

R.19356

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Te
616.53-002
VAR

**ESTUDIO FENOTIPICO Y FUNCIONAL
LINFOCITARIO EN PACIENTES CON
GASTRITIS CRONICA AUTOINMUNE Y
ANEMIA PERNICIOSA**



Biblioteca
de Medicina
José Antonio Vargas Núñez

Madrid, 1992



La Tesis doctoral de D. JUAN ANTONIO VARGAS

DURAZO

titulada ESTUDIO FENOTÍPICO Y FUNCIONAL LINFOCITARIO
EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA AUTÓLOGA Y MENA PERNI-
CIOSA

Director Dr. D. ALBERTO DURANTEZ MARTINEZ

fue leída en la Facultad de MEDICINA de la
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

el día 12 de JULIO de 1991 ante el tribunal constituido
por los siguientes Profesores:

Presidente MANUEL DIAZ RUBIO

Vocal JUAN MARTINEZ LOPEZ DE LETONA

Vocal JOSE LUIS ALVAREZ - SÁLA WALTER

Vocal OCTAVIO SALMERON VIGIL

Secretario RAFAEL LAGUNA MARTINEZ

habiendo recibido la calificación de APTO CUM LAUDE
POR VUANIMIDAD

Madrid, a 12 de Julio de 1991

El Secretario del Tribunal,

Rafael

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ESTUDIO FENOTIPICO Y FUNCIONAL LINFOCITARIO
EN PACIENTES CON GASTRITIS CRONICA
AUTOINMUNE Y ANEMIA PERNICIOSA

TESIS DOCTORAL

JUAN ANTONIO VARGAS NUÑEZ

DIRECTORES: ALBERTO DURANTES MARTINEZ
MELCHOR ALVAREZ DE MON SOTO



Departamento de Medicina

*Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid*

D. MANUEL DÍAZ-RUBIO GARCÍA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

I N F O R M A :

que el proyecto de tesis doctoral que presenta D. JOSÉ ANTONIO VALVERDE LÓPEZ, bajo la dirección del Sr. D. MANUEL DÍAZ-RUBIO GARCÍA y que lleva por título "ESTUDIO FENOTÍPICO Y FUNCIONAL LINFOCITARIO EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA AUTOINMUNE Y ANEMIA PERNICIOSA", reúne los requisitos necesarios para proceder a su lectura en un tribunal.

rogado que extiendo el presente informe, a petición del Sr. D. JOSÉ ANTONIO VALVERDE LÓPEZ, en Madrid a dieciséis de mayo de mil novecientos noventa y uno.

D. ALBERTO DURANTEZ MARTINEZ, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID Y D. MELCHOR ALVAREZ DE - MON SOTO, CATEDRATICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES.

CERTIFICAN :

Que D. JUAN ANTONIO VARGAS NUÑEZ, natural de -- Madrid, con D.N.I. 5374410, Licenciado en Medicina y Cirugía ha trabajado bajo nuestra dirección y asesoramiento directo en la elaboración de su Tesis Doctoral : "Estudio fenotípico y funcional linfocitario en pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa", considerando que se encuentra en las debidas condiciones para ser sometida al correspondiente exámen ante el Tribunal que proceda.

Madrid, 27 de mayo de 1991.



Fdo.: Dr. A. Durántez



Fdo.: Dr. M. Álvarez de Mon.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta Tesis doctoral han participado numerosas personas a las que tengo el deber de ofrecer mi más sincero agradecimiento.

Comenzaré por los Dres. Alberto Durántez y Melchor Alvarez de Mon, directores de esta Tesis, que me otorgaron su experiencia y conocimientos además de su amistad.

Al Dr. Espinós, por la confianza depositada en mí y en la presente Tesis.

La colaboración prestada por los Servicios de Gastroenterología, Hematología y Medicina Interna de la Clínica Puerta de Hierro fue esencial en la captación de los pacientes. Tanto a éstos como a las personas que participaron como controles les expreso mi gratitud.

Así mismo la ayuda prestada por otros Servicios de la Clínica Puerta de Hierro fue determinante en la culminación de este trabajo. El Dr. Kreisler me permitió el acceso a las instalaciones del Servicio de Inmunología. Isabel Pérez se encargó de las extracciones sanguíneas mostrando suma paciencia conmigo. Los Servicios de Hematología, Bioquímica y Medicina Nuclear realizaron las diversas exploraciones analíticas complementarias. A Beni Alvarez debo el análisis fenotípico de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo. El Servicio de Cirugía Experimental a través de María del Mar López e Isabel Candela me proporcionó una perfecta asistencia editorial.

Los comentarios, ideas y consejos recibidos por numerosas personas fueron esenciales para la realización de esta Tesis. Con temor a olvidarme de alguien citaré a : A. Abbillos, C. Isasi, F. Gambón, A. González, J.A. Girón, J.L.

Menéndez, J.E. Alás, F. Merino, F. Bonilla. La Dra. Isabel Millán fue fundamental en el análisis estadístico de los resultados.

Una serie de personas colaboraron conmigo estrechamente apoyándome en todo momento. Citaré a L. Manzano (compañero de fatigas), M. Marazuela, F. Albarrán, A.F. Corugedo, F. González, F. Lacomá. Es difícil de expresar la ayuda prestada por Gloria Peraile y Concepción Lorences. Ellas fueron quienes me introdujeron en el complicado mundo del laboratorio, ofreciéndome su ayuda constante y su amistad.

A todos los miembros de mi Servicio, especialmente los Residentes por facilitarme el tiempo necesario para la realización de este trabajo. Mención especial he de hacer del Dr. Miguel Yebra Bango, maestro y amigo.

Finalmente a mis padres, a Paloma Vargas y en especial a María José y a mi hija María, auténticas responsables de que esta Tesis haya podido realizarse.

A María José y María
A mis Padres
A Hortensia y Pepe

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	15
I. ASPECTOS HISTORICOS, CLINICOS, DIAGNOSTICOS Y TERAPEUTICOS DE LA GASTRITIS CRONICA AUTOINMUNE Y ANEMIA PERNICIOSA	17
II. FACTORES ETIOPATOGENICOS DE LA GASTRITIS CRONICA Y ANEMIA PERNICIOSA	28
A) FACTORES EXOGENOS	28
1) Alimentos y deficiencias nutricionales.....	28
2) Alcohol, tabaco y fármacos.....	29
3) Helicobacter pylori.....	29
B) FACTORES ENDOGENOS	30
1) Envejecimiento.....	30
2) Factores genéticos.....	30
3) Factores inmunológicos.....	31
a) Naturaleza de la lesión gástrica. Estudios cuantitativos de las poblaciones linfoides en mucosa gástrica y sangre periférica..	32
b) Anticuerpos gástricos.....	33
c) Estudios funcionales de las células mononucleares de sangre periférica.....	36
d) Asociación con otras enfermedades autoinmunes.....	36
e) Respuesta a agentes inmunosupresores....	37
III. SISTEMA INMUNE	37
A) BASE CELULAR DEL SISTEMA INMUNE	41
1) Linfocitos T.....	41
2) Linfocitos B.....	43
3) Células accesorias.....	44
4) Células NK.....	44

B) BASE MOLECULAR DEL SISTEMA INMUNE. LINFOCINAS Y MONOCINAS.....	46
C) ACTIVACION LINFOCITARIA.....	54
1) Activación de los linfocitos T.....	54
2) Activación de los linfocitos B.....	60
3) Activación de las células NK.....	64
<u>OBJETIVOS</u>	68
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	70
I. MATERIALES Y REACTIVOS.....	71
A) MATERIALES.....	71
B) REACTIVOS.....	73
C) REACTIVOS UTILIZADOS EN CULTIVOS CELULARES.....	74
D) MEDIOS Y TAMPONES.....	75
E) LINEAS CELULARES.....	75
II. POBLACION OBJETO DE ESTUDIO.....	76
III. METODOS.....	78
A) OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	78
B) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.....	78
C) AISLAMIENTO DE SUBPOBLACIONES CELULARES.....	79
D) RECUESTO Y ESTUDIO DE VIABILIDAD DE LAS POBLACIONES OBTENIDAS.....	80
E) CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS POBLACIONES CELULARES.....	81
F) CULTIVOS CELULARES.....	83
G) PRODUCCION DE SOBRENADANTES CONTENIENDO LINFOCINAS.....	85

	10
H) ENSAYO DE DETECCION DE LA ACTIVIDAD IL-2.....	85
I) ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NK.....	86
IV. ANALISIS ESTADISTICO.....	87
RESULTADOS	89
I. DATOS CLINICOS.....	90
II. DETERMINACIONES ANALITICAS.....	93
III. ESTUDIOS RADIOLOGICOS, ENDOSCOPICOS Y BIOPSIOS.....	95
IV. OTRAS PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.....	95
V. ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	96
A) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE PACIENTES CON "ANEMIA PERNICIOSA HEMATOLOGICAMENTE RESUELTA".....	96
1) Estudio fenotípico de las células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T purificados.....	96
2) Respuesta proliferativa de CMSP y linfocitos T purificados.....	98
a) Respuesta blastogénica de CMSP y linfocitos T, basalmente y tras adición al medio de fitohemaglutinina.....	98
b) Respuesta proliferativa de los CMSP a los mitógenos que interaccionan selectivamente con el complejo CD3/Ti.....	105
c) Respuesta proliferativa de los linfocitos T a mitógenos que actúan sobre proteincinasa C.....	107
3) Estudio de la implicación de la interleucina-2 en la activación del linfocito T.....	107

- a) Producción de sobrenadantes con actividad IL-2..... 109
 - b) Expresión de moléculas de activación... 109
 - c) Respuesta blastogénica del linfocito T en presencia de IL-2 recombinante..... 112
- 4) Estudio funcional de la población linfoide B..... 114
- 5) Estudio de la actividad NK..... 118
- B) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE PACIENTES CON "ANEMIA PERNICIOSA"..... 118
- 1) Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados..... 120
- 2) Respuesta proliferativa de CMSP y linfocitos T purificados..... 120
- a) Respuesta blastogénica de linfocitos T, basalmente y tras adición al medio de fitohemaglutinina..... 120
 - b) Respuesta proliferativa de las CMSP a los mitógenos que interaccionan selectivamente con el complejo CD3/Ti..... 124
 - c) Respuesta proliferativa de los linfocitos T a mitógenos que actúan sobre proteínacinasas C..... 127
- 3) Estudio de la implicación de la interleucina-2 en la activación del linfocito T..... 127
- a) Producción de sobrenadantes con actividad IL-2..... 127
 - b) Expresión de moléculas de activación... 130

- c) Respuesta blastogénica del linfocito T en presencia de IL-2 recombinante..... 130
- 4) Estudio funcional de la población linfoide B..... 133
- 5) Estudio de la actividad NK..... 133
- C) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE SEGUIMIENTO DE UNA MUESTRA DE PACIENTES CON ANEMIA PERNICIOSA NO TRATADA Y EN TRATAMIENTO CON VITAMINA B12 DURANTE 2 Y 6 MESES..... 136
- 1) Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados..... 136
- 2) Respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaglutinina e IL-2..... 138
- 3) Estudio de la actividad NK..... 138
- D) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE PACIENTES CON "GASTRITIS CRONICA AUTOINMUNE"..... 141
- 1) Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados..... 141
- 2) Respuesta proliferativa de las CMSP y linfocitos T purificados..... 141
- a) Respuesta blastogénica de linfocitos T, basalmente y tras adición al medio de fitohemaglutinina..... 141
- b) Respuesta proliferativa de las CMSP a los mitógenos que interaccionan selectivamente con el complejo CD3/Ti..... 143

c) Respuesta proliferativa de los linfocitos T a mitógenos que actúan sobre proteincinasa C.....	143
3) Estudio de la implicación de la interleucina 2 en la activación del linfocito T.....	149
a) Producción de sobrenadantes con actividad IL-2.....	149
b) Expresión de moléculas de activación...	149
c) Respuesta blastogénica de linfocito T en presencia de Il-2 recombinante.....	149
4) Estudio de la población linfocida B.....	152
5) Estudio de la actividad NK.....	152
VI. CORRELACIONES CLINICO-INMUNOLOGICAS.....	156
<u>DISCUSION</u>	157
I. CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES INVESTIGADOS.....	158
II. ANALISIS DEL ESTUDIO FENOTIPICO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA.....	160
III. ANALISIS DEL ESTADO FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS T...	161
IV. ANALISIS DEL ESTADO FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS B...	168
V. ANALISIS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NK.....	170
<u>CONCLUSIONES</u>	172
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	175

Indice de Abreviaturas.

AcMo	:	anticuerpo monoclonal
Ag	:	antígeno
A.P.	:	anemia perniciosa
A.P.H.R.	:	anemia perniciosa hematológicamente resuelta
CD	:	grupo de diferenciación
CMSP	:	células mononucleares de sangre periférica
cpm	:	cuentas por minuto
DE	:	desviación estandar
DNA	:	ácido desoxirribonucleico
ELISA	:	enzimoimmunoensayo
FITC	:	isotiocianato de fluoresceína
G.C.A.	:	gastritis crónica autoinmune
³ HT	:	timidina tritiada
Ig	:	inmunoglobulina
IgS	:	inmunoglobulina de superficie
IL	:	interleucina
INF	:	interferón
NK	:	citotoxicidad natural
PHA	:	fitohemaglutinina
PMA	:	forbol miristato acetato
r	:	recombinante
R	:	receptor
SAC	:	proteína A del estafilococo aureus cepa CowanI
SBF	:	suero bovino fetal
SN	:	sobrenadante
SNst	:	sobrenadante estandar
SPH	:	sistema principal de histocompatibilidad
Ti ó TCR	:	receptor específico del linfocito T

INTRODUCCION

La gastritis crónica es un proceso inflamatorio de etiología desconocida, que afecta exclusivamente a la capa mucosa de la pared gástrica^(1,2). De su definición se desprende que se trata de un término histológico, ya que no se acompaña de una sintomatología característica e incluso en muchos casos puede ser asintomática. Únicamente aparece un cuadro clínico definido si, en su evolución, se desarrolla anemia perniciosa. Esta se produce cuando la mucosa gástrica es incapaz de secretar factor intrínseco impidiendo la absorción de vitamina B12 en íleon terminal, lo que determina una hematopoyesis anormal^(3,4).

La lesión gástrica en los pacientes con gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa es morfológicamente indistinguible de la de los enfermos con anemia perniciosa. Asimismo, parece que los posibles factores etiopatogénicos son comunes a ambas situaciones. Por estos motivos se considera la gastritis crónica autoinmune como un estadio latente o previo a la anemia perniciosa⁽⁵⁾.

Aunque se desconoce el mecanismo íntimo de la lesión gástrica, la gastritis crónica autoinmune y la anemia perniciosa se consideran enfermedades de probable origen en una alteración de la autorreactividad fisiológica del sistema inmune dados los hallazgos clínicos, histológicos e inmunológicos. Entre éstos se pueden destacar: la naturaleza de la lesión gástrica, las anomalías fenotípicas y funcionales de los linfocitos de sangre periférica y mucosa gástrica, la presencia de autoanticuerpos gástricos y su asociación con diversas enfermedades autoinmunes y tipos HLA⁽⁵⁻¹⁰⁾.

I.- ASPECTOS HISTORICOS, CLINICOS, DIAGNOSTICOS Y TERAPEUTICOS DE LA GASTRITIS CRONICA AUTOINMUNE Y ANEMIA PERNICIOSA.

ASPECTOS HISTORICOS

Thomas Addison, en una conferencia de la Sociedad Médica Londinense en 1849, realizó la primera descripción claramente reconocible de anemia perniciosa, aunque el no le dió esta denominación. Austin Flint de forma intuitiva relacionó la anemia perniciosa con una degeneración de las glándulas gástricas⁽⁹⁾. Sin embargo, fue Fenwick⁽¹¹⁾ en 1870 el que proporcionó la primera evidencia histológica de atrofia gástrica y dos años mas tarde fue denominada anemia perniciosa por Biermer^(6,9).

Inicialmente la conexión causal entre la anemia y la gastritis fue incomprensible, aunque se había observado una respuesta reticulocitaria en pacientes que habían tomado grandes cantidades de hígado cocinado (Minot y Murphy, 1926)⁽¹²⁾. La explicación de este hecho fue dada por Castle⁽¹³⁾ quien mostró que la combinación de un "factor extrínseco" identificado como vitamina B12 y un "factor intrínseco" en el jugo gástrico, daban lugar a la respuesta reticulocitaria. Más tarde, otros estudios demostraron la existencia de títulos séricos elevados de autoanticuerpos gástricos⁽¹⁴⁾. Finalmente, por el cumplimiento de los criterios de enfermedad autoinmune de Mackay y Burnet, la anemia perniciosa y la gastritis crónica autoinmune se consideraron como una única entidad denominada enfermedad autoinmune gástrica⁽⁹⁾.

ASPECTOS CLINICOS, DIAGNOSTICOS Y TERAPEUTICOS

La anemia perniciosa se define como una pancitopenia megaloblástica causada por malabsorción de vitamina B12 secundaria a la deficiencia de factor intrínseco^{2,4}. Sin embargo, aunque la anemia perniciosa está siempre asociada a gastritis crónica atrófica, aclorhidria y malabsorción de B12, no todas las formas de gastritis crónica y malabsorción de B12 representan anemia perniciosa⁶. Por ello debemos considerar en primer lugar la situación de la anemia perniciosa dentro del amplio espectro de variedades de gastritis y malabsorción de B12.

ANEMIA PERNICIOSA Y GASTRITIS

Cuando hablamos de gastritis asociada a anemia perniciosa, nos referimos únicamente al tipo de lesión denominada gastritis crónica autoinmune^{2,5,10,15,16}.

La gastritis aguda es un proceso autolimitado que retrocede cuando el agente desencadenante (alcohol, drogas, tóxicos, radiación, gérmenes, etc.) desaparece. No progresa a gastritis crónica y por tanto no se relaciona con la anemia perniciosa^{2,10}.

Ciertas enfermedades inflamatorias crónicas del estómago como la gastritis hipertrófica hipersecretora, la gastritis granulomatosa, la gastritis infecciosa o la gastritis eosinofílica, son entidades nosológicas diferentes no relacionadas con la anemia perniciosa^{2,4,15,16}.

El primer problema que plantea el estudio de la gastritis crónica es su clasificación. Sin embargo, a partir de la utilización de las técnicas endoscópicas y la toma de biopsias múltiples se han realizado dos tipos de clasificaciones en base a criterios histológicos e inmunológicos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

La clasificación histológica de la gastritis crónica está basada en el grado de intensidad de las lesiones⁽¹⁷⁾. Se distinguen:

1.- Gastritis crónica superficial. Es un proceso frecuente que llega a afectar a más del 50% de la población por encima de 40 años. Se caracteriza histológicamente por la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico en el tercio luminal de la mucosa, constituido fundamentalmente por linfocitos y células plasmáticas. La estructura glandular está conservada y el epitelio de superficie muestra sólo cambios leves e inespecíficos. Si bien la evolución de esta lesión no se conoce con claridad, parece relacionarse en algunos casos con la aparición de una gastritis crónica atrófica a largo plazo.

2.- Gastritis crónica atrófica. Se define histológicamente por la presencia de una mucosa gástrica adelgazada en la que el infiltrado inflamatorio previamente descrito se extiende a la zona glandular, con pérdida variable de ésta y con la consiguiente disminución del número de células parietales y principales. Existe también alteración del epitelio de revestimiento, apareciendo zonas de metaplasia intestinal y pilórica.

3.- Atrofia gástrica. Al avanzar la gastritis crónica

atrófica desaparecen las glándulas gástricas, el infiltrado inflamatorio acompañante es mínimo y la metaplasia es más generalizada.

En 1973, Strickland y Mackay⁽¹⁸⁾, y en 1988 Correa⁽¹⁹⁾, proponen una clasificación de la gastritis crónica atrófica en base a criterios histológicos, topográficos, analíticos e inmunológicos:

1.- Gastritis crónica tipo A ó autoinmune o corporal difusa. Constituye la lesión anatómica gástrica asociada a la anemia perniciosa. Se caracteriza por atrofia de la mucosa del cuerpo y fondo con pérdida de glándulas oxínticas y sin afectación del antro o con gastritis antral superficial. Otras características son: ausencia o disminución de la secreción de ácido, pepsinógeno y factor intrínseco; elevación de la gastrina sérica y presencia en suero y jugo gástrico de autoanticuerpos gástricos. Se transmite de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta. Asimismo, en estos pacientes la incidencia de carcinoma gástrico parece estar aumentada⁽¹⁹⁾, aunque es tema actual de controversia.

2.- Gastritis crónica tipo B ó no autoinmune o antral difusa. Se caracteriza por afectación del antro y cambios en el cuerpo de carácter focal. Existe una marcada disminución de la secreción ácido-péptica-gástrica, con niveles de gastrina sérica normales o bajos. Se asocia con la enfermedad ulcerosa péptica. La presencia de los mencionados autoanticuerpos es inusual. Sin embargo, en un porcentaje mínimo de pacientes se han encontrado algunos autoanticuerpos con especificidad frente a células secretoras de gastrina, lo que supondría la posible existencia de una variante autoinmune⁽²⁰⁾.

3.- Gastritis crónica mixta o tipo AB o multifocal.

Está afectada tanto la mucosa antral como la fúndica con una distribución multifocal. Es el tipo más frecuente y se caracteriza por: disminución de la secreción gástrica ácido péptico, niveles de gastrina sérica variables, ausencia de detección de autoanticuerpos gástricos y cuantificación de vitamina B12 normal. Se asocia a la úlcera gástrica y tiene una incidencia mayor de carcinoma gástrico. Se ha descrito una predisposición genética tipo autosómica recesiva, aunque se necesitan mayores estudios para su confirmación⁽⁹⁾.

ANEMIA PERNICIOSA Y MALABSORCION DE B12

Al igual que existen gastritis no relacionadas con la anemia perniciosa, la deficiencia de vitamina B12 pueda ser secundaria a diferentes alteraciones no asociadas con aquella tales como el vegetarianismo estricto, la gastrectomía, ciertos parasitismos, patología o resección del ileon terminal, diversos fármacos (PAS, Colchicina, Neomicina) etc. Existen, sin embargo, ciertas anormalidades metabólicas de la absorción de B12 de muy baja prevalencia que tienen cierta similitud con la anemia perniciosa, aunque generalmente son fácilmente distinguibles por su aparición a temprana edad y por no afectar a la secreción ácida gástrica. Estas entidades son la anemia perniciosa congénita (déficit aislado de factor intrínseco o funcionalmente anómalo), el síndrome de Imerslund-Grasbeck (ausencia congénita o anormalidad del receptor ileal para la vitamina B12), y el defecto congénito de transcobalamina II⁽⁹⁾.

DEFICIENCIA DE COBALAMINA

En el hombre, la cobalamina tiene dos funciones metabólicas principales, en primer lugar participa en el metabolismo del folato y en segundo lugar es necesaria para la degradación de ciertos ácidos grasos⁽²¹⁻²³⁾.

1.- Metilación de la homocisteína en metionina. Esta reacción envuelve la transformación de 5N-metil-tetrahidrofólico (forma circulante del ácido fólico) en ácido tetrahidrofólico (forma activa intracelular) mediante la acción de la metilcobalamina. La deficiencia de cobalamina provoca un descenso en las concentraciones intracelulares de ácido tetrahidrofólico y un incremento de la eliminación urinaria de homocisteína. El acúmulo de folato circulante, metilfolato, se denomina "trampa del folato". Esto origina un trastorno en las reacciones que requieren folato incluyendo la síntesis de DNA. La sensibilidad e intensidad de la lesión que el déficit de síntesis de DNA ocasiona, está en relación con la velocidad de división celular, siendo más sensibles y por ende más lesionados aquellos tejidos con un alto índice mitótico (médula ósea; células epiteliales de los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital; gónadas y osteoblastos).

2.- Isomerización de metilmalonilcoenzima A a succinil-coenzima A. En el hombre, el proceso principal del metabolismo del propionil-coenzima A procede de la isomerización del metilmalonilcoenzima A a succinilcoenzima A, a través de la enzima metilmalonil-coA mutasa, que requiere la desoxiadenoxilcobalamina como cofactor esencial.

La carencia de cobalamina provoca el acúmulo

intracelular de metilmalonil-coA y propionil-coA, con un aumento de la eliminación del metilmalonato por la orina. El propionil-coA (con tres carbonos) es incorporado en la biosíntesis de ácidos grasos en lugar del acetyl-coA (con dos carbonos), dando lugar a ácidos grasos con un número impar de carbonos. Estos ácidos grasos anómalos son incorporados en los lípidos de la membrana de las células neuronales provocando trastornos en la conducción nerviosa y posiblemente interviniendo en el proceso de desmielinización. Este trastorno metabólico es la causa de las alteraciones neurológicas observadas en la deficiencia de cobalamina.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA GASTRITIS CRÓNICA Y ANEMIA PERNICIOSA.

En la mayoría de los casos, la gastritis crónica es asintomática y en otros las manifestaciones clínicas son inespecíficas, englobables en el concepto de dispepsia. Sólo aparece un cuadro clínico definido al desarrollarse la anemia perniciosa⁽²¹⁻²³⁾.

El inicio del cuadro clínico es lento, pues la anemia, de carácter crónico, es bien tolerada a pesar de cifras bajas de hemoglobina. La triada clásica formada por palidez marcada, ardor lingual (glositis atrófica) y parestesias es infrecuente⁽²¹⁻²³⁾.

Las manifestaciones neurológicas son muy variables y se relacionan con el tiempo de evolución de la enfermedad. Su forma más típica es la mielosis funicular o degeneración combinada de los cordones espinales (posteriores y laterales). En los casos leves, únicamente se manifiesta como parestesias e hiporreflexia; en los casos avanzados y graves puede

apreciarse pérdida de fuerza, alteraciones de la marcha, y trastornos de la sensibilidad de posición y vibración en grado variable con un signo de Romberg positivo, hiperreflexia, síndrome piramidal y polineuropatía ⁽²⁴⁾. En raras ocasiones se observa este cuadro clínico sin anemia megaloblástica⁽²⁵⁾.

Pueden existir también manifestaciones psiquiátricas en forma de cuadro depresivo, trastornos de la conducta, pérdida de memoria y demencia, incluso en ausencia de anemia o macrocitosis⁽²⁶⁾.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA GASTRITIS CRÓNICA Y ANEMIA PERNICIOSA.

1.- Se describen a continuación los hallazgos encontrados en la anemia perniciosa, dado que la gastritis crónica no se asocia con alteraciones en los parámetros bioquímicos o hematológicos determinados habitualmente^(21-23,27,28).

A.- Hemograma. En el hemograma característicamente se objetiva la presencia de anemia macrocítica normocrómica, con VCM > 100 fl (frecuentemente entre 110-140 fl en casos graves). La morfología de los hematíes en los frotis es anormal con eliptocitosis, anisopoiquilocitosis, macrocitosis, observándose en ocasiones eritroblastos. Los reticulocitos pueden ser normales o estar ligeramente disminuidos en relación con el grado de anemia. Es frecuente observar moderada leucopenia, siendo característica la existencia de neutrófilos hipersegmentados. Los recuentos de plaquetas pueden estar también disminuidos, especialmente en los pacientes muy anémicos.

B.- Médula ósea. La médula ósea es hipercelular, con hiperplasia de la serie eritroide, presencia de eritroblastos de gran tamaño con intensa basofilia, fundamentalmente en las formas jóvenes. La cromatina tiene un aspecto perlado, evidenciando un fallo en la maduración nuclear. Las series mielóide y megacariocítica muestran también megaloblastosis, siendo característica la presencia de metamielocitos gigantes, neutrófilos hipersegmentados y megacariocitos con citoplasma anormalmente amplio. Mediante tinción de Perls se observa un excesivo número de sideroblastos y aumento del hierro macrofágico.

C.- Pruebas bioquímicas. Se observa hiperbilirrubinemia indirecta, incremento de la lacticodehidrogenasa (LDH) y disminución de la haptoglobina debido al aumento de la destrucción de los hematíes por macrocitosis y hematopoyesis ineficaz. La sideremia y la ferritina suelen encontrarse elevadas.

2.-PRUEBAS ESPECIFICAS

A.- Determinación de la cobalamina plasmática mediante radioinmunoensayo ⁽²⁹⁾. Los valores normales oscilan entre 300 y 1000 pg/ml. Cifras inferiores a 120 pg/ml caracterizan la deficiencia de cobalamina y las de 120 a 300 aconsejan el seguimiento del paciente.

B.- Test de Schilling. Se objetiva una marcada disminución de la absorción de cobalamina. La normalización de la prueba mediante la administración de factor intrínseco junto con la cobalamina, es imprescindible para establecer el diagnóstico⁽³⁰⁾.

C.- Determinación sérica de anticuerpos antifactor intrínseco y anticélulas parietales gástricas^(5,9). La sospecha de anemia perniciosa por datos clínicos o por una prueba de Schilling anormal se eleva si existen anticuerpos contra el factor intrínseco y/o las células parietales gástricas.

D.- Estudio endoscópico y biopsia gástrica. La imagen endoscópica característica en la gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa es una mucosa tanto pálida como eritematosa, con pérdida de pliegues y en casos avanzados, visualización de vasos submucosos por atrofia de la mucosa. Pueden encontrarse pólipos a cualquier nivel de origen hiperplásico así como tumores carcinoides⁽¹¹⁾. El diagnóstico definitivo se realiza por medio del estudio histológico, para lo cual deben tomarse biopsias del antro, cuerpo y fundus gástrico⁽²⁾. Habitualmente se observará una gastritis crónica atrófica de cuerpo y fondo sin afectación del antro o con una gastritis antral superficial. El análisis del jugo gástrico demostrará invariablemente aclorhidria histaminorresistente. Todos estos datos se completarán con la determinación de pepsinógeno I y gastrina, que mostrará hipopepsinogenemia e hipergastrinemia^(11,33).

EVOLUCION DE LA GASTRITIS CRONICA Y ANEMIA PERNICIOSA

La lesión gástrica puede mantenerse sin variaciones durante largos períodos de tiempo, mientras que en otros casos progresa hacia atrofia gástrica o excepcionalmente remite llegando incluso a la normalidad⁽²⁴⁾.

