

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO INMUNOGENETICO E INMUNOHISTOQUIMICO
DE LA ARTERITIS DE HORTON

Tesis presentada por
M. CINTA CID XUTGLA
para acceder al grado
de Doctor.

BARCELONA 1989

II.- ESTUDIO IMMUNOGENETICO.

Al igual que en la mayor parte de trabajos previos (28, 49, 84, 317, 343, 401, 498, 569), no pudimos demostrar una asociación significativa con ninguno de los antígenos de clase I testados.

En cuanto a los antígenos de clase II, nuestros resultados confirman la asociación de la AH con el antígeno DR4 descrita en trabajos previos (25, 38, 58, 96, 268, 384, 498) en una serie amplia y homogénea de pacientes con demostración histológica de la enfermedad. Nuestra serie es la más amplia publicada a excepción de la de Barrier y Bignon (38, 58) que reúne 88 enfermos estudiados en dos tiempos y publicados separadamente con un intervalo de 3 años. En la actualidad, la asociación de la AH con el antígeno DR4, no está todavía oficialmente reconocida puesto que no ha sido considerada en ningún workshop de histocompatibilidad ni recogida en la recopilación de Tiwari y Terasaki de las enfermedades asociadas al SMH (579). Por este motivo, la aportación de una serie numerosa es ya de por sí una contribución importante al estudio de la relación de la AH con el sistema HLA. Nuestro trabajo es asimismo el primero realizado en nuestro país y junto al de Barrier y Bignon (38, 58) los únicos reali-

zados en países mediterráneos. Dado que el antígeno o antígenos a los que se asocian las distintas enfermedades varían según las etnias (579), nuestro trabajo es también importante en este aspecto.

El hallazgo más interesante de este estudio se obtiene, no obstante, al valorar los datos clínicos y observar que el antígeno DR4 se relaciona principalmente con la presencia de PMR. En efecto, la prevalencia de DR4 entre los enfermos con PMR es en nuestra serie del 58'8%, significativamente superior a la de los pacientes sin PMR (19%) ($p < 0'005$) que no difiere de la población control (20%). Este hecho no ha sido remarcado en trabajos previos. Sin embargo, el examen detenido de las series previamente publicadas revela datos acordes con nuestros resultados. El incremento en la frecuencia de DR4 lo obtienen tanto los autores que estudian series homogéneas de pacientes con AH demostrada por biopsia (38, 58, 268) como los que trabajan sobre pacientes con PMR sin sospecha clínica o evidencia histológica de AH (26) o en series mixtas (25, 96, 384). Este hecho sugiere que el antígeno DR4 se asocia al nexo común entre todos ellos: la presencia de PMR. Por otro lado, en las series mixtas compuestas por pacientes con PMR aislada y pacientes con AH donde se valoran separadamente ambos grupos de pa-

cientes, la prevalencia de DR4 es superior en los enfermos con PMR aislada que en los pacientes con AH que incluyen individuos con y sin PMR (25, 96). Existe también un dato epidemiológico interesante que apoya nuestros resultados: la AH es rara en la población de raza negra (33, 168, 246, 349) pero, además, aquellos individuos que desarrollan la enfermedad, de modo infrecuente sufren PMR. Sólo 12-20% de los negros con AH tienen PMR (383) en comparación con el 40-60% observado en la raza blanca (48, 245, 282, 320). Este hecho coincide con la baja prevalencia de DR4 en los individuos de raza negra (383).

Durante el proceso de publicación de nuestro trabajo (118), Richardson et al (498) publicaron idénticas conclusiones extraídas a partir del estudio de una serie de 43 casos. Estos autores realizan además un análisis conjunto de las series previamente publicadas (25, 58, 96, 269, 384) y concluyen, efectivamente, que la asociación de la AH con el antígeno DR4 es altamente significativa y que tal asociación se debe, realmente, a la presencia de PMR. Estos hallazgos pueden contribuir a una mejor comprensión de las debatidas relaciones entre la PMR y la AH. Entre los pacientes con AH, únicamente aquellos genéticamente predispuestos desarrollarán PMR.

La asociación con DR4 parece ser más estrecha en aquellos pacientes con mayor dolor y limitación funcional donde la PMR constituye la manifestación clínica fundamental que en aquellos pacientes con síntomas moderados donde la PMR es un aspecto menor frente al protagonismo de los síntomas craneales. En la AH y la PMR parecen existir 2 grupos evolutivos distintos: aproximadamente el 50% de los pacientes quedan definitivamente en remisión tras un período de tratamiento de alrededor de 2 años. El resto requiere un tratamiento durante mucho más tiempo, quizá indefinidamente (46, 49, 116, 621). Dentro de nuestro grupo de pacientes de larga evolución, DR4 fue más frecuente entre los pacientes que todavía recibían tratamiento a los 3 años del diagnóstico respecto a los que ya no lo precisaban, pero la diferencia no fue significativa. No podemos, sin embargo, excluir la relación entre DR4 y los requerimientos terapéuticos a largo plazo puesto que nuestro grupo de enfermos de larga evolución es reducido y, al proceder de distintos centros, no existió un criterio unánime a la hora de decidir el momento adecuado para retirar el tratamiento.

