd, reconegut per sèrums anti-RNP, i dels de 29,7, 28,8, 14,8 i 11 Kd reconeguts per sèrums anti-Sm¹⁵.

Respecte a la funció d'aquestes partícules, dues són les teories més acceptades. En primer lloc, la que els dona un paper en el processament («splicing») dels precursors del RNAm, concretament en l'excisió dels fragments no traduïbles o introns. La complementaritat entre seqüències-senyal de l'intró i l'U1-RNP, el fet de què el processament de RNA d'adenovirus en el nucli de cèl·lules HeLa no té lloc quan els nuclis són preincubats amb sèrums anti-RNP o anti-Sm¹⁶, així com la demostració de què U1-RNP purificats poden unir-se a RNA sintètics amb seqüències corresponents a un intró del gen de la β -globina i protegir una regió curta que enclou la zona de tall 5'¹⁷ són evidències al seu favor. L'altre paper que s'els ha assignat és el d'elements d'unió de precursors del RNAm a la bastida del nucli (matriu nuclear) per a transportar-los al lloc del seu processament, i es basa en estudis de microscopia electrònica que demostren la presència dels snRNP en partícules denses lligades a la matriu nuclear i als precursors de RNAm¹³. La cita recent¹⁸ de la coexistència, en el sèrum de malalts de MCTD, d'anticossos reactius contra dues espècies de ribonucleoproteïnes nuclears: els snRNP i una partícula d'alt pes molecular lligada a la matriu nuclear pot ser el lligam d'ambdues teories.

D'altre banda, i ja per acabar, resta dir que és desconegut l'efecte que els autoanticossos que hem descrit, i d'altres que no hem tractat, puguin tenir «in vivo» sobre els mecanismes cel·lulars citats, i sobre la sintomatologia que acompanya aquestes malalties.

Bibliografia

1. ROBERTS, J.L. *Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus and Lupus nephritis*. Contr. Nephrol. 35: 150-169, Karger Ed. Basel, 1983.
2. WEISS, R.A., MOGAVERO, H.S., SYNKOWSKI, D.R., PROVOŠT, T.T. *Annals of Allergy*. 51: 135-146, 1983.
3. N. TALAL Ed. *Autoimmunity*. Academic Press Inc. New York, 1977.
4. SCHWARTZ, R.S. *Immunol. today*. 4: 68-69, 1983.
5. STOLLAR, B.D. *Arthritis and Rheumatism*. 24: 1010-1018, 1981.
6. PAPALIAN, M., LAFER, E., WONG, R., STOLLAR, B.D. *J. Clin. Invest.* 65: 469-477, 1980.
7. LAFER, E.M., RAUCH, J., ANDRZEJEWSKI, C., MUDD, D., FURIE, B., SCHWARTZ, R.S., STOLLAR, B.D. *J. Exp. Med.* 153: 897-909, 1981.
8. STOLLAR, B.D., PAPALIAN, M. *J. Clin. Invest.* 66: 210-219, 1980.
9. COCHRANE, C.G., KOEFFLER, D. *Adv. Immunol.* 16: 185-264, 1973.
10. MORIMOTO, C., SANO, H., ABE, T., HOMMA, M., STEINBERG, A. *J. of Immunol.* 139: 1960-1965, 1982.
11. TUNG, K.S.K., DE HORATIUS, R.J., WILLIAMS, R.C. *Clin. Exp. Immunol.* 43:615-625, 1981.
12. ADU D., DOBSON, J., WILLIAM, D.G. *Clin. Exp. Immunol.* 43: 605-614, 1981.
13. BUSCH, H., REDDY, R., HENNING, D., SPECTOR, D., EPSTEIN, P., DOMAE, N., LIU, M., CHIRALA, S., SCHRIER, W., ROTHBLUM, L. *UCLA Symp. on mol. and cell. biol.* 26: 167-187, 1982.
14. INTERBERGER, M., PETTERSON, I., STEITZ, J.A. *J. Biol. Chem.* 258: 2604-2613, 1983.
15. DURAN, N., BACH, M., PUIGDOMÈNECH, P., PALAU, J. *Mol. Immunol.* 21: 731-739, 1984.
16. MURRAY, V., HOLLIDAY, R. *FEBS lett.* 106: 6-7, 1979.

17. MOUNT, S.M., PETTERSON, I., HINTERBERGER, M., KARMAS, A., STEITZ, J.A. Cell 33: 509-518, 1983.
18. FRITZLER, M.J., ALI, R., TAN, E.M. J. of Immunol. 132: 1216-1222, 1984.
19. STRAND M., LILLY, F., AUGUST, J.T. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 39: 1117-1122.