Un 16% de los pacientes con gastritis crónica autoinmune desarrollará una anemia perniciosa latente o manifiesta en un plazo medio de ocho años⁽¹¹⁾. También puede

aparecer deficiencia de hierro^(35,36).

En los pacientes con anemia perniciosa después de la administración de vitamina B12 se observará una rápida normalización de todos los parámetros clínicos y analíticos, a excepción de los cambios irreversibles producidos en el sistema nervioso⁽³⁷⁾.

Asimismo, aunque es objeto de controversia, dada la mayor incidencia de carcinoma gástrico en estos pacientes, deben ser revisados periódicamente, realizando una endoscopia gástrica en caso de que aparezcan síntomas⁽³⁷⁾. Actualmente, mediante cuantificación del DNA y análisis del ciclo celular es posible que se puedan identificar a los pacientes con riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico⁽³⁸⁾.

TRATAMIENTO DE LA GASTRITIS CRÓNICA Y ANEMIA PERNICIOSA

El tratamiento de los pacientes con gastritis crónica es sintomático, procurando evitar factores irritantes gástricos y empleando antiácidos si aparecen síntomas dispépticos, aunque la respuesta obtenida suele ser variable^(35,16).

En los pacientes con anemia perniciosa el único tratamiento es la administración de hidroxocobalamina o cianocobalamina durante toda la vida^(39,40). Un esquema de tratamiento puede ser el siguiente : 1000 µg a días alternos durante la primera semana; 1000 µg dos veces por semana en la segunda y 1000 µg a la semana durante la tercera y la cuarta. De mantenimiento se utilizará una dosis de 100 µg mensualmente. La administración de dosis masivas de vitamina B12 no sólo no acelera la normalización de la megaloblastosis, sino que incluso es causa de complicaciones trombóticas, embólicas,

hipopotasemia, trombocitosis importantes y alteraciones en los lípidos plasmáticos⁽³⁹⁾.

Hay que monitorizar la respuesta al tratamiento. En las primeras veinticuatro horas desciende la concentración sérica de hierro, que puede permanecer baja durante varias semanas. El segundo día se inicia una reticulocitosis, alcanzando un máximo hacia el séptimo. En los casos en que no se produce respuesta reticulocitaria o es menor de lo esperado se deben investigar otros factores que contribuyen a la anemia (infección, déficit coexistente de ácido fólico o hipotiroidismo). Durante la primera fase del tratamiento es aconsejable controlar la concentración sérica de potasio y administrar un suplemento del mismo si es necesario⁽³⁹⁻⁴⁰⁾.

II.- FACTORES ETIOPATOGENICOS DE LA GASTRITIS CRONICA Y ANEMIA PERNICIOSA

En la etiopatogenia de la gastritis crónica y anemia perniciosa se han implicado muchos factores⁽⁴¹⁾.

A.- FACTORES EXOGENOS

1.- Alimentos y deficiencias nutricionales.

Se atribuyeron a las bebidas calientes, té y café una participación en el desarrollo de gastritis crónica, que posteriormente no se ha demostrado. En relación con las deficiencias nutricionales, se ha intentado correlacionar la aparición de gastritis crónica con los descensos de retinol, riboflavina y niacina, pero no se poseen suficientes datos para asegurarlo⁽⁴¹⁾.

2.- Alcohol, tabaco y fármacos.

Ha sido objeto de muchos estudios el papel del alcohol en el desarrollo de esta patología, pero tan sólo se ha podido establecer una relación con la gastritis crónica no autoinmune en algunos casos de etilismo crónico⁽⁴²⁾. En cuanto al papel del tabaco se ha encontrado una mayor frecuencia de gastritis crónica no autoinmune en aquellos fumadores que consumen más de 20 cigarrillos/día debido posiblemente a un aumento del reflujo duodeno-gástrico, con lesión de la barrera mucosa y retrodifusión de H^+ ⁽⁴³⁾. No se ha encontrado relación entre la gastritis crónica y el consumo de fármacos⁽⁴⁴⁾.

3.- Helicobacter pylori.

Es una bacteria espiral microaerofílica que se encuentra en la superficie de las células de la mucosa gástrica, protegida del ácido por la capa de moco que la envuelve y por las secreciones alcalinas de las células epiteliales. Son móviles en un medio altamente viscoso y parecen adaptarse especialmente a la capa mucosa de éstas células, ya que no se encuentran en áreas de metaplasia intestinal del estómago, y cuando se identifican en el duodeno sólo se localizan en zonas de metaplasia gástrica. Este microorganismo se ha relacionado con el desarrollo de la mayoría de las patologías gástricas, principalmente úlcera péptica y gastritis crónica B⁽⁴⁵⁾. Sin embargo, se ha observado que estos microorganismos se hallan menos frecuentemente en los pacientes con anemia perniciosa, probablemente relacionado con el desarrollo de extensas áreas de metaplasia intestinal^(46,47).

B.- FACTORES ENDOGENOS

1.- Envejecimiento.

Todos los estudios coinciden en demostrar que la prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad, especialmente por encima de la sexta década, aunque con variaciones geográficas⁽⁴⁸⁾.

2.- Factores genéticos.

Existen evidencias para pensar que la anemia perniciosa y la gastritis crónica autoinmune son enfermedades con bases genéticas^(49,53):

A) Relativa alta incidencia de la anemia perniciosa entre los habitantes del Norte y Este de Europa, posiblemente porque es el grupo de población mejor estudiado, siendo típica la asociación en sujetos con ojos azules y temprana aparición de canas⁽⁴⁹⁾.

B) Existencia entre los familiares de estos enfermos de mayor incidencia de anemia perniciosa, gastritis crónica atrófica y otros trastornos inmunológicos. Mientras que la prevalencia de anemia perniciosa en la población en general es de menos del 0.2%, la enfermedad se observa en el 20% de los parientes en primer grado de pacientes afectados. Así mismo se ha observado anemia perniciosa en gemelos homocigotos; sin embargo también se han encontrado discordancias sugiriendo que algún factor medioambiental puede influenciar el desarrollo de la enfermedad⁽⁵⁰⁾.

C) Según estudios recientes la gastritis crónica autoinmune se hereda de forma autosómica dominante⁽⁵¹⁾.

D) Los estudios HLA realizados han resultado discordantes, aunque parece existir una mayor asociación con HLA-A3 y HLA-B7⁽⁵²⁾. Estudios más recientes han mostrado una clara asociación con antígenos Dr⁽⁵³⁾. Se ha observado que el riesgo de anemia perniciosa en ausencia de enfermedad endocrina se relaciona con la combinación Dr2/Dr4 y Dr4/Dr5, mientras que en su presencia se asocia preferentemente a Dr3/Dr4.

3.- Factores inmunológicos.

Los hallazgos clínicos experimentales desarrollados hasta la actualidad, aunque precarios y limitados en diversos aspectos, permiten sugerir la participación patogénica del sistema inmune en el desarrollo de estos dos procesos. Esta posibilidad está basada en los siguientes hechos:

1.- Las características anatomopatológicas de la lesión gástrica con infiltración tisular por linfocitos y células plasmáticas.

2.- La asociación a alteraciones de la distribución de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica y mucosa gástrica.

3.- La objetivación de anomalías funcionales en los linfocitos de sangre periférica.

4.- La detección de títulos elevados de autoanticuerpos gástricos en suero y jugo gástrico.

5.- La asociación con otras enfermedades autoinmunes.

6.- La respuesta favorable a agentes inmunosupresores.

a) Naturaleza de la lesión gástrica. Estudios cuantitativos de las poblaciones linfoides en mucosa gástrica y sangre periférica.

Como ya se ha referido previamente la lesión gástrica se caracteriza por un infiltrado inflamatorio crónico en la mucosa gástrica, compuesto por linfocitos y células plasmáticas. Hasta el momento se dispone de muy escasa información sobre la composición de las células linfoides presentes en la mucosa gástrica de estos pacientes. Kaye y col.⁽⁵⁴⁾ estudiaron las subpoblaciones linfoides en mucosa gástrica utilizando una técnica de inmunoperoxidasa indirecta aplicada a secciones de biopsias gástricas de doce pacientes con anemia perniciosa. Las subpoblaciones de linfocitos T fueron identificadas mediante anticuerpos monoclonales, mientras los linfocitos no T fueron estimados indirectamente. Aunque el número de linfocitos T totales, supresores y cooperadores, fue significativamente mayor en el grupo de anemia perniciosa que en los controles, la diferencia más notoria estuvo en las células no-T que eran seis veces superiores en aquel. Sin embargo no pudieron discernir la estirpe de diferenciación de los linfocitos no T (linfocitos B o NK). En un modelo experimental animal de gastritis autoinmune, también se observó infiltración linfocitaria de la mucosa con evolución de células T hacia B a lo largo del tiempo de seguimiento de las lesiones⁽⁵⁵⁾.

Los estudios realizados en sangre periférica han dado resultados contradictorios. Los estudios iniciales de Imamura y col.⁽⁵⁶⁾ y Wodzinski y col.⁽⁵⁷⁾ en que observaron un aumento del cociente CD4/CD8 por disminución del CD8 no han sido posteriormente confirmados por Soler y col.⁽⁵⁸⁾ y Carmel y col.⁽⁵⁹⁾.

b) Anticuerpos gástricos

Son de dos tipos: anticuerpos anticélulas parietales gástricas (ACPG) y anticuerpos antifactor intrínseco (AFI).⁽⁵⁻⁹⁾

Los anticuerpos anticélulas parietales gástricas se detectan en el suero del 90% de los pacientes con anemia perniciosa y del 30 al 60% con gastritis crónica autoinmune. Existen dos variedades: una reacciona con el componente microsomal intracitoplasmático (AMCP)⁽⁶⁰⁾ y la otra con la superficie celular (ASCP)⁽⁶¹⁾. Se encuentran no solo en el suero (predominantemente IgG) sino que también en el jugo gástrico (IgG y fundamentalmente IgA). El AMCP ha sido identificado en las células plasmáticas de la mucosa gástrica. Como ocurre con otros autoanticuerpos en diferentes enfermedades con alteraciones en la autorreactividad del sistema inmune, la detección de estas inmunoglobulinas no es patognomónico de esta enfermedad sino que también se observa en pacientes con anomalías de la regulación del sistema inmune asociadas a lesión, preferentemente de un órgano diana, tales como: (trastornos tiroideos, 20-30%; enfermedad de Addison, 20-30%; diabetes mellitus tipo I, 20-30%; artritis reumatoide, 7%) así como en sujetos normales (2-16%), incrementándose con la edad⁽⁶⁾.

¿Cual es la relevancia de los anticuerpos anticélulas parietales gástricas? ¿Son meramente un epifenómeno, que aparecen cuando es dañada la célula parietal por otro mecanismo o son mediadores primarios de la destrucción celular?. Existe cierta evidencia acumulada a favor de que estén directamente implicados en la patogénesis. Varios estudios animales sustentan esta hipótesis, pero sin embargo hasta la actualidad, la lesión gástrica no ha sido reproducida en un modelo animal. Estos estudios se basan en la administración de anticuerpos ACPG a animales de experimentación observando disminución del número de células parietales y de la secreción ácida

gástrica^(62,63).

Más recientemente, Loveridge y col.⁽⁶⁴⁾ observan una disminución de la secreción ácida y de la actividad anhidrasa carbónica de las células parietales de la rana en presencia de extractos de inmunoglobulina humana que contienen ACPG, sugiriendo como explicación un bloqueo de los receptores para la gastrina, con la consiguiente inhibición de la proliferación y maduración de las células parietales. En 1983, De Aizpurua y col.⁽⁶⁵⁾ midieron la actividad citotóxica dependiente del complemento del suero de 60 pacientes con anemia perniciosa frente a células de mucosa gástrica canina, observando una citotoxicidad superior en comparación con una serie de grupos controles. Además el grado de citotoxicidad fue proporcional a la concentración de IgG, donde residía el factor activador del complemento, y se relacionaba con la presencia de ASCP pero no con AMCP o AFI. Posteriormente De Aizpurua y col.⁽⁶⁶⁾ sugieren la existencia de un autoanticuerpo frente al receptor de la gastrina de la célula parietal en algunos enfermos de anemia perniciosa. Observan que fracciones de IgG sérica de 6 de 20 pacientes con anemia perniciosa inhiben la unión de la gastrina a la célula parietal y reducen la captación de aminopirina (un índice in vitro de la actividad de secreción ácida gástrica). Sin embargo, Burman y col. demuestran un efecto inhibitorio de los ACPG frente a la adenosin trifosfatasa H^+ , K^+ productora de ácido de la célula parietal, pero no frente al receptor de la gastrina⁽⁶⁷⁾.

En suma, los anticuerpos ACPG podrían estar implicados en la lesión de la mucosa gástrica, a través de :

- a) un efecto inductor de la lisis de las células parietales tras su interacción con ellas y fijación del complemento, b)
- una inhibición de maduración y proliferación de la célula parietal mediante bloqueo del receptor de la gastrina y c)
- una inhibición de la adenosin trifosfatasa H^+ , K^+ de la célula parietal.

Los anticuerpos antifactor intrínseco son de dos variedades: una, denominada tipo I o bloqueante que impide su combinación con la vitamina B12 y otro, tipo II o precipitante que se une al complejo B12-FI inactivándolo. El tipo I esta presente en el 70% de los pacientes con anemia perniciosa y el tipo II en aproximadamente un 50%, el cual no se observa en ausencia del primero⁽⁶⁸⁾. Se ha demostrado la presencia de AFI tipo II en células plasmáticas de la mucosa gástrica. Se detectan tanto en suero como en jugo gástrico siendo habitualmente IgG e infrecuentemente IgA. Son moderadamente sensibles pero altamente específicos dado que se observan ocasionalmente en otros procesos (trastornos tiroideos, <5% ; diabetes mellitus tipo I, 4%; y en controles sanos, <2%)⁽⁶⁸⁾.

Los anticuerpos antifactor intrínseco son biológicamente importantes, dado que la combinación de estos con FI en jugo gástrico lleva al desarrollo de malabsorción de B12 en pacientes en los que su secreción está reducida pero no ausente⁽⁶⁸⁾. Asimismo existe cierta evidencia que los anticuerpos anti-FI pueden contribuir a la lesión gástrica de la anemia perniciosa, aunque los estudios realizados son escasos. Así, Jacob y Glass⁽⁶⁹⁾ observaron que en la mucosa gástrica humana normal incubada con AFI de pacientes con anemia perniciosa, complemento y anticomplemento humano fluoresceinado, se producía una agregación de estos elementos en el citoplasma de la célula parietal, infiriendo un posible efecto destructivo mediado por complejos inmunes. Más tarde Inada y Glass⁽⁷⁰⁾ inyectando extractos de IgG-AFI a ratas, observaron una disminución de la secreción de factor intrínseco y pepsinógeno.

c) Estudios funcionales de las células mononucleares de sangre periférica.

A principio de los años setenta se realizaron estudios in vitro, observando transformación blástica de linfocitos de sangre periférica en presencia de factor intrínseco humano, jugo gástrico, o con homogeneizados de mucosa gástrica^(71,72). Así mismo se constató la inhibición de migración leucocitaria en presencia de jugo gástrico humano o factor intrínseco⁽⁷³⁾. Sin embargo el significado patogénico de estas reacciones es desconocido⁽⁵⁾.

A diferencia de los estudios serológicos sobre autoanticuerpos gástricos, los estudios de la funcionalidad de los linfocitos de sangre periférica son escasos y poco concluyentes en estos pacientes. Sin embargo, aunque posteriormente se desarrollará en base a nuestro trabajo experimental, existen autores que indican que las células mononucleares de sangre periférica presentan una respuesta proliferativa defectuosa o normal a la estimulación mitogénica policlonal con lectinas vegetales^(74,75).

d) Asociación con otras enfermedades autoinmunes.

La incidencia de anemia perniciosa está claramente aumentada en pacientes con diversas enfermedades, especialmente endocrinas. Así se ha observado en relación con enfermos afectados de hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipoparatiroidismo, enfermedad de Addison, diabetes mellitus insulín dependiente, vitiligo, miastenia gravis, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado, etc. En general en estas entidades se pueden observar autoanticuerpos gástricos. Asimismo en la

anemia perniciosa se observan autoanticuerpos frente a diversos antígenos tisulares, incluyendo tiroides, glándula suprarrenal, islotes pancreáticos, células ováricas entre otros⁽⁵⁻⁹⁾.

e) Respuesta a agentes inmunosupresores

La administración de corticoides a pacientes afectados de anemia perniciosa ha producido: mejoría de la absorción de vitamina B12, aumento de la secreción de factor intrínseco, disminución del título de autoanticuerpos y mejoría histológica con aumento del número de células parietales. Sin embargo, la aquilia persiste tras su administración⁽⁷⁶⁾. También en un paciente afecto de gastritis crónica atrófica, que recibió azatioprina, se observó regeneración de las células parietales con aumento de la secreción ácida gástrica⁽⁷⁷⁾. Estas observaciones implican potencialmente a mecanismos inmunes en la patogénesis de la lesión gástrica.

III.- SISTEMA INMUNE.

El sistema inmune está constituido por una base estructural de células y moléculas especializadas en diferentes funciones que se encuentran dispersas por el organismo. El componente celular está formado por dos grandes poblaciones linfocitarias, T y B, y por las denominadas células accesorias (macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células citotóxicas naturales, etc.), mientras que la base molecular está compuesta por las inmunoglobulinas y las citocinas (linfocinas y monocinas)⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾.

La característica biológica esencial de esta compleja red celular y molecular es la capacidad de reconocimiento, con constantes interacciones entre sus elementos, con el resto de los componentes estructurales del organismo y con los posibles elementos extraños que puedan penetrar en éste⁽⁷⁸⁾.

Esta capacidad de reconocimiento del sistema inmune, está determinada por los denominados receptores específicos (inmunoglobulinas y receptores de linfocitos T), que son moléculas dotadas de una gran variabilidad estructural que surge a nivel génico lo que origina millones de formas ligeramente diferentes⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾. Ambos tipos de moléculas poseen una estructura tridimensional relativamente similar con unos dominios constantes y unos variables en los extremos carboxilo y aminoterminal, respectivamente. Existen además zonas de hipervariabilidad incluidas en estos dominios variables que determinan su diversidad. Sin embargo, frente a la semejanza estructural entre ambos tipos de moléculas, los mecanismos de reconocimiento y activación empleados por los linfocitos T y B son diferentes. Los linfocitos B pueden reconocer y activarse por antígenos solubles mientras que los linfocitos T requieren ver al antígeno sobre superficies celulares que expresen además marcadores de su propio sistema principal de histocompatibilidad (SPH), característica denominada fenómeno de restricción. El timo es el órgano donde se origina la restricción. En él, además, los linfocitos T que reaccionan intensamente con lo propio son inhibidos o eliminados (tolerancia)⁽⁸²⁾.

Dentro del SPH se han definido tres clases de moléculas, las cuales son codificadas en una región cercana al centrómero del brazo corto del cromosoma 6. Las moléculas de clase I, presentes en todas las células nucleadas, están formadas por dos cadenas (alfa y beta 2 microglobulina) y sirven como estructuras de reconocimiento para los linfocitos T CD8+. Las moléculas de clase II, que en condiciones

fisiológicas tienen una distribución celular más limitada (macrófagos, linfocitos T activados y linfocitos B), están constituidas por dos cadenas (alfa y beta) y son utilizadas como estructuras de reconocimiento por parte de los linfocitos T CD4+. Las moléculas de clase III se refieren a los componentes del complemento C₂, C₄ y factor B⁽⁸³⁾.

La existencia de dos tipos de moléculas del SPH (Clase I y clase II) se corresponde con la existencia de dos vías de procesamiento de péptidos antigénicos, según provengan de la degradación de proteínas sintetizadas por la propia célula (por ejemplo, proteínas virales), en cuyo caso los péptidos resultantes se asocian a proteínas de clase I o se trata de proteínas exógenas (por ejemplo de origen microbiano o antígenos solubles) endocitadas y degradadas en el compartimiento lisosomal, asociándose los péptidos resultantes a proteínas de clase II⁽⁸⁴⁾.

Hay que subrayar que las moléculas de clase I y clase II presentan homologías estructurales con inmunoglobulinas y receptores de linfocitos T. Se cree que esta similitud pone de manifiesto relaciones evolutivas comunes entre los genes que codifican a todas estas moléculas implicadas en el reconocimiento inmunológico, pudiendo haber surgido todas ellas de un único gen ancestral del que se habrían ido diversificando y separando a lo largo de la evolución ("familia de supergenes de las inmunoglobulinas")⁽⁸⁵⁾ (Figura 1).

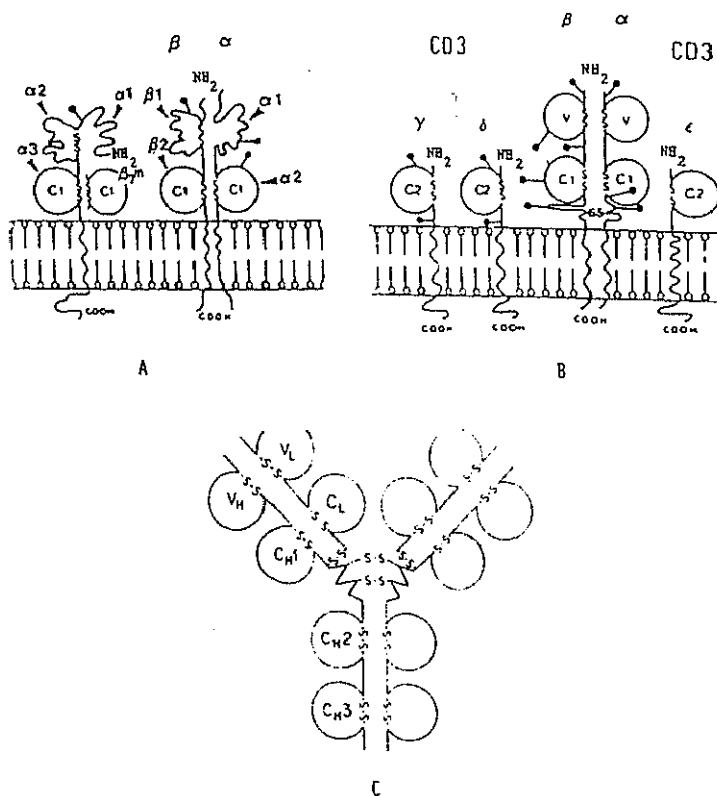


FIGURA 1.- Representación de : A) las moléculas de clase I y II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad; B) el Complejo T1/CD3; C) una molécula de IgG.

A.- BASE CELULAR DEL SISTEMA INMUNE.

1.- Linfocitos T

Así denominados por su maduración intratímica. Clásicamente se les identificó por su capacidad para formar rosetas con los hematíes de carnero y actualmente por expresar en su membrana el receptor clonotípico y por tener reordenados los genes que codifican su síntesis⁽⁴¹⁾. Entre los linfocitos T existe heterogeneidad funcional y fenotípica; se pueden identificar diversas subpoblaciones como los linfocitos T cooperadores y los supresores/citotóxicos.

Los linfocitos T humanos expresan en su superficie una serie de glucoproteínas que pueden actuar como moléculas de reconocimiento o activación del linfocito T. Destacan entre ellos los complejos Ti/CD3, CD2, CD4, CD8.

El complejo Ti/CD3 engloba el receptor antigénico específico de cada clon, denominado Ti, y a una estructura pentapeptídica, denominada CD3⁽⁴²⁻⁴⁶⁾. El receptor antigénico está compuesto por dos cadenas glucoprotéicas (alfa y beta). La cadena alfa está codificada por genes situados en el cromosoma 14 y la beta en el 7. Tal como ocurre con las inmunoglobulinas, las cadenas alfa y beta son el resultado final del acoplamiento de distintos segmentos génicos, que sufren reordenamiento. Asociados al receptor antigénico, se encuentran cinco péptidos, designados gamma, delta, épsilon, zeta y eta que conjuntamente constituyen el complejo CD3. Al contrario de las moléculas que constituyen el receptor Ti, las proteínas constitutivas del CD3 son estructuras monomórficas. En cuanto a la función, mientras que el heterodímero alfa/beta (Ti) está involucrado en el reconocimiento antigénico en presencia de moléculas del SPH, el CD3 según la mayoría de los autores estaría implicado en la transducción de la señal de activación, producida por la unión

Ag-Ti, al interior de la célula⁽²⁴⁻²⁶⁾.

Recientemente se ha descrito un receptor antigénico distinto constituido por dos cadenas (gamma y delta) en un 10% de los linfocitos T periféricos. Está asociado igualmente al complejo CD3 y su organización genética es similar. Su función es desconocida pero se cree que participan en la lisis celular no restringida por el SPH, en la eliminación de agentes infecciosos y en el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes⁽²⁷⁾.

El complejo CD2 es el receptor para hematíes de carnero, cuya función no está totalmente definida. Es una proteína ontogénicamente primitiva, conservada a lo largo de la evolución del linfocito T y se le ha implicado como una vía alternativa de activación al CD3/Ti, y, como una molécula de adhesión (también denominada LFA-2) que contribuiría a estabilizar la unión Ag-Ti a través de la unión con su ligando LFA-3⁽²⁸⁾.

Las moléculas CD4 y CD8 definen dos subpoblaciones mutuamente excluyentes de linfocitos T. Aunque en un principio la presencia del marcador CD4 se consideró característica de los linfocitos T cooperadores y el CD8 de los linfocitos T con función citotóxica/supresora, posteriormente se comprobó que dichas funciones pueden ser ejercidas por ambas subpoblaciones.

Actualmente, la característica que define a estas subpoblaciones es la capacidad de reconocimiento del antígeno en presencia de las moléculas de Clase II (linfocitos CD4+) o de clase I (linfocitos CD8+) del SPH⁽²⁹⁾. Actualmente se consideran dos subgrupos dentro de los linfocitos T CD4+(TH1 y TH2) según secreten IL-2 y gamma-IFN (TH1) o IL-4, IL-5 e IL-6 (TH2). Esta subdivisión proviene del estudio de clases establecidas en ratón. Aunque la función exacta de estas subpoblaciones está por aclarar se considera que la TH1 está

relacionada con las reacciones de hipersensibilidad retardada y la TH2 juega un papel principal en la colaboración T-B⁽⁹⁰⁾.

2.- Linfocitos B

Denominados así por su maduración en la bursa de Fabricio en aves o en el equivalente de la misma (médula ósea) en mamíferos. Los linfocitos B expresan en su membrana citoplasmática inmunoglobulinas de superficie (IgS) y tienen la capacidad de diferenciarse a células plasmáticas, secretoras de inmunoglobulinas. Todas las inmunoglobulinas tienen una estructura básica formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas y dos ligeras, con regiones variables (con capacidad de unión a un antígeno determinado) y regiones constantes (a las que se han atribuido otras funciones, distintas para cada tipo de inmunoglobulina: unión a células con receptores específicos, activación del complemento, etc.)⁽⁹¹⁾.

Los linfocitos B poseen en su genoma regiones que codificarán las distintas inmunoglobulinas específicas, tras un proceso de reordenamiento genético. Estos reordenamientos, fundamentalmente producidos por delección de segmentos genéticos intercalados, permitirán la generación de diversidad y la capacidad subsecuente de reconocimiento de todos los antígenos de la naturaleza⁽⁹¹⁾.

Entre los antígenos de membrana de linfocitos B destacan: CD10 (CALLA), CD19 (B4), CD20 (B1), CD21 (B2), CD23 y CD5 (T1)⁽⁹²⁾. El CD10 o CALLA se describió como antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común y se encuentra en los precursores de los linfocitos B; su función es desconocida. El CD19 y CD20 son pan-B específicos, cuya función no está aclarada. El efecto más revelante del AcMo antiCD20 es el de proporcionar una señal precoz al linfocito B en su activación, pasando a un estadio donde es capaz de responder a otros

estímulos tardíos. El CD21 es un antígeno de membrana con afinidad para el componente C3d del complemento y para el virus de Epstein-Barr. El CD23 es un antígeno de activación, además de ser el receptor para la fracción Fc de la IgE. La interleucina 4 puede inducir la expresión de CD23 sobre linfocitos B. El CD5 es un antígeno propio de los linfocitos T, pero una minoría de linfocitos B lo expresan. Se observa habitualmente en los linfocitos de la leucemia linfocítica crónica B. Los linfocitos B CD5+ parecen estar relacionados con la producción de autoanticuerpos y con diversas enfermedades autoinmunes, principalmente artritis reumatoide⁽⁹³⁾.

3.- Células accesorias

Este grupo está constituido por monocitos/macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, astrocitos, células de Kupffer, etc. Expresan en su membrana moléculas de clase I y II del SPH así como receptores para diversas moléculas incluyendo la región Fc de la IgG y componentes activados del complemento⁽⁹⁴⁾.

Estas células poseen la capacidad de captar antígenos, procesarlos intracelularmente y expresar en su membrana sus determinantes antigénicos asociados al SPH. Colaboran, igualmente, en la activación de los linfocitos T y B a través de fenómenos celulares de contacto físico directo, o mediante la producción de factores solubles. Recientemente se ha demostrado la capacidad de los linfocitos B para ejercer la función de presentación antigénica⁽⁹⁴⁾.

4.- Células NK

Se denomina actividad citotóxica espontánea o citotoxicidad natural (NK, "Natural killer") a la capacidad

lítica, in vitro y espontánea que desarrollan ciertas células inmunocompetentes frente a un amplio espectro de células diana, sin requerir una fase de sensibilización previa y sin estar restringida por moléculas del SPH⁽⁶¹⁻⁶⁶⁾. A pesar de esta aparente falta de especificidad, las células NK han sido implicadas en diversas funciones inmunológicas. Estas funciones incluyen: citotoxicidad frente a células tumorales, células infectadas por virus y células embrionarias o con un escaso grado de diferenciación; resistencia frente a agentes microbianos (bacterias, hongos y parásitos); inmunoregulación mediante la secreción de linfocinas (Interleucina 2, factor de necrosis tumoral, interferon); regulación de la hematopoyesis y resistencia natural a injertos alogénicos⁽⁶⁵⁾.