La prevalencia del antígeno DR4 en los pacientes con PMR, cercana al 60% tanto en nuestra serie como en otras (26, 498), su relación con la severidad del pro-

ceso y la asociación negativa con el antígeno DR2 configuran unas características inmunogenéticas similares a las propias de la artritis reumatoide (AR) (115, 451 bis, 579 bis, 617 bis, 629 bis). Efectivamente, desde los trabajos iniciales de Stastny (553 bis), la asociación de la AR con el antígeno DR4 es un hecho reiteradamente comprobado en distintas poblaciones (115, 404, 451 bis, 579 bis, 617 bis, 629 bis), a excepción de algunas etnias donde se asocia preferentemente con el antígeno DR1 (404, 525 bis, 626 bis). La prevalencia de DR4 entre los pacientes con AR oscila entre el 47 y el 77% según los trabajos (404, 451 bis, 553 bis, 579 bis, 629 bis). Aunque no comprobado por todos los autores (318 bis, 617 bis), muchos constatan una relación entre la presencia de DR4 y la severidad de las lesiones articulares (417 bis, 501 bis, 579 bis, 617 bis). Al mismo tiempo en la AR se observa una disminución en la prevalencia de DR2 a la vez que una evolución más benigna en los pacientes portadores de este antígeno (451 bis, 629 bis). Resulta interesante comprobar la similitud inmunogenética existente entre la AR y la PMR dado que estas enfermedades poseen rasgos comunes. Según se describe en la AR (517) y según se desprende de nuestro estudio, ambos procesos son más frecuentes en el sexo femenino. Aunque más leve en la PMR, ambos tienen un substrato morfológico común (sino-

vitis). Aunque la distribución de las articulaciones afectadas es distinta para los prototipos de ambos procesos, en la AR con frecuencia se afectan las articulaciones proximales especialmente en la AR de inicio tardío (287) y la PMR puede acompañarse de sinovitis periférica con afección incluso de pequeñas articulaciones (116, 267, 287). La PMR, aunque en aproximadamente la mitad de los casos remite de manera definitiva en un plazo de alrededor de 1-3 años, en el resto de pacientes sigue un curso crónico con recidivas tardías y requerimientos terapéuticos indefinidos (46, 116), llegando incluso a originar erosiones articulares (5, 116, 450). La AR, especialmente en su forma de inicio tardío, puede empezar con un cuadro clínico indistinguible de la PMR (287, 502). A su vez, en el curso evolutivo de la PMR, entre un 6-17'7% de pacientes acaban cumpliendo criterios de la ARA para el diagnóstico de AR definida en un plazo de 3-5 años (5, 116, 286). La PMR, como ya sugerían algunos autores en las primeras descripciones de la enfermedad (30) podría ser una forma especial de AR de inicio tardío como Healey ha señalado repetidamente en los últimos años (280, 285, 286, 287). Este autor considera que clínica y evolutivamente la PMR es indistinguible de la mayor parte de enfermos con AR seronegativa de inicio en la edad avanzada (280, 287). La similitud inmunogenética

entre la PMR y la AR fue señalada ya por Armstrong en 1984 (26) en un conjunto de pacientes con PMR aislada donde obtuvo un RR para DR4 similar a un grupo de enfermos con AR. La posible objeción a su trabajo de que quizá parte de sus enfermos con PMR fueran en realidad portadores de una AR inicial, queda obviada en nuestro trabajo, al partir de una serie de pacientes cuya enfermedad fundamental es una AH histológicamente demostrada.

Aunque sin llegar a ser significativa, obtuvimos una prevalencia superior de DR1 en los pacientes con PMR respecto al resto de enfermos. En la AR existe un aumento de DR1 en los pacientes DR4 negativos, especialmente en aquellas etnias donde la enfermedad no se asocia significativamente a DR4 (115, 258 bis, 259 bis 404, 525 bis, 626 bis). Ante este hecho se ha postulado que las moléculas DR1 y DR4 tendrían epítomos comunes con cuya función biológica se relacionaría la predisposición a la enfermedad (258 bis). De hecho se han descrito algunas especificidades que reaccionan con DR1 y DR4 (180 bis, 367 bis). La prevalencia de alguna de estas especificidades en la AR es muy superior a la de DR4 (180 bis). En nuestra serie, no observamos diferencias significativas en la prevalencia de DR1 en los pacientes DR4 negativos con PMR respecto a los pacien-

tes sin FMR o en relación a la población control DR4 negativa.

A diferencia de otras vasculitis como la panarteritis nodosa donde es común la detección de FR (148) este hecho es infrecuente en la AH tanto en ausencia como en presencia de PMR (48, 282, 542, 621). Su detección en la PMR aislada es motivo de exclusión según algunos de los criterios diagnósticos propuestos (114, 285, 450). Cuando en el curso de la PMR o de la AH se van cumpliendo criterios de AR, la seronegatividad sigue siendo la regla (238). La incidencia de AR seropositiva en estos pacientes no es superior a la esperada por azar en un grupo de individuos de edad avanzada. En concordancia con estos datos, sólo en el 24% de nuestros pacientes se detectó la presencia de FR y únicamente en un 5% alcanzó títulos significativos. Esta frecuencia es la descrita en la población senil normal. La presencia de FR en nuestros pacientes se halla probablemente más en relación con el proceso de inmunosenescencia (155, 215, 557) que con la existencia de la enfermedad. Otros autores han relacionado la seropositividad en la AR con la presencia del antígeno DR4 (514, 589). Este hecho no ha sido constatado por otros autores (579 bis) que creen que DR4 y FR se asocian de manera independiente a formas más severas de la

enfermedad y, por tanto, coinciden en las formas clásicas de AR, que suelen constituir los colectivos en estudio. En los pacientes estudiados no observamos ninguna relación entre la existencia de DR4 y la presencia de FR.

En nuestra serie observamos asimismo un incremento en la frecuencia de DRw53 en los enfermos con PMR respecto a los pacientes sin PMR aunque no alcanzó significación estadística. Este hecho probablemente se halla en relación con el incremento de DR4 puesto que ambos antígenos se hallan en desequilibrio de asociación (296 bis, 402).

También hemos podido constatar una disminución significativa del antígeno DQ2 en la serie global y en ambos grupos de pacientes. Los antígenos correspondientes al locus DQ son de caracterización serológica relativamente reciente (296 bis). Su prevalencia en enfermos con AH se ha estudiado únicamente en dos trabajos previos donde sólo se han testado los antígenos DQ1 y DQ3. Hansen et al (268) observan una disminución de DQ1 y Richardson (498) no halla desviaciones significativas respecto al grupo control. El análisis del desequilibrio de asociación en nuestra serie demuestra un desequilibrio de asociación negativo significativo

entre el antígeno DR4 y el antígeno DQ. Creemos, pues, que la disminución en la frecuencia de DQ2 observada obedece al incremento en la frecuencia de DR4.

