

Enfermedad Autoinmune: Perturbación de la Conversación entre la Célula Blanco (epitelial) y la Matriz Extracelular

María Julieta González B.

Profesora Asociada, Programa de Biología Celular y Molecular,
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Resumen

Glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren presentan un aumento en la degradación de componentes de la lámina basal (LB, laminina y colágeno IV) y estroma (colágenos I y III y fibronectina). Estos cambios se correlacionan con un desbalance en la expresión y actividad de metaloproteinasas y sus inhibidores titulares (MMP/TIMP) que desorganiza la LB de acinos y ductos. Esta desorganización es concomitante a una sobreexpresión de lamininas -1 y -5 y a la degradación de nidógenos 1 y -2, que tienen como función establecer puentes de conexión entre laminina y colágeno IV. Cambios post-transcripcionales de la integrina $\alpha 6\beta 4$ están correlacionados con una drástica redistribución de $\beta 4$ en acinos con LB desorganizadas. Estos resultados sugieren que alteraciones en la adhesión célula-matriz y en la formación de contactos célula-célula pueden modificar la señalización de la integrina $\alpha 6\beta 4$ induciendo muerte celular cuando hay una severa interrupción de la célula acinar con la LB.

Palabras clave: Síndrome de Sjögren, glándulas salivales, desorganización de lámina basal.

Autoimmune disease: Impaired cross-talk between epithelial cell and extracellular matrix

Summary

Increased degradation of basal lamina (BL, laminin and type IV collagen) and stroma (type I and III collagens, and fibronectin) proteins have been observed in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Such changes are associated with imbalanced expression and activity of extracellular matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors (MMPs/TIMPs), which contribute

to disorganization of the parenchyma basal lamina. Disorganization of the basal lamina is paralleled by an overexpression of laminin-1 and -5 and the degradation of nidogens 1 and -2: linker proteins that help maintain the integrity of type IV collagen and laminin networks.

Additionally, post-transcriptional changes in $\alpha 6\beta 4$ integrin are associated with a dramatic redistribution of $\beta 4$ in acini, particularly where perturbations in BL organization were apparent. These findings are taken to suggest that changes in acinar cell-matrix adhesion and cell-cell contact formation may alter $\alpha 6\beta 4$ integrin signaling, triggering cell death only when severe disruption of cell-BL attachment occurs.

Key words: Sjögren's syndrome, salivary glands, basal lamina disorganization.

Una mirada biológica integral del ser humano requiere de una alta integración y comunicación de los diferentes sistemas que lo constituyen. Cada tejido tiene una composición celular diversa, una matriz extracelular (MEC) específica y estados particulares de diferenciación de los diversos tipos celulares que lo organizan. Desafortunadamente, aún no tenemos las herramientas metodológicas para efectuar estudios integrales; en consecuencia, todos los resultados obtenidos a la fecha son fragmentos dentro de este complejo universo biológico que es el ser humano.

El centro de esta presentación son las glándulas salivales labiales (GSL) humanas, las cuales estamos estudiando en pacientes con síndrome de Sjögren (SS), una enfermedad autoinmune sistémica que afecta de preferencia las glándulas exocrinas, en particular, glándulas lacrimales y salivales.

Las GSL están constituidas por acinos mixtos seromucosos, cuyas células acinares interactúan entre ellas a través de diferentes tipos de uniones (uniones estrechas, desmosomas en banda, desmosomas en botón y uniones comunicantes). La interacción con las células mioepiteliales, que le forman un canastillo al acino, ocurre a través de desmosomas en botón. La lámina basal (LB), un tipo particular de MEC, interactúa con las células mioepiteliales por complejos proteicos, llamados hemidesmosomas, y con la membrana plasmática basal de las células acinares formando complejos de adhesión, a la fecha no bien definidos. Además de estas interacciones se debe tener presente la acción de diferentes factores solubles, autocrinos y paracrinos, que hacen posible que estas glándulas sintetizen una gran variedad de componentes de secreción y también modulen la organización altamente polarizada del acino. Por fuera de la LB está el resto de los componentes moleculares de la MEC (estroma, tejido conectivo), ej., diversidad de colágenos fibrilares, proteoglicanos, diversos factores solubles; y celulares, ej., fibroblastos, células cebadas (mastocitos), células mononucleares, entre otras. La organización descrita para el acino, con características particulares, también se encuentra en los ductos intercalares, estriados, colectores.⁽¹⁾