En la especie humana, los efectos de la actividad NK se encuentran estrechamente asociados a unas células con una morfología peculiar, los linfocitos grandes granulares, un 70% de los cuales son capaces de ejercer actividad NK. Estas células, que presentan un núcleo arríñonado y abundantes gránulos azurófilos en su citoplasma, expresan en su membrana citoplasmática una serie de marcadores característicos, como el CD16 (receptor para el fragmento Fc de IgG) y el NKH-1 o CD56, que están presentes en la práctica totalidad de estas células. Se diferencian de los linfocitos T por no expresar el complejo Ti/CD3. Sin embargo existen ciertos linfocitos T $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ que expresan una actividad citolítica semejante a la de las células NK. Estos linfocitos T no deben denominarse células NK, sino linfocitos T que desarrollan una actividad "NK-like" ó una citolisis no restringida por el SPH. Las células "asesinas" activadas por linfoquinas (LAK) son linfocitos activados por interleucina-2 o interferon gamma de cualquiera de las dos categorías comentadas. En sangre periférica las células LAK procederán principalmente de las células NK⁽⁶⁶⁾.

B) BASE MOLECULAR DEL SISTEMA INMUNE. LINFOCINAS Y MONOCINAS

En 1966 Claman y col⁽⁹⁷⁾. demostraron que los linfocitos T participaban en la regulación de la proliferación, activación y maduración de los linfocitos B. Posteriormente se desarrollo el concepto de cooperación celular T/B a través de fenómenos de contacto celular directo, restringido por moléculas del SPH y se comprobó además la existencia de factores solubles no antígeno específicos producidos por los linfocitos T capaces de inducir la proliferación de los linfocitos B y su diferenciación a células productores de Igs^(91,99).

Actualmente se conoce la actividad biológica y la estructura bioquímica de diversos factores solubles con capacidad inmunorreguladora, englobados genéricamente dentro del concepto de citocinas (linfocinas y monocinas), que se pueden definir como aquellas moléculas, que segregadas por linfocitos o monocitos, regulan la activación, proliferación y/o diferenciación de las células del sistema inmune. La composición de estas moléculas es independiente del antígeno que ha determinado su producción. Recientemente se ha comprobado que ni su síntesis ni sus efectos se limitan al sistema inmune⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾.

Analizaremos las distintas citocinas atendiendo al tipo de células productoras, a los estímulos inductores de su producción, a sus células dianas y a su acción biológica.

1.- Interleucina-1 (IL-1)

La interleucina 1, previamente llamada "factor activador de linfocitos", es un polipéptido del que se conocen dos formas moleculares, α y β . Las dos formas tienen un grado bajo de homología a nivel de péptido (26%) pero aparentemente

tienen actividades similares y se unen a un receptor común de alta afinidad⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾. La IL-1 es producida por un gran número de estirpes celulares (monocito-macrófago, queratinocitos, células endoteliales, algunos linfocitos T y B), siendo el monocito-macrófago la línea celular más empleada para su obtención. Es secretada al medio por gran variedad de estímulos: endotoxina bacteriana, exotoxinas, hemaglutininas víricas, TNF, TGF- β , la misma IL-1, inmunocomplejos, componente C5a del sistema de complemento, linfocitos T activados, esteres del forbol, radiación ultravioleta, cristales de sílice y urato⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾.

Sobre las células del sistema inmune la IL-1 tiene efectos variados. Así, estimula indirectamente la mitosis de determinados linfocitos T (TH2), actuando como un cofactor junto a otros estímulos, tales como el antígeno o mitógeno. Estos estímulos combinados conducen a la liberación de IL-2 y a la expresión de receptores de alta afinidad para ésta interleucina sobre los citados linfocitos T⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾. Además, la IL-1 puede actuar sobre los linfocitos B durante, al menos, dos etapas de su desarrollo. En primer lugar, en el estado de precursores de linfocitos B induce la síntesis de cadenas ligeras y la expresión de Igs. En segundo lugar, durante la activación del linfocito B, favoreciendo la progresión en el ciclo celular junto a otras citocinas⁽¹⁰⁵⁾.

El monocito es, finalmente, el tercer tipo de célula del sistema inmune que responde a la IL-1. La respuesta consiste en quimiotactismo, liberación de la prostaglandina E_2 , síntesis del activador del plasminógeno y activación de la lisis tumoral. Asimismo la IL-1 induce la síntesis de reactantes de fase aguda, prostaglandinas y colagenasa por los fibroblastos y condrocitos; también actúa como pirógeno. El análisis de los efectos de IL-1 es complicado dado que la molécula puede inducir la producción de otras citocinas (por ej. IL-6)^(103,104).

2.- Interleucina-2 (IL-2)

La IL-2, previamente llamada "factor de crecimiento de linfocitos T", es una proteína generada por los linfocitos T tras su activación, siendo su pico máximo de producción a las 18-24 horas del estímulo. Es una lincocina capaz de mantener el crecimiento de los linfocitos T en cultivo⁽¹⁰⁷⁾.

Su acción es mediada por la unión a un receptor situado en la membrana de las células diana, el cual está formado por dos cadenas glicopeptídicas, denominadas p75 o receptor de afinidad media y p55 o receptor de baja afinidad, unidas entre sí por un enlace no covalente^(108,109). Ambas cadenas pueden aparecer disociadas en la membrana citoplasmática y unirse independientemente a la IL-2, presentando distinta afinidad por la misma ($K_d\alpha$ 1 nM, $K_d\beta$ 10 nM). La expresión conjunta de ambas cadenas da lugar a los receptores de alta afinidad. La cadena p75 es esencial para la transmisión de la señal producida por la unión a su ligando y la p55 actuaría modificando la conformación del locus de unión a la IL-2 aumentando la afinidad del mismo. La cadena p55 se detecta mediante el anticuerpo monoclonal anti-TAC. En fase quiescente el linfocito T presenta unas 100 moléculas de receptor para la célula, de las que sólo un 10% son de alta afinidad. La expresión del receptor en la membrana celular se induce por: IL-1, factor de necrosis tumoral (FNT) y la propia IL-2 (regulación positiva). Tras la unión de la IL-2 a su receptor ocurre una endocitosis del complejo y la progresión de la célula en el ciclo celular o la diferenciación de la misma. Es de destacar que los linfocitos T activados son las únicas células capaces de expresar conjuntamente IL-2R e IL-2, activando el sistema en forma paracrina/autocrina para asegurar la expansión clonal de los linfocitos activados⁽¹⁰⁸⁾. El mecanismo de acción intracelular no está aclarado, aunque se considera que es independiente de la vía de la proteína cinasa C⁽¹¹⁰⁾.

Sobre los linfocitos B activados, colabora en la progresión del ciclo celular y en la síntesis de DNA por dichas células, siendo capaz de conducir a su diferenciación sin inducir proliferación previa⁽¹¹⁾.

La incubación "in vitro" de células NK con IL-2 recombinante determina un aumento de su actividad lítica siendo capaces de mediar citotoxicidad frente a líneas celulares NK-sensibles y NK-resistentes. Las células NK presentan en su membrana la cadena p75 del receptor de IL-2, no expresando la cadena p55^(12,13).

3.- Interleucina-3 (IL-3)

Es una glucoproteína producida por linfocitos T (TH1 y TH2) activados, capaz de mantener la proliferación de células mieloides, mastocitos y células multipotenciales de la médula ósea⁽¹⁴⁾. Puede intervenir en el crecimiento de células pre-B⁽¹⁵⁾.

4.- Interleucina-4 (IL-4)

La IL-4 o factor del crecimiento tipo I de linfocitos B (BSF 1) es una glucoproteína producida por linfocitos T (TH2) activados que aparece en el medio de cultivo a las 6 horas y presenta su concentración máxima a las 24. Se han encontrado receptores específicos para la misma en linfocitos T, B y mastocitos en fases quiescentes y aumentan tras la activación celular⁽¹¹⁵⁾.

La acción de la IL-4/BSF-1 ha sido estudiada fundamentalmente sobre linfocitos B. En los linfocitos B en reposo aumenta la expresión de moléculas de clase II y de los receptores para la porción Fc de la IgE (CD23). Es coestimulante, junto con los ligandos de las Ig, en la síntesis

de Igs. Sobre linfocitos B estimulados previamente con lipopolisacárido bacteriano determina un cambio en el isotipo de las Ig secretadas, aumentando la producción de IgG, e IgE y disminuyendo la de IgG₃; sin embargo, la producción de IgM no se modifica⁽¹¹⁶⁾.

Los linfocitos T de sangre periférica también responden a la IL-4/BSF-1. La supervivencia de linfocitos T tras un período de siete días de cultivo es cinco veces superior cuando en el medio está presente esta lincocina, aunque no origina síntesis de DNA. Por otro lado, puede actuar junto a TPA (éster del forbol) incrementando la expresión de receptores para la IL-2 y aumentando la mitogénesis por un mecanismo distinto al debido a la unión de IL-2/IL-2R⁽¹¹⁷⁾. Sobre monocitos, conduce a un aumento de la expresión de moléculas de clase II y de la actividad citotóxica⁽¹¹⁸⁾.

5.- Interleucina-5 (IL-5)

La interleucina 5 o BCGF II es una proteína producida por los linfocitos T activados (TH2), cuyas células diana son los eosinófilos, timocitos y linfocitos B. Se ha comprobado que esta implicada en la producción de colonias de eosinófilos a partir de células de sangre de cordón fetal, en la diferenciación de timocitos hacia linfocitos T citolíticos, y en linfocitos B activados induce su proliferación. Por otra parte, induce la secreción de IgM e IgA por linfocitos B estimulados con SAC⁽¹¹⁹⁾.

6.- Interleucina-6 (IL-6)

La IL-6 o interferon beta2 o factor del crecimiento tipo II de linfocitos B es una proteína producida por fibroblastos, células endoteliales, células de mixoma cardíaco,

monocitos y linfocitos T activados (TH2), cuya inducción pueda producirse por virus, IL-1 o TNF- α , entre otros⁽¹¹⁹⁾.

A nivel de sistema inmune, actúa sobre linfocitos T y B mediante la interacción con su receptor, que está presente en linfocitos T quiescentes y no aumenta tras la estimulación con lectinas vegetales, mientras que está ausente en linfocitos B en reposo y lo adquieren tras la activación⁽¹²⁰⁾.

Sobre los linfocitos B, la IL-6 promueve la proliferación de células infectadas por virus de Epstein-Barr y conduce a un aumento de la secreción y síntesis de cadenas pesadas de un isotipo idéntico al de la IgG presente en el linfocito B al inicio del cultivo. Se ignora su efecto sobre la producción de cadenas ligeras⁽¹²⁰⁾.

Su acción sobre los linfocitos T no está aclarada. Se ha comprobado que puede sustituir a la IL-1 en la inducción del receptor de la IL-2 por los linfocitos T CD4⁺⁽¹²⁰⁾.

7.- Interleucina-7 (IL-7)

La IL-7 es una proteína producida por células estromales de médula ósea y timocitos que actúa sobre precursores de linfocitos T y B como factor de crecimiento. Los linfocitos T maduros responden únicamente en presencia de un estímulo secundario (antígeno y mitógeno). Los linfocitos B maduros no responden a la IL-7⁽¹²¹⁾.

8.- Interferón gamma

El sistema interferón (INF) humano consta de tres grupos antigénicamente distintos de proteínas denominadas alfa, beta (beta 1 y beta 2), y gamma. Los INF alfa y beta 1 (INF tipo I) son inducidos por virus, mientras que el INF gamma (INF

tipo II) y el INF beta 2 (BSF 2) son generados por antígenos específicos o mitógenos de linfocitos T⁽¹⁰²⁾.

El INF gamma es una proteína producida por linfocitos T activados (TH1) y células NK. Su actuación se ejerce sobre diversos tipos celulares, tales como monocitos, linfocitos B, células NK, células epiteliales, células hematopoyéticas, fibroblastos, etc^(101,102).

Sobre los monocitos determina un aumento de la expresión de moléculas de clase II del SPH y de la producción de IL-1 y TNF, actuando tras la activación previa de dichos monocitos por lipopolisacárido bacteriano⁽¹²²⁾.

En los linfocitos B ejerce una inhibición de la proliferación celular inducida por la IL-4⁽¹²³⁾. No obstante por sí sólo favorece la mitogénesis inducida por ligandos de las Ig de superficie⁽¹²⁴⁾. Incrementa además la síntesis de cadenas ligeras de las Ig y el acoplamiento de las mismas con las cadenas pesadas⁽¹²⁵⁾.

Por un mecanismo no aclarado es capaz de generar actividad LAK (células líticas activadas por linfocitos), tras la incubación de células mononucleares de sangre periférica con esta linfocina⁽¹⁰²⁾.

9.- Factor de necrosis tumoral (TNF alfa)

El TNF alfa previamente denominado caquectina, es una molécula polipeptídica secretada fundamentalmente por los monocitos en respuesta, sobre todo, al lipopolisacárido bacteriano. Asimismo también la producen los linfocitos T activados y células NK^(126,130).

Sus efectos sobre las células del sistema inmune no

están perfectamente delimitados. Sobre el monocito conduce a un aumento de la expresión de moléculas de clase I y II del SPH y a la liberación de IL-1⁽¹²⁶⁾.

El linfocito T en reposo carece de receptores para el TNF-alfa. Tras su activación por antígenos o mitógenos, aumenta progresivamente el número de receptores, alcanzando el máximo a los 6 días. Sobre los linfocitos T activados aumenta la expresión de moléculas de clase II del SPH y el número de receptores para la IL-2. Cuando existe IL-2 en el medio, incrementa la producción de INF gamma inducida por aquella⁽¹²⁷⁾.

Sobre los linfocitos B incrementa la proliferación inducida por otros estimulantes (anti-IgM ó SAC), mientras que, por sí mismo, carece de efecto sobre la blastogénesis. Así mismo incrementa la producción de IgM en presencia de IL-2 y SAC⁽¹²⁸⁾.

10.- Linfotoxina (TNF beta)

La linfotoxina es una proteína que muestra un 30% de similitud con el TNF alfa y que compite por un mismo receptor celular que aquel. Es producida fundamentalmente por linfocitos T y B estimulados con antígeno o mitógenos y por líneas celulares linfoblastoides B⁽¹³¹⁾. Sus acciones son similares a las del TNF alfa. Recientemente se ha comprobado que posee una importante actividad BCGF⁽¹³²⁾.

11) Factor transformante del crecimiento beta (TGF β)

Es un polipéptido sintetizado entre otras células por linfocitos T y B. Inhibe la proliferación dependiente de la IL-2 de linfocitos T y B, y en estos últimos, la secreción de Ig producida por IL-2 o por sobrenadantes de cultivos de

linfocitos T con actividad BCDP^(133,134). Inhibe la actividad NK y la actividad LAK mediada por IL-2⁽¹⁶⁵⁾.

c) ACTIVACION LINFOCITARIA.

Se denomina activación linfocitaria al proceso por el cual los linfocitos, al ser estimulados por antígenos o mitógenos, son capaces de proliferar y diferenciarse para generar de esta forma células efectoras⁽⁷⁸⁾.

La mayor parte de los linfocitos T y B presentes en el organismo en un momento determinado se encuentran funcionalmente en reposo, es decir, están en la fase G₀ o de reposo del ciclo celular. La exposición a un antígeno induce la activación de algunos clones linfocitarios y su avance en el mismo⁽⁷⁸⁾.

Analizaremos sucesivamente los procesos de activación de los linfocitos T, B y NK.

1.- Activación de los linfocitos T

Como resultado de la selección clonal, sólo un grupo de linfocitos T específicos es activado por un determinado antígeno. Esto produce la expansión clonal de aquellos linfocitos T antígeno-específicos que adquirirán capacidades funcionales diferenciadas. La activación de los linfocitos T es una consecuencia de las interacciones ligando-receptor que ocurren en la interfase del linfocito T y de la célula presentadora de antígeno. Estas interacciones inician cambios bioquímicos intracelulares dentro del linfocito T que culminan en la respuesta celular⁽⁶⁴⁾. La mayoría de los autores aceptan el

esquema de Larsson y col. para el estudio de la activación del linfocito T⁽¹³⁵⁾. Según este modelo el proceso podría tener lugar en dos fases:

a) Inducción

Inicialmente el antígeno al que se ha expuesto el sistema inmune es captado y procesado por las células accesorias (fundamentalmente macrófagos) y es expresado en su membrana citoplasmática, unido físicamente a moléculas del SPH⁽¹³⁶⁾. De esta forma el antígeno es reconocido por el linfocito T que posee el receptor clonotípico específico para el mismo (Figura 2).

El macrófago, tras el procesamiento del antígeno y la interacción con el linfocito T, segrega al medio IL-1, que se une a su receptor situado en la membrana de este⁽¹³⁷⁾. Actualmente se acepta que el macrófago proporciona además otras señales importantes para la activación del linfocito T, que incluyen la interacción de moléculas de asociación celular. En este sentido recientemente se ha comprobado que una molécula de superficie de las células accesorias denominada LFA-3 interactúa con el complejo CD2 (LFA-2) condicionando un aumento en la producción de IL-1 y una amplificación de la respuesta bioquímica intracelular inducida en el linfocito T por la unión antígeno-receptor. De igual forma se ha demostrado la unión de moléculas de clase II monocitarias a la glucoproteína CD4 del linfocito T, de moléculas de clase I con la glucoproteína CD8 y de los determinantes de membrana CD 11a,18 (LFA-1) con las moléculas de adhesión intracelular ICAM-1 e ICAM-2 (Figura 3). Todas estas uniones contribuyen a estabilizar la unión SPH-antígeno-Ti/CD3 y participan en mayor o menor medida en la activación^(84,89,138).

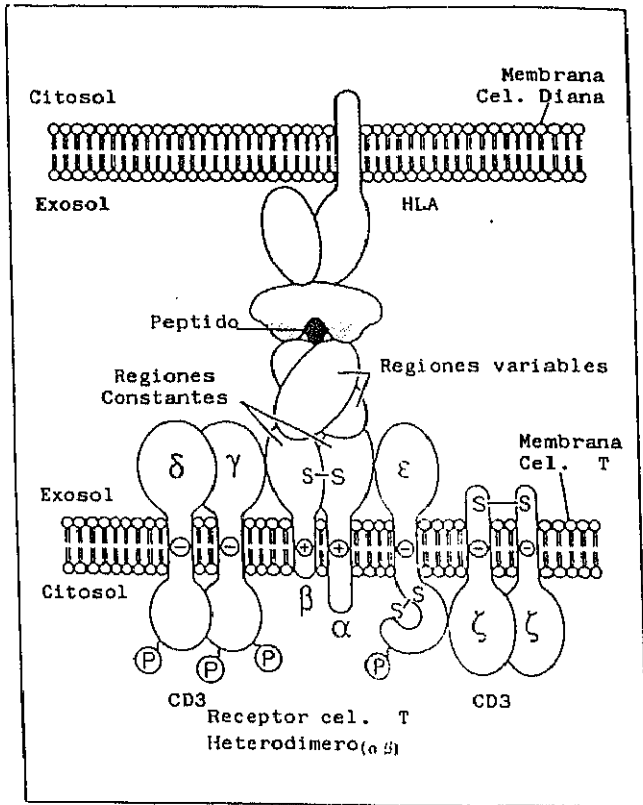


FIGURA 2.- Interacción HLA-Péptido-Receptor antigénico de los linfocitos T.

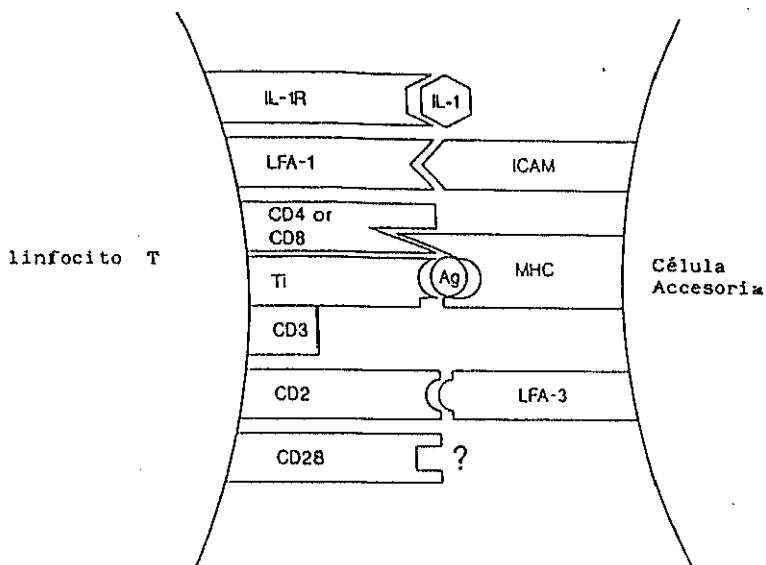


FIGURA 3.- Representación esquemática de algunas de las interacciones que ocurren durante la presentación antigénica por parte de la célula accesoria al linfocito T.

La adición de estas señales, conduce a la activación del linfocito T que pasaría de la fase G_0 a la fase G_1 precoz (G_{1c}) del ciclo celular. Esta progresión se asocia a una serie de modificaciones de sistemas enzimáticos cuyo resultado final es la síntesis proteica⁽³⁸⁾. Dos vías de transducción de señal parecen estar reguladas por el receptor del linfocito T: la vía del fosfatidilinositol y la vía de la tirosina cinasa.

Así, la interacción de un ligando con su receptor de superficie, activa, a través de la proteína G, a una fosfodiesterasa (fosfolipasa C) que hidroliza el fosfatidilinositol-difosfato dando lugar a dos sustancias que actuarán como segundos mensajeros: el inositol-trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG)⁽³³⁻³⁴⁾. El IP3 libera calcio iónico de fuentes intracelulares y extracelulares aumentando su concentración intracelular⁽⁴⁴⁾. El DAG induce la translocación de proteincinasa C (serina/treonina cinasa) del citoplasma a la membrana plasmática, donde el enzima es activado en presencia de fosfatidilserina⁽³⁹⁾. El aumento del calcio intracelular y la activación de la proteincinasa C sinergizan induciendo la expresión del receptor de la IL-2 así como la síntesis de IL-2 y la proliferación de los linfocitos T. A nivel intracelular originan una serie de cambios necesarios para la proliferación celular: se incrementa la entrada de glucosa, se activan diversas enzimas glicolíticas, aumenta la actividad ornitina-decarboxilasa y se activa el sistema de transporte transmembrana Na^+/H^+ produciendo mayor alcalinización intracelular⁽³³⁻³⁴⁾.

Las tirosina cinasas desempeñan un papel crucial en la regulación de la activación y diferenciación de las células en los mamíferos. En linfocitos se ha demostrado la fosforilación en residuos de tirosina de varios sustratos tras la activación con lectinas, IL-2 o anticuerpos monoclonales contra el complejo CD3-receptor antigénico. Uno de estos sustratos se ha identificado como la cadena zeta del CD3⁽⁴²⁾.

Entre las tirosina cinasas destaca la denominada p56^{lck}, sobre todo desde que se descubrió su asociación a las moléculas CD4 y CD8⁽¹⁴³⁾.

La función y regulación de las fosfotirosina fosfatasas es menos conocida. Recientemente se purificó una importante fosfotirosina fosfatasa de la placenta humana que tenía una gran homología con el antígeno común leucocitario (CD45), lo que sugirió que el CD45 podría tener actividad fosfotirosina fosfatasa, como se comprobó poco después⁽¹⁴⁴⁾.

b) Expansión

Los linfocitos T activados incrementan el número de receptores para la IL-2, desde unas 100 moléculas por célula, de las que sólo el 10 % son de alta afinidad, hasta aproximadamente unas 35.000, de las que 2000 a 4000 son receptores de alta afinidad^(107,109).

La IL-2 actúa, sobre la población que expresa su receptor, de modo análogo a un sistema hormonal clásico: es específica para el ligando, es saturable, presenta gran afinidad, es reversible y es capaz de regular la expresión de su propio receptor. Tras la unión a su receptor el complejo IL-2/IL-2R se internaliza en la célula y determina la progresión de la misma a la fase G₁ tardía (G_{1b}) continuando la síntesis de m-RNA y proteínas. Algunas de las proteínas sintetizadas, como el receptor de la transferrina son específicos de esta fase tardía del ciclo celular y permitirán al linfocito capturar elementos nutritivos del medio para avanzar hacia las fases de síntesis de DNA y mitosis. El resultado final es la proliferación celular y la generación de células efectoras, bien cooperadoras o citotóxicas⁽⁷⁰⁾.

Por último existen antígenos de activación de

aparición tardía que se expresan al cabo de varios días de la activación como los VLA. Estos antígenos pertenecen a la familia de las "proteínas de adhesión".

La activación de los linfocitos T puede lograrse, in vitro, mediante la incorporación al medio de cultivo de distintas sustancias: anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD2, lectinas vegetales (fitohemaglutinina, concanavalina A) por acción sobre receptores de membrana y mediante los ésteres del forbol e ionóforos que actuarían sobre la proteína cinasa C y la concentración de calcio iónico libre intracitoplasmático, respectivamente⁽¹³⁸⁾ (Figura 4).

2.- Activación de los linfocitos B

La activación de los linfocitos B quiescentes, su proliferación y la diferenciación a células productoras de anticuerpos requieren la interacción con un antígeno soluble y la colaboración de los linfocitos T. Algunos, aunque no todos los efectos de los linfocitos T cooperadores pueden ser reemplazados por factores solubles producidos por ellos. Junto a éste modelo, útil para la explicación de las respuestas a antígenos timodependientes, los linfocitos B pueden responder a antígenos timoindependientes mediante mecanismos no claramente establecidos⁽¹⁴³⁾.

Podemos dividir la respuesta de los linfocitos B en tres fases:

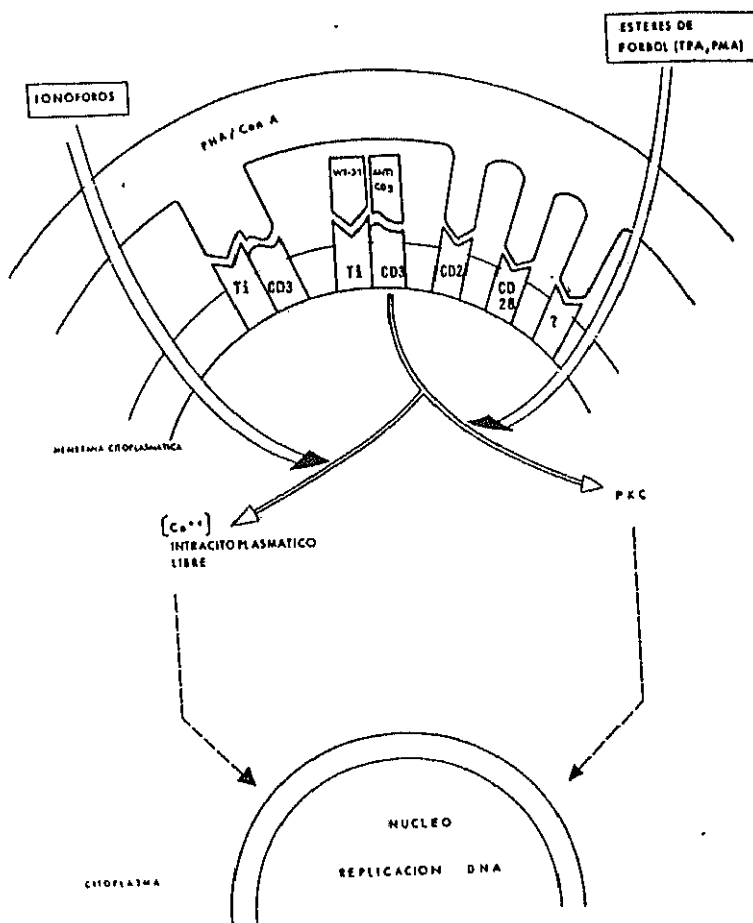


FIGURA 4.- Representación de la actuación de los distintos mitógenos sobre los linfocitos T.

a) Activación

El receptor antigénico de los linfocitos B está representado por sus inmunoglobulinas de superficie. Su unión con el antígeno y el subsecuente entrecruzamiento de las distintas moléculas de Igs, además de dar especificidad a la respuesta, determina dos efectos: la conducción de la célula a un estado de activación (G_{II}), caracterizado por un aumento en el volumen celular, síntesis de mRNA y expresión en su superficie de nuevas moléculas proteicas, y la internalización del complejo Ag-Ig, que se degrada y se expresa sobre la superficie del linfocito B asociado a moléculas de clase II del SPH pudiendo actuar como célula presentadora de antígeno. A consecuencia de ello el linfocito T es inducido hacia la generación de señales requeridas para la activación y proliferación de los linfocitos B y su diferenciación a células productoras de Igs^(143,146).

De entre los factores solubles que participan en la activación del linfocito B destaca la interleucina 4. Diversos hallazgos confirman que la IL-4 actúa sobre linfocitos B en reposo en ausencia de cualquier otro estímulo⁽¹¹⁹⁾: a) los linfocitos B en reposo cultivados con IL-4 presentan un aumento del volumen celular y una mejor viabilidad; b) asimismo se incrementa la expresión de moléculas de clase II del SPH en su membrana citoplasmática; c) el pretratamiento de los linfocitos B en reposo durante 24 horas con interleucina 4 acelera la respuesta subsecuente a anti-IgM e IL-4 en aproximadamente 12 horas.

Existen otras vías alternativas de activación. De estas, los mejores caracterizados son los ejercidos por los anticuerpos monoclonales anti-CD20 y CD40, dos proteínas de membrana, cuyo ligando fisiológico no es conocido. El Ac monoclonal anti-CD20 es capaz de activar a los linfocitos B en reposo, pasando de la fase G_0 a G_1 . Se sugiere que el CD20 actúa

como un canal iónico en la activación del linfocito B, sin embargo el Ac monoclonal anti-CD40 no activa a los linfocitos B en reposo, sino que estimula a los linfocitos B activados a progresar en el ciclo celular desde la fase G₁ a la fase S. Se sugiere que el CD40 podría ser el receptor de algún factor de crecimiento⁽¹⁴⁸⁾.