Hemos observado, asimismo, un incremento en la frecuencia de DR3 como refieren Lowenstein et al (384) pero al igual que describen Hansen et al (268) no llegó a ser significativo. Asimismo hemos objetivado un aumento significativo en la frecuencia de heterocigotos DR3-DR4, especialmente en el grupo de pacientes con PMR. El incremento de heterocigotos DR3-DR4 ha sido referido únicamente por Lowenstein et al (384) en una serie mixta que incluye numerosos pacientes con PMR. No obstante, en las series donde se han estudiado los antígenos de clase I, los referidos con mayor asiduidad como más frecuentes son el B8 (278, 511) y el Cw3 (25, 268), en desequilibrio de asociación con DR3 y DR4 respectivamente. Este hecho refleja probablemente el incremento de DR3 y DR4 en estos pacientes. Un aumento en la frecuencia de heterocigotos DR3-DR4 se ha descrito en algunas enfermedades, especialmente la diabetes mellitus juvenil donde los portadores de DR3, DR4 o ambos, constituyen el 90% de los casos (296 bis, 579).

Al intervenir directamente en la regulación de la respuesta inmune, los antígenos de clase II se hallan

probablemente implicados de manera directa en el desarrollo de las enfermedades de base autoinmune asociadas al SMH. Los mecanismos precisos mediante los cuales esto sucede no son bien conocidos. La configuración espacial que adoptan las moléculas de clase II a nivel de la membrana celular parece ser de capital importancia (258 bis). Pequeñas diferencias en la configuración de una molécula, con una misma reactividad serológica, condicionan distintos patrones de respuesta en cultivo linfocitario mixto (258 bis). Contrariamente distintas especificidades definidas serológicamente que tienen en común algunos epitotos críticos, tienen el mismo comportamiento biológico y el mismo papel en la predisposición a determinadas enfermedades (258 bis). DR3 y DR4 se hallan en fuerte desequilibrio de asociación con DQ2 y DQ3 respectivamente. Ambas cadenas α y β de las moléculas DQ son polimórficas. La formación de moléculas DQ híbridas fruto de la combinación de cadenas α y β de DQ2 y DQ3 podría tener un papel importante en la alteración de los mecanismos inmunorreguladores que conducen a la aparición de determinadas enfermedades (581, 582). DR3 y DR4 parecen tener un papel inmunorregulador distinto sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T frente al virus de la parotiditis y virus Coxackie (90). Este hecho podría ser importante en la patogénesis de la diabetes melli-

tus juvenil, donde la infección por estos virus con tropismo pancreático podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. El papel de las infecciones víricas como desencadenantes de la AH y la PMR se ha postulado repetidamente en base a los pequeños brotes de predominio estacional observados por algunos autores (62) y a la aparición de la enfermedad en varios familiares no consanguíneos (42, 227 bis).

Estudios realizados en la AR demuestran una asociación preferente de la enfermedad con determinados haplotipos que contienen DR4 sugiriendo que otros genes situados en su proximidad pueden tener también importancia patogenética. De los haplotipos posibles que incluyen el antígeno DR4, B8-DR4, B62-DR4 y B60-DR4 son significativamente más frecuentes entre los pacientes con AR que en la población general (115). El análisis del desequilibrio de asociación entre DR4 y antígenos de los loci B y DQ en nuestros pacientes demostró únicamente una débil asociación con el antígeno B62 sin alcanzar significación estadística. Existía desequilibrio de asociación entre DR4 y DRw53 como ocurre en la población general y un desequilibrio de asociación negativo con DQ2 que explica probablemente la disminución de DQ2 objetivada en nuestros pacientes. No pudimos, pues, demostrar que la asociación de la AH con

el antígeno DR4 ocurriera de manera preferente a través de ningún haplotipo determinado.

Las enfermedades asociadas a DR3, entre ellas el lupus eritematoso sistémico y la diabetes mellitus insulino dependiente se caracterizan por una producción anómala de autoanticuerpos (202). Con frecuencia se detecta también en ellas la presencia de CIC, a la que parece contribuir, al menos parcialmente, una ineficacia de la función Fc del sistema mononuclear fagocítico (148). Estas anomalías se han detectado incluso en portadores sanos del antígeno DR3 (365). El papel del depósito de CIC y consiguiente activación del complemento en la patogenia de las lesiones vasculares de la AH se ha defendido con asiduidad (194, 454) por analogía con otras vasculitis donde su importancia patogénica parece fuera de duda (8, 124, 148, 201). Esta convicción ha motivado a distintos autores a estudiar la presencia de CIC en los pacientes con AH, con resultados ampliamente discordantes debido tanto a la heterogeneidad de la población estudiada (series mixtas de AH y PMR aislada) como de las técnicas empleadas. En nuestra serie pudimos detectar la presencia de CIC en un 21% de los pacientes sin ninguna correlación con la actividad de la enfermedad. Nuestros resultados se hallan en una situación intermedia entre los autores

que no detectan CIC en cantidad apreciable (49, 489) y aquellos que los detectan entre un 44-90% de los casos en correlación estrecha con la actividad de la enfermedad (194, 454, 459). Park y Jones 1981 (459) obtienen mediante la técnica de unión a la conglutinina, utilizada en nuestro estudio, una sensibilidad inferior a otros procedimientos, probablemente porque la conglutinina tiene especificidad únicamente para ciertos fragmentos C3 (190). En cualquier caso la detección de CIC no implica un papel patogénico en el desarrollo de la enfermedad donde se estudian. Concretamente en la AH que raramente (si nunca) afecta la piel y el riñón, órganos preferentemente lesionados en las enfermedades por depósito de CIC (123, 124, 148) y donde la necrosis fibrinoide y el infiltrado por polimorfonucleares típicos de estos procesos no son hallazgos habituales (16, 392), la patogenia por depósito de CIC parece altamente improbable. El examen ultraestructural de las lesiones sinoviales de la PMR, sugiere para algunos autores (114), el depósito de complejos inmunes. La afección articular, base de las manifestaciones de la PMR, podría ser atribuida al depósito de CIC más razonablemente que otras manifestaciones de la AH. De hecho, las series donde se detecta una elevada prevalencia de CIC, incluyen un número considerable de pacientes con PMR (194, 459, 542). Sin embargo, no

podimos demostrar en nuestros pacientes ninguna relación entre la presencia de CIC y la existencia de PMR. La posibilidad de que la presencia de CIC obedezca a una alteración en la inmunoregulación asociada a la presencia de DR3, tampoco parece comprobarse en nuestro estudio.

