



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
ÁREA DE DOCENCIA E INVESTIGACIONES
DIRECCIÓN DE CIENCIA Y TÉCNICA
PROYECTO DE SALUD

- **Unidad que presenta el Proyecto:** LABCEL (Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo)
- Código del Proyecto

Título del Proyecto: Respuesta neuroinmunológica del lupus eritematoso sistémico.

Programa al que pertenece: Enfermedades crónicas no transmisibles

Objetivos al cual responde: Desarrollo y evaluación de tecnologías que favorezcan el control y eliminación de enfermedades crónicas no transmisibles prioritarias.

Unidad Ejecutora Principal: **LABCEL. Facultad de Ciencias Médicas Dr Miguel Enríquez**

Nombre y Apellidos de su Investigador Principal: Dr. José Pedro Martínez Larrarte

- Nombres y Apellidos y Unidad donde trabajan los demás Investigadores

Dr C. Alberto Dorta Contreras (LABCEL)

Lic. Bárbara Padilla Docal (LABCEL)

- Fecha propuesta de inicio y de terminación
- 2014-2016

CLASIFICACIÓN DEL PROYECTO: BASICO APLICADO

RESUMEN:

NOMBRE DEL PROGRAMA EN QUE SE INSERTA OBJETIVOS A LOS CUALES RESPONDE:

Enfermedades crónicas no transmisibles

Objetivos al cual responde: Desarrollo y evaluación de tecnologías que favorezcan el control y eliminación de enfermedades transmisibles prioritarias.

NOMBRE Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. José Pedro Martínez Larrarte

INSTITUCION QUE PRESENTA:

Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL). Facultad de Ciencias Médicas
Dr Miguel Enríquez

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Dr C. Alberto Dorta Contreras (LABCEL)
Lic. Bárbara Padilla Docal (LABCEL)

INSTITUCIONES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO:

1. Facultad de Ciencias Médicas Dr Miguel Enríquez.

Dirección :Ramón Pintó # 202

Teléfono : 984583

2. Hospital Clínico Quirúrgico de Diez de Octubre

3. Hospital Pediátrico William Soler

4. Hospital Universitario Dr Miguel Enríquez

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la síntesis intratecal de las inmunoglobulinas mayores en pacientes con manifestaciones neurológicas en el lupus eritematoso sistémico.

Objetivos específicos

- Describir los patrones de síntesis intratecal de las inmunoglobulinas mayores IgG, IgA e IgM con que cursa esta enfermedad.
- Establecer la relación existente entre la respuesta inmune y la síntesis intratecal de inmunoglobulinas mayores.
- Definir las condiciones de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) en estos pacientes.

RESULTADOS A ALCANZAR:

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO:

EVALUACION DE SU EXCELENCIA:

IMPACTO SOCIAL:

- Aportará al conocimiento del mecanismo fisiopatológico de esta enfermedad y podrá trazar pautas para facilitar el diagnóstico temprano y evitar complicaciones que se producen en la cronicidad.
- Como resultados indirectos se ganará en conocimiento sobre la enfermedad y los mecanismos neuroinmunológicos durante su curso.

Aportes teóricos

- Se espera poder brindar un panorama más acabado de la respuesta inmune local a nivel de SNC, en esta enfermedad.
- Aporta un método de análisis que podrá ser utilizado para desentrañar estos mecanismos en las manifestaciones neurológicas de otras enfermedades.
- Se trataría de vincular estos hallazgos con la recuperación o no del paciente estudiado y sus posibles secuelas, si procede, en futuros estudios longitudinales.

Aportes prácticos

- Se reintroducirá en nuestro laboratorio la determinación de las inmunoglobulinas mayores IgG, IgA e IgM en el LES.

IMPACTO ECONÓMICO:

De obtener resultados satisfactorios se implantarían estas tecnologías en este laboratorio. La misma sólo está disponible en instituciones de países desarrollados y en Cuba seríamos el único centro que brindaríamos este servicio con posibles clientes entre los pacientes que se atiende en los servicios de turismo de salud.

Además con este proyecto obtendremos un banco de muestras muy valiosas (seroraquioteca), en el campo de las neurociencias que pudiera permitir el intercambio entre investigadores de otros centros y/o países para el desarrollo de nuevos proyectos.