El linfocito B, tras activarse, expresa en su superficie varios Ags de activación como el antígeno Ba, el CD23 (receptor para la fracción Fc de la IgE) y el receptor para la interleucina 4 (se incrementa su número desde 100 a 1000 tras la activación del linfocito B)⁽¹⁴⁹⁾.

Los mecanismos bioquímicos de estas interacciones celulares son similares a los comentados previamente en los linfocitos T, implicando al calcio iónico intracitoplasmático y a la PKC como segundos mensajeros⁽¹⁴⁹⁾.

b) Proliferación

En esta fase actuarían los factores de replicación de linfocitos B (interleucina 4, interleucina 2, gamma-interferon y principalmente interleucina 5) que tras la unión a sus receptores específicos hacen que el linfocito B progrese a la fase G_{1b}, S, G₂, y M, produciéndose la proliferación clonal. Por otra parte, los linfocitos B activados pueden secretar un factor de crecimiento que regularía su proliferación de modo autocrino. Se ha sugerido que este factor podría ser la porción de 25Kd del CD23 aunque hasta el momento no ha sido demostrado⁽¹⁴⁵⁾.

c) Diferenciación a células productoras de Igs

Después de la proliferación y expansión clonal, los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Estas células secretan gran cantidad de anticuerpos con idéntico idiotipo y especificidad que las moléculas IgM e IgD expresadas en la membrana de los linfocitos B progenitores. Durante la maduración final se produce el cambio de clase de las Igs (switch) por el que se secretan anticuerpos con otro isotipo distinto (IgG, IgA, IgE) pero con la misma especificidad antigénica. Tanto la diferenciación a célula plasmática como el cambio de clase están regulados por interleucinas derivadas de linfocitos T (principalmente IL-6, pero también IL-2, IL-4, IL-5 y gamma-IFN)^(145,146).

Al transformarse el linfocito B en célula plasmática perderá las Ig de superficie y sus antígenos de diferenciación característicos, adquiriendo otros propios de la célula plasmática como el CD38. No todos los linfocitos B activados se transformaran en células plasmáticas, ya que algunos pasarán de nuevo a un estadio de linfocito pequeño maduro, la célula de memoria, que gozará de la capacidad de responder mas rápidamente a un nuevo estímulo antigénico⁽¹⁴⁷⁾.

3.- Activación de las células NK

Dividiremos su estudio en dos apartados: a) Fases del proceso lítico y b) Regulación de la actividad NK por linfocinas⁽¹⁵⁰⁾.

a) Fases del proceso lítico

Basándonos en datos morfológicos podemos distinguir tres etapas en el proceso de citotoxicidad:

1) Reconocimiento y adhesión a la célula diana.

Por el momento, se desconocen las estructuras de superficie de las células NK y células diana que participan en el reconocimiento⁽⁹⁶⁾.

La adhesión de la célula NK a la célula diana es magnesio-dependiente y se realiza en 2-3 minutos. Después de la unión, el centro organizador de los microtúbulos y el aparato de Golgi de la célula NK se orientan hacia la célula diana, seguido de movimiento de gránulos hacia el área de contacto⁽¹⁵⁰⁾.

2) Programación para la lisis.

Esta fase es calcio-dependiente, sensible a cambios de temperatura y dura aproximadamente 10 minutos. Durante este tiempo la célula efectora segrega sustancias contenidas en sus gránulos (perforinas o citolisinas y serina proteasas), que inducen lesiones en la membrana de las células dianas. La citolisina o perforina es una sustancia protéica, en forma de monómero, que al polimerizar da lugar a unas estructuras cilíndricas (poliperforinas) que se insertan en la membrana de las células dianas, donde inducen la aparición de unos poros de 15 nm de diámetro que recuerdan a las lesiones producidas por el complemento. El calcio parece ser necesario en la inserción en la membrana y polimerización de los monómeros de perforina. Se requiere un mínimo de 3-4 monómeros para formar un poro funcional. En cuanto al papel realizado por las serina proteasas aun permanece sin aclarar^(150,151).

Sin embargo, existen otras vías de citotoxicidad independientes del calcio y las perforinas. Se producen a través de la secreción de diversos mediadores como leucalaxina, factor de necrosis tumoral, línfotoxina y el factor citotóxico

de células NK. Posiblemente este último represente la actividad de múltiples citotoxinas incluyendo FNT, LT y leukalexina⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾.

3) Lisis independiente de la célula efectora.

Esta fase, que no requiere la presencia de la célula efectora, se caracteriza por las alteraciones en la membrana de la célula diana (poros) que culmina en la lisis osmótica de la misma. Esta fase dura de 30 a 90 minutos. La célula efectora una vez separada de la célula diana, puede iniciar un nuevo proceso lítico⁽¹⁵⁰⁻¹⁵¹⁾.

Actualmente se sabe que los efectos de las células efectoras sobre las células dianas no se confinan a la lisis osmótica. La fragmentación del DNA de la célula diana es un hallazgo importante y puede representar un mecanismo causal fundamental de la lisis celular⁽¹⁵⁵⁾. El FNT, la LT y la leukalexina pueden producir fragmentación del DNA^(152,156).

En todos estos mecanismos se supone que la célula diana tiene un papel pasivo. Sin embargo actualmente se sugiere que la célula diana tendría un programa suicida que sería activado por diferentes estímulos. Estos estímulos activarían nucleasas endógenas que podrían ser las causantes de la fragmentación del DNA⁽¹⁵⁷⁾.

b) Regulación de la actividad NK por linfocinas

Como los otros elementos celulares del sistema inmune, la función de las células NK puede regularse por diversas citocinas⁽⁶⁶⁾. Los estudios en humanos mostraron que el sobrenadante de cultivos de estas células con líneas tumorales susceptibles a su acción lítica contenía un factor soluble que facilitaba su actividad citotóxica y que fue identificado como

interferon (INF). Una importante observación fue que los sobrenadantes que contenían IL-2 y estaban libres de INF incrementaban la actividad NK en ratón y en humano. El hecho de que la IL-2 induzca la producción de INF, hizo pensar que los efectos de esta linfocina fuesen mediados por el INF. Sin embargo, la disponibilidad de IL-2r ha permitido aclarar el efecto de esta linfocina sobre la actividad NK. La preincubación de células efectoras con IL-2r resultó en una potenciación de la actividad NK, que fue cloro-dependiente e independiente de la síntesis de INF, ya que esta fué un hecho más tardío y la adición de Ac contra el INF no bloqueó la facilitación inducida por aquella. El mecanismo del efecto facilitador del INF y de la IL-2 sobre la actividad citotóxica de las células NK se desconoce. Por otro lado, la incubación de CMSP con IL-2 durante períodos de tiempo prolongados (3-5 días) genera una amplia actividad citotóxica frente a líneas celulares NK-sensibles y NK-resistentes.⁽¹⁵⁰⁾ Un patrón de actividad lítica similar puede ser inducido "in vitro" en otros modelos experimentales, tales como, el cultivo de CMSP en medio que contiene SBF, cultivos mixtos de linfocitos o por lectinas vegetales. Dado que la relación existente entre las células NK y las efectoras generadas en los sistemas anteriormente mencionados permanece por aclarar, éstas últimas han recibido diferentes nombres, "células tipo NK", "células líticas anómalas", "células líticas activas" o "células líticas activadas por linfocinas (LAK)"⁽¹⁵¹⁻¹⁶⁰⁾.

OBJETIVOS

Diversos hallazgos clínicos y experimentales indican que el sistema inmune está implicado en la patogénea de la gastritis crónica autoinmune y de la anemia perniciosa. Por otra parte, el sistema inmune está constituido por una serie de poblaciones celulares cuya activación, proliferación y diferenciación está regulada por diversas moléculas entre las que se incluyen a las linfocinas y monocinas.

Estas bases teóricas nos llevaron a investigar el estado funcional de los linfocitos T, B y de las células NK de los enfermos con gastritis crónica autoinmune en sus dos estadios evolutivos determinados por la presencia o ausencia de malabsorción de vitamina B12 y su posible variación determinada por el tratamiento sustitutivo con esta vitamina. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de la distribución de las poblaciones linfocitarias y de los monocitos en sangre periférica así como de su estado de activación por identificación y cuantificación de la expresión de moléculas de superficie.
- 2) Estudio del estado funcional de los linfocitos T y B de sangre periférica por su capacidad de respuesta blastogénica a estímulos policlonales y de síntesis de linfocinas.
- 3) Estudio del estado funcional de las células NK por análisis de su capacidad citotóxica.
- 4) Estudio de la significación clínica de los hallazgos encontrados en los puntos anteriores.

MATERIAL Y METODOS

I) MATERIALES Y REACTIVOS

A) MATERIALES

A continuación se detallan los materiales utilizados en la realización de los experimentos:

- Placas estériles de cultivo de 24 o 96 pocillos de fondo plano o fondo redondo (Greiner, Soria-Greiner, Madrid, España), (Costar, Cambridge, M.A., EEUU).
- Placas Dyhatech MicroElisa de 96 pocillos de fondo plano (Greiner).
- Placas Petri de diversos diámetros, estériles (Costar, Greiner).
- Frascos estériles de cultivo de 25 y 250 ml (Costar, Cambridge, M.A., EEUU).
- Frascos de vacío de 250 ml (Baxter Ibérica, Madrid, España).
- Jeringas de plástico de 1, 5, 10, 20 y 50 ml, estériles.
- Tubos de cultivo de 16 x 100 mm (Nuncion, Nunc, Dinamarca).
- Tubos de plástico de 5, 10 y 50 ml, estériles.
- Tubos Eppendorf para microcentrifuga (Elkay, Boston, EEUU).
- Pipetas de cristal de 1,5 y 10 ml, estériles.
- Pipetas Pasteur de un sólo uso, estériles (Brand, RFA).
- Pipetas de volumen ajustable (Labsystems Finnpipe, Helsinki, Finlandia).
- Pipetas multicanal de 8 y 12 canales (Titertek, Labsystems and Flow Lab, Helsinki, Finlandia).
- Multipipeta Eppendorf (Hamburgo, RFA).
- Puntas de propileno virgen, estériles (Daslah, Madrid).

- Porta-objetos y cubre-objetos de cristal (Hirschmann, RFA).
- Cámaras de conteo Neubaver (Saaringia, RFA).
- Microjeringa Hamilton (Bonaduz, Suiza).
- Filtros Millipore (Bedford, Massachusetts, EEUU).
- Incubador de agua de 37°C con agitación continua (Unitronic, Selecta, España).
- Pipetador automático Pipetus (Hirschmann, RFA).
- Cámara de flujo laminar (Telstar SA, Tarrasa, España).
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC-3 (Dupont Instrument, Conn, EEUU).
- Centrífuga de mesa IEC HN-SII (Damon/IEC, MA, EEUU).
- Microcentrífuga Centriphuge 5414S (Eppendorf, Hamburgo).
- Estufa de cultivo celular Napco 6100 (Napco, Portland, EEUU).
- Microscopio Nikon Alphaphot 4SH-1 (Nikon, Japón).
- Microscopio invertido de contraste de fase Nikon TMS (Nikon, Japón).
- Microscopio de fluorescencia Leitz-Dialux 20 EB (Leitz, Wetzlar, RFA).
- Congelador -70°C Forma Biofreezer 8200 (Forma Scientific, Marietta, Ohio, EEUU).
- Congelador -20°C Arctis 330 GS (AEG, RFA).
- Lavador de placas de Elisa de 12 canales (Titertek, Flow Lab. Reino Unido).
- Colector de cultivos SKATRON AS (Flow Lab., Lieberbeyn, Noruega).
- Dispensador de líquido de centelleo (Accupenser, Nichiro, Japón).
- Contador Beta Rackbeta (LKB-Wallac, Finlandia).
- Contador gamma 4000 (Beckman Ins. Inc., Irvine, Ca, EEUU).
- Espectrofotómetro Titertek Multiskan (Flow Lab.,

Irvine, Ca, EEUU).

- Citómetro de flujo EPICS C cell sorter (Coulter Immunology, Hialeah, FL, EEUU).

B) REACTIVOS

A continuación se detallan los reactivos utilizados en la separación e identificación de subpoblaciones celulares:

- Heparina Leo (Laboratorios Leo, Madrid, España).
- Suero salino fisiológico (SSF) Apiroserum clorurado simple (Ibys, Madrid, España).
- Ficoll metrizoato sódico. Lymphoprep, densidad 1077 (Nyegaard Co, Oslo, Noruega).
- Hematíes de carnero tratados con AET (2-aminoethyl-isothiomonium-bromide). Los hematíes se extrajeron del carnero del animalario de la Clínica Puerta de Hierro y se diluyeron (V/V) en condiciones de esterilidad en solución de Alseviars (20,1 g. de dextrosa; 9,10 g. de citrato sódico y 4,2 g por litro de agua destilada, pH 6,1). Antes de su utilización en cada experimento se lavaron tres veces con SSF, y se disolvieron al 12% en solución de AET (2g. en 50 ml de agua destilada ajustando el pH a 9 con Na OH 10N) incubándose 15 minutos a 37°C; se lavaron con SSF y se diluyeron finalmente al 12% en medio RPMI.
- Azul tripan (Fluka, Chemische Fabrick, Buchs, SG).
- Naranja de acridina (Merck, Darmstord, RFA.).
- Suero anti-inmunoglobulinas de ratón, fluoresceinado (Kallestad, Austin. TX, EEUU).
- Sueros anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA humanos (Sigma, San Luis Mo, EEUU).
- Sueros anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA humanos conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma, San Luis Mo, EEUU).

- Anticuerpos monoclonales:

- OKT3 (CD3), OKT4 (CD4), OKT8 (CD8), OKT9 (receptor para la transferrina) y OKT11 (CD2) son productos de Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, EEUU.

- Anti-B1 (CD20), anti-Mo2 (CD14) y anti-TAC (CD25) son productos de Coulter Electronics, Hialeah, Fla, EEUU).

- Leu 11b (CD16) y anti HLA Dr son productos de Becton & Dickinson, Mountain View, Ca, EEUU).

- Complemento de conejo (Behring Inst., Marburg, RFA).

- Mezcla hipotónica compuesta por un 75% de agua bidestilada y un 25% de SSF.

C) REACTIVOS UTILIZADOS EN CULTIVOS CELULARES

- Medio RPM1 1640 (Flow Lab., Irvine, Ca, EEUU).

- L-glutamina (Flow Lab., Irvine, Ca, EEUU).

- Hepes 1M (Flow Lab., Irvine, Ca, EEUU).

- Mezcla antibiótica compuesta por: cloxacilina 500 mg., ampicilina 500 mg., gentamicina 80 mg. (para 50 cc.).

- Suero bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, EEUU).

- Fitoheماغlutinina M (PHA) (Difco, Detroit, Michigan, EEUU).

- Interleucina 2 recombinante (Hoffman-La Roche Inc., Nutley, EEUU).

- Forbol-miristato-acetato (PMA), (Sigma, San Luis MO, EEUU).

- Stafilococcus aureus Cowan I (SAC), (Pansorbin, Calbiochem, Behring Corp, La Jolla, Ca, EEUU).

- Sobrenadante con actividad IL-2, BCGF y BCDF obtenido de amígdalas humanas.

- Timidina Tritiada, actividad específica 1 mCi/ml (Radiochemical Center, Amersham, Reino Unido).
- Cromo-51, en forma de cromato sódico, actividad específica de 1 mCi/ml (Radiochemical Center, Amersham, Reino Unido).
- Solución de centelleo Normascint (Scharlan, Ferosa, España).

D) MEDIOS Y TAMPONES

- Medio completo. Como medio completo se utilizó RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM y mezcla antibiótica al 1%.

- Medio de cultivo. Se utilizó medio completo al que se añadió suero bovino fetal al 10%. En determinados experimentos, el suero bovino fetal fue sustituido por suero autólogo o suero AB de donante. Todos los sueros fueron descomplementados por calentamiento a 57° C durante 45 minutos.

- Disolución salina fosfatada (PBS). Por cada litro de agua destilada se disolvieron: 8,75 g. de PO_4HNa_2 ; 1,89 g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 4,25 g. de Cl Na ; se ajustó el pH a 7,4.

- Buffer carbonato-fosfato. Por cada litro de agua destilada se disolvieron: Co_3Na_2 15,9 g.; $\text{Co}_3\text{H Na}$ 29,3 g. y N_3Na 2 g.; se ajustó el pH a 8.

E) LINEAS CELULARES

- Línea CTL-L2. Línea citotóxica murina dependiente de IL-2 en el medio para su crecimiento y que responde a IL2 humana⁽¹⁶¹⁾.

- K-562. Línea derivada de un clon procedente del derrame pleural de un paciente con leucemia mieloide crónica

humana, que crece continuamente en suspensión en forma de blastos indiferenciados. Es una línea NK-sensible⁽¹⁶⁷⁾.

- JY. Línea linfoblástica humana de estirpe B infectada con virus de Epstein-Barr. Es una línea NK-resistente⁽¹⁶⁸⁾.

IX.- POBLACION OBJETO DE ESTUDIO

El presente trabajo fue realizado sobre una muestra formada por 41 enfermos diagnosticados de gastritis crónica atrófica autoinmune, 32 de los cuales previamente o coincidiendo con el momento del estudio presentaron anemia perniciosa.

El diagnóstico de gastritis crónica atrófica autoinmune se efectuó en base a los hallazgos anatomopatológicos encontrados en las biopsias de mucosa gástrica. En los casos en que no dispusimos de la biopsia, el diagnóstico se realizó en base a la presencia de al menos tres de los cuatro criterios siguientes: a) imagen endoscópica sugerente de gastritis crónica atrófica; b) aquilia histaminorresistente; c) hipopepsinogenemia e hipergastrinemia; d) presencia de anticuerpos anticélulas parietales gástricas.

Para el diagnóstico de anemia perniciosa, aparte de la presencia de gastritis crónica atrófica autoinmune, se precisó de al menos tres de los cuatro criterios siguientes: a) megaloblastosis en sangre periférica y/o médula ósea; b) disminución de la cobalamina plasmática; c) test de Schilling patológico normalizado tras la administración de factor intrínseco; d) respuesta satisfactoria a la vitamina B12 parenteral.

En todos los pacientes estudiados se comprobó la ausencia de: a) tratamiento previo con fármacos capaces de influir sobre el estado funcional de las células del sistema inmune (antiinflamatorios no esteroideos, cimetidina, teofilina, estrógenos, etc.) y b) la existencia de infecciones o transfusiones sanguíneas en los tres meses anteriores a la realización del estudio.

Se confeccionaron protocolos clínicos individuales haciendo constar: filiación, antecedentes personales, fechas de inicio de los síntomas y del diagnóstico, presencia de enfermedades asociadas, datos bioquímicos, estudios radiológicos y endoscópicos, descripción histológica, comportamiento evolutivo y tratamientos previos y actuales.

Se realizaron, mediante técnicas habituales, por los servicios de Bioquímica, Hematología, Inmunología y Medicina Nuclear de la Clínica Puerta de Hierro, las siguientes determinaciones analíticas: hemograma, bilirrubina, fosfatasa alcalina, colesterol, proteínas totales, albúmina, vitamina B12, ácido fólico, pepsinógeno, gastrina, hierro, transferrina, ferritina, anticuerpos anticélulas parietales gástricas, inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM).

Como controles se utilizaron muestras de 33 individuos sanos, de edad y sexo similares a los pacientes.

III.- METODOS

A) OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

1) Sangre venosa.

Se realizaron las extracciones en condiciones de esterilidad, por venopunción periférica, de una cantidad variable de sangre que osciló, según los estudios a realizar, entre 30 y 150 ml., añadiendo 25u. de heparina sódica por cada 20 ml de sangre y diluyendo al 50% con suero salino fisiológico.

2) Amígdalas humanas.

Se obtuvieron por tonsilectomía terapéutica (donadas por el Servicio de Otorrinolaringología del Pabellón VIII, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid) de individuos con edades comprendidos entre 6 y 15 años de edad. Se lavaron con SSF (que contenía mezcla antibiótica al 1%), se trocearon y disgregaron suavemente con un bisturí, obteniéndose una suspensión que se recogió en tubos estériles.

B) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

Para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se procedió a su separación mediante gradiente de densidad sobre ficoll⁽⁶⁴⁾. Por este método se obtiene una interfase ficoll-plasma compuesta por células linfoides y monocitos.

Se colocaron suavemente 3 a 10 ml de ficoll en el fondo de 7 a 30 ml. de suspensiones de sangre o amígdala. Se centrifugaron a 600 g durante 45 minutos, se recogieron las interfases y se centrifugaron tres veces a 400 g durante 10 minutos resuspendiendo cada vez en SSF (lavado). El precipitado final se resuspendió en medio completo.

C) AISLAMIENTO DE SUBPOBLACIONES CELULARES.

1.- Obtención de linfocitos T por roseteo con hematíes de carnero tratados con AET^(145,166).

La suspensión de células de amígdalas o de CMSP se mezcló a la concentración de 3 a 5 x 10⁶ células/ml con otra de hematíes de carnero tratados con AET, de forma que resultase una proporción aproximada de 100 x 10⁶ células mononucleares por cada 2-3 ml. de la solución de AET-hematíes de carnero al 12%. Previa incubación a 37°C durante 5 minutos en baño se centrifugaron los tubos a 250 g. durante cinco minutos y se incubaron posteriormente a 4° C durante 45 minutos. A continuación, se suspendieron los precipitados muy suavemente y se vertieron 10 ml de ficoll en el fondo de cada tubo, centrifugándose durante 30 minutos a 500 g. El precipitado formado en el fondo, constituido por AET-hematíes de carnero unido a linfocitos T se mezcló a temperatura ambiente, con una solución de SSF y agua destilada (SSF 25%, agua destilada 75%), con el objeto de lisar los hematíes. La lisis fue interrumpida, a los treinta segundos, rellenándose los tubos con SSF. Tras dos lavados se resuspendió en medio completo. Tras este proceso se obtuvo una suspensión celular con más de un 90% de células formadoras de rosetas.

2.- Obtención de linfocitos B por roseteo con hematíes de carnero tratados con AET (selección negativa) y lisis con monoclonales (anti-CD3 y anti-MO₂).

Se siguió la misma técnica comentada en el apartado anterior. Tras la separación en gradiente de ficoll se recogieron las interfases formados por las células que no habían formado rosetas. Se lavaron con SSF y se sometieron en presencia de complemento, a un proceso de lisis con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-MO₂. Se añadió un microlitro de ambos anticuerpos por cada millón de células y se incubó durante 45 minutos a 4° C, con agitación cada 10 minutos. A continuación se añadió complemento de conejo en proporción 1/2 (v/v), incubándose durante 45 minutos a 37° C con agitación frecuente. La suspensión resultante fue lavada y resuspendida en medio completo. De esta forma se obtuvo una población adecuadamente purificada de linfocitos B (CD20+ ≥ 60%, CD3+ < 2%).

D) RECUENTO Y ESTUDIO DE VIABILIDAD DE LAS POBLACIONES OBTENIDAS.

En todas las suspensiones se determinó la concentración celular mediante dilución con azul tripán al 0,1% y posterior recuento con microscopio utilizando una cámara Neubaver. El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante; sólo se prosiguieron aquellos experimentos en los que la viabilidad fue mayor del 95%.

E) CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LAS POBLACIONES CELULARES.

1.- Tinción con anticuerpos monoclonales.

Se empleó una técnica de inmunofluorescencia indirecta, usando como sustrato la suspensión celular a estudiar (CMSP, linfocitos T o linfocitos B), que se incubó con diversas preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón y, en un segundo paso, con suero fluoresceinado anti-Ig de ratón, del que se utilizó su fracción F(ab)', para evitar una unión citofílica a CMSP.

Se incubaron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células con 5-50 microlitros de anticuerpo monoclonal (según titulación previa) durante 30 minutos a 4°C , agitando cada diez minutos. Se lavaron tres veces, dos con SSF y uno con medio completo, ambos al 1%, de suero bovino fetal, y sobre el último precipitado se añadieron 100 microlitros de una disolución al 1/60 de fracción F(ab)', fluoresceinado de Ig de cabra anti-IgG de ratón (FITC). Se repitió el proceso de incubación y lavado y se resuspendió en PBS al 0,4% de formol (conservante), hasta proceder al recuento de células.

Un resumen de los anticuerpos monoclonales utilizados en el análisis fenotípico se expone en la Tabla I.

2.- Recuento de células fluorescentes mediante citómetro de flujo EPICS C cell sorter.

Se valoraron las curvas de distribución de 10^4 células viables. Las células que se teñían más que el fondo presente en el segundo reactivo se calcularon mediante los bloques estadísticos incorporados en los sistemas V2.0 y V2.2A. El laser de argón fue sintonizado a 488 nm, que permite excitar

TABLA 1.- Anticuerpos monoclonales más empleados en el análisis de las poblaciones linfocitarias

AcMo	CD	Patron de reactividad
OKT11, anti-Leu 5,9.6	CD2	Linfocitos T, células NK. Receptor de hematias de carnero (LFA-3 o CD58)
OKT3, anti-Leu 4	CD3	Linfocitos T, complejo CD3 (cinco cadenas)
OKT4, anti-Leu 3a	CD4	Subpoblación de linfocitos T (cooperadora).Receptor HIV
OKT1, anti-Leu 1	CD5	Linfocitos T. Subpoblación de linfocitos B
OKT8, anti-Leu 2	CD8	Subpoblación de linfocitos T (citotóxica)
2F12	CD11a	Leucocitos. LFA-1
MO1	CD11b	Monocitos, granulocitos,células NK. Receptor C3bi
MO2	CD14	Monocitos
Leu11b	CD16	Células NK, macrófagos, subpoblación de linfocitos T. Receptor para Fc de IgG
B4	CD19	Linfocitos B
B1	CD20	Linfocitos B
B2	CD21	Linfocitos B. Receptor C3d y virus Epstein-Bahr
TAC	CD25	Linfocitos T, B, células NK y monocitos activados. Receptor de interleucina 2
Leu19, NKH-1	CD56	Células NK, subpoblación de linfocitos T
OKT9	CD71	Receptor de transferrina

la fluorescencia del FITC. Los porcentajes de células teñidas se calcularon integrando las señales de fluorescencia verde mediante un amplificador logarítmico.

F) CULTIVOS CELULARES

Todos los cultivos celulares realizados se desarrollaron en condiciones de esterilidad, manteniéndose a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

La respuesta a un determinado estímulo mitogénico depende de la densidad y tipo de célula estudiada, del tiempo de cultivo y de la concentración del agente mitogénico.

La densidad celular fue de $0,5 \times 10^6$ células /ml en medio de cultivo; se sembraron por duplicado o triplicado en placas estériles de 96 pocillos, con fondo plano, de forma que quedase al final un volumen de 0,2 ml. por pocillo.

El tiempo de cultivo fue variable, oscilando entre 3 y 7 días según los experimentos realizados.

La concentración adecuada del agente mitógeno puede variar con cada lote de fabricación, por lo que se utilizó uno sólo, en el que se determinó su concentración óptima sobre cultivos de donantes sanos. Las dosis empleadas fueron:

- Fitoheماغlutinina (PHA): 10 microgramos/ml.
- Interleucina 2 recombinante (IL2r): 10 ó 100 u/ml.
- Anti-CD3: 8 microgramos/ml.
- Forbol-miristato-acetato (PMA): 100 nanogramos/ml.
- SAC: 1/1000.
- Sobrenadante de amígdala humana: 25%, 12%, 6%.

Ante una activación mitogénica, los linfocitos sufren un proceso de blastogénesis con crecimiento y diferenciación celular. El método empleado para cuantificar la proliferación celular fue el análisis de la incorporación de timidina tritiada (3H-T) al DNA sintetizado "de novo". Para ello, tras la adición de 1 microcurio de 3H-T a cada pocillo durante las últimas 18-24 horas, los cultivos se recogieron por aspiración utilizando un colector de cultivos Skatron, obteniéndose los extractos secos de dichos cultivos. Estos extractos secos se distribuyeron en viales de centelleo a los que se añadió 4 ml. de líquido de centelleo, determinando en un contador beta la emisión de radiación beta en cuentas por minuto (cpm). Los resultados se expresaron como la media aritmética de las determinaciones realizadas en cada caso, siendo la variabilidad de los valores individuales menor del 10% de la media.

Todo lo referido previamente es válido para los ensayos de proliferación de células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T purificados. Sin embargo, los linfocitos B precisan una estimulación previa con SAC. Para ello se incuban linfocitos B a una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/ml (2 ml) en placas estériles de 24 pocillos de fondo plano junto a SAC a una concentración final de 1/1000. Tras un período de cultivo de 36-48 horas se recogen los linfocitos B ajustándolos a una concentración de $0,5 \cdot 10^6$ células/ml, estando preparados para la adición de los diferentes mitógenos. El período de cultivo completo fue de cinco días.

G) PRODUCCION DE SOBRENADANTES CONTENIENDO LINFOCINAS.

1.- Sobrenadantes de linfocitos T.

Los linfocitos T, a una concentración de 5×10^6 células/ml en medio completo que contenía 10 microgramos/ml. de PHA y 10% de suero bovino fetal, se incubaron en tubos estériles durante 24 y 72 horas⁽¹⁴⁰⁾. Con el objeto de detectar si existía secreción espontánea de linfocinas se mantuvieron paralelamente suspensiones celulares a idéntica concentración en medio sin PHA. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron a 500 g. durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes y fueron congelados a -20° C hasta su utilización.

2.- Sobrenadantes de linfocitos T de amígdala humana.

La suspensión de linfocitos T de amígdala fue sometida a un doble estímulo: cultivo mixto linfocitario con dos suspensiones de distintas amígdalas y PHA a 10 microgramos/ml en medio de cultivo durante 72 horas. Se obtuvo así un sobrenadante estandar con actividad IL-2, BCGF y BCDF que será referido como SN_u . Esta SN_u se filtró, alicuotó y congeló a -20° C hasta su utilización.

H) ENSAYO DE DETECCION DE LA ACTIVIDAD IL-2.

Para determinar la actividad IL-2 presente en los sobrenadantes de linfocitos T, se aprovechó que la línea celular CTL-L2 tiene dependencia absoluta de IL-2 en el medio de cultivo para su división y de forma dosis-dependiente⁽¹⁴¹⁾.