Tanto los componentes de la LB como las células de la MEC son particulares de cada tejido. Dos son los componentes principales de la LB, laminina y colágeno tipo IV; ambos forman redes poliméricas que se relacionan por moléculas entrecruzantes (ej., nidógenos, perlecán, fibulinas y otros). La diversidad de LB resulta de la enorme variedad de isoformas de lamininas descritas a la fecha (16 isoformas), y también de la coexistencia de diferentes isoformas de lamininas en una misma LB. Los componentes de la LB interactúan con receptores de adhesión presentes en las membranas plasmáticas de células acinares, mioepiteliales y ductales, llamados integrinas. Por ejemplo, laminina 5 interactúa con integrina $\alpha\beta 4$, mientras que laminina 1 lo hace con la integrina $\alpha\beta 1$. Estas interacciones desencadenan cascadas de transducción de señales particulares que participan en la señalización de varios procesos celulares.^(2-4, 15)

Lo anterior es una breve sinopsis de una complejidad de integración comprendida aún a medias. La falta de conocimiento de esta complejidad es extensiva a todos los tejidos y células libres que forman parte del ser humano. Cuando el reumatólogo Dr. Sergio Aguilera Covarrubias me invitó a participar en un estudio básico-clínico de este síndrome, una pregunta que me mantuvo inquieta por mucho tiempo fue: ¿Si existe este nivel de desconocimiento, es factible estudiar la patogénesis en GSL de pacientes SS? Empezamos estudiando sin tener una respuesta a esta pregunta.

Sin embargo, a medida que obtuvimos los primeros resultados comprendimos que un funcionamiento armónico de las GSL debería resultar de la integridad y relaciones de todas las interacciones descritas. De lo contrario, la falta de integración necesariamente va a **perturbar el diálogo entre células acinares, acinares y mioepiteliales y de ambas con la MEC.**

En las enfermedades autoinmunes los estudios se han focalizado esencialmente en las células del infiltrado inflamatorio, y de preferencia se han empleado células mononucleares circulantes, las cuales provienen de diferentes nichos ecológicos celulares, incluso de aquellos que no presentan alteraciones. ¿Es esta aproximación experimental una estrategia conceptual adecuada? Todas las células son altamente versátiles y así pueden modificar su patrón de expresión molecular, estructural y funcional, dependiendo de sus interacciones con componentes modificados de la MEC, tales como productos de proteólisis y/o de un desbalance de factores solubles (ej., citoquinas, factores de crecimiento, quimoquinas), entre otros. La conducta celular cambiará notablemente si se compara a otra célula de la misma estirpe que no está recibiendo la misma influencia. Aún más, en un mismo tejido alterado, pero en etapas diferentes de la enfermedad, el comportamiento celular debería ser diferente.

En estudios realizados en ratones que desarrollan una patología algo similar al SS (NOD/SCID, sin linfocitos funcionales) se observó que el parénquima de glándulas salivales presentaba alteraciones, tales como aumento de actividad de cisteínas proteasas, aumento de Fas/FasL, incremento de proteasas que degradan la MEC. Este hallazgo y otros permitieron postular que en el SS la fase de inicio podría ser no autoinmune.⁽⁵⁾

Con estos antecedentes, sumados a nuestra experiencia en glándulas salivales, iniciamos los estudios en pacientes con síndrome de Sjögren. El razonamiento fue muy simple: “las alteraciones en la MEC deben estar siendo causadas por enzimas que participan en su degradación, las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP)”. Efectivamente encontramos cambios en la actividad enzimática de MMP-9, no así de MMP-2; sin embargo, lo más sorprendente fue que las células que expresan estas enzimas eran las células acinares y ductales, pero no las células inflamatorias. Las células acinares y ductales también expresaban altos contenidos de MMP-3. La expresión a nivel celular fue independiente de la cercanía del foco inflamatorio, pero no se descarta que las células inflamatorias en esta enfermedad expresen otras MMP, como ha sido reportado en otras enfermedades autoinmunes. Estos resultados necesariamente nos llevaron a preguntar qué ocurría con los inhibidores tisulares de estas enzimas (TIMP-1 y 2) y

si existía un balance en la expresión (R) MMP/TIMP. Un valor de $R > 1$ indica degradación, un $R = 1$, el sistema está en un estado estacionario, y un $R < 1$ implica acumulación de productos de MEC, en otras palabras, fibrosis. Evaluamos los niveles de expresión génica de MMP-2, 3, 9 y de TIMP-1 y 2 y calculamos los balances de expresión (R) MMP-2/TIMP-2, MMP-3/TIMP-1 y MMP-9/TIMP-1. En pacientes SS que tenían el mismo infiltrado inflamatorio, medido por el *score* de focos, encontramos una asociación entre valores de $R > 1$, simultáneos para las duplas de MMP-3/TIMP-1 y MMP-9/TIMP-1, y alteraciones morfológicas severas en los acinos; un ejemplo de ellas es la pérdida de polaridad nuclear, demostrando que las GSL presentan una mayor actividad enzimática que se relaciona al daño del parénquima. La mayor actividad enzimática se probó incubando extractos glandulares con proteínas puras, tales como colágeno IV y laminina, observándose una degradación de estas proteínas.⁽⁶⁻⁹⁾