IDEAS EXISTENTES PARA GARANTIZAR SU SOSTENIBILIDAD :

Cuba es el único país con condiciones de organización de salud para lograr las muestras necesarias para hacer el trabajo. Contamos con la fuerza de trabajo calificada para llevar a cabo la investigación. Argumentación en cuanto a que permite el desarrollo de capacidades científico-técnicas del investigador principal o de alguno de los investigadores que participan en el proyecto y de la institución acorde al impacto esperado.

Los investigadores lograrán mejorar sus habilidades técnicas por la ejecución de la tecnología que esto implica, permite el desarrollo científico de ambos y ayuda a la imagen de la institución en el ámbito internacional y el aporte científico será patrimonio cubano para el mundo. Este proyecto es la base sobre la cual la investigadora principal hará su tesis de doctorado.

Alternativas de acción de no realizarse este proyecto

No se podría obtener la posibilidad de transferencia de la tecnología al país.

Antecedentes

Entre los aparatos y sistemas que se afectan en el curso del Lupus Eritematoso Sistémico (LES), se encuentra el sistema nervioso central (SNC), ^{1,2} dando lugar, sus signos y síntomas, a uno de los criterios de clasificación de esta entidad, tabla 1 los cuales prevalecen entre el 25 y el 70% de estos pacientes. Si bien con frecuencia se puede afectar el sistema nervioso periférico (SNP), las manifestaciones más graves están relacionados con el SNC.³⁻⁵

Criterios para la clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico
1- Eritema malar
2- Lupus discoide
3- Fotosensibilidad
4- Úlceras orales
5- Artritis
6- Serositis
• Pleuritis
• Pericarditis
7- Afección renal
• Proteinuria persistente mayor de 0.5g/día o mayor de 3 cruces si no se logró cuantificar
• Cilindros celulares que pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos
8- Alteración neurológica
• Convulsiones o
• Psicosis
9- Trastorno hematológico
• Anemia hemolítica con reticulocitosis o
• Leucopenia: menos de 4000 leucocitos/mm ³ en dos o más ocasiones
• Linfopenia: menos de 1500 linfocitos/mm ³ en dos o más ocasiones
• Plaquetopenia: Menos de 100 000 /mm ³ en ausencia de medicamentos lesivos
10- Alteración inmunológica
• Células LE positivas; o
• Anti-DNA: anticuerpos anti-DNA nativo a título anormal o
• Anti-Sm: Presencia de anticuerpos contra el antígeno

- nuclear Sm; o
 - Pruebas serológicas para la sífilis falsas positivas
- 11- Anticuerpos antinucleares

Manifestaciones neuropsiquiátricas del LES

En ocasiones, las manifestaciones del SNC llegan a ser tan moderadas en sus inicios, que pueden confundirse con alteraciones transitorias de la población normal, fluctuando entre discretos dolores de cabeza, depresiones transitorias, o leves situaciones de hiperactividad que no se asocian directamente con el LES insipiente; otras veces las manifestaciones neuropsiquiátricas suelen ser más graves, e incluyen, la depresión profunda,⁶⁻⁸ severos cuadros psicóticos, disfunciones cognoscitivas o graves accidentes vasculares cerebrales que puedan comprometer inexorablemente la vida del paciente. ^{Tabla 2} En este sentido, el American College of Rheumatology publicó en el año 1999, una lista con 19 síndromes neuropsiquiátricos descritos en enfermos de lupus. ⁹

Tabla 2 Manifestaciones neuropsiquiátricas más frecuentes en el LES

Manifestaciones neuropsiquiátricas del LES	
Manifestaciones del SNC	Manifestaciones del SNP
<ul style="list-style-type: none"> • Meningitis aséptica • Neuritis óptica • Enfermedad cerebrovascular • Síndromes desmielinizantes • Cefalea • Convulsiones • Corea • Ansiedad • Alteraciones cognoscitivas • Cambios de carácter • Psicosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Guillain – Barré • Alteraciones autonómicas • Mononeuritis única • Mononeuritis múltiple • Miastenia gravis • Neuropatía cranial • Plexopatía • Polineuropatía

En la actualidad, la prueba más útil para el diagnóstico de LES, es la detección de anticuerpos antinucleares dirigidos contra diferentes estructuras nucleares de la células, los cuales se encuentran presentes en casi el 100 % de los enfermos; son ellos los responsable de la mayoría de las manifestaciones clínicas de esta entidad. ¹⁰⁻¹²