En este ensayo se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes y se completo con medio hasta 0,1 ml. en cada pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente se añadió 0,1 ml. de una suspensión de CTL-L2 a una concentración de 5×10^4 células/ml. Tras 18 horas de cultivo se añadió un microcurio de $^3\text{H-T}$ por pocillo, continuando la incubación seis horas más, después de las cuales se llevó a cabo la recogida y procesamiento del cultivo.

En cada experimento se determinó la incorporación basal de $^3\text{H-T}$ de las células en ausencia de IL-2, y la proliferación ocasionada por distintas concentraciones de IL-2r.

I) ENSAYO DE ACTIVIDAD NK

Como fuentes de células dianas se emplearon las líneas K-562 y JY. El marcaje con Cr51 se llevó a cabo por incubación de $1-3 \times 10^6$ células suspendidas en 100 microlitros de SBF al que se añadió 100 a 150 microcurios de Cr51 (100-150 microlitros de una disolución de cromato sódico con una actividad específica de 1 mCi/ml). La incubación se efectuó en un baño a 37°C durante 90 minutos con agitación intermitente. A continuación, las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en medio completo a una concentración de 50.000 células/ml. Como células efectoras se utilizaron células mononucleares de sangre periférica⁽¹⁶⁾.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de fondo en U. En cada pocillo se incubaron las células efectoras (100 microlitros de 4 diluciones para obtener una relación efectora/diana de 50:1, 25:1, 12:1 y 6:1) y las células diana (100 microlitros de la suspensión; 5000

células/pocillo). Los ensayos se realizaron por triplicado, y se incluyeron controles de células dianas sin efectoras para valorar la liberación espontánea de Cr51 y pocillos en los que las células dianas se mezclaron con detergente para valorar la liberación máxima de Cr51. Posteriormente, las placas se incubaron durante 4 horas a 37° C y 5% de CO₂, y al final de este período se aspiraron 100 microlitros de sobrenadante de cada pocillo para el conteo de la radiación gamma emitida. Tras la medición, se calculó la media y la desviación estándar de cada triplicado. Para calcular el porcentaje de lisis específica (LE) se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LE} = \frac{P - E}{M - E} \times 100$$

donde:

P = X cpm de la muestra problema

M = X cpm de la liberación máxima

E = X cpm de la liberación espontánea.

IV.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los estudios experimentales realizados se presentan en forma de medias y desviaciones estándar.

Para el estudio estadístico, inicialmente se analizó la naturaleza de las distribuciones empleando el contraste de

normalidad de Shapiro-Whilk. En general, los datos obtenidos no siguieron distribuciones normales por lo que se emplearon contrastes no paramétricos al efectuar comparaciones entre las distintas muestras. Los test empleados fueron los siguientes: contraste U de Mann Whitney, para muestras independientes; contraste T de Wilconxon, para datos emparejados; T de Student, en el caso de haberse comprobado las hipótesis de normalidad. Al analizar la posible relación entre algunas variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. En todas las comparaciones realizadas, se valoraron niveles de significación por debajo del 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

I.- DATOS CLINICOS

Los 41 pacientes estudiados fueron clasificados en tres grupos (Tabla II): A (11 pacientes), enfermos con anemia perniciosa en los que no se había iniciado tratamiento con vitamina B12 parenteral; B (21 pacientes), aquellos afectos previamente de anemia perniciosa que seguían tratamiento satisfactorio con vitamina B12 parenteral y C (9 pacientes), con gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa.

El grupo incluía 29 mujeres (70,7%) y 12 varones (29,2%), cuya edad media fue de 69,5 años (rango 30-87). No existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y el sexo entre los tres grupos previamente mencionados, ni con respecto a los controles.

Clínicamente se encontraban asintomáticos 25 pacientes (61%) y sintomáticos 16 (39%). Seis enfermos del grupo A estaban sintomáticos. Sus datos clínicos fueron: astenia y anorexia (5/6), ictericia (3/6), palidez (5/6), insuficiencia cardíaca (3/6), parestesias (2/6), trastornos psiquiátricos (1/6) y quemazón lingual (1/6). Los otros cinco fueron diagnosticados de forma casual al realizar un análisis de rutina (4/5) o coincidiendo con un proceso intercurrente (1/5). De los 21 pacientes del grupo B, 18 se encontraban asintomáticos y tres presentaban astenia, uno de ellos asociado a ferropenia. De los 9 pacientes del grupo C, siete estaban sintomáticos con molestias epigástricas (2/7), diarrea (5/7) y astenia (1/7); este último caso asociado también a ferropenia.

TABLA II.-

HALLAZGOS CLINICOS Y ANALITICOS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS, DISTRIBUIDOS EN TRES GRUPOS (A: ANEMIA PERNICIOSA SIN TRATAMIENTO; B: ANEMIA PERNICIOSA HEMATOLOGICAMENTE RESUELTA EN TRATAMIENTO CON VITAMINA B12 PARENTERAL; C: GASTRITIS CRONICA AUTOINMUNE SIN ANEMIA PERNICIOSA), EXPRESADO EN MEDIA (DESVIACION STANDARD). LOS DATOS CLINICOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJES.

VARIABLE	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GLOBAL	RANGO NORMAL
EDAD (años)	73.4 (5.9)	71.4 (13.4)	62.3 (18.8)	69.5 (13.1)	
SEXO FEMENINO	8/11 (72%)	14/21 (66%)	7/9 (77%)	29/41 (70%)	
ASINTOMATICOS	5/11 (45%)	18/21 (85%)	2/9 (22%)	25/41 (61%)	
ENFERMEDAD AUTOINMUNE ASOCIADA	1/11 (9%)	2/21 (9%)	3/9 (33%)	6/41 (14%)	
HEMOGLOBINA (gramos/dl)	10.4 (4.6)	14.2 (1.7)	13.7 (1.4)	12.8 (3.3)	13.5-17.5 (V) 12-16 (H)
V. C. M. (fentolitros)	118.1 (17.6)	94.8 (5.8)	89.8 (8.5)	101.5 (16.3)	82-99
LEUCOCITOS ($\times 10^9/l$)	6.0 (1.9)	6.4 (1.1)	6.6 (1.2)	6.3 (1.4)	4-10
LINFOCITOS ($\times 10^9/l$)	1.3 (0.7)	1.9 (0.8)	1.9 (0.3)	1.7 (0.7)	1.5-4
MONOCITOS ($\times 10^9/l$)	0.2 (0.2)	0.3 (0.1)	0.7 (0.2)	0.3 (0.2)	0.2-0.9
PLAQUETAS ($\times 10^9/l$)	197.0 (109.5)	258.3 (57.5)	248.7 (48.4)	237.2 (78.0)	150-400
COBALAMINA (picogramos/ml)	358.2 (193.3)	845.2 (526.2)	740.8 (406.4)	685.7 (466.3)	300-1000
ACIDO FOLICO (nanogramos/ml)	12.8 (3.1)	11.5 (5.1)	11.4 (2.9)	11.8 (4.1)	3-18

VARIABLE	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GLOBAL	RANGO NORMAL
PEPSINOGENO (nanogramos/ml)	11.7 (6.0)	12.9 (10.5)	22.4 (17.6)	15.0 (12.2)	20-80
GASTRINA (picogramos/ml)	785.8 (527.8)	841.4 (327.6)	320.1 (339.4)	676.6 (446.2)	30-90
HIERRO (microgramos/dl)	133.7 (79.8)	93.0 (34.5)	82.1 (24.4)	105.8 (57.2)	60-125
TRANSFERRINA (miligramos/dl)	229.0 (43.5)	275.7 (50.4)	291.1 (40.3)	263.2 (51.4)	220-400
FERRITINA (nanogramos/ml)	212.4 (130.1)	113.3 (117.4)	51.1 (73.0)	134.6 (127.1)	50-350
PROTEINAS TOTALES (gramos/dl)	6.0 (0.8)	7.0 (0.1)	6.9 (0.2)	6.6 (0.6)	6-8
ALBUMINA (gramos/dl)	3.8 (0.4)	4.4 (0.2)	4.3 (0.2)	4.2 (0.3)	3.5-5
GOT (U/dl)	31.2 (17)	20.6 (2.3)	20.7 (4.3)	23.5 (10.1)	7-40
LDH (mU/dl)	491 (228)	242 (97)	198.2 (26.7)	275.4 (169)	100-225
BILIRRUBINA (mg/dl)	1.7 (1.4)	0.7 (0.1)	0.7 (0.2)	1 (0.8)	0.15-1
COLESTEROL (mg/dl)	150.6 (48)	219.8 (34)	195.7 (32.2)	187.9 (44)	150-265
Ig G (mg/dl)	1038.5 (343.1)	1185 (224.4)	1147.4 (145.6)	1129.3 (253.9)	539-1349
Ig A (ml/dl)	220.8 (145.8)	216.4 (133.7)	265 (137.1)	230.3 (135.9)	70-312
Ig M (ml/dl)	124.1 (58.2)	123.6 (56.3)	150.4 (66.3)	130.7 (58.9)	56-352

La exploración física fue normal en todos los casos a excepción de los seis pacientes sintomáticos del grupo A que presentaban palidez (5/6), ictericia (3/6) y semiología de insuficiencia cardíaca (3/6) ya comentados, así como, disminución de la sensibilidad profunda en miembros inferiores (3/6).

Las enfermedades autoinmunes asociadas fueron: hipotiroidismo (4) y vitiligo (4). Dos pacientes asociaban ambos procesos.

En ningún enfermo observamos desarrollo de adenocarcinoma gástrico y un paciente presentó fibrosis pulmonar idiopática en su evolución.

II.- DETERMINACIONES ANALITICAS

A) HEMOGRAMA

El valor absoluto medio de las concentraciones de hemoglobina, leucocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas así como el volumen corpuscular medio se muestra en la tabla II. Se observó una disminución de la concentración de hemoglobina y un aumento en el volumen corpuscular medio en el grupo A, estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto a los enfermos de los grupos B y C. La cuantificación de plaquetas, leucocitos y linfocitos fue inferior en el grupo A pero no estadísticamente significativa ($p > 0,05$); no así el de monocitos que fue inferior en los grupos A y B respecto a C y estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

B) BIOQUIMICA SERICA

El valor medio global de los parámetros bioquímicos estudiados así como su distribución por grupos se expone en la tabla II. Se observaron con más frecuencia alteraciones en el A. Así se observó una disminución de la cobalamina y un aumento de bilirrubina y lacticodeshidrogenasa (LDH) con respecto a los grupos B y C ($p < 0.05$). Asimismo se detectaron en los tres alteraciones en aquellas pruebas que constituyen parámetros propios de la enfermedad como la hipopepsinogenemia y la hipergastrinemia. Es de interés reseñar que cinco pacientes del grupo B que presentaban cifras de hierro y transferrina normales tenían una ferritina disminuida denotando una ferropenia coexistente.

Las concentraciones séricas de inmunoglobulina G, A y M fueron normales en los tres grupos, sin existir diferencias significativas. Sin embargo se objetivó: disminución de la IgG en dos pacientes del grupo A; de la IgA en otros dos (uno del grupo A y otro del grupo B); y de la IgM en cuatro enfermos (dos del grupo A, uno del B y otro del C).

C) PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS

Los anticuerpos anticélulas parietales gástricas fueron positivos en 25 de 36 determinaciones séricas realizadas (69,4%). Los casos negativos fueron dos del grupo A, cinco del B, y cuatro del C. En global el 75% de los pacientes con anemia perniciosa tenían ACPG, así como el 55% de los enfermos con gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa.

Se realizaron 13 determinaciones de anticuerpos antitiroideos siendo positivos en nueve casos (69,2%), frente

a la fracción microsomal y en dos también a tiroglobulina. De 23 detecciones de anticuerpos antinucleares cinco fueron positivos (21,7%) a títulos bajos ($\leq 1/40$) y quince de antimitocondriales y antímúsculo liso fueron negativas.

III.- ESTUDIOS RADIOLOGICOS, ENDOSCOPICOS Y BIOPSICOS

Se realizaron 25 estudios con bario del tracto digestivo superior siendo nueve de ellos normales. En los 16 restantes se observó disminución de pliegues en 8/16 compatible con gastritis atrófica y hernia de hiato en 9/16. Se llevaron a cabo veinticinco endoscopias, siendo seis normales. De los 19 restantes se observó disminución de pliegues y palidez mucosa en 11/19, hernia de hiato 7/19 y pólipos en cuerpo 3/19.

De los estudios biópsicos diferentes de cuerpo y antro gástricos, 21 presentaron gastritis crónica atrófica corporal difusa, con extensión antral en once. Dos biopsias no fueron valorables.

En quince pacientes afectos de anemia perniciosa y antes de haber empezado tratamiento con vitamina B12 se realizó biopsia de médula ósea observándose rasgos megaloblásticos en todas ellas.

IV.- OTRAS PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

En todos los pacientes se realizó el test de Schilling que fue normal en los que presentaron una gastritis crónica sin anemia perniciosa. Los enfermos con anemia perniciosa presentaron un defecto de absorción de B12 corregido con factor intrínseco.

En 14 pacientes se realizó estudio del quimismo gástrico observando en todos aquilia histaminorresistente.

V.- ESTUDIO EXPERIMENTAL

A) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE PACIENTES CON "ANEMIA PERNICIOSA HEMATOLÓGICAMENTE RESUELTA".

Inicialmente estudiamos a 21 pacientes con anemia perniciosa en tratamiento con vitamina B12 (entre 3 y 60 meses) que, en el momento de realizar el estudio, no presentaban alteraciones hematológicas. A este grupo le hemos denominado "anemia perniciosa hematológicamente resuelta".

1.-Estudio fenotípico de las células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T purificados del grupo de pacientes con "anemia perniciosa hematológicamente resuelta" y controles

Se cuantificó el porcentaje de células marcadas con el monoclonal correspondiente de cada subpoblación celular respecto al total de la población analizada. Como se observa en la Tabla III, el análisis estadístico de los resultados obtenidos no demostró diferencias significativas entre las proporciones de CMSP reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD20, anti-CD14 y anti-CD16, en el grupo de pacientes y en el de controles.

Tabla III.- Estudio fenotípico de las CMSP de una muestra de pacientes con anémia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles

FENOTIPO	PACIENTES	CONTROLES	VALOR DE p
Linfocitos T (CD3+)	60,4 (7,3)	69 (9,6)	>0,05
Linfocitos B (CD20+)	22 (3,2)	16,6 (5,1)	> 0,05
Monocitos (CD14+)	21,6 (10,9)	19 (6,9)	> 0,05
Células NK (CD16+)	16,7 (8,2)	14 (8,2)	> 0,05

Los resultados expresan la media y desviación estandar de los porcentajes de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.
CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

Posteriormente se realizó un estudio de las diferentes subpoblaciones presentes en preparaciones de linfocitos T purificados (Tabla IV). Al igual que en las CMSP no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de células marcadas con los monoclonales anti-CD2, CD3, CD4, CD8 de ambos grupos. El cociente CD4/CD8 fue similar al de controles.

2.- Respuesta proliferativa de CMSP y linfocitos T purificados de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles tras estímulo mitogénico

Se estudiaron dos poblaciones celulares diferentes. Por un lado, la CMSP en que la proporción media de linfocitos T fue aproximadamente del 60% (determinada mediante el estudio de la expresión del antígeno de membrana CD3) y por otro, linfocitos T purificados con una pureza de alrededor del 90%.

a) Respuesta blastogénica de CMSP y linfocitos T, basalmente y tras adición al medio de fitohemaglutinina.

La respuesta proliferativa basal (células en presencia exclusiva de medio de cultivo) tanto de CMSP como de linfocitos T purificados fue similar y escasa en los pacientes y controles. Sin embargo, tras estímulo mitogénico por fitohemaglutinina, la síntesis de DNA de CMSP y linfocitos T purificados tras cinco días de cultivo fue significativamente menor en los pacientes que en los controles (Figura 5, Tabla V).

Se consideró la posibilidad de que la hipoproliferación observada en los pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta a los cinco días de

cultivo fuese debida a una alteración en la cinética de la respuesta, entendiendo como tal, un adelanto o atraso del pico máximo de síntesis de DNA tras estímulo con PHA. En este sentido, se determinó la respuesta proliferativa a dicho mitógeno tras 3, 5 y 7 días de cultivo. Como se puede comprobar en la Figura 6, tanto en pacientes como en controles los niveles más elevados de blastogénesis se observaron al quinto día de cultivo. La respuesta proliferativa de las CMSP y linfocitos T de los pacientes fue significativamente inferior en el tercer y quinto día de cultivo con respecto a los controles, igualándose en el séptimo.

Atendiendo a la respuesta inducida por fitohemaglutinina en el quinto día de cultivo proliferativo los pacientes se clasificaron en dos subgrupos según que ésta hubiese sido normal (considerando como tal a aquella que estuviese incluida dentro de la desviación estandar establecida por la población control, o disminuida (por debajo del referido rango de normalidad). En este sentido siete pacientes se encontraron en el subgrupo de normorrespondedores o normoproliferantes y 14 en el de hiporrespondedores o hipoproliferantes.

Dado que en los experimentos previamente comentados los cultivos celulares fueron llevados a cabo en presencia de suero bovino fetal estudiamos la posibilidad de que cultivados con sus respectivos sueros autólogos, la hiporrespuesta observada se modificase. La respuesta blastogénica conseguida con la suplementación de este suero fue superior a la observada con el suero bovino fetal y el pico de máxima proliferación se adelantó al tercer día. La síntesis de DNA de CMSP y linfocitos T purificados cultivados con sus sueros autólogos, tras estímulo con fitohemaglutinina, al tercer día de cultivo, fue significativamente inferior en los pacientes con respecto a la de los controles (Figura 7).



TABLA IV.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles

FENOTIPO	ANEMIA PERNICIOSA RESUELTA	CONTROLES	VALORES DE P
CD2+	87,5 (6,7)	90,8 (4,5)	> 0,05
CD3+	72,0 (13,0)	77,8 (14,5)	> 0,05
CD4+	43,5 (11,2)	47,7 (14,1)	> 0,05
CD8+	32,7 (12,6)	30,0 (10,7)	> 0,05
CD4/CD8	1,49 (0,6)	1,80 (1,0)	> 0,05

Los resultados expresan la media y desviación estandar de los porcentajes de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

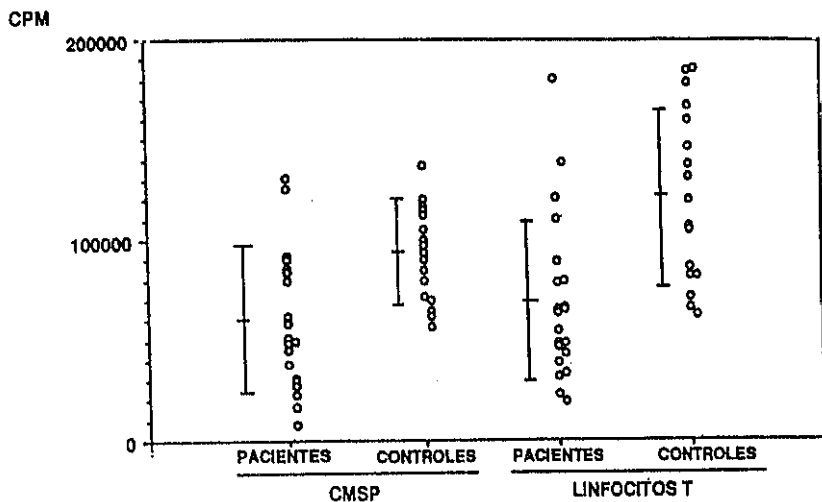


FIGURA 5.- Respuesta proliferativa de las CMSP y linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaglutinina de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, tras cinco días de cultivo.

TABLA V.- Respuesta proliferativa de las CMSP y linfocitos T de sangre periférica de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, basalmente y tras el estímulo proporcionado por diversos mitógenos

<u>MITOGENO</u>	<u>PACIENTE</u>	<u>CONTROLES</u>	<u>VALOR DE P</u>
<u>C M S P</u>			
BASAL	482 (366)	564 (688)	N.S.
PHA	59.372 (33.774)	92.765 (23.134)	< 0,05
Anti-CD3	24.716 (16.031)	33.288 (13.178)	N.S.
<u>LINFOCITOS T</u>			
BASAL	489 (542)	371 (439)	N.S.
PHA	69.072 (40.501)	122.227 (43.165)	< 0,05
PMA	35.135 (10.852)	40.107 (13.396)	N.S.

Resultados expresados como media (desviación estandar) en cpm.
 ABREVIATURAS empleadas: PHA: litoheماغlutinina; Anti-CD3: anticuerpo monoclonal anti-CD3; PMA: forbol-miristato-acetato (ester del forbol). N.S.: no significativo ($p > 0,05$)

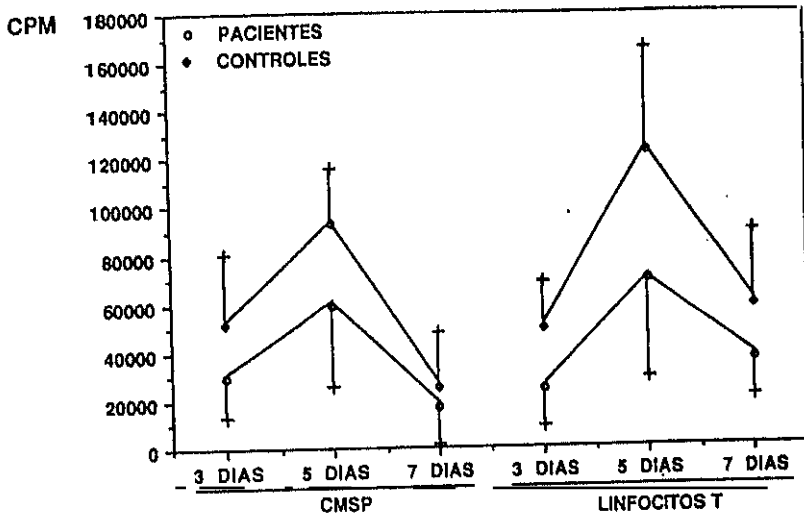


FIGURA 6.- Cinética de la respuesta proliferativa de CMSP y linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaglutinina, en pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

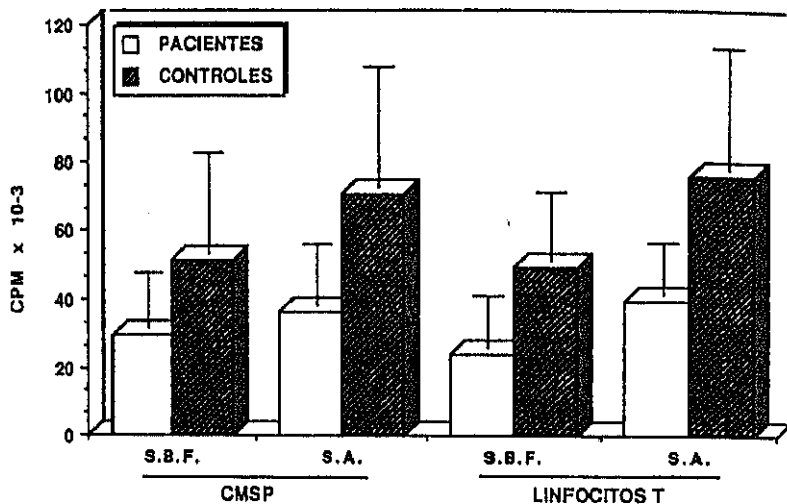


FIGURA 7.- Respuesta proliferativa en presencia de suero bovino fetal o suero autólogo de CMSP y linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaglutinina en pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles, al tercer día de cultivo.

b) Respuesta proliferativa de las CMSP de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta a los mitógenos que interaccionan selectivamente con el complejo CD3/Ti.

Teniendo en cuenta la alteración previamente demostrada de la síntesis de DNA por los CMSP tras estímulo con fitohemaglutinina de los pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta, se investigó su respuesta proliferativa a la estimulación con el AcMo anti-CD3, el cual reconoce selectivamente el antígeno CD3, que está integrado en el complejo Ti/CD3 y se halla implicado en la transducción de la señal de activación producida por la unión antígeno-Ti.

La síntesis de DNA inducida por anti-CD3 fue similar en el grupo total de pacientes y en los controles (Tabla V). Profundizando en el estudio investigamos por separado la respuesta blastogénica inducida por anti-CD3 de los enfermos normoproliferantes e hipoproliferantes a la estimulación con fitohemaglutinina. Como se aprecia en la Figura 8, la síntesis de DNA en presencia de anti-CD3 fue significativamente menor en el grupo de los hipoproliferantes con respecto a la observada en los normoproliferantes y en los sujetos controles sanos no apreciándose diferencias entre las de estos dos últimos grupos.

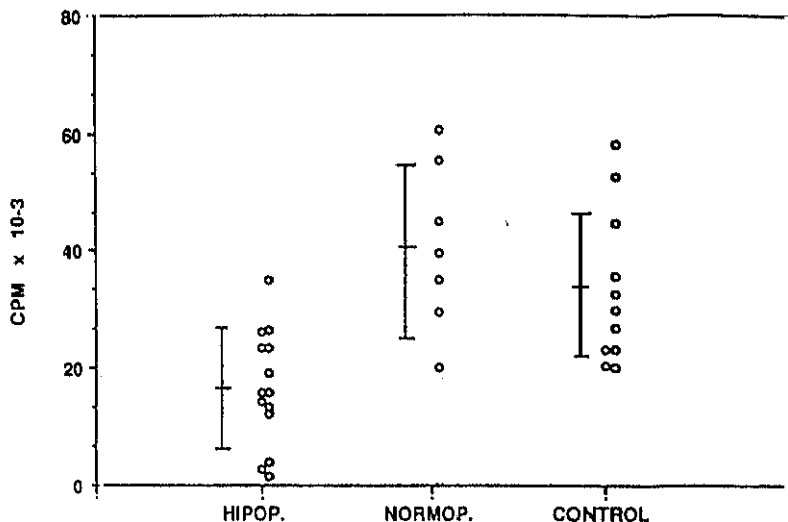


FIGURA 8.- Respuesta proliferativa de CMSP frente a anti-CD3 en función de los grupos formados según la respuesta a fitohemaglutinina (hipo y normoproliferativos) de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

c) Respuesta proliferativa de los linfocitos T de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta a mitógenos que actúan sobre proteincinasa C (PKC)

La hipoproliferación de los linfocitos T observada en un grupo de pacientes tras estímulo mitógeno con PHA y anti-CD3 pudiera ser explicada por un defecto en la unión de estas moléculas a sus receptores y/o a una alteración en la transducción de su señal. Como comentamos previamente la respuesta a los distintos ligandos de estructuras de superficie es transmitida al interior de la célula mediante la activación de segundos mensajeros, entre las que se incluye con una función esencial a la proteincinasa C.

El estímulo de esta vía metabólica mediante la adición al medio de cultivo de forbol-miristato-acetato (PMA) produjo una respuesta blastogénica similar en los linfocitos T de pacientes y en los de controles (Tabla V). Esta respuesta proliferativa fue así mismo similar en los dos subgrupos subdivididos en base a la síntesis de DNA en presencia de PHA y en los individuos controles sanos (Figura 9).

3.- Estudio de la implicación de la interleucina 2 en la activación del linfocito T de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

Si siguiendo el modelo de Larsson y cols., dividiremos el estudio de la activación de los linfocitos T en tres fases: 1) Producción de IL-2. 2) Expresión del receptor para IL-2. 3) Respuesta blastogénica tras la interacción de la IL-2 con su receptor.

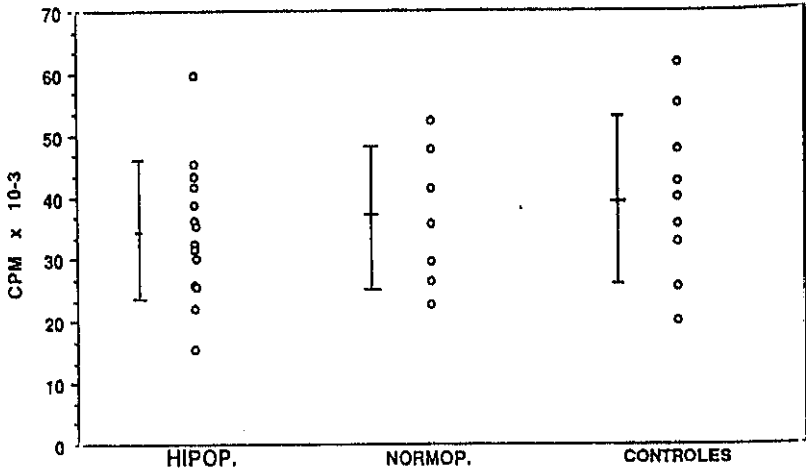


FIGURA 9.- Respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados frente a PMA (éster del forbol) en función de los grupos formados según la respuesta a fitohemaglutinina (hípo y normoproliferativos) de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

a) Producción de sobrenadantes con actividad IL-2

En condiciones basales no se demostró actividad IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de 24 y 72 horas de los linfocitos T de pacientes y controles.

Cuando estos linfocitos T se estimularon con fitohemaglutinina, se detectó fuerte actividad IL-2 en los sobrenadantes con niveles similares en pacientes y controles ($p > 0.05$) (Figura 10). Distribuidos los pacientes en función de la respuesta blastogénica de los linfocitos T a la fitohemaglutinina (hipoproliferantes y normoproliferantes) no se detectaron diferencias significativas en la producción de IL-2 ambos grupos ni con respecto a los controles (Tabla VI). Tanto en pacientes como en sujetos sanos la actividad IL-2 presente en el medio de cultivo fue mayor en los sobrenadantes de 24 horas que en los del tercer día.

b) Expresión de moléculas de activación.

Determinamos a continuación la expresión del receptor para IL-2, junto con la de otras moléculas de superficie, ausentes en fase quiescente y cuya aparición en la membrana citoplasmática del linfocito T se relaciona con fases posteriores del ciclo celular. Con dicho objetivo se analizó secuencialmente en los linfocitos T de 6 pacientes y 6 controles, basalmente y a las 24 y 72 horas tras estímulo con PHA, la expresión de dichas moléculas, mediante el empleo de una serie de AcMo que permiten su reconocimiento. Entre los pacientes estudiados, tres pertenecían al grupo hipoproliferante y tres al normoproliferante previamente descrito.