En las enfermedades reumáticas el antígeno DR4 parece estar relacionado con la susceptibilidad genética a enfermedades con un tropismo vascular y articular (202). Así, un 70% de los pacientes occidentales con enfermedad de Takayasu son portadores del antígeno DR4 (202). Las complicaciones vasculíticas de la AR parecen ser asimismo más frecuentes en los pacientes con DR4 (617 bis), aunque en este hecho no existe unanimidad (514). De hecho, las vasculitis más frecuentemente asociadas a la AR son de tipo leucocitoclástico y obedecen probablemente a mecanismos patogénéticos distintos a los implicados en la AH. Las enfermedades sistémicas asociadas a DR4 parecen constituir un espectro desde las arteritis de células gigantes a la AR a través de la PMR y entre ellas puede existir superposición a distintos niveles. Un pequeño porcentaje de enfermos con AH (4%) desarrolla una AR seronegativa (238). En algunos casos la AH puede afectar los troncos supra-aórticos como ocurre en los pacientes con enfermedad de

Takayasu (13, 48, 49, 178, 267, 320, 354, 448, 583) y esta enfermedad puede debutar como una poliartritis crónica clínica e histológicamente indistinguible de la AR (260, 378) incluso seropositiva (267). A su vez, en el curso de la AR puede aparecer afección vascular de grandes vasos (378, 448). El tropismo vascular y articular de las lesiones en las enfermedades reumáticas asociadas a DR4, podrían relacionarse con la existencia de fenómenos de autoinmunidad frente al colágeno, importante componente de estas estructuras (202). Sin ser un requisito indispensable (337 bis), la presencia del antígeno DR4 parece condicionar o favorecer una respuesta de los linfocitos T (548 bis) y una producción de anticuerpos frente al colágeno tipo II desnaturalizado (514). Otros autores relacionan más estrechamente la producción de anticuerpos frente al colágeno con la presencia del antígeno DR3 (182, 259 bis). La autoinmunidad frente al colágeno en los pacientes portadores de DR4 o DR3, evidentemente no explica de manera satisfactoria ni definitiva el desarrollo de estos procesos. Sin embargo estos hechos contribuyen a configurar las enfermedades reumáticas asociadas a DR4 como un conjunto de entidades que comparten mecanismos patogénicos comunes responsables de la similitudes clínicas entre ellas y la progresión de unas a otras durante su curso evolutivo.

III.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.

Los mecanismos patogenéticos que conducen a la lesión vascular en la AH son mal conocidos. La caracterización mediante técnicas inmunohistoquímicas de las poblaciones celulares que constituyen el infiltrado inflamatorio de la AH, objetivo principal de la segunda parte de este trabajo, puede contribuir al esclarecimiento de los mecanismos patogenéticos que conducen a la lesión vascular.

Mediante la detección inmunohistoquímica de la proteína S-100 hemos podido demostrar por primera vez la presencia de células interdigitantes (IRC) en las lesiones arteríticas de la AH.

El antisuero policlonal comercial anti S-100 (Dakopatts) utilizado en nuestro trabajo, se halla dirigido principalmente hacia la subunidad β , puesto que ésta es la más abundante en el cerebro bovino que se utiliza en el proceso de inmunización (100, 565). Por este motivo, asumimos que las células identificadas corresponden muy probablemente a IRC. La detección de proteína S-100 en otras estirpes celulares presentes también en las lesiones inflamatorias, como los macrófagos, requiere el uso de un anticuerpo monoclonal

dirigido hacia la cadena α (100). La característica morfología dendrítica, claramente objetivada en alguna de estas células (figuras 13 y 14), permite catalogarlas con mayor fiabilidad como IRC. En ningún caso pudimos objetivar células positivas para el anticuerpo monoclonal CD1 (T6). Algunos autores han defendido la inmunorreactividad de las IRC para este anticuerpo monoclonal al igual que ocurre con las células de Langerhans (588, 616). Sin embargo, este hecho no se ha comprobado por otros investigadores que sostienen que las células "veiled", probables precursoras de las IRC y de las células de Langerhans son CD1 positivas pero que la transformación hacia IRC se asocia a la pérdida del antígeno T6 (100). Nuestros resultados apoyan esta convicción.

Las IRC se han identificado en las lesiones producidas por diversas enfermedades infecciosas o inflamatorias, como la lepra, sarcoidosis y psoriasis (483). Si bien se observan con facilidad en la sinovial de la artritis reumatoide (483), son prácticamente inexistentes en la sinovial de enfermedades articulares no inflamatorias (93). Otro dato interesante es la rareza de estas células en las lesiones pulmonares de la alveolitis alérgica extrínseca, enfermedad probablemente inducida por depósito de complejos inmunes (483).

Asimismo su presencia es mucho más frecuente en los granulomas inmunogénicos, es decir desencadenados por un mecanismo de hipersensibilidad retardada, que en los granulomas a cuerpo extraño (472). Todos estos hechos apoyan la participación de las IRC en el desarrollo de la reacción inflamatoria, probablemente en su papel primordial como células presentadoras de antígenos (64, 228, 483, 554). Su presencia apoya la existencia de una inducción local de la reacción inflamatoria y sugiere la presentación "in situ" a los linfocitos T de la sustancia antigénica desencadenante con la consiguiente activación de los mismos. En efecto, en ocasiones ha sido posible demostrar en otras lesiones como las IRC se hallan en íntimo contacto con los linfocitos (157, 472, 483, 484), especialmente pertenecientes a la subpoblación CD4 (484) los cuales expresan marcadores de activación (483). Nosotros pudimos efectivamente observar en algunos casos como las prolongaciones dendríticas de estas células rodeaban a los linfocitos (figura 14).