Uno de los inconvenientes que presenta la detección de anticuerpos antinucleares en el LES, está relacionado con la posibilidad de aparecer en el curso de otras entidades de origen sistémico-inmunológico. Los anticuerpos antinucleares más característico en LES son los de doble cadena, considerados con cierto nivel de especificidad para esta entidad. ¹³⁻¹⁵

Otra de las causas frecuentes de las manifestaciones neuropsiquiátricas en el LES, está relacionada con los defectos de perfusión y los infartos cerebrales asociados a las lesiones vasculíticas, demostrados a través de gammagrafía cerebral y resonancia magnética nuclear; en ocasiones, se ha podido observar infartos cerebrales en ausencia de oclusión vascular, o de vasculitis, aún en presencia de anticuerpos antifosfolípidos.¹⁶⁻²⁰

A pesar del desarrollo alcanzado en el diagnóstico del LES, y específicamente de sus manifestaciones neurológicas, a través del conocimiento de los diferentes anticuerpos antinucleares y los múltiples estudios imagenológicos del cerebro, no sustituyen en la actualidad la información que logra el análisis del LCR obtenido mediante la punción lumbar, y específicamente los métodos dirigidos a identificar las diferentes inmunoglobulinas que se forman en el compartimento intratecal.^{21,22}

Entre los estudios con esta posibilidad se encuentra los Reibergramas, donde básicamente se analiza de forma integrada, la funcionabilidad de la barrera sangre-LCR y la síntesis intratecal de proteínas, que de forma aislada, no lograrían tener un mayor impacto en el diagnóstico de esta enfermedad.²³⁻²⁵

El Reibergrama

Este gráfico consta de las partes siguientes:

- Unas líneas verticales para indicar los rangos de referencia según la edad para la razón albúmina. Un incremento de la razón albúmina (QAlb) indica disfunción de la barrera sangre/LCR.
- Una línea hiperbólica discriminadora que separa, el rango de referencia para la fracción de las proteínas derivadas de la sangre por debajo de la línea, y de la fracción de las proteínas sintetizadas intratecalmente por encima de esa línea.

Los rangos de referencia para las razones LCR/suero del Reibergrama se apoyan en las líneas discriminatorias, una superior (Q límite) dibujada más fuerte y una inferior, mas tenue (Q bajo), usando una escala logarítmica que cubren los rangos más frecuentes para las proteínas, siendo para QAlb desde 1,5 a 150×10^{-3} .²⁶

Las líneas de puntos indican la magnitud de la fracción sintetizada intratecalmente (FI=20, 40, 60, 80%) y se calcula a partir de Q lim=0%. Esta gráfica permite la integración de las barras verticales fijas para valores normales de QAlb como lo muestra la Figura 1, para las edades de 15, 40 y 60 años.²⁷

El Reibergrama ofrece además una serie de ventajas, entre ellas tenemos la posibilidad de evaluar la síntesis intratecal de la proteína que se desee analizar, conocer la funcionabilidad de la barrera sangre-LCR, y encontrar patrones de síntesis intratecal típicos para una enfermedad en particular, relacionándolas con otras entidades de un solo vistazo, todo lo cual abre nuevas posibilidades de evaluación de enfermedades neurológicas autoinmunes.²⁸

Por otro lado, el resultado no depende del volumen de LCR extraído y puede realizarse con LCR lumbar, ventricular o cisternal; además, las razones que se calculan no dependen del método analítico empleado en la cuantificación, siempre que se haga en

la misma corrida analítica y por el mismo método, y puede trabajar en cualquier rango de QAlb.²⁹

Este método analítico ha sido aplicado en el estudio de las síntesis intratecal de subclases de IgG en pacientes con enfermedad de Alzheimer ²⁰, y otras enfermedades autoinmunes como la Esclerosis múltiple ²¹ y el Guillain Barré ²², además de meningoencefalitis virales, bacterianas, y eosinofílicas en pacientes pediátricos. ²³⁻²⁵

También ha sido útil en el estudio de otras proteínas no inmunoglobulinas, como el antígeno carcinoembrionario,²⁹ la enzima convertidora de angiotensina, ²⁷ para evaluar la síntesis intratecal de proteínas del sistema de complemento como el C3c ²⁸y el C4, ²⁹ y más recientemente la lectina de unión a manosa, proteína de la tercera vía de activación de este sistema.³⁰

Los reibergramas representan en la actualidad, una de las formas más objetivas de caracterizar la función de la barrera sangre/LCR y la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en enfermedades que cursan con manifestaciones neurológicas; quedando muchas en las que no ha sido aplicado este estudio, entre ellas se encuentran las manifestaciones neurológicas que se presentan en el LES, por lo que nos proponemos con esta investigación, valorar la posibilidad de utilizar el reibergrama como un método analítico más en el diagnóstico de las manifestaciones neurológicas del LES.