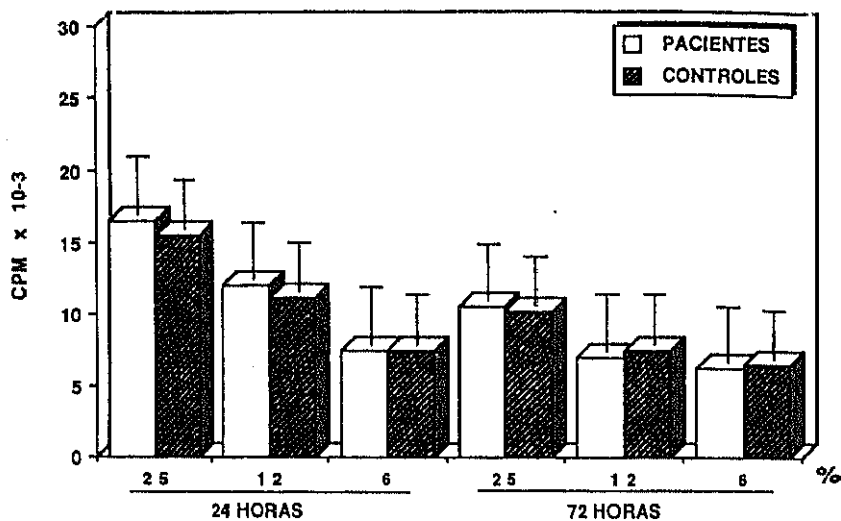


FIGURA 10.- Cuantificación de la actividad interleucina 2 en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T purificados, previamente estimulados con fitohemaglutinina a 24 y 72 horas, de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

TABLA VI.- Actividad interleucina 2 detectada en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T, estimulados con fitohemaglutinina, de pacientes con anemia perniciosa resuelta distribuidos en función de la respuesta blastogénica a PHA y controles.

DILUCION DEL SOBRENADANTE		PACIENTES		CONTROLES
		HIPOP	NORMOP	
24 HORAS	25%	12413(2605)	16632(4122)	15869 (3125)
	12%	8432(2315)	12514(3992)	11278 (4032)
	6%	5015(1419)	9015(2883)	7462 (3015)
72 HORAS	25%	8719(2901)	12112(3416)	10259 (3803)
	12%	5691(1907)	9016(2911)	7596 (2649)
	6%	3566(1012)	7121(2018)	6817 (2111)

Resultados expresados como media (desviación estandar) en cpm.

HIPOP: hipoproliferativos

NORMOP: normoproliferativos

Los receptores de activación estudiados fueron: receptor para la IL-2 (cuya cadena p55 es reconocida por el AcMo antiTAC), moléculas de clase II del SPH (reconocidas por antiDR) y receptor para la transferrina (reconocida por el antiT9).

La densidad celular y la cinética de expresión de las distintas moléculas reconocidas por los citados AcMo en los linfocitos T de los pacientes no diferían en los controles sanos, y en los enfermos independientemente de que estuvieran encuadrados en los grupos "hipo" o "normoproliferantes" (Tabla VII).

c) Respuesta blastogénica del linfocito T en presencia de IL-2 recombinante

Se cuantificó la proliferación obtenida tras la adición de IL-2r a los cultivos de linfocitos T no estimulados con mitógenos, con el fin de analizar mediante un examen funcional la hipótesis de que la cadena p75 del receptor para la IL-2 (se había descartado mediante estudio fenotípico la expresión de la cadena p55) estuviera expresada en los linfocitos T en reposo de los pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y que la interacción IL-2r/p75 fuera funcionalmente activa, en cuyo caso se detectaría una respuesta blastogénica superior a la de los individuos controles tras la citada suplementación. Para ello se analizó la proliferación obtenida tras la adición de IL-2 recombinante en dosis saturantes (10 y 100 u/ml) a los cultivos de linfocitos T no estimulados con mitógenos.

TABLA VII.- Expresión de receptores de activación en la membrana citoplasmática de linfocitos T de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, basalmente y tras estímulo con fitohemaglutinina a 24 y 72 horas

TIEMPO (horas)	IL-2R		DR		T9	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
0	2,3(1,6)	2,7(1,3)	6,2(2,4)	6,5(2,9)	3,1(1,9)	2,9(1,5)
24	39,6(14,8)	31,2(16,1)	30,8(4,0)	36,5(9,1)	23,5(6,1)	21,7(5,6)
72	57,5(11,4)	58,6(19,0)	45,0(9,5)	48,0(8,4)	53,5(14,7)	63,5(23,3)

Los resultados expresan la media (desviación estandar) en porcentaje de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

ABREVIATURAS:

- IL-2R: Cadena p55 del receptor para la interleucina 2 reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-TAC
- DR: Molécula de clase II del sistema principal de histocompatibilidad
- T9: Receptor para la transferrina

Paralelamente investigamos el efecto de la incorporación de IL-2 recombinante a cultivos de linfocitos T purificados estimulados con fitohemaglutinina. El objeto de esta fase de nuestra investigación fue analizar si el aporte exógeno en dosis saturantes normalizaba o no la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los pacientes.

Basalmente, la adición de IL-2r produjo un ligero aumento dosis-dependiente de la respuesta blastogénica de los linfocitos T, tanto en enfermos como en controles, no apreciándose diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 11).

En presencia de fitohemaglutinina cuando se suplementó el medio de cultivo de los linfocitos T de los pacientes con IL-2 a concentraciones saturantes no revirtió la alteración ni incrementó significativamente su respuesta mitogénica frente a lectinas. En los controles tampoco se observó una tendencia al incremento de la respuesta (Figura 11).

4.- Estudio funcional de la población linfocida B de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

De forma paralela al estudio de la población linfocida T se investigó el estado funcional de los linfocitos B de sangre periférica de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles. Para ello valoramos la respuesta proliferativa de los linfocitos B purificados, basalmente y tras estímulo mitogénico.

La síntesis de DNA por los linfocitos B mantenidos en cultivo durante cinco días en ausencia de estímulo blastogénico fue similar en el grupo de pacientes y en el de controles (Figura 12).

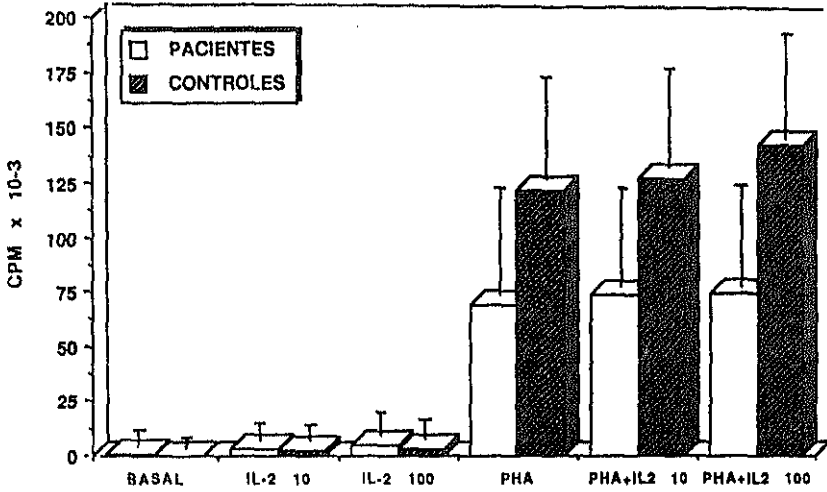


FIGURA 11.- Efecto de la adición de IL-2r sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados, de forma aislada o conjuntamente con PHA, de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

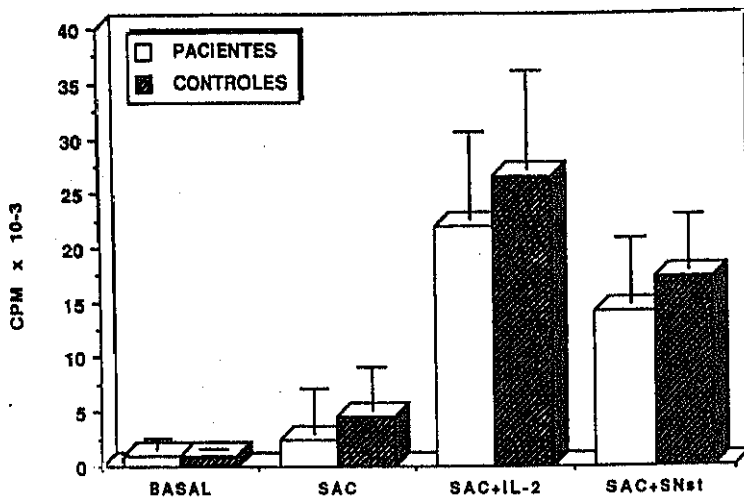


FIGURA 12.- Respuesta blastogénica de los linfocitos B, basalmente y tras diversos estímulos mitogénicos, de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

A continuación se estudió la respuesta proliferativa de los linfocitos B de pacientes y controles incubados previamente durante 36 horas con SAC, el cual origina la activación y proliferación de los linfocitos B mediante su unión a las Igs de superficie y su entrecruzamiento. En estas condiciones, la síntesis de DNA tanto en enfermos como en controles fue con SAC superior a la observada en ausencia de este estímulo. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de sujetos (Figura 12).

Los linfocitos B, activados por antígeno o ligandos de las Igs de superficie, expresan en su membrana citoplasmática receptores para una serie de linfocinas producidas por los linfocitos T estimulados. La interacción de estas moléculas con sus receptores en los linfocitos B induce la proliferación y/o diferenciación de los mismos. Estas citocinas se agrupan genéricamente como actividad BCGF y actividad BCDF según promuevan la proliferación o diferenciación del linfocito B.

Los factores con actividad BCGF actúan sobre los linfocitos B que expresan receptores para los mismos induciendo su avance en el ciclo celular. Basados en este concepto, investigamos el efecto proliferativo de la adición de diversas linfocinas con actividad BCGF (IL-2 recombinante o sobrenadante BCGF estandar) sobre blastos B de sangre periférica obtenidos tras incubación previa con SAC como previamente se ha comentado. En estas diferentes condiciones experimentales, los linfocitos B de los pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta presentaron una blastogénesis similar a la de los individuos controles (Figura 12).

5.- Estudio de la actividad NK de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles

Conjuntamente al estudio de la población linfóide T y B realizamos un análisis de la actividad NK de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles frente a la línea celular K-562 (NK-sensible).

No observamos diferencias significativas en la actividad NK, expresada en porcentaje de lisis específica, desarrollada por pacientes y controles en las diversas diluciones utilizadas (Figura 13).

B.- ESTUDIO EXPERIMENTAL DE PACIENTES CON "ANEMIA PERNICIOSA".

A continuación estudiamos un grupo de 11 pacientes con anemia perniciosa no tratada con vitamina B12, que presentaban en el momento de realizar el estudio manifestaciones hematológicas diversas (macrocitosis, anemia, pancitopenia). A este grupo le hemos denominado "anemia perniciosa".

Se realizó un estudio secuencial similar al seguido con los pacientes de anemia perniciosa resuelta pero enfocándonos en los linfocitos T purificados, linfocitos B y células NK.

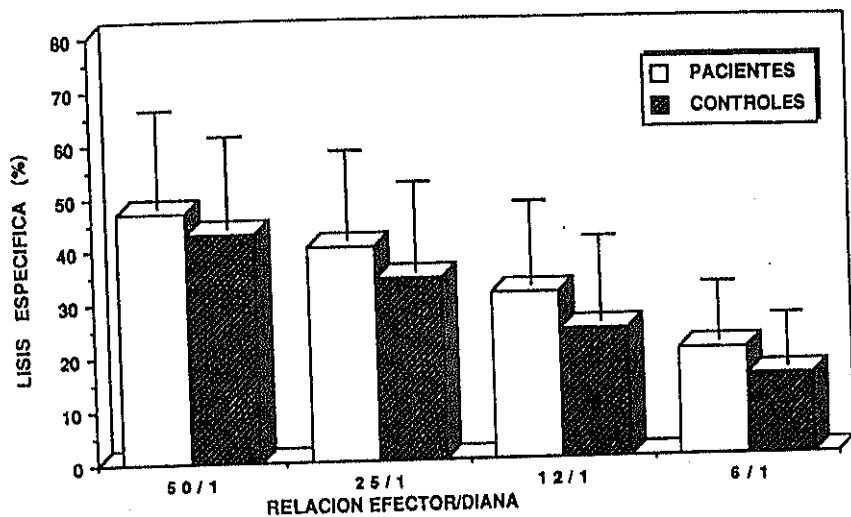


FIGURA 13.- Actividad NK de las CMSP frente a K-562 de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

1.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados del grupo de pacientes con anemia perniciosa y controles

No observamos diferencias significativas en los porcentajes de células marcadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD2, CD3, CD4, CD8 y CD16. Así mismo el cociente CD4/CD8 fue similar al de individuos controles (Tabla VIII).

Al comparar estos resultados con el grupo de pacientes "anemia perniciosa hematológicamente resuelta" tampoco se observaron diferencias significativas (Tabla VIII).

2.- Respuesta proliferativa de CMSP y linfocitos T purificados de pacientes con anemia perniciosa y controles tras estudio mitogénico

a) Respuesta blastogénica de linfocitos T, basalmente y tras adición al medio de fitohemaglutinina

La proliferación basal de los linfocitos T purificados tras cinco días en medio de cultivo fue similar y mínima en pacientes con anemia perniciosa y controles. Sin embargo, tras estímulo mitogénico con fitohemaglutinina, se detectó una marcada respuesta blastogénica al quinto día de cultivo que fue significativamente menor en los pacientes que en los controles (Figura 14, Tabla IX). No obstante, al comparar el grupo de pacientes de "anemia perniciosa" frente al de "anemia perniciosa hematológicamente resuelta" no se observaron diferencias significativas en la síntesis de DNA de sus linfocitos T en estas condiciones experimentales.

TABLA VIII.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles

FENOTIPO	ANEMIA PERNICIOSA	ANEMIA PERNICIOSA RESUELTA	CONTROLES
CD2+	89,4 (5,5)	86,5 (10,7)	90,8 (4,5)
CD3+	74,8 (6,9)	72,0 (13,0)	77,8 (14,5)
CD4+	46,7 (10,5)	43,5 (11,2)	47,7 (14,1)
CD8+	27,0 (10,4)	32,7 (12,6)	30,0 (10,7)
CD4/CD8	2,0 (0,9)	1,49 (0,6)	1,80 (1,0)
CD16	14,2 (8,3)	16,7 (8,2)	14,0 (8,2)

Los resultados expresan la media en porcentaje (desviación estandar) de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

p > 0,05 en las comparaciones realizadas entre grupos

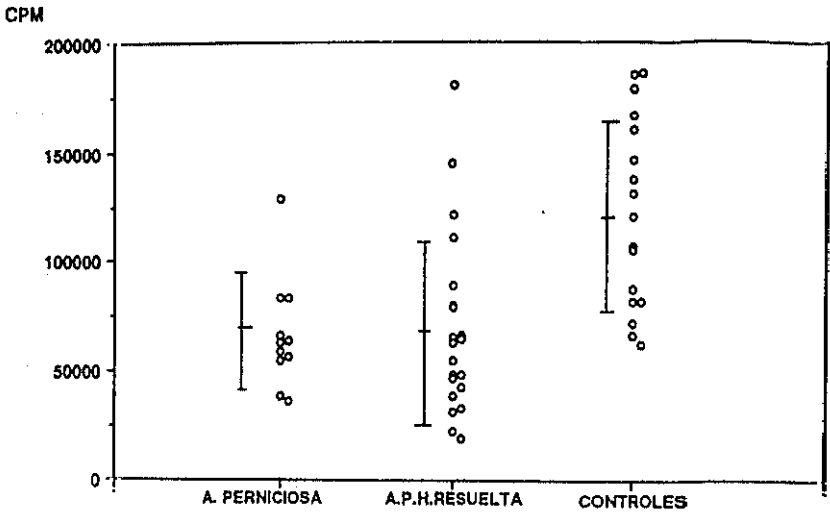


FIGURA 14.- Respuesta proliferativa al quinto día de cultivo de los linfocitos T purificados tras estímulo con PHA de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

TABLA IX.- Respuesta proliferativa de las CMSP y linfocitos T de sangre periférica de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, basalmente y tras la adición de diversos mitógenos.

MITOGENO	ANEMIA PERNICIOSA	ANEMIA PERNICIOSA RESUELTA	CONTROLES
BASAL	460 (433)	489 (542)	371 (439)
PHA	66.752 (26657)*	69.072 (23.134)*	122.227 (43.165)
Anti-CD3	21.921 (9.356)	24.716 (16.031)	33.288 (13.178)
PMA	37.499 (11.137)	35.135 (10.852)	40.107 (13.396)

Resultados expresados como media (desviación estándar) en cpm.

ABREVIATURAS empleadas: PHA: fitohemaglutinina; Anti-CD3: anticuerpo monoclonal anti-CD3; PMA: forbol-miristato-acetato (ester del forbol).

* $p < 0,05$ con respecto a los controles

Según los criterios previamente expuestos en relación con la respuesta inducida por fitohemaglutinina en los linfocitos T, ocho pacientes pertenecían al subgrupo de hipoproliferantes y tres al de normoproliferantes.

En cuanto a la cinética de la respuesta blastogénica tras la estimulación con PHA observamos que la proliferación máxima se obtuvo al quinto día de cultivo tanto en pacientes como en controles (Figura 15). La respuesta proliferativa de los linfocitos T de los pacientes fue significativamente inferior que la de los controles en el quinto día de cultivo siendo similar en el tercero y séptimo. El estudio de cinética de respuesta proliferativa de los linfocitos T del grupo de pacientes con "anemia perniciosa" fue similar al del grupo de "anemia perniciosa hematológicamente resuelta" en cada uno de los diferentes tiempos analizados (Figura 15).

b) Respuesta proliferativa de CMSP a los mitógenos que interactúan selectivamente con el complejo CD3/Ti.

La respuesta proliferativa inducida por anti-CD3 fue similar en pacientes con anemia perniciosa y controles (Tabla IX). Sin embargo, la síntesis de DNA tras este estímulo fue significativamente menor en el subgrupo de hipoproliferantes que en la población control (Figura 16). No se observaron diferencias significativas al comparar el subgrupo de hipoproliferantes de pacientes de "anemia perniciosa" con el de pacientes de "anemia perniciosa hematológicamente resuelta".

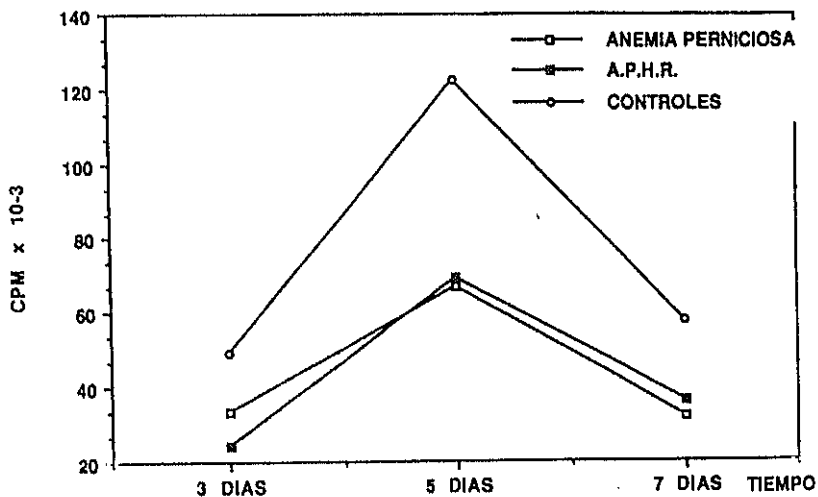


FIGURA 15.- Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos T purificados tras estímulo con PHA, de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

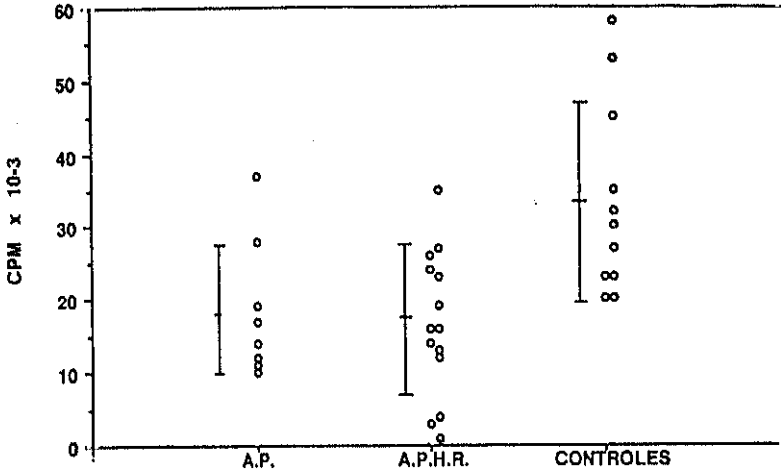


FIGURA 16.- Respuesta proliferativa de CMSP frente a anti-CD3 referida a los subgrupos hipoproliferativos de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

c) Respuesta proliferativa de los linfocitos T a mitógenos que actúan sobre proteincinasa C (PKC).

La utilización de forbol-miristato-acetato produjo una respuesta proliferativa similar en los linfocitos T de pacientes con anemia perniciosa y controles (Tabla IX). Esta respuesta proliferativa fue asimismo similar al comparar la del subgrupo de hipoproliferantes respecto a controles y frente al grupo de pacientes de anemia perniciosa hematológicamente resuelta (Figura 17).

3.- Estudio de la implicación de la interleucina 2 en la activación del linfocito T de pacientes con anemia perniciosa y controles.

a) Producción de sobrenadantes con actividad IL-2

En condiciones basales no se demostró actividad IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de 24 y 72 horas de los linfocitos T de pacientes con anemia perniciosa y controles.

Cuando estos linfocitos T fueron estimulados con fitohemaglutinina, la actividad IL-2 detectada en los sobrenadantes de los pacientes se elevó notablemente, siendo similar a la cuantificada en los controles y en pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta (Figura 18). Asimismo la distribución de los pacientes en función de la respuesta blastogénica a fitohemaglutinina (hipoproliferantes y normoproliferantes) no detectó diferencias significativas entre estos grupos ni con respecto al grupo control ni al de pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta.

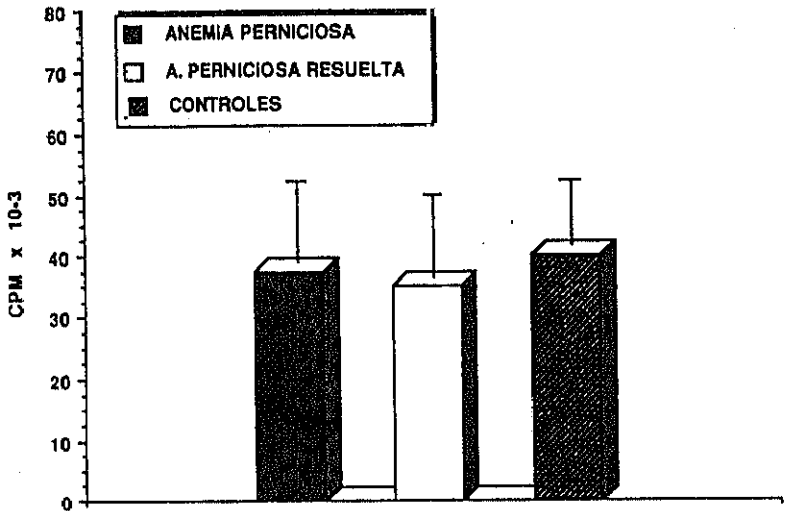


FIGURA 17.- Respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados frente a PMA de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

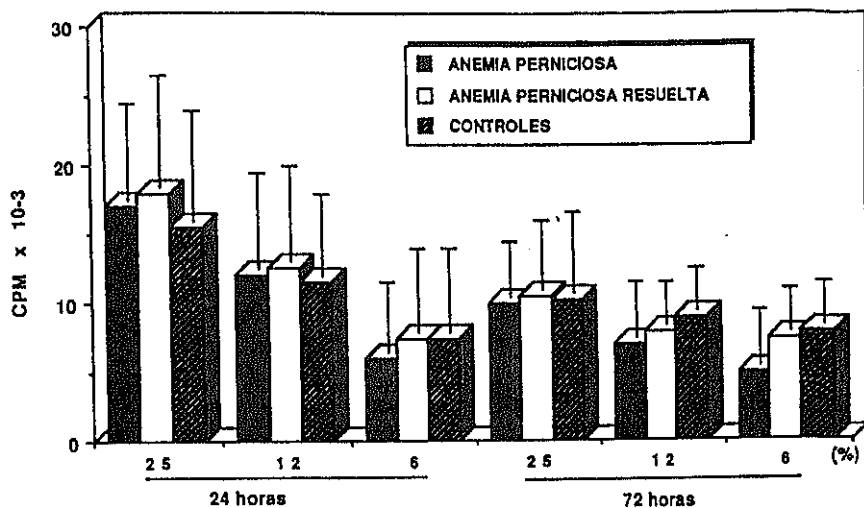


FIGURA 18.- Cuantificación de la actividad interleucina 2 en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T purificados, previamente estimulados con PHA a 24 y 72 horas, de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

b) Expresión de moléculas de activación

Se analizó secuencialmente la activación de los linfocitos T de cuatro pacientes con anemia perniciosa (dos hipoproliferantes y dos normoproliferantes) y cuatro controles, basalmente y a las 24 y 72 horas tras estímulo con fitohemaglutinina, cuantificando la expresión del receptor para IL-2, de moléculas de clase II del SPH y del receptor para la transferrina.

La densidad celular de las distintas moléculas reconocidas por los AcMo y el tiempo de aparición de los mismos en los linfocitos T de los pacientes no diferían de los detectados en los linfocitos T de los pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles sanos, independientemente de que estuvieran encuadrados en los grupos "hipo" o "normoproliferantes" (Tabla X).

c) Respuesta blastogénica del linfocito T en presencia de IL-2 recombinante.

La adición de IL-2r produjo una respuesta blastogénica similar de los linfocitos T de pacientes con anemia perniciosa y controles. Asimismo no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo de pacientes de anemia perniciosa con respecto al de anemia perniciosa hematológicamente resuelta (Figura 19).

En presencia de fitohemaglutinina cuando se suplementó el medio de cultivo con IL-2 a concentraciones saturantes no revirtió la alteración ni incremento significativamente la respuesta mitógena frente a lectinas presente en los pacientes (Figura 19).

TABLA X.- Expresión de receptores de activación en la membrana citoplasmática de linfocitos T de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, basalmente y tras estímulo con fitohemaglutinina a 24 y 72 horas

TIEMPO (horas)	IL-2R			DR			T9		
	A.P.	A.P.H.R.	Controles	A.P.	A.P.H.R.	Controles	A.P.	A.P.H.R.	Controles
0	1,8(0,9)	2,3(1,6)	2,7(1,3)	5,5(3,7)	6,2(2,4)	6,5(2,9)	2,6(1,7)	3,1(1,9)	2,9(1,5)
24	30,5(10,9)	39,6(14,8)	31,2(16,1)	35,6(10,1)	30,8(4,0)	36,5(9,1)	20,2(4,6)	23,5(6,1)	21,7(5,6)
72	54,5(7,7)	57,5(11,4)	58,6(19,0)	43,4(9,1)	45,0(9,5)	48,0(8,4)	53,5(14,7)	55,6(13,1)	63,5(23,3)

Los resultados expresan la media (desviación estándar) en porcentaje de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

ABREVIATURAS:

- A.P.: Anemia perniciosa
- A.P.H.R.: Anemia perniciosa hematológicamente resuelta
- IL-2R: Cadena p55 del receptor para la interleucina 2 reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-TAC
- DR: Molécula de clase II del sistema principal de histocompatibilidad
- T9: Receptor para la transferrina

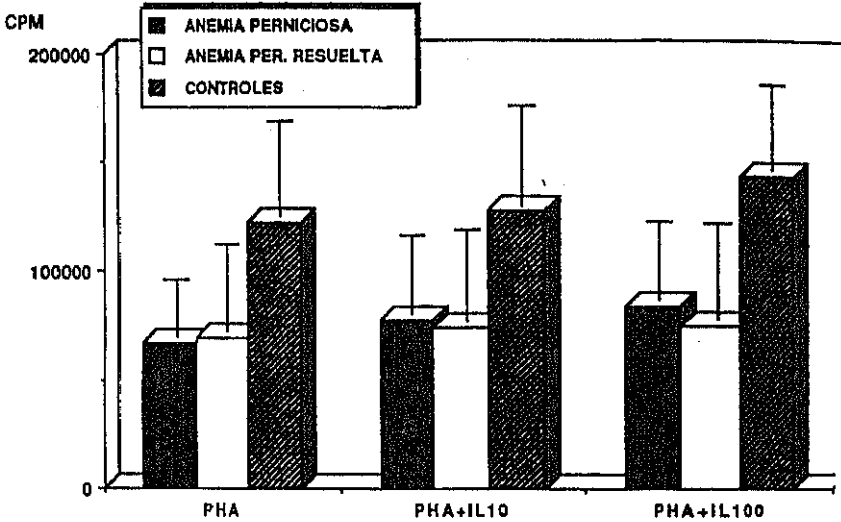


FIGURA 19.- Efecto de la adición de IL-2r sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados al quinto día de cultivo tras estímulo con PHA de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

4.- Estudio funcional de la población linfocida B de pacientes con anemia perniciosa y controles.

La síntesis de DNA por los linfocitos B en ausencia de estímulo blastogénico fue similar en el grupo de pacientes con anemia perniciosa con respecto a los controles (Figura 20).

La respuesta proliferativa de los linfocitos B de pacientes con anemia perniciosa y controles tras incubación con SAC y adición de IL-2 recombinante y sobrenadante estandar fue asimismo similar. No existieron diferencias significativas en las respuestas blastogénicas de los linfocitos B de pacientes con anemia perniciosa y anemia perniciosa hematológicamente resuelta (Figura 20).