Las IRC no fueron numerosas en ninguno de los casos estudiados. Su presencia ha sido cuantitativamente muy variable en las enfermedades inflamatorias donde se han investigado (483). Incluso dentro de un mismo proceso en algunos casos se han objetivado y en

otros no (472). La presencia de IRC parece estar relacionada con la cronología de la enfermedad. Así, en estudios seriados practicados en lesiones cutáneas de hipersensibilidad retardada y en sarcoidosis las IRC infiltran las áreas muy precozmente, incluso antes de la llegada de los linfocitos, de acuerdo con su función como células presentadoras de antígenos (483). En el liquen plano se ha observado, asimismo, una elevada proporción de IRC en las lesiones precoces de menos de 3 semanas de evolución, mientras que estas células son escasas en lesiones tardías (de 1 a 12 meses), donde predominan los linfocitos T y los macrófagos (157). Del mismo modo, en la sarcoidosis cutánea, las IRC son abundantes en las lesiones inflamatorias incipientes y son escasas o ausentes cuando el granuloma se halla bien formado (472). El escaso número de IRC objetivado en la mayoría de nuestros casos estaría, pues, de acuerdo con estos datos, puesto que sólo una de las biopsias se obtuvo en un plazo inferior a 3 semanas. En la misma línea, pudimos comprobar que el tiempo de evolución de los síntomas craneales fue significativamente inferior (1'7 meses) en los pacientes en cuyas lesiones se pudo identificar la presencia de IRC respecto a aquellos en quienes estas células no pudieron objetivarse (3'8 meses) ($p < 0'05$). Si bien el hallazgo de IRC dependía del tiempo de evolución de la AH, no

encontramos ninguna relación entre su presencia y la actividad de la enfermedad. El mantenimiento de la inflamación y su repercusión clínica no precisan, pues, de la acción de las IRC sino que dependen de otros factores que perpetúan la acción de los mecanismos efectores. La principal intervención de las IRC parece, pues, tener lugar en los inicios del proceso, como parte de los fenómenos desencadenantes del mismo. Estas observaciones están de acuerdo con las dos fases reconocidas en las reacciones inmunes: la etapa inicial antígeno-dependiente donde los linfocitos T se activan a través de la presentación del antígeno y liberación de monokinas por parte de las células presentadoras de antígenos y la etapa antígeno-independiente donde la IL-2 liberada por los linfocitos T inductores activados se une a las células que expresan su receptor e induce su expansión clonal y la activación de los mecanismos efectores. Esta última etapa, que se autopropaga en las enfermedades inflamatorias crónicas, no requeriría la acción de las IRC.

El hallazgo de IRC en las zonas arteríticas de la AH tiene un importante significado patogenético. Su presencia sugiere la hipótesis de la inducción local de una lesión autoinmune dirigida hacia componentes de la pared arterial, probablemente procesados y presentados

in situ. En base a estos hallazgos resulta mucho más plausible esta hipótesis que el depósito de complejos inmunes circulantes que sostienen algunos autores (194, 370). El objeto de esta reacción autoinmune podrían ser las fibras elásticas alteradas por el proceso de envejecimiento o las radiaciones solares (4, 111, 348, 373, 440 bis, 462) o como diana de una reacción cruzada con un agente infeccioso cuyo papel desencadenante ha sido también defendido con frecuencia en la AH (10, 42, 227 bis). La importancia de las fibras elásticas en la patogenia de la AH ha sido intuída desde hace ya varias décadas en base a las alteraciones observadas en la misma tanto en su configuración como en sus afinidades tintoriales y en su ultraestructura (4, 348, 373, 462, 494) y en base al hecho, comprobado en estudios necrópsicos, de que las lesiones arteríticas a lo largo de las arterias afectadas no suelen aparecer distalmente a la zona donde pierden la lámina elástica (406, 620). Por otro lado las propiedades antigénicas de la elastina (324) y su capacidad para inducir la formación de granulomas (456) parecen estar bien documentadas. Los fragmentos de fibras elásticas objetivados por varios autores en el interior de las células gigantes (35, 348) parecen también indicar que el proceso inflamatorio se halla encaminado hacia su destrucción.

La celularidad estuvo constituida principalmente por macrófagos y linfocitos T. Ambos elementos se encontraban en proporción variable según los casos aunque en la mayor parte de ellos existía un claro predominio de macrófagos. Los linfocitos pertenecían fundamentalmente a la subpoblación CD4. Existían también linfocitos CD8 aunque en menor proporción. La presencia de linfocitos B fue insignificante y no pudimos identificar células K. Estos datos proporcionan interesante información respecto a los mecanismos efectores que conducen al daño vascular. La presencia moderada o escasa de linfocitos CD8 hace improbable la participación de citotoxicidad celular directa restringida por antígenos HLA de clase I. De hecho, en otros procesos en cuya patogenia parece intervenir este mecanismo (enfermedades producidas por virus (183), enfermedad del injerto contra el huésped (532), rechazo de trasplantes (532), predominan claramente los linfocitos CD8 en el infiltrado inflamatorio de las lesiones. Sin embargo, no podemos excluir por completo un mecanismo citotóxico mediado por linfocitos CD4 puesto que estas células pueden desarrollar una función citotóxica especialmente dirigida hacia células diana con expresión de antígenos de clase II (181). Del mismo modo, la ausencia de células K no sugiere, en principio, la participación de fenómenos de citotoxicidad celular anticuer-

po-dependiente, aunque los macrófagos podrían ser también capaces de desarrollar esta función a través de sus receptores Fc (243). El hallazgo inespecífico, inconstante y no concluyente de inmunoglobulinas en la pared arterial referido en otros estudios (112, 227, 370, 458) tampoco apoya esta posibilidad.