Bibliografía

1. West SG, Emlen W, Wener MH, Kotzin BL. Neuropsychiatric lupus erythematosus: A 10-year prospective study on the value of diagnostic tests. *Am J Med.* 1995;99:153.
2. Conti F, Alessandri C, Bompane D, Bombardieri M, Spinelli FR, Rusconi AC, et-al. Autoantibody profile in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations: A role for anti-endothelial-cell antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6:366-72.
3. Hanly JG, Urowitz MB, Siannis F, Farewell V, Gordon C, Bae SC, et-a.l, Systemic Lupus International Collaborating Clinics. Autoantibodies and neuropsychiatric events at the time of systemic lupus erythematosus diagnosis: Results from an international inception cohort study. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:843-53.
4. ACR AD HOC Committee on neuropsychiatric lupus nomenclature. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis & Rheum* 1999; 42:599.
5. Isenberg DA, Garton M, Reichlin W, Reichlin M. Long-term follow-up of autoantibody profiles in black female lupus patients and clinical comparison with Caucasian and Asian patients. *Br J Rheumatol.* 1997; 136:229-33.
6. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey S.R.L, Cervera R, et-al. International Consensus statement on an update of the classification criteria for definite APS. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:295-306.

7. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008; 28:454-67.
8. Espinoza G, Cervera R, Font J, Shoenfeld Y. Antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanism. *Autoimmun Rev*. 2003; 2:86-93.
9. Bowie EJ, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen C.A. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med*. 1963; 62:416-30.
10. Yoshio T, Hirata D, Onda K, Nara H, Minota S. Antiribosomal P protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2005; 32:34-9.
11. Matus S, Burgos PV, Bravo-Zehnder M, Kraft R, Porras OH, Farías P, et-al. Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exp Med*. 2007; 204: 221-34.
12. Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:847-55.
13. Sun KH, Tang SJ, Chen CY, Lee TP, Feng CK, Yu CL, et-al. Monoclonal ribosomal P autoantibody inhibits the expression and release of IL-12, TNF-alpha and iNOS in activated RAW macrophage cell line. *J Autoimmun*. 2005; 24:135-43.
14. Katzav A, Solodov I, Brodsky O, Chapman J, Pick CG, Blank M, et-al. Induction of autoimmune depression in mice by anti-ribosomal P antibodies via the limbic system. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:938-48.
15. Katzav A, Ben-Ziv T, Chapman J, Blank M, Reichlin M, Shoenfeld Y.J. Anti-P ribosomal antibodies induce defect in smell capability in a model of CNS-SLE. *J Autoimmun*. 2008; 31:393-8.
16. Karassa FB, Afeltra A, Ambrozic A, Chang DM, De Keyser F, Doria A, et-al. Accuracy of anti-ribosomal P protein antibody testing for the diagnosis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: An international meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:312-24.
17. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF): a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci*. 1994; 122:189 – 203.
18. Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function. *J Neurol Sci*. 1994; 126: 243 – 245.
19. Reiber H. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler*. 1998; 4: 99-107.