5.- Estudio de la actividad NK de pacientes con anemia perniciosa y controles

La actividad NK de los pacientes con anemia perniciosa fue significativamente inferior con respecto al grupo de pacientes de anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles (Figura 21).

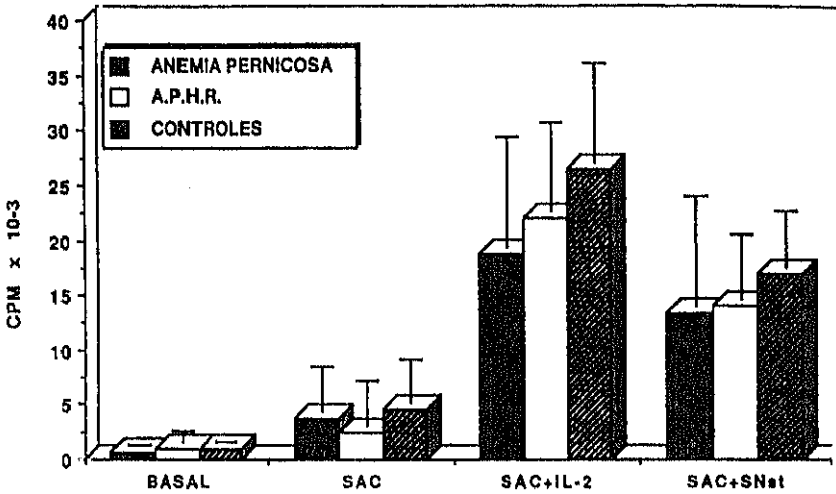


FIGURA 20.- Respuesta blastogénica de los linfocitos B, basalmente y tras diversos estímulos mitogénicos, de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

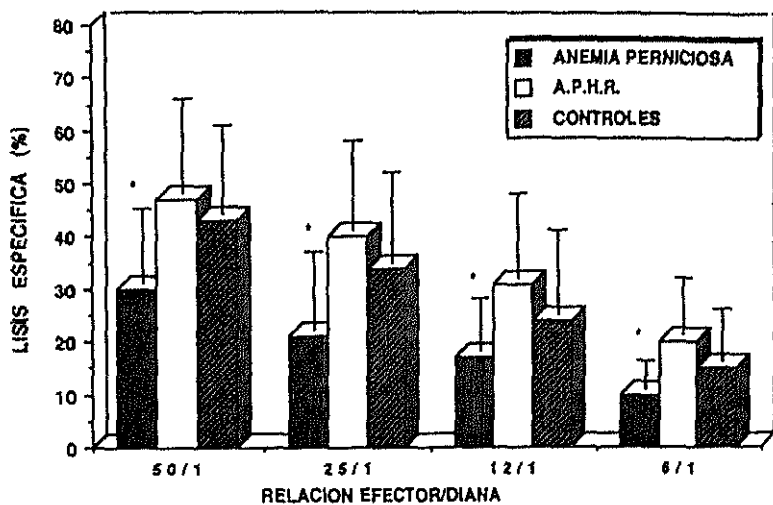


FIGURA 21.- Actividad NK de las CMSP frente a K-562 de pacientes con anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

* $p < 0,05$ con respecto a los pacientes con anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

C) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE SEGUIMIENTO DE UNA MUESTRA DE PACIENTES CON ANEMIA PERNICIOSA NO TRATADA Y EN TRATAMIENTO CON VITAMINA B12 DURANTE DOS Y SEIS MESES.

Conjuntamente, realizamos un estudio de seguimiento de cinco pacientes en los que se realizó el estudio en tres situaciones:

1.- Fase de anemia perniciosa con alteraciones hematológicas, no tratada con vitamina B12.

2.- Anemia perniciosa resuelta, en tratamiento con vitamina B12 durante dos meses.

3.- Anemia perniciosa resuelta, en tratamiento con vitamina B12 durante seis meses.

En estos cinco pacientes estudiamos el fenotipo de linfocitos T purificados, la respuesta blastogénica de linfocitos T frente a fitohemaglutinina e interleucina 2 y la actividad NK.

1.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados.

No observamos diferencias entre las tres situaciones en cuanto al porcentaje de células marcadas por el AcMo anti-CD2. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos reconocidos por el AcMo anti-CD3 fue menor en los pacientes que llevaban 6 meses de tratamiento. En este mismo grupo se observó un aumento de la población CD2+ CD3- (NK). Los porcentajes de células marcadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD25, anti-CD4 y CD8, así como el cociente CD4/CD8 fue similar en las tres situaciones estudiadas (Tabla XI).

TABLA XI.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados de pacientes con anemia perniciosa no tratada y en tratamiento con vitamina B12 durante dos y seis meses y de controles.

FENOTIPO	A.P. No tratada	A.P. B12 2 MESES	A.P. B12 6 MESES	CONTROLES
CD2+	88,6 (5,9)	85,0 (4,6)	83,0 (8,8)	89,6 (2,0)
CD3+	75,4 (5,0)	75,0 (7,2)	64,0 (10,6)*	78,4 (3,1)
CD2+CD3-	12,4 (9,7)	10,0 (4,3)	19,0 (7,2)*	11,2 (2,2)
CD4+	39,2 (3,8)	50,8 (13,3)	44,2 (10,2)	42,2 ((6,8)
CD8+	28,8 (12,4)	30,4 (14,3)	22,4 (5,7)	39,2 (6,6)
CD4/CD8	1,7 (1,0)	2,4 (2,3)	2,0 (0,5)	1,2 (0,4)
CD25	3,2 (5,2)	2,6 (1,0)	2,5 (2,3)	3,1 (1,6)

Los resultados expresan la media en porcentaje (desviación estandar) de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

p < 0,05 con respecto a los otros tres grupos

2.- Respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaqlutina e IL-2.

La respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaqlutina fue inferior en los enfermos con anemia perniciosa no tratada y tratada durante seis meses, con respecto a los tratados durante dos meses y controles (Figura 22).

Cuando se suplementó el medio de cultivo con IL-2 exógena con concentraciones saturantes no se observaron modificaciones significativas de la respuesta proliferativa de los linfocitos T a la lectina que en ausencia de esta linfocina (Figura 22).

3.- Estudio de la actividad NK.

La actividad NK desarrollada por las CMSP frente a K-562 fue similar en las dos primeras situaciones, es decir aquellos pacientes no tratados con vitamina B12 o tratados durante dos meses. El porcentaje de lisis específico fue menor en estas dos situaciones con respecto a los tratados durante seis meses y controles (Figura 23).

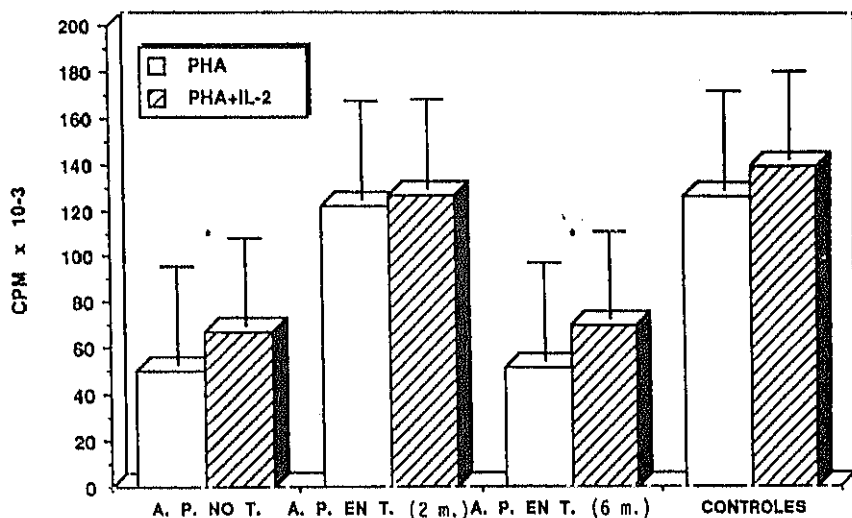


FIGURA 22.- Respuesta proliferativa de linfocitos T purificados tras estímulo con PHA sólo o asociado a IL-2r, de una muestra de pacientes con anemia perniciosa no tratada y en tratamiento con vitamina B12 durante dos y seis meses.

* $p < 0,05$ con respecto a controles y pacientes de anemia perniciosa tratados con vit. B12 durante dos meses.

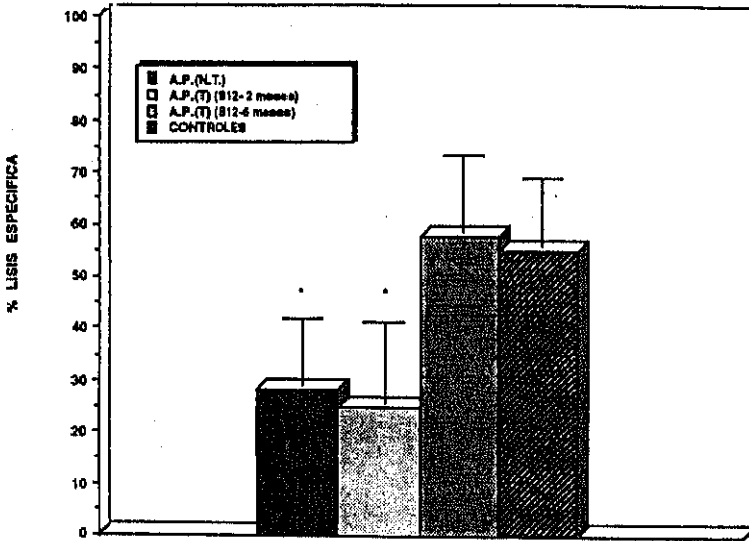


FIGURA 23.- Actividad NK de las CMSP frente a K-562 de una muestra de pacientes con anemia perniciosa no tratada y en tratamiento con vitamina B12 durante dos y seis meses.
 * $p < 0,05$ con respecto a pacientes con A.P. tratados con vit. B12 durante 6 meses y controles sanos

D) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE PACIENTES CON "GASTRITIS CRÓNICA AUTOINMUNE"

A continuación quisimos comprobar si las alteraciones observadas en el sistema inmune de los pacientes con anemia perniciosa se observaban en enfermos con gastritis crónica autoinmune sin déficit de vitamina B12. Para ello estudiamos a nueve pacientes afectos de este proceso.

1.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles.

No observamos diferencias significativas en los porcentajes de células marcadas con los anticuerpos monoclonales anti-CD2, CD4 y CD8 entre pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles. Asimismo, el cociente CD4/CD8 fue similar. Sin embargo, el porcentaje de células marcadas por el AcMo anti-CD3 fue significativamente inferior con respecto a los controles y a los pacientes del grupo de anemia perniciosa. Asimismo el porcentaje de células marcadas por el AcMo anti-CD16 fue significativamente superior al de controles y pacientes del grupo de anemia perniciosa (Tabla XII).

2.- Respuesta proliferativa de CMSP y linfocitos T purificados de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles.

a) Respuesta blastogénica de linfocitos T, basalmente y tras adición al medio de fitohemaglutinina.

La respuesta proliferativa basal de los linfocitos T purificados fue similar y mínima en pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles.

TABLA XII.- Estudio fenotípico de los linfocitos T purificados de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles

FENOTIPO	GASTRITIS CRÓNICA AUTOINMUNE	ANEMIA PERNICIOSA	ANEMIA PERNICIOSA RESUELTA	CONTROLES
CD2+	86,7(5,3)	89,4 (5,5)	87,5(6,7)	90,8 (4,5)
CD3+	62,8(12,7)*	74,8 (6,9)	72,0 (13,0)	77,8 (14,5)
CD4+	39,7(10,9)	46,7 (10,5)	43,5 (11,2)	47,7 (14,1)
CD8+	34,5(11,7)	27,0 (10,4)	32,7 (12,6)	30,0 (10,7)
CD4/CD8	1,27(0,31)	2,0 (0,9)	1,49 (0,6)	1,80 (1,0)
CD16	22,5(9,9)*	14,2 (8,3)	16,7 (8,2)	14,0 (8,2)

Los resultados expresan la media en porcentaje (desviación estándar) de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

p < 0,05 con respecto a los otros tres grupos

La respuesta blastogénica tras adición de fitohemaglutinina fue significativamente inferior con respecto a los controles pero no frente a los pacientes de anemia perniciosa. Según la respuesta inducida por fitohemaglutinina, tres pacientes pertenecían al subgrupo de normoproliferantes y seis al de hipoproliferantes (Figura 24, Tabla XIII). El pico máximo de proliferación se obtuvo al quinto día de cultivo, de forma similar a lo observado en los grupos de anemia perniciosa (Figura 25).

b) Respuesta proliferativa de las CMSP a los mitógenos que interaccionan selectivamente con el complejo CD3/T1.

La respuesta proliferativa inducida por anti-CD3 fue similar en pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles, así como frente a los pacientes de anemia perniciosa. Sin embargo, la respuesta blastogénica fue significativamente menor en el subgrupo de hipoproliferantes que en la población control pero similar a los subgrupos de pacientes hipoproliferantes afectados de anemia perniciosa (Figura 26, Tabla XIII).

c) Respuesta proliferativa de los linfocitos T a mitógenos que actúan sobre proteínasasa C.

La respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados con gastritis crónica autoinmune tras adición de PMA fue similar en pacientes y controles, tanto como grupo o al subdividirlos según su respuesta a fitohemaglutinina. Asimismo no se observaron diferencias con respecto a los grupos de anemia perniciosa (Figura 27, Tabla XIII).

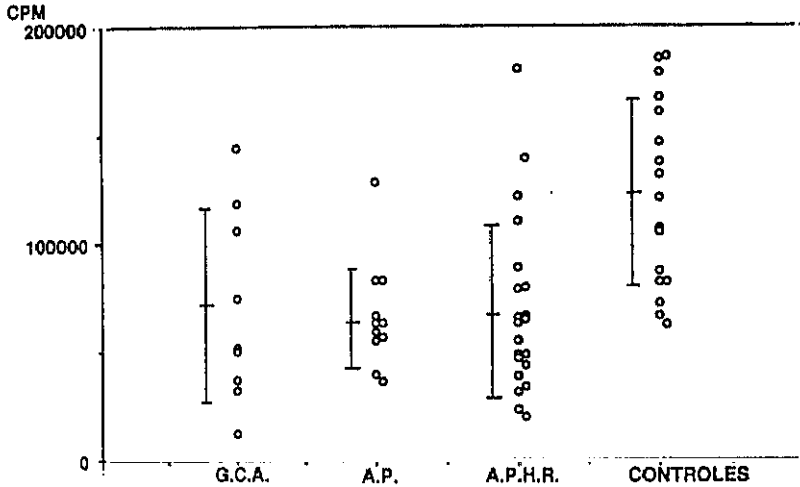


FIGURA 24.- Respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados al quinto día de cultivo tras estímulo con PHA de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

TABLA XIII.- Respuesta proliferativa de las CMSP y linfocitos T de sangre periférica de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, basalmente y tras la adición de diversos mitógenos.

MITÓGENO	GASTRITIS CRÓNICA AUTOINMUNE	ANEMIA PERNICIOSA	ANEMIA PERNICIOSA RESUELTA	CONTROLES
BASAL	312(221)	460 (433)	489 (542)	371 (439)
PHA	69.727(44288)*	66.752 (26657)*	69.072(23134)*	122.227 (43165)
Anti-CD3	21.797(11621)	21.921 (9.356)	24.716 (16.031)	33.288 (13178)
PMA	30.121(12433)	37.499 (11137)	35.135 (10852)	40.107 (13396)

Resultados expresados como media (desviación estandar) en cpm.

ABREVIATURAS empleadas: PHA: fitohemaglutinina; Anti-CD3: anticuerpo monoclonal anti-CD3; PMA: forbol-miristato-acetato (ester del forbol).

* $p < 0.05$ con respecto a los controles

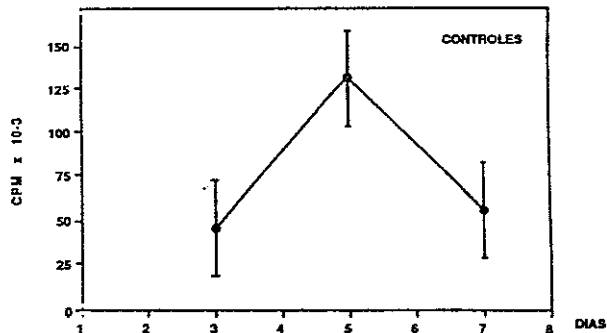
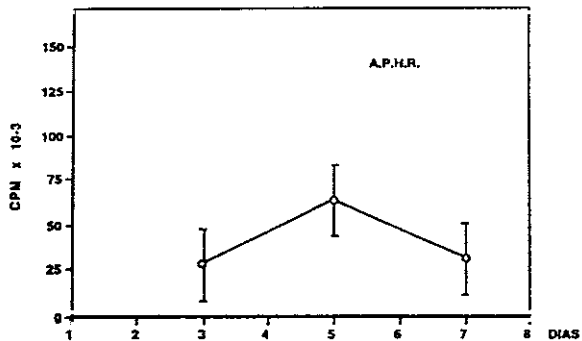
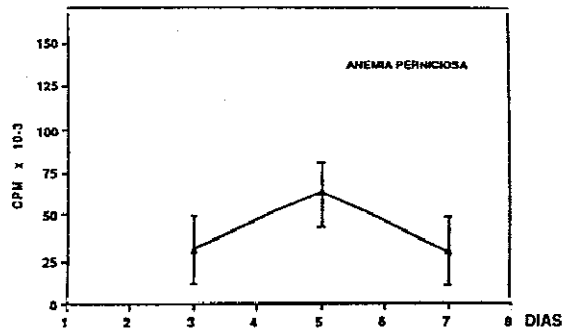
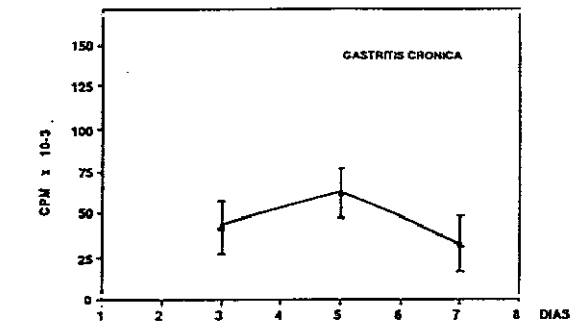


FIGURA 25.- Cinética de la respuesta proliferativa de linfocitos T purificados tras estímulo con PHA de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

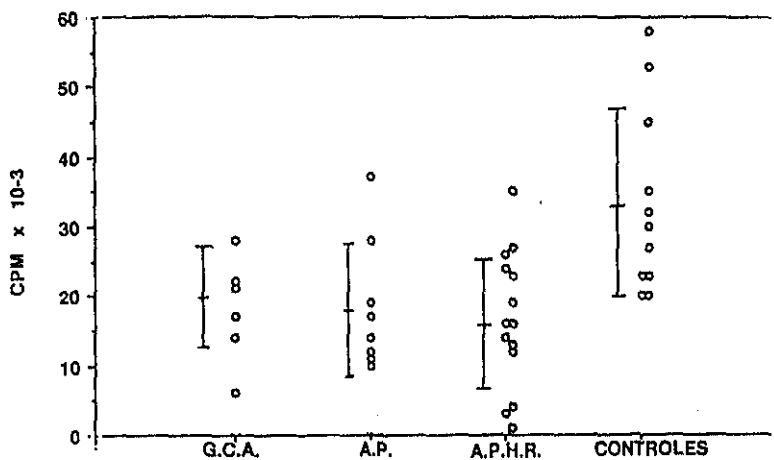


FIGURA 26.- Respuesta proliferativa de CMSP frente a anti-CD3 referida a los subgrupos hipoproliferativos de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

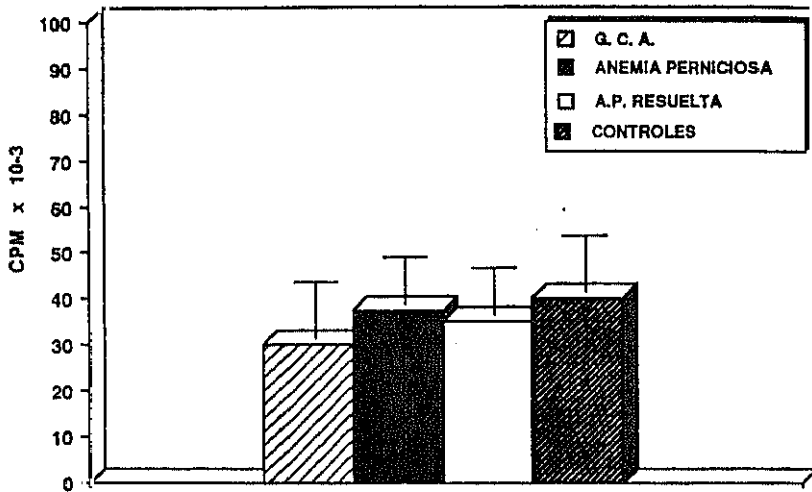


FIGURA 27.- Respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados frente a PMA de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

3.- Estudio de la implicación de la interleucina 2 en la activación del linfocito T de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles.

a) Producción de sobrenadantes con actividad IL-2

La actividad IL-2 detectada en los sobrenadantes de los linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina fue similar a la de los controles y grupos de anemia perniciosa (Tabla XIV), tanto conjuntamente como al distribuir a los pacientes en función de la respuesta blastogénica a fitohemaglutinina (hipoproliferantes y normoproliferantes).

b) Expresión de moléculas de activación

La densidad celular de las distintas moléculas reconocidas por los AcMo anti-TAC, T9 y Dr y el tiempo de aparición de los mismos en los linfocitos T de los pacientes con gastritis crónica autoinmune no difieren de los detectados en los grupos de pacientes de anemia perniciosa y controles sanos (Tabla XV), independientemente de que estuvieran encuadrados en los grupos "hipo" o normoproliferantes.

c) Respuesta blastogénica del linfocito T en presencia de IL-2 recombinante.

La adición de IL-2r produjo una respuesta similar y escasa de los linfocitos T de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles. Asimismo no se observaron diferencias con respecto a los grupos de anemia perniciosa.

TABLA XIV.- Cuantificación de la actividad interleucina 2 en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T purificados de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles sanos.

	DILUCION DEL SOBRENADANTE	GASTRITIS CRONICA	ANEMIA PERNICIOSA	ANEMIA PERNICIOSA RESUELTA	CONTROLES
24 horas	25%	15758(9338)	16731(4474)	16814(4722)	15869(3125)
	12%	13591(9350)	11591(4941)	12024(5119)	11278(4032)
	6%	7970(6433)	6541(3484)	7223(4375)	7462(3015)
72 horas	25%	11543(6312)	10015(3880)	10542(4353)	10259(3803)
	12%	8015(5412)	6893(2892)	7032(3532)	7596(2649)
	6%	5024(3516)	5125(2891)	6519(3002)	6817(2111)

Resultados expresados como media (desviación estandar) en cpm

TABLA XV.- Expresión de receptores de activación en la membrana citoplasmática de linfocitos T de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y de controles, basalmente y tras estímulo con fitohemaglutinina a 24 y 72 horas

TIEMPO (horas)	IL-2R				DR				T9			
	G.C.A.	A.P.	A.P.H.R.	Controles	G.C.A.	A.P.	A.P.H.R.	Controles	G.C.A.	A.P.	A.P.H.R.	Controles
0	2,6(1,5)	1,8(0,9)	2,3(1,6)	2,7(1,3)	4,4(3,1)	5,5(3,7)	6,2(2,4)	6,5(2,9)	3,3(1,6)	2,6(1,7)	3,1(1,9)	2,9(1,5)
24	32,5(9)	30,5(11)	39,6(15)	31,2(16)	39,3(10)	35,6(10)	30,8(4)	36,5(9)	18,1(5)	20,2(5)	23,5(6)	21,7(6)
72	46,3(18)	54,5(8)	57,5(11)	58,6(19)	48,3(9)	43,4(9)	45,0(9)	48,0(8)	50,1(12)	53,5(14)	55,6(13)	63,5(23)

Los resultados expresan la media (desviación estandar) en porcentaje de células marcadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente respecto al total de la muestra celular estudiada.

ABREVIATURAS:

- G.C.A.: Gastritis crónica autoinmune
- A.P.: Anemia perniciosa
- A.P.H.R.: Anemia perniciosa hematológicamente resuelta
- IL-2R: Cadena p55 del receptor para la interleucina 2 reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-TAC
- DR: Molécula de clase II del sistema principal de histocompatibilidad
- T9: Receptor para la transferrina

En presencia de fitohemaglutinina cuando se suplementó el medio de cultivo con IL-2 a concentraciones saturantes no revirtió la alteración ni incremento significativamente la respuesta proliferativa frente a lectinas (Figura 28).

4.- Estudio de la población linfóide B de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles.

La respuesta proliferativa de los linfocitos B de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles basalmente y tras incubación con SAC y adición de IL-2r y sobrenadante estandar fue similar. Asimismo no existieron diferencias significativas con respecto a los grupos de pacientes de anemia perniciosa (Figura 29).

5.- Estudio de la actividad NK de pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles.

La actividad NK desarrollada por las CMSP frente a K-562 fue similar en pacientes con gastritis crónica autoinmune y controles. Asimismo no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo de pacientes de anemia perniciosa hematológicamente resuelta pero si frente al grupo no tratado de anemia perniciosa (Figura 30).

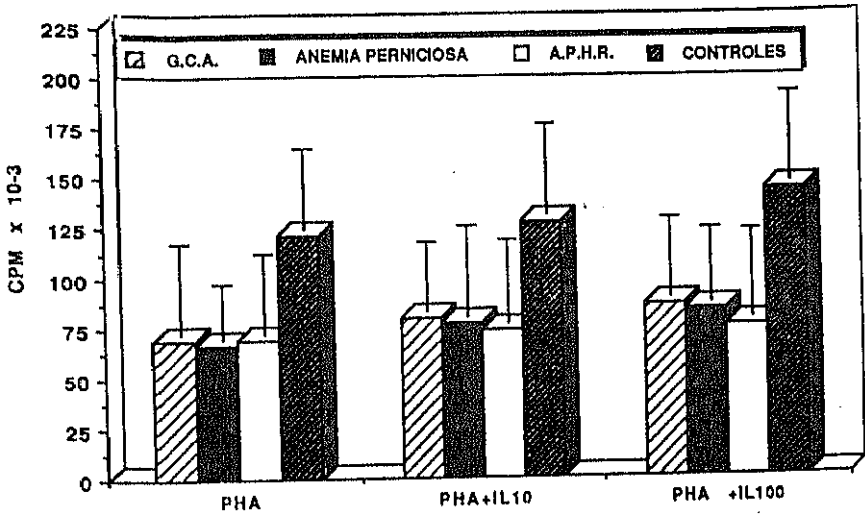


FIGURA 28.- Efecto de la adición de IL-2r sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T purificados, tras estímulo con PHA, de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

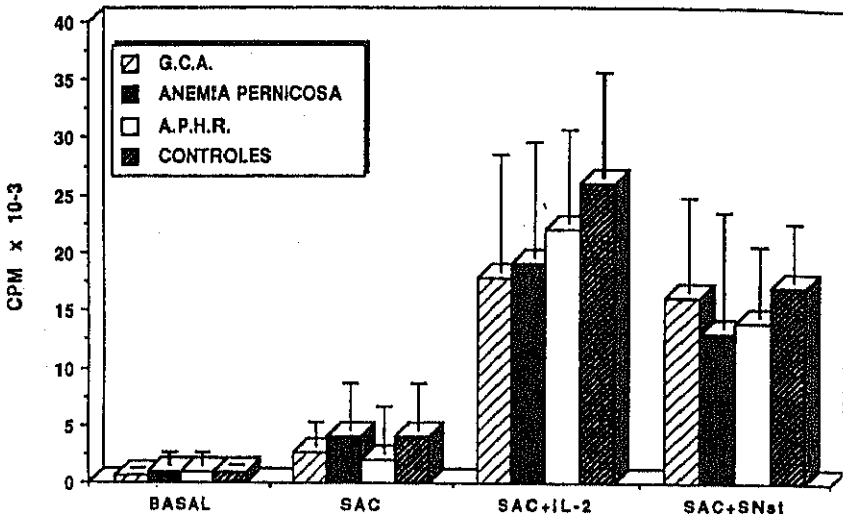


FIGURA 29.- Respuesta blastogénica de los linfocitos B basalmente y tras diversos estímulos mitogénicos de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.

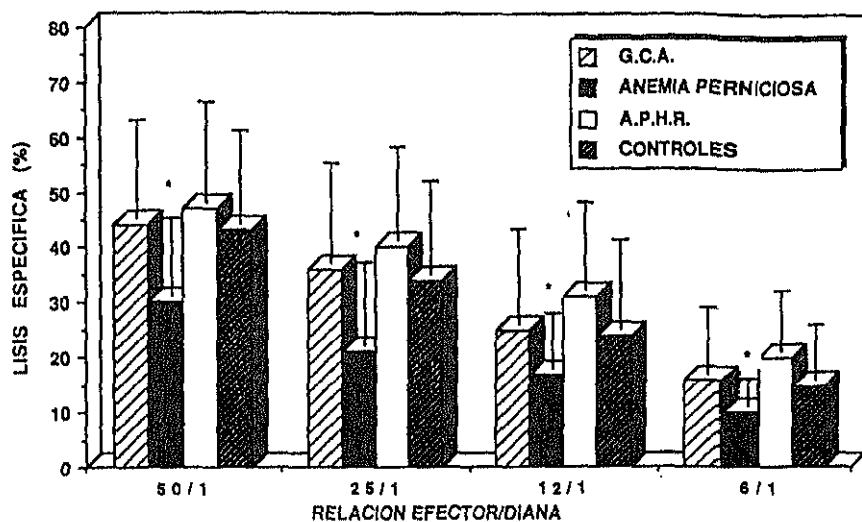


FIGURA 30.- Actividad NK de las CMSP frente a K-562 de pacientes con gastritis crónica autoinmune, anemia perniciosa, anemia perniciosa hematológicamente resuelta y controles.
 * $p < 0,05$ con respecto al resto de los grupos

VI.- CORRELACIONES CLÍNICO-INMUNOLÓGICAS.