Una distribución de las poblaciones similar a la encontrada por nosotros se describe en otras enfermedades granulomatosas, infecciosas o de etiología desconocida, donde la celularidad está también constituida por macrófagos y linfocitos CD4 con proporciones variables de CD8 (232, 357, 434, 532). La reacción granulomatosa parece ser el resultado de la colaboración entre linfocitos T sensibilizados y otras estirpes celulares, especialmente macrófagos, de cara a la degradación de toxas no eliminables mediante los mecanismos propios de la inflamación aguda o crónica o cuyo estímulo antigénico persiste indefinidamente (2, 181). Las fibras elásticas como objetivo teórico de la agresión granulomatosa poseerían estas características. La leve e inconstante necrosis que aparece en las lesiones propias de la AH sugiere que el objetivo de la agresión es una sustancia relativamente inerte (2) a diferencia de lo que ocurre en las enfermedades infecciosas donde la necrosis suele ser un hallazgo constante. Algunos

autores sugieren que la interacción entre linfocitos colaboradores y supresores tendría gran importancia en el adecuado desarrollo de la reacción granulomatosa (425, 434). Una proporción CD4/CD8 elevada y la disposición de los linfocitos CD8 en el manto periférico condicionaría una adecuada configuración del granuloma, una mayor maduración de los macrófagos y una eficacia superior en la eliminación del antígeno desencadenante. Una proporción elevada de CD8 conduciría a la situación inversa. Las lesiones de la lepra tuberculoide y la lepra lepromatosa ejemplificarían respectivamente los extremos de ambas situaciones. Otros autores (426) no comparten esta convicción y sostienen que una respuesta granulomatosa efectiva no parece relacionarse con la constatación morfológica de un exceso de linfocitos T con fenotipo CD4 ni con una disposición particular de las subpoblaciones, sino que depende de una adecuada liberación de linfocinas (426). En la mayoría de nuestros casos (82%) existía un franco predominio de la población CD4, aunque en un 18% de los mismos la proporción CD4/CD8 era casi similar. En nuestro conocimiento existen únicamente 3 estudios inmunohistoquímicos previos realizados de cara a identificar las poblaciones celulares en las lesiones de la AH, todos ellos practicados en una serie reducida de casos, aproximadamente la mitad de los incluidos en nuestro trabajo (21,

35, 112). Banks et al (35) y Andersson et al (21) constatan asimismo un notable predominio de linfocitos CD4 mientras que Chess identifica proporciones similares de linfocitos CD4 y linfocitos CD8 (112). Al igual que Banks et al (25), no pudimos demostrar ninguna correlación entre la densidad de la celularidad (variedad clásica o atípica), la proporción linfocitos T/macrófagos o la proporción de las subpoblaciones CD4/CD8 y el tiempo de evolución de la enfermedad. Este hecho no es de extrañar puesto que los fenómenos que conducen a la organización del granuloma ocurren dentro de las primeras 72 horas que siguen al estímulo antigénico. A partir de este momento, el granuloma se halla perfectamente establecido (547). Nuestras biopsias, como es habitual, se practicaron tardíamente, al cabo de un intervalo mínimo de una semana tras el inicio de los síntomas.

La inmunorreactividad para el HLA-DR fue intensa en todos los casos estudiados en concordancia con lo observado por otros autores (20, 21, 35). La expresión de DR puede atribuirse a distintos tipos celulares: linfocitos B, linfocitos T activados y macrófagos. Dado que no se practicó doble marcaje no es posible discriminar con precisión que tipo de células expresaban DR. La ausencia o escaso protagonismo de los linfoci-

tos B sugiere que las células responsables de la positividad eran básicamente macrófagos y linfocitos T activados. La distribución de la inmunorreactividad para DR en nuestros casos seguía fielmente el patrón de los marcadores histiocitarios EBM-11 y lisozima. Otros autores han demostrado con doble tinción (20) la presencia de DR no sólo en los macrófagos sino en un 28% de los linfocitos T. Las fibras musculares de la pared arterial no expresaban antígenos de clase II, tal como observan Andersson et al (20). La expresión intensa del HLA-DR por los macrófagos refleja su estado de activación (330, 585, 586), puesto que los macrófagos residentes y los macrófagos inflamatorios (es decir no activados por linfocinas) apenas expresan antígenos de clase II (2). Por tanto, los macrófagos existentes en las lesiones de la AH se encuentran en plena capacidad para ejercer sus funciones efectoras. No es por ello aventurado postular que el daño vascular en la AH se halla mediado por la liberación de sus productos citotóxicos (2). La expresión de antígenos de clase II confiere al macrófago activado capacidad como célula presentadora de antígenos (2, 65, 330, 585, 586). Como se ha sugerido en otros procesos autoinmunes (78, 217, 487, 585, 586) esta función podría tener importancia en la perpetuación de la inflamación en la AH.

Uno de los fenómenos característicos inherentes a la activación del linfocito T como consecuencia de la unión de su receptor clonotípico con el antígeno y mediante la acción de la IL-1, es la aparición en su superficie del receptor para la IL-2 (IL-2R) (605, 606). La aparición del IL-2R se considera, pues, un marcador de activación. En un 65% de los casos estudiados existía inmunorreactividad para el IL-2R. Las células positivas eran escasas en todos los casos. Este hecho se ha constatado también por Andersson et al (21) en el único estudio realizado previamente en torno a la expresión del IL-2R en la celularidad de la AH. En otras enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad de Sjögren (513, 530) o en procesos granulomatosos como la lepra (424) o la reacción de Mantoux (226), se ha observado también un escaso porcentaje de células positivas para el IL-2R. En algunos de estos casos, otros marcadores de activación como la expresión de antígenos de clase II (530) o el antígeno Tal (226), existían en un porcentaje superior de linfocitos. Como explicación a este hecho se ha sugerido que la interacción de la IL-2 con el receptor impediría su unión con el anticuerpo monoclonal (530). De hecho, cuando la IL-2 se une a los receptores de alta afinidad, el complejo IL-2/IL-2R se internaliza para realizar su función (17, 605, 606). Sin embargo, esta explicación no