20. Dorta-Contreras AJ, Robinson Agramonte MA, Mena López R, et al. Local synthesis of IgG subclasses in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Rev.* 1998; 3: 63-6.
21. Padilla- Docal B, Dorta-Contreras AJ, Noris- García E, et al. C3c Intrathecal synthesis evaluation in patients with Multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; 65 (3-B):800-802.
22. Iglesias I, Dorta Contreras AJ, Padilla Docal B. Respuesta neuroinmunológica del VIH asociado al síndrome de Guillain Barré. Reporte de un caso. *WJNS.* 2012; 2: 32-35.
23. Dorta-Contreras AJ, Ferrá Valdés M, Torres Romo U, et al. Local synthesis og immunoglobulins in meningoencephalitis. In Felgenhauer K, Holzgraep M, Prange HW, eds. *CNS barriers and modern CSF diagnosis.* Weinheim: CVH: 1993; pp.396-9.
24. Dorta-Contreras AJ, Vásquez Martínez M, Ferrá Valdés M, et al. Inmunidad intratecal anti-*Neisseria meningitis*. *Rev Esp Pediatr.* 1995; 51: 245-52.
25. Dorta-Contreras AJ, Reiber H. Intrathecal synthesis of immunoglobulins in eosinophilic meningoencephalitis. *Clin Fiagn Lab Immunol.* 1998; 5: 452-5.
26. Jacobi C, Reiber H, Fergenhauer K. The clinical reference of the locally produced carcinoembryonic antigen in cerebrospinal fluid. *J Neurol.* 1986; 233: 358-61.
27. Reiber H. Evaluation of blood/CSF barrier function and quantitation of the humoral immune response within the CNS. In Thompson EJ, Trojano M, Livrea P, eds. *Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis.* Milan: Springer Verlag; 1996; pp. 51-72.
28. Dorta-Contreras AJ, Noris- García E, Padilla- Docal B, et al. Reibergrama para la evaluación de la síntesis intratecal de C3c. *Arq Neuropsiquiatr* 2006; 64(3-A):585-588
29. Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Bu-Coifiu-Fanego R, et al. CSF/serum quotient graphs for the evaluation of intrathecal C4 synthesis. *Cerebrospinal Fluid Research.* 2009, 6:8.
30. Hansotto R, Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, et al. Mannan-binding lectin in cerebrospinal fluid: a leptomeningeal protein. *Fluids and Barriers of the CNS.* 2012, 9: 17.

METODOLOGIA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Planeamiento detallado
 - a) De las tareas a ejecutar

Términos: Las tareas a ejecutar son: elaboración del proyecto, búsqueda bibliográfica, colección de muestras, montaje de las técnicas, evaluación de los resultados, evaluación de las estadísticas, discusión de los resultados, salidas (informe y publicación)

b) Métodos

- Cuantificación de albúmina e inmunoglobulinas mayores en suero y LCR por inmunodifusión radial simple.

c) Diseño experimental

Se realizará un estudio observacional, transversal con estudio de las variables en el curso de la enfermedad, de corte descriptivo por serie de casos.

Por la temporalidad del estudio, será retrospectivos para los casos ya colectados y prospectivos para los casos nuevos.

No contempla sujetos normales. Utilizaremos la punción lumbar diagnóstica, por lo que no será necesario realizar otra intervención cruenta al paciente. La obtención de la información será fundamentalmente prolectiva.

PROCEDIMIENTO

Se recolectarán muestras de LCR y suero de manera simultánea en durante el curso del LES. Las mismas se guardaran correctamente rotuladas en un freezer de -70°C en alícuotas de 0.5- 1ml para evitar los procesos de congelación-descongelación hasta su posterior utilización.

Se cuantificarán los niveles de IgG, IgA, IgM y albúmina en el suero y LCR respectivamente.

Métodos Estadísticos:

- Test de Kolgomorov-Smirnov para saber si las variables en estudio tienen una distribución normal.
- Para el procesamiento de las muestras se emplearán tablas de contingencia a las que se realizará un test de Chi cuadrado con un nivel de significación $p < 0.05$.
- Test de comparación de medias (test t de Student) para las variables en estudio.

CRONOGRAMA

No	Tareas	Etapas	Participante
1	Selección de los Pacientes	mes0-mes12	José Pedro Martínez

			Larrarte
2	Recolección de muestra	Mes 2- mes 22	José Pedro Martínez Larrarte
3	Cuantificación de inmunoglobulinas y albúmina en suero y LCR	Mes 2-mes12	Dr C. Alberto Dorta Contreras Bárbara Padilla Docal
4	Análisis de los resultados	Mes 22-24	Todos el equipo de investigación
5	Confección del informe final	Mes 22-24	Todo el equipo de investigación

Resultados a alcanzar:

Informe final. Es el informe detallado de toda la investigación. Permite reproducir los resultados por una tercera persona. Aporta los resultados científicos y tiene afectaciones sociales (Ver Impacto) Publicaciones. De acuerdo a cómo se comporte la recolección de las muestras realizaremos al menos 3 publicaciones.

Cliente.

Nuestros clientes serán el Hospital Pediátrico William Soler, el Hospital Miguel Enríquez, el Hospital Clínico Quirúrgico de Diez de Octubre que se comprometerán a aplicar y generalizar los resultados obtenidos.

INFRAESTRUCTURA DISPONIBLE:

En LABCEL contamos con la siguiente infraestructura que permite el desarrollo de la investigación

- Freezer -20°C
- Lector de ELISA