Finalmente se investigó la existencia o no de correlaciones entre los resultados experimentales obtenidos (respuestas proliferativas de linfocitos T y B, producción de IL-2 por linfocitos T, actividad NK, estudio fenotípico) y una batería de datos clínicos y analíticas en la cual se incluyó: 1) edad; 2) parámetros hematológicos: hemoglobina, volumen corpuscular medio, linfocitos, monocitos, plaquetas; 3) concentraciones séricas de: cobalamina, ácido fólico, pepsinógeno, gastrina, hierro, transferrina, ferritina, albúmina; 4) cuantificación de Ig séricas (IgG, IgA, IgM); 5) títulos de ACPG; 6) estadio histológico; 7) duración de la enfermedad, desde el momento del diagnóstico.

No se halló ninguna correlación con valor significativo entre cada uno de los resultados experimentales obtenidos in vitro y cualquiera de los aspectos incluidos en la batería clínica y analítica referida.

DISCUSION

En este trabajo hemos investigado las alteraciones del sistema inmune subyacentes al desarrollo de gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa. Se han analizado las características fenotípicas y funcionales en las poblaciones linfoides T,B y células NK en sus dos estadios evolutivos determinados por la presencia o ausencia de malabsorción de vitamina B12. Así mismo hemos estudiado su posible variación determinada por el tratamiento sustitutivo con esta vitamina.

Para dar una mayor significación biológica y fisiopatológica a estos hallazgos hemos analizado a una población de enfermos homogénea descartando a aquellos en que la presencia de enfermedades intermitentes o la toma de fármacos pudiesen influir en la función y estructura de su sistema inmune.

I.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INVESTIGADOS.

El resumen de los principales datos clínicos y analíticos aparece en la Tabla 2. Estos datos coinciden en general con los comunicados previamente en la literatura médica (2,3,15,16,21,22,23,27,28,32,33,170). De éstos queremos reseñar dos aspectos relevantes: las cifras séricas de pepsinógeno I/gastrina y el estado férrico de los pacientes.

Nuestro grupo, ha observado previamente que el pepsinógeno está disminuido en los pacientes con gastritis crónica autoinmune⁽¹⁷¹⁾. Este descenso es evidente en las cifras de pepsinógeno I (<20 mg/ml) y se relaciona con la pérdida de las células principales que estos enfermos presentan y que son la fuente principal de secreción de esta proenzima^(31,171). Sin embargo, el pepsinógeno II permanece normal probablemente

porque la atrofia gástrica no se extiende habitualmente a la mucosa pilórica que junto a la fúndica son las secretoras de pepsinógeno II. Como resultado de esta disparidad en la producción de ambas proenzimas, se objetiva una disminución del cociente PGI/PGII que es característico de la atrofia gástrica pudiendo aumentar el valor diagnóstico de los niveles séricos disminuidos de pepsinógeno I⁽¹⁷²⁾. Junto al estudio de las cifras de pepsinógeno analizamos también los niveles séricos de gastrina⁽²³⁾, los cuales estaban aumentados en nuestros enfermos (>200 mg/ml), probablemente por ausencia de atrofia gástrica en el antro, lugar de producción de la gastrina (células G) o por pérdida del mecanismo de control negativo determinado por la existencia de anticuerpos frente al receptor de gastrina de las células parietales⁽¹⁷³⁾. En un 81% de nuestros pacientes hemos observado simultáneamente hipopepsinogenemia/hipergastrinemia.

Por otra parte, nuestros hallazgos así como los de otros autores^(23,36) indican la necesidad de estudiar el estado férrico de los pacientes de forma rutinaria. Estos resultados demuestran que aunque los niveles de hierro están normales o elevados en la anemia perniciosa no tratada, existe deficiencia del mismo en los pacientes en tratamiento. La causa de esta hiposideremia es incierta en la mayoría de los casos, aunque es posible que se deba a malabsorción por aclorhidria^(23,36). Sin embargo, es necesario excluir otras causas de pérdida crónica de sangre, particularmente del tracto gastrointestinal dada la posible predisposición al carcinoma gástrico⁽¹⁷⁴⁾ y la asociación con el cáncer de colon recientemente observada⁽¹⁷⁵⁾.

II.- ANÁLISIS DEL ESTUDIO FENOTÍPICO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA.

Los estudios previos de la literatura a este respecto obtienen resultados dispares, siendo motivo de controversia. Así inicialmente Imamura et al⁽⁶⁶⁾ describieron tres pacientes de anemia perniciosa no tratados con vitamina B12 en los que observaron un aumento del cociente CD4/CD8 por disminución de los linfocitos T citotóxicos CD8+. Wodzinski et al⁽⁶⁷⁾ estudiando 23 pacientes con anemia perniciosa observaron un incremento del cociente CD4/CD8 en los pacientes que presentaban anticuerpos anti-factor intrínseco; sin embargo no encontraron que se relacionase esta redistribución linfocitaria T con la presencia de anticuerpos anticélulas parietales gástricas. Soler et al⁽⁶⁸⁾ en seis pacientes con anemia perniciosa no tratados no detectaron ningún tipo de alteración fenotípica. Posteriormente Carmel et al⁽⁶⁹⁾ en el estudio más amplio, junto con el nuestro, no observaron diferencias fenotípicas en 40 pacientes de anemia perniciosa (34 tratados y 6 no tratados).

Nuestro análisis no demostró la existencia de alteraciones en la relación entre los linfocitos CD4 y CD8 en ninguno de los diferentes grupos de pacientes analizados (A: anemia perniciosa sin tratamiento; B: anemia perniciosa en tratamiento con vitamina B12 parenteral; C: gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa), aunque se observaron alteraciones individuales. Sin embargo, se encontró en el grupo C una disminución porcentual, estadísticamente significativa de la población CD3+ con normalidad de la CD2+. Con frecuencia, CD2 y CD3 se utilizan indistintamente como marcadores universales de linfocitos T. Sin embargo, CD2 se encuentra también en células NK, que constituyen un linaje linfocitario distinto al de los T. CD3, en cambio, tiene una distribución celular restringida expresándose únicamente en asociación con el receptor antigénico de los linfocitos T. El fenotipo CD2+

CD3- es característico de las células NK y se encuentra aumentado en la población senil⁽¹⁷⁶⁾. El estudio con el anticuerpo monoclonal anti-CD16+, propio de la población NK, no mostró diferencias entre los grupos A, B y controles. Sin embargo, observamos un aumento significativo de la población CD16+ en el grupo C (pacientes con gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa). En el estudio de seguimiento de pacientes con anemia perniciosa, realizado en cinco sujetos, se observó un aumento relevante de la población CD2+ CD3- (NK) a los seis meses de tratamiento con vitamina B12, no evidenciándose diferencias antes del tratamiento ni tras dos meses de haberse iniciado. No observamos diferencias significativas entre los enfermos de cualquiera de los tres grupos y controles en el porcentaje de linfocitos B, definidos por el anticuerpo monoclonal anti-CD20, aunque estaba ligeramente aumentada en los pacientes. Estos hallazgos pueden relacionarse con el fenotipo observado por Kaye et al⁽⁸⁴⁾ en mucosa gástrica, en donde detectaron una infiltración linfoide constituida predominantemente por linfocitos no-T, no pudiendo discernir su pertenencia a células B o NK. En un futuro habrá que realizar estudios fenotípicos más completos que permitan definir si las poblaciones CD2+ CD3- CD16+ o CD20+ participan en el desarrollo de la lesión tisular.

III.- ANALISIS DEL ESTADO FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS T

La siguiente fase de nuestro estudio de las alteraciones del sistema inmune asociados al desarrollo de gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa fue el análisis del estado funcional de la población linfoide T. Para ello investigamos la activación y respuesta proliferativa de esta población celular con diferentes mitógenos que permiten analizar secuencialmente los diferentes mecanismos implicados

en estos procesos celulares. Empleamos una lectina vegetal (fitohemaglutinina) que interacciona con múltiples moléculas de la superficie linfocitaria así como el anticuerpo monoclonal anti CD3 que se une selectivamente con la estructura CD3 y transduce fisiológicamente la señal determinada por la unión del receptor clonotípico y el antígeno. Así mismo, analizamos la respuesta a los ésteres del forbol que actúan directamente sobre la proteína cinasa C soslayando las fases previas del proceso molecular de activación linfocitaria.

Iniciamos el estudio funcional de los linfocitos T de los pacientes estimando su capacidad proliferativa frente a fitohemaglutinina. La síntesis de DNA por los CMSP y por los linfocitos T purificados tras estímulo con esta lectina vegetal fue menor en los pacientes y esta deficiente respuesta blastogénica se observó en cada uno de los grupos analizados, no observando diferencias estadísticas entre ellos pero sí con respecto a los controles.

Estudios previos muestran resultados dispares. Así Mac Cuish et al⁽⁷⁴⁾ observan una respuesta hipoproliferativa de las CMSP a fitohemaglutinina en veinte pacientes de anemia perniciosa tratados con vitamina B12. Estos autores consideran que la deficiente blastogénesis se debe a un fallo en la incorporación intranuclear de timidina tritiada por los linfocitos, más que a un defecto en la inducción de blastogénesis. Esto, según dichos autores, podría reflejar un defecto metabólico más que una anomalía inmunológica inherente. Sin embargo, Kätkä⁽⁷⁵⁾ no encontró diferencias significativas en la proliferación de las CMSP de pacientes y controles frente a fitohemaglutinina, tanto antes como durante el tratamiento con vitamina B12. A diferencia de nuestro estudio en que se utilizaron CMSP y linfocitos T purificados, estos trabajos utilizan únicamente CMSP. Este aspecto metodológico es relevante en cuanto que no se asegura la existencia de un número similar de linfocitos T respondedores

y puede, además, interferir el estado funcional de éstos por la acción del amplio número de células no T presentes en las muestras.

Podría sugerirse que la deficiente respuesta proliferativa frente a fitohemaglutinina observada en los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa fuese debida a una alteración de la cinética celular. Sin embargo, en nuestro estudio se observa claramente que el patrón de la cinética es similar al de los controles, mostrando una respuesta proliferativa disminuida tanto al tercer como al quinto día de cultivo.

Así mismo podría plantearse la posibilidad que un factor inhibidor fuese el responsable de la hipoproliferación a fitohemaglutinina. Sin embargo, la observación de una respuesta proliferativa similar o incluso superior, en presencia de suero autólogo en vez de suero bovino fetal es un argumento experimental suficiente para afirmar que la hipoproliferación de los linfocitos T y CMSP no depende de la presencia de algún factor sérico inhibidor.

A continuación, y de acuerdo con el esquema experimental indicado progresamos en la investigación de la activación de los linfocitos T estudiando la respuesta a otros mitógenos (anti-CD3 y ésteres del forbol). La respuesta mitógena de los CMSP tras estímulo con anti-CD3 estuvo disminuida en los pacientes que hipoproliferaban frente a fitohemaglutinina, de los tres grupos estudiados. El defecto subyacente a esta alteración permanece desconocido, pero dada la proliferación normal ante ésteres del forbol, probablemente estribe en una alteración de la unión de los mitógenos a su receptor o en la transducción de la señal previa a la activación de protein-cinasa C. Estos hallazgos localizan, por lo tanto, el defecto funcional de los linfocitos T a este nivel de la activación celular. Esta alteración de los linfocitos T

de los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa requerirá en un futuro analizar las bases celulares y moleculares subyacentes a esta inmunodeficiencia.

Al analizar la significación patogénica y clínica de estos hallazgos debe indicarse que la deficiencia linfocitaria T está ya presente en los pacientes con gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa. Más aun, la intensidad del defecto funcional T no se modifica en aquellos pacientes que además han desarrollado una anemia perniciosa ni tampoco en los que tras haber realizado el tratamiento sustitutivo presentan una normalización de las anomalías hematológicas inducidas por el déficit metabólico. Por lo tanto, el estado funcional anormal de los linfocitos T podría relacionarse con la lesión tisular gástrica y no parece estar determinado por la alteración metabólica de la vitamina B12. Es reseñable, sin embargo, que transitoriamente y precozmente durante el tratamiento con vitamina B12 parenteral se objetiva una normalización de la respuesta blastogénica de los linfocitos T. Aunque no podamos, en la actualidad, definir los mecanismos subyacentes a este hallazgo celular es planteable indicar que sea secundario a las modificaciones metabólicas subsiguientes al aporte de vitamina B12 con su consiguiente repercusión en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Este posible mecanismo podría modificar transitoriamente el estado funcional alterado existente en la población T pero que tras la adaptación metabólica a la existencia de niveles normales de vitamina B12, reaparece y se expresa funcionalmente. Otros autores han observado un potencial efecto inmunomodulador de la vitamina B12 *in vitro*, a través del incremento de la respuesta proliferativa de los linfocitos T, en respuesta a concanavalina A y linfocitos B autólogos, cultivados en presencia de metil-B12⁽¹⁷⁾.

Para tratar de seguir profundizando en la deficiencia de los linfocitos T de los pacientes con gastritis crónica

autoinmune y anemia perniciosa estudiamos los mecanismos de comunicación intercelular implicados básicamente en la regulación de la proliferación de esta estirpe celular.

Se ha comprobado que la activación de los linfocitos T es un proceso en el que se pueden distinguir dos fases: 1) interacción del antígeno (o en su caso, el mitógeno empleado "in vitro") sobre el linfocito T en presencia de células accesorias y 2) producción de una serie de proteínas por el linfocito T (fundamentalmente IL-2 y su receptor) que determina la progresión del linfocito T a través del ciclo celular⁽¹³⁵⁾. Por lo tanto, investigamos la producción de esta interleucina por los linfocitos T activados así como la expresión de su receptor en la membrana citoplasmática.

Se comprobó que la producción de IL-2 por los linfocitos T de los pacientes, considerados por grupos, fue similar entre ellos y a la sintetizada por los individuos controles. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la producción de IL-2 entre los subgrupos de pacientes que normo o hipoproliferaban tras el estímulo con fitohemaglutinina. No existen precedentes en la literatura médica en que se determine la producción de IL-2 aunque otros autores han analizado la producción de interferon-gamma de CMSP estimuladas con fitohemaglutinina, en ocho pacientes con anemia perniciosa, resultando similar tanto antes como durante el tratamiento con vitamina B12⁽¹⁷⁶⁾.

Simultáneamente, objetivamos que la cinética de adquisición del receptor de la IL-2 por los linfocitos T de los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa así como la intensidad de su expresión eran similares a la de sus controles. También analizamos la aparición en la membrana citoplasmática de otras moléculas implicadas y asociadas al proceso de activación linfocitante T (Dr y T9). Observamos que la expresión de estas proteínas de membrana eran similares en

pacientes y controles.

Ante esta situación, se pueden aducir una serie de explicaciones sobre la deficiente respuesta proliferativa de los linfocitos T de estos pacientes tras estímulo con fitohemaglutinina, no mutuamente excluyentes entre si:

1) Es posible que la unión IL2-IL2R fuese anómala o que la señal transmitida al interior celular por IL2R tras la unión a IL2 lo fuese.

2) Es posible que, si bien la formación de la cadena p55 del receptor para IL2 (reconocida por el AcMo antiTac) ocurría normalmente, no sucediese así con la cadena p75, de modo que no se conformara un número normal de receptores de alta afinidad para IL2.

3) La posibilidad de que existiese una molécula de IL2 funcionalmente defectuosa se ha excluido razonablemente, al demostrar que la adicción de IL2r al medio de cultivo no normaliza la deficiente respuesta blastogénica de los linfocitos T de los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa.

Existe una serie de evidencias experimentales recientes que refuerzan la idea de la implicación de los linfocitos T en la patogenia de la enfermedad^(155, 179). Estos estudios están basados en un modelo murino en el que se realiza

una timectomía neonatal precoz. El momento de la timectomía es crucial y debe realizarse en el tercer día de vida, dado que la excisión del timo antes o después de esta fecha no provoca la enfermedad. Se postula que los linfocitos T autorreactivos están presentes en el timo al tercer día tras el nacimiento pero que las células supresoras de estos T autorreactivos aparecen unos días más tarde. Por tanto, la timectomía realizada en esta fecha conserva los linfocitos T autorreactivos pero elimina la generación de linfocitos T supresores. De hecho ciertos subtipos de linfocitos T están ausentes en el ratón adulto posttimectomizado. Además, la enfermedad autoinmune gástrica se puede prevenir transfiriendo linfocitos T adultos normales al ratón timectomizado. Estos datos sugieren que los linfocitos T supresores pueden jugar un papel en la prevención de la enfermedad autoinmune gástrica⁽¹⁷⁹⁾.

Por otra parte, se sugiere que los linfocitos T supresores implicados en la enfermedad son específicos de órgano. Aunque un órgano dado contiene un gran número de potenciales autoantígenos y por tanto requeriría un gran número de células supresoras diferentes para impedir el desarrollo de la enfermedad, es posible que exista un número limitado de antígenos dominantes que disparen la enfermedad. Este concepto se basa en el reciente hallazgo que la mayoría de los anticuerpos anticélulas parietales gástricas están dirigidos frente a un único antígeno, la bomba $H^+-K^+-ATPasa$ ⁽⁶⁷⁾. En este caso el número de células supresoras diferentes para impedir la enfermedad será mucho menor. Esta cuestión no se resolverá hasta que no se conozca la estructura molecular de varios autoantígenos y de los receptores antigénicos de los linfocitos T relacionados.

IV.- ANÁLISIS DEL ESTADO FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS B.

En este trabajo también hemos investigado el estado funcional de los linfocitos B de los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa. Los estudios de regulación de la proliferación de esta población linfoide son similares a los de los linfocitos T aunque difieren en el proceso inicial de activación.

En una primera fase, el linfocito B se activa por un antígeno de forma específica o policlonal con ligandos de las inmunoglobulinas de superficie tales como anti- μ o SAC. Tras esta unión el linfocito B pasa de la fase G_0 a G_{1a} , expresando a continuación antígeno de activación. Sobre estas estructuras actúan citocinas producidas fundamentalmente por los linfocitos T, que hacen avanzar en el ciclo celular a los linfocitos B y que se integran colectivamente bajo la denominación de actividad BCGF (factores de crecimiento de linfocitos B). Tras esta activación, el linfocito B adquiere la capacidad para responder a las moléculas inductoras de diferenciación, tras lo cual los linfocitos B maduran a células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas⁽¹⁴⁵⁾.

Siguiendo este esquema y utilizando una población purificada de linfocitos B, hemos investigado la función de estos en pacientes y controles. No se observaron diferencias significativas en la síntesis de DNA por los linfocitos B de pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa y de controles, tanto en condiciones basales como tras incubación previa con SAC. Tampoco hubo diferencias entre los tres grupos de pacientes estudiados. A continuación investigamos la respuesta inducida sobre linfocitos B activados previamente con SAC frente a linfocinas que influyen en su proliferación. La adición de un sobrenadante BCGF y IL-2 recombinante a los cultivos de linfocitos B estimulados con SAC

de los pacientes produjo una respuesta blastogénica similar a la cuantificada en el grupo control. Así mismo no observamos diferencias al comparar los tres grupos de pacientes estudiados con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa.

Esta proliferación normal de los linfocitos B refuerza el hallazgo previo de la existencia de una deficiencia de los linfocitos T en los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa no inducida por la alteración metabólica subsiguiente a la disminución de la vitamina B12 objetivada en algunos de ellos.

Sin embargo, hubo dos limitaciones metodológicas importantes ya que el número de linfocitos B disponibles para los ensayos funcionales tras los diversos procedimientos de purificación fue siempre escaso y, además, que el número de células de la población monocitaria contaminando esta subpoblación osciló alrededor del 40%. Aunque en la literatura abundan las publicaciones con este grado de pureza nosotros consideramos que para establecer conclusiones firmes es fundamental trabajar con porcentajes más altos (superiores al 90%) de las células objeto de estudio, al menos en los sistemas y con los propósitos que nosotros pretendíamos. Es necesario mejorar el método para poder extraer conclusiones definitivas en este terreno.

V.- ANÁLISIS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NK.

Por último, estudiamos la actividad citotóxica espontánea de los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa mediante un ensayo de liberación de cromosoma 51 utilizando células K-562 como dianas y las CMSP como efectoras⁽¹⁵⁰⁾.

La actividad NK de los pacientes con anemia perniciosa no tratada con vitamina B12 fue significativamente inferior al resto de grupos y controles sanos. En base a la normalidad porcentual de la población NK de estos pacientes, podemos afirmar que la disminución de la actividad NK no depende de una alteración cuantitativa de éstas, sino de un trastorno en sus procesos de reconocimiento y unión a la célula diana y/o en las subsecuentes fases moleculares de lisis.

En el estudio de seguimiento de pacientes con anemia perniciosa observamos una actividad NK disminuida tanto antes como al inicio de la terapéutica con vitamina B12. Sin embargo, al cabo de seis meses de tratamiento se normaliza, no existiendo diferencias con respecto a los controles. Estos datos, a diferencia de lo observado con linfocitos T, sugieren que la disminución de la actividad NK viene determinada por un trastorno metabólico derivado de la deficiencia de vitamina B12 más que por un problema intrínseco de las células NK.

Existen diversas evidencias que sugieren que las células NK pueden jugar un importante papel en la homeostasis de la hematopoyesis⁽¹⁸⁰⁾. En experimentos realizados en humanos se ha objetivado que las células NK pueden inhibir, "in vitro", la formación de colonias tanto mieloides como eritroides. Sin embargo, es evidente que esta propiedad de las células NK no interviene en el desarrollo de la anemia de los pacientes con enfermedad autoinmune gástrica.

Por otra parte, las células NK se han implicado en la vigilancia del sistema inmune frente a neoplasias e infecciones⁽¹⁸¹⁾. En pacientes tumorales se ha objetivado una disminución de la actividad NK de las células mononucleares de sangre periférica asociada con la progresión local y diseminación de la enfermedad^(113, 182). Así mismo, se ha detectado un incremento de infecciones virales, principalmente herpéticas, en un paciente sin células NK⁽¹⁸³⁾. Sin embargo,

tanto en el grupo de pacientes con anemia perniciosa no tratada, en el que se detectó una actividad NK disminuida, como en el resto, no hemos observado un incremento de infecciones virales ni el desarrollo de ningún tumor en el período de seguimiento realizado.

Por lo tanto, en nuestro trabajo se demuestra que en los pacientes con gastritis crónica autoinmune existe una alteración funcional del sistema inmune, detectable a nivel de población linfoide T. En estas células se observa una deficiente respuesta en la vía principal de activación y proliferación linfocitaria que es la dependiente de interleucina-2. Teniendo en cuenta que en el mantenimiento de la autorreactividad fisiológica del sistema inmune es esencial su complementariedad interna, la recirculación linfocitaria y la indemnidad de los mecanismos que regulan la activación, proliferación y maduración de estas células, se puede sugerir que las anomalías funcionales de los linfocitos T objetivadas en los pacientes con gastritis crónica autoinmune están implicadas en la patogénia de la lesión tisular gástrica, característica de este proceso. Este hallazgo, a nivel sistémico, de alteraciones linfocitarias en una entidad nosológica con manifestaciones clínicas predominantes en un único órgano, refuerza la visión sistémica de las enfermedades autoinmunes.

CONCLUSIONES

- 1.- La proporción de las distintas poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (linfocitos T, linfocitos B, monocitos y células NK) es normal en los pacientes afectados de anemia perniciosa tanto antes como durante el tratamiento con vitamina B12. Sin embargo, en los enfermos de gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa se observa un aumento de la población CD2+ CD3-, al igual que en los pacientes del grupo de seguimiento tratados con vitamina B12 durante 6 meses. El porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+, así como su cociente, es similar al determinado en los controles.
- 2.- La síntesis de DNA por las CMSP y por los linfocitos T purificados tras estímulo con fitohemaglutinina fue menor en los grupos de pacientes de gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa, sin observar diferencias entre ellos, que en el de individuos sanos. En los pacientes cuyas CMSP y linfocitos T hipoproliferaron con fitohemaglutinina, se observó una respuesta proliferativa disminuida tras estímulo con anti-CD3 y normal ante los ésteres del forbol. Es reseñable, sin embargo, que transitoriamente y precozmente durante el tratamiento con vitamina B12 parenteral se objetiva la normalización de la respuesta blastogénica de linfocitos T.
- 3.- La síntesis de interleucina 2 por los linfocitos T de los pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa, en cualquiera de los tres grupos, es normal, así como la expresión de la cadena p55 de su receptor. Además, la adición de dicha linfocina no es capaz de revertir la hipoproliferación que dichas células presentan en presencia de fitohemaglutinina.
- 4.- La respuesta blastogénica de los linfocitos B de los pacientes es normal tras el estímulo proporcionado por

diversos mitógenos policlonales (SAC, interleucina-2 recombinante, sobrenadantes con actividad BCFG), en cualquiera de los tres grupos analizados de gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa, con respecto a los individuos controles.

- 5.- La actividad citotóxica espontánea de los pacientes de anemia perniciosa no tratados con vitamina B12 está disminuida. Sin embargo, se encuentra normal en los enfermos de anemia perniciosa tratados con vitamina B12 y de gastritis crónica autoinmune sin anemia perniciosa. En el estudio de seguimiento se observa una normalización tardía de la actividad NK tras tratamiento con vitamina B12.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cheli R, Perasso A, Giacosa A. Definition of gastritis. In: Gastritis. A Critical Review. Springer Verlag, 1987: 3.
- 2.- Rathbone BJ, Heatley RV. Gastritis. In: Losowsky MS, ed. Gut Defences in Clinical Practice Edimburgo, Churchill Livingstone, 1986: 228-242.
- 3.- Herbert V. Megaloblastic anemias. Lab Invest 1985; 52: 3-19.
- 4.- Carmel R. Megaloblastic anemia: vitamin B12 and folate. In: Fairbanks VF, ed. Current Hematology. New York, John Wiley and sons, 1983: 243-280.
- 5.- Kaya MD. Immunological aspects of gastritis and pernicious anaemia. Baillieres Clin Gastroenterol 1987; 1: 487-506.
- 6.- Taylor KB. Immune aspects of pernicious anemia and atrophic gastritis. Clin Haematol 1976; 5: 497-519.
- 7.- Maclaurin BP. The stomach-pernicious anaemia and gastritis. In: Asquitt P, ed. Immunology of the Gastrointestinal Tract. Edimburgo, Churchill Livingstone, 1979; 55-65.
- 8.- Field SP, Sachar DB. The immunology of pernicious anemia. In: Gastrointestinal Immunity for the Clinician. The Mayo Foundation, 1985; 61-74.
- 9.- Whittingham S, Mackay IR. Pernicious anemia and gastric atrophy. In: Rose NR, Mackay IR, eds. The autoimmune diseases. Orlando: Academic Press, 1985; 243-266.

- 10.- Strickland RG. Gastritis. Springer Semin Immunopathol 1990; 12: 203-217.
- 11.- Fenwick S. On atrophy of the stomach. Lancet 1870; 2: 78-80.
- 12.- Minot GR, Murphy WP. Observations on patients with pernicious anaemia partaking of a special diet. J Am Med Assoc 1926; 87: 470-476.
- 13.- Castle WB, Townsend WC, Heath CW. Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anaemia. Am J Med Sci 1930; 180: 305-335
- 14.- Taylor KB, Roitt IM, Doniach D, Couchman KG, Shapland C. Autoimmune phenomena in pernicious anaemia: gastric antibodies. Br Med J 1962; 2: 1347-1354.
- 15.- Gonzalo MA, Rossi I, Marín MC, Alvarez-Mon M. Gastritis crónica. En: Chantar C, Rodés J, eds. Actualidades en Gastroenterología y Hepatología. J.R. Prous, 1988; 129-138.
- 16.- Serrano MC, Barrios C, Pineda JR, Albillos A. Gastritis. Medicine (Madrid) 1988; 152-158.
- 17.- Whitehead R, Truelove SC, Gear MWL. The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscop biopsy specimens. J Clin Pathol 1972; 25: 1-11.
- 18.- Strickland RG, Mackay IR. A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. Am J Dig Dis 1973; 18: 426-440.
- 19.- Correa P. Chronic gastritis: A clinico-pathological classification. Am J Gastroenterol 1988; 83: 504-509.

- 20.- Vandelli C, Bottazzo GF, Doniach D, Franceschi F. Autoantibodies to gastrin-producing cells in antral (type B) chronic gastritis. *N Engl J Med* 1979; 300: 1406-1410.
- 21.- Colon-Otero G, Wheby MS. Disorders of cobalamin and folate metabolism. In: Thorva OA, ed. *Fundamentals of clinical hematology*. Philadelphia, WB Saunders, 1987; 185-211.
- 22.- Beck WS. The Megaloblastic anemias. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. *Hematology*. New York, McGraw-Hill, 1983; 434-465.
- 23.- Bajor BM, Bunn HF. Megaloblastic anemias. In: Braunwald E, Isselbacher KJ, Pertersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Eds. *Harrison's. Principles of Internal Medicine*. New York, McGraw-Hill, 1987; 1498-1504.
- 24.- Fine EJ, Hallet M. Neurophysiological study of subacute combined degeneration. *J Neurol Sci* 1980; 45: 331-336.
- 25.- Martinez JM, Arboix A, Orta C, Cabezas R, Gimferrer E, Martí JL. Mielosis funicular sin anemia megaloblastica. *Med Clin (Barc)* 1987; 89: 739-740.
- 26.- Lindenbaum J, Heaton EB, Savage DG, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1720-1728.
- 27.- Carmel R. The laboratory diagnosis of megaloblastic anemias. *West J Med* 1978; 128: 294-304.
- 28.- Marsá L, González G, Hernández L. Anemias megaloblásticas. *Medicine (Madrid)* 1988; 686-699.

- 29.- Herbert V. Don't ignore low serum cobalamin (vitamin B12) levels. Arch Intern Med 1988; 148: 1705-1707.
- 30.- Carmel R. The Schilling test. Ann Intern Med 1980; 92: 570-571.
- 31.- Sjöblom S-M, Sipponen P, Karonen S-L, Järvinen HJ. Mucosal argyrophil endocrine cells in pernicious anaemia and upper