es satisfactoria ya que la unión de la IL-2 con su receptor induce una intensa actividad proliferativa (17, 171, 172, 605, 606) y ésta no se ha podido demostrar en las lesiones donde ha sido estudiada. Así, en el infiltrado de las glándulas salivales en el síndrome de Sjögren, pocas células incorporan timidina tritiada (530). Asimismo, el examen mediante microscopio electrónico revela cambios morfológicos propios de transformación blástica en un número reducido de linfocitos (530). En la propia ²⁴ pocos linfocitos expresan el receptor de la transferrina, otro marcador relacionado con la proliferación celular (21, 561). La escasa presencia del IL-2R parece pues ser real y traducir la escasa actividad replicativa de estas células. Algunos autores sugieren que este hecho puede estar condicionado por el tiempo de evolución de las lesiones al ser biopsiadas (530). La expansión clonal tras la exposición antigénica parece ser un fenómeno precoz que se desencadena en horas y de breve duración dada la corta vida media de las linfocinas y la fugacidad de sus efectos biológicos (127, 172, 605). Esta actividad proliferativa parece estar sometida a un riguroso control para evitar su perpetuación indefinida. La propia IL-2 regula la expresión de su receptor (17, 545, 605, 606). En algunas enfermedades inflamatorias crónicas se ha objetivado además la presencia de inhibidores de

la IL-2 (263, 421). Una vez desencadenada la reacción inflamatoria se necesitan relativamente pocas células sensibilizadas para mantener la especificidad de la reacción y la coordinación de los mecanismos efectores (127). Por este motivo no es de extrañar que exista poca actividad replicativa.

Contrariamente a la capacidad proliferativa, la capacidad secretora, otro de los fenómenos inducidos por la activación linfocitaria, parece estar altamente desarrollada en la AH. La intensa expresión de antígenos de clase II por los macrófagos, demostrada por nosotros y por otros autores, tanto en la AH (20, 21, 35) como en otras enfermedades granulomatosas (426, 434) traduce la existencia de una vigorosa liberación de γ -IFN (219, 508). Las células gigantes características de la AH constituyen la última etapa en el proceso madurativo de los macrófagos con una capacidad degradativa máxima (2, 330, 527). Su presencia es también una evidencia indirecta de la síntesis de γ -IFN por los linfocitos T ya que esta linfokina tiene un importante papel en la diferenciación de los macrófagos a células gigantes (330, 614). Como es de esperar, dada su estirpe macrofágica, las células gigantes presentaban inmunorreactividad con el suero antilisozima y con el anticuerpo monoclonal EBM-11.

Podemos establecer, pues, la hipótesis de que la AH es la consecuencia del intento del sistema inmune de aislar una sustancia de difícil degradación, teleonomía de cualquier reacción granulomatosa según las interesantes reflexiones de Adams (2). Esta sustancia sería relativamente inerte, en base a la ausencia o poca intensidad de la necrosis y estaría situada en la pared arterial, dada la presencia local de células dendríticas. La lámina elástica, fragmentada y desestructurada, con porciones desaparecidas y en ocasiones con fragmentos identificables en el interior de las células gigantes, podría ser el objeto de esta reacción granulomatosa como han sugerido diversos autores desde hace ya varios años (245, 265, 348). Los linfocitos CD4 cuyo estado de activación resulta evidente por la detección de células positivas para el IL-2R serían los responsables de la activación y organización de los macrófagos. En las fases de la enfermedad en que se obtuvieron las biopsias, su actividad secretora de linfoquinas, observada indirectamente a través de la expresión de DR por los macrófagos, sería superior a su actividad proliferativa en base al escaso número de células portadoras del IL-2R. La presencia de células dendríticas hace más probable la activación "in situ" de los linfocitos CD4 que la migración de linfocitos activados circulantes hacia las lesiones. El daño

tisular y, por tanto, las manifestaciones clínicas estarían determinadas por la liberación de productos líticos y vasoactivos a cargo de los macrófagos cuyo estado de activación se demuestra por la intensa expresión de antígenos HLA-DR. La expresión de antígenos de clase II les capacita como células presentadoras de antígenos y este hecho podría conducir teóricamente a la perpetuación de las lesiones.

Otro aspecto estudiado fue la influencia del tratamiento con corticosteroides (1mg/Kg/día) sobre las lesiones. No encontramos diferencias significativas entre la densidad de la celularidad (AH clásica o atípica) entre los enfermos tratados o no tratados. Este hecho está de acuerdo con las referencias esporádicas que existen en la literatura de casos en que se demuestra la presencia de lesiones histológicamente "activas" tras varios años de tratamiento (200, 245, 265, 267). En la misma línea, tampoco pudimos demostrar diferencias en la proporción linfocitos/macrófagos en relación con el tratamiento. A nivel de sangre periférica, la administración de corticosteroides induce una redistribución de las poblaciones linfocitarias con reducción de la subpoblación CD4 circulante (52, 147, 415, 568). A nivel de las lesiones, otros agentes inmunomoduladores como la ciclosporina A en el síndrome de Sjögren

(150) o el tratamiento de fondo (d-penicilamina o sales de oro) en la artritis reumatoide (609) reducen el número de células T del infiltrado, especialmente las pertenecientes a la subpoblación CD4. Aunque en nuestro estudio todos aquellos pacientes con relación-CD4/CD8 próxima a la unidad habían recibido corticosteroides, la diferencia no llegó a ser significativa y no pudimos, por tanto, demostrar ningún efecto del tratamiento sobre la distribución "in situ" de las subpoblaciones linfocitarias. Los mismos resultados obtienen Banks et al (35) y Andersson (21). Los trabajos realizados en otras enfermedades inflamatorias donde se demuestra una reducción en el número de células CD4 infiltrantes en relación con el tratamiento se practicaron al menos 6 meses después del inicio del mismo (150, 609) mientras que en nuestro estudio el tiempo de evolución desde el inicio del tratamiento hasta el momento de la biopsia fue muy inferior. Estudios secuenciales en otras enfermedades inflamatorias crónicas demuestran que el tratamiento con corticosteroides y otros inmunosupresores disminuyen la expresión de antígenos de clase II a nivel de las lesiones (52, 609). No pudimos objetivar este hecho puesto que nuestro estudio no fue secuencial y la densidad de macrófagos, el tipo celular principalmente responsable de la expresión de DR no era uniforme en todos los

pacientes. Por tanto, no pudimos establecer comparaciones en cuanto a la intensidad de DR entre el grupo de pacientes tratados y los no tratados.