¿Por qué se podría producir la pérdida de la polaridad nuclear? Una posibilidad es la pérdida de anclaje de la célula acinar con la LB. Como las MMP-3 y -9 son producidas por las células acinares y ductales, ellas se secretan directamente a la LB y así pueden degradarla. Los estudios de la LB se realizaron detectando por inmunohistoquímica los componentes principales, laminina 1 y colágeno tipo IV, y también una evaluación por microscopía electrónica de transmisión (MET). En pacientes SS, los acinos y ductos presentaron una LB muy desorganizada y adelgazada, coincidente en algunos casos con la invasión en las regiones alteradas de la LB de acinos y ductos por linfocitos TCD8+ y TCD4+.⁽¹⁰⁾ La evaluación por MET confirmó estos resultados y, más aún, mostró cambios importantes en el polo apical de la célula acinar, microdominio de la membrana plasmática donde reside la mayoría de la maquinaria molecular que participa en la exocitosis de los gránulos de secreción. También se observó una aparente fusión de los gránulos de secreción; esta anomalía está descrita en otros tipos celulares y se relaciona con alteraciones en el proceso de exocitosis, llevando a una acumulación de estos gránulos.⁽⁶⁾ Sin embargo, a pesar de estos cambios, sobre un 60% de los pacientes presentan abundante cantidad de parénquima (~70%), y el informe de sus biopsias dice: “se observa gran cantidad de **parénquima conservado**”.

Estos resultados permitieron formular dos nuevas preguntas: 1. ¿Las LB recambian sus componentes? y 2. Considerando que la LB es un regulador de muchas funciones que son dependientes del diálogo célula-LB, ¿hay modificaciones en la expresión y/o modificaciones post-traduccionales de componentes de secreción? Nuestros resultados mostraron que las LB de los pacientes

SS estudiados sufren remodelamiento; encontramos una sobreexpresión en mRNA y de proteínas de laminina-5. Un resultado de gran interés fue la evaluación de la expresión de nidógenos 1 y 2 (150 y 200 kDa, respectivamente), cuyos niveles de expresión de mRNA y proteínas no se modificaron en relación con los controles, pero mostraron una intensa banda electroforética de degradación (135 kDa). Esto último podría explicar la desorganización de la LB; a pesar del incremento de laminina-5, la falta de nidógeno y su función entrecruzante no permitirían una correcta organización de ella.⁽¹¹⁾ Por lo tanto, el parénquima está presente, pero con características patológicas. De ahí es de esperar que su funcionalidad secretora esté alterada. En paralelo se estudió uno de los receptores de adhesión que unen la célula acinar con la LB, más específicamente la integrina $\alpha 6 \beta 4$ con la laminina-5.⁽¹⁴⁾ Los resultados mostraron que en las regiones donde había pérdida de esta laminina, la integrina se internalizó al citoplasma, demostrando la pérdida de anclaje. Proteínas que se asocian a la integrina $\beta 4$ en la membrana plasmática, BP180 o colágeno XVII, o en la región citosólica, proteína BP230, están siendo estudiadas. Su prefijo BP viene de *bullous pemphigoid*; ambas proteínas han sido asociadas a otras enfermedades autoinmunes en otros epitelios.

La consecuencia de la pérdida de anclaje podría repercutir en el estado diferenciado de la glándula, porque estos receptores (integrinas) no sólo tienen la función de anclaje, sino que además ellos señalizan, desencadenando cascada de transducción de señales que modulan procesos celulares; de ahí el abordaje de la pregunta 2. Para ello, se identificaron mucinas específicas de estas glándulas, como son MUC5B, MUC7 y MUC1. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular, organizadas por unidades repetidas de aminoácidos que se conectan a través de puentes disulfuros; pueden ser solubles (MUC5B y MUC7) o integrales de membrana plasmática (MUC1). En pacientes SS, MUC5B mostró una expresión de mRNA y proteínas semejantes a controles; su detección inmunohistoquímica reveló una mayor inmunorreactividad que los controles. La determinación de modificaciones post-traduccionales a nivel de los oligosacáridos (residuos de azúcares sialilados y sulfatados) mostró una marcada disminución en los niveles de sulfatación. Interesantemente, tanto pacientes que presentaban un flujo salival no estimulado muy bajo (normal, 1,5 mL/15 minutos) o cercano a lo normal mostraron un porcentaje de acinos con MUC5B no sulfatada similar. Este hallazgo es relevante, porque los grupos sulfatos son hidrofílicos, y, en consecuencia son los que participan en la lubricación de las mucosas; por lo tanto, éste sería uno de los factores que podrían explicar el “fenotipo seco” que padecen los pacientes SS. Ambos