Por el contrario, sí pudimos objetivar un claro efecto inhibitor de los corticosteroides sobre la expresión del IL-2R, particularmente más allá de los 4 primeros días de tratamiento. Este hallazgo está de acuerdo con estudios "in vitro" donde los corticosteroides suprimen, no sólo la síntesis de IL-2 (294, 415) y su unión al receptor (303) sino también la expresión del IL-2R sobre la superficie celular (303). En efecto, la incubación de linfocitos con hidrocortisona durante 7 días suprime casi completamente la expresión del IL-2R (303). Andersson et al (21) en el único estudio sobre la expresión del IL-2R en el infiltrado de la AH realizado previamente al nuestro, no encontraron diferencias entre los pacientes tratados y los no tratados. Sin embargo, sus resultados no son completamente opuestos a los nuestros ya que en su estudio, únicamente incluyen 4 pacientes tratados durante un período de 3 a 10 días. Su grupo de pacientes era pues demasiado pequeño y el intervalo de tiempo demasiado variable como para detectar diferencias significativas.

La administración de corticosteroides, tratamiento de elección de la AH, produce una completa remisión de las manifestaciones de la enfermedad en pocos días en la mayor parte de los pacientes. Sin embargo, esta mejoría clínica no se acompaña de modificaciones sustanciales en la distribución de las poblaciones celulares en las lesiones, al menos a corto plazo. A partir del efecto observado sobre el IL-2R podemos deducir que su espectacular eficacia en la AH obedece a profundas modificaciones funcionales en las células implicadas.

CONCLUSIONES

I.- ESTUDIO INMUNOGENETICO.

1.- Existe una predisposición genética a padecer arteritis de Horton ligada al Sistema Mayor de Histocompatibilidad . En nuestra etnia, la arteritis de Horton se asocia al antígeno de Clase II DR4.

2.- La presencia de DR4 condiciona fundamentalmente la expresión de la enfermedad como polimialgia reumática. Asimismo, los portadores de DR4 presentan con mayor frecuencia formas más severas e incapacitantes de polimialgia reumática.

3.- El incremento en la frecuencia del antígeno DRw53 observado en los pacientes con polimialgia reumática respecto a los enfermos sin ella y la disminución de DQ2 se deben a la existencia de un desequilibrio de asociación positivo y negativo, respectivamente, entre estos antígenos y el antígeno DR4.

4.- En nuestra serie, la asociación de la polimialgia reumática con el antígeno DR4 no ocurre de manera preferente a través de ningún haplotipo concreto.

5.- No existe relación entre DR4 y la presencia de factores reumatoides que se detectan a títulos significativos (mayor o igual a 80 UI) en únicamente el 5% de nuestros pacientes en relación con la actividad de la enfermedad ni con la presencia de polimialgia reumática.

6.- En los pacientes con arteritis de Horton existe una prevalencia aumentada de heterocigotos DR3-DR4, con un riesgo relativo superior para los enfermos con polimialgia reumática.

7.- No hemos podido observar ninguna relación entre la presencia del antígeno DR3 o del haplotipo B8-DR3 y la existencia de complejos inmunes circulantes. Estos se han detectado mediante la técnica de unión a la conglutinina en un 21% de los pacientes sin relación con la actividad de la enfermedad, presencia de polimialgia reumática o detección de factores reumatoides.

8.- La demostración de la asociación de la polimialgia reumática con el antígeno DR4 evidencia interesantes similitudes inmunogenéticas con la artritis reumatoide cuya forma de inicio en la edad avanzada se encuentra estrechamente relacionada con la polimialgia reumática desde el punto de vista clínico y evolutivo.

II.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUINICO.

1.- La presencia de células interdigitantes, identificadas por primera vez en las lesiones inflamatorias de la arteritis de Horton, sugiere la inducción local de una respuesta inmune frente a antígenos presentes en la pared arterial.

2.- El tiempo de evolución de los síntomas craneales en los pacientes en los que se han identificado células interdigitantes (x 1'7 meses) es significativamente inferior al de los enfermos que carecen de ellas (x 3'8 meses), de acuerdo con el papel de estas células en las fases iniciales de la reacción inflamatoria.

3.- La celularidad en la arteritis de Horton se halla fundamentalmente constituida por macrófagos y linfocitos T, especialmente pertenecientes a la subpoblación CD4, distribución similar a la descrita en otras enfermedades granulomatosas.

4.- La inmunorreactividad para antígenos de Clase II (DR) del Sistema Mayor de Histocompatibilidad es intensa y sigue la misma distribución que la población de macrófagos. Este hecho traduce probablemente su estado de activación.

5.- Estos datos permiten postular que el daño vascular en la arteritis de Horton se halla mediado por los productos liberados por los macrófagos activados mediante las linfoquinas procedentes de los linfocitos CD4. La presencia no predominante de linfocitos CD8 hace poco probable la participación de fenómenos de citotoxicidad celular directa restringida por antígenos de Clase I del Sistema Mayor de Histocompatibilidad. Del mismo modo, la ausencia de células K no sugiere mecanismos efectores de citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente.

6.- En un 65% de los casos se ha demostrado inmunorreactividad para el receptor de la interleukina-2. La presencia de células interdigitantes hace más probable la activación local de los linfocitos que la difusión de linfocitos circulantes activados.

7.- Aunque se observa una tendencia a la disminución de la relación CD4/CD8 en los sujetos tratados, la administración de corticosteroides no influye de manera significativa a corto plazo sobre la distribución de la celularidad.

8.- La desaparición del receptor de la interleukina-2 a los 4 días de tratamiento indica que la administración de corticosteroides induce de manera precoz la aparición de importantes cambios funcionales.