grupos de pacientes manifestaban la sensación de boca seca; por ende, la cantidad de agua no es suficiente para evaluar boca seca. Por otra parte, la detección simultánea de componentes de LB y mucinas corroboran que aquellos acinos con LB desorganizadas presentan una sulfatación disminuida. Estos resultados muestran cambios en los patrones de diferenciación de la célula acinar.^(12, 13)

En conclusión, en una enfermedad autoinmune, como es el síndrome de Sjögren, existe una perturbación en el diálogo de la célula epitelial con su MEC, afectando la arquitectura y función de los acinos. ¿Cómo contribuye esta pérdida de diálogo en la autoinmunidad de este síndrome?

Estos estudios han sido financiados por los proyectos FONDECYT 1080006, 1020755 y 1050192.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinkstaff CA. Cytology, histology and histochemistry of salivary glands: an overview. In: Dobrosielski-Vergona K, editor. *Biology of the Salivary Glands*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc; 1993, pp. 15-38.
2. Aumailley M, El Khal A, Knoss N, Tunggal L. Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol* 2003; 22(1):49-54.
3. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 2005. (In press).
4. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285(5430):1028-32.
5. Robinson CP, Yamamoto H, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD (nonobese diabetic)-scid mouse in the absence of detectable lymphocytic infiltration: a potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79(1):50-9.
6. Goicovich E, Molina C, Perez P, Aguilera S, Fernandez J, Olea N, Alliende C, Leyton C, Romo R, Leyton L, Gonzalez MJ. Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum* 2003; 48(9):2573-84.
7. González MJ, Molina C, Alliende C, Pérez P, Goicovich E. Matriz extracelular de glándulas salivares en el síndrome de Sjögren. En: Anaya JM, Ramos M, García M, editores. *Síndrome de Sjögren*. Medellín, Corporación para Investigaciones Biológicas, 2001, pp. 113-30.
8. Pérez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, Pinto R, Romo R, Martínez B, González MJ. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2000; 43(12):2807-17.
9. Pérez P, Kwon YJ, Alliende C, Leyton L, Aguilera S, Molina C, Labra C, Julio M, Leyton C, González MJ. Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjögren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. *Arthritis Rheum* 2005 (Sep); 52(9):2751-60. (ISI: 6,787)
10. Molina C, Alliende C, Aguilera S, Kwon YJ, Leyton L, Martínez B, Leyton C, Pérez P, González MJ. Basal lamina disorganization of the acini and ducts of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: association with mononuclear cell infiltration. *Ann Rheum Dis* 2006 (Feb); 65(2):178-83.
11. Kwon YJ, Pérez P, Aguilera S, Molina C, Leyton L, Alliende C, Leyton C, Brito M, Romo R, González MJ. Involvement of specific laminins and nidogens in the active remodeling of the basal lamina of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2006 (Nov); 54(11):3465-75.
12. Anaya JM, Vega P, Correa P, Kwon YJ, Brito M, Alliende C, González MJ. Síndrome de Sjögren. En: Anaya JM, Shoenfeld Y, Correa P, García M, Cervera R, editores. *Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune*. Medellín, Corporación para Investigaciones Biológicas, 2005, pp. 295-315.
13. Alliende C, Kwon YJ, Brito M, Molina C, Aguilera S, Pérez P, Leyton L, Quest AF, Mandel U, Veerman E, Espinosa M, Clausen H, Leyton C, Romo R, González MJ. Reduced sulfation of MUC5B is linked to xerostomia in Sjögren's Syndrome patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008; 67:1480-1487
14. José Velozo, Sergio Aguilera, Cecilia Alliende, Patricia Ewert, Claudio Molina, Paola Pérez, Lisette Leyton, Andrew Quest, Mónica Brito, Sergio González, Cecilia Leyton, Marcela Hermoso, Rafael Romo and María-Julieta González. Dramatic changes in the polarized expression of the $\alpha 6 \beta 4$ integrin and their relationship with the basal lamina organization in salivary acini from Sjögren's syndrome patients. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 991-996.
15. María-Carolina Páez, María-Julieta González, Norma C. Serrano, Yehuda Shoenfeld and Juan-Manuel Anaya. Physiological and Pathological Implications of Laminins: From the Gene to the Protein. *Autoimmunity* 2007 (Mar); 40(2):83-94. (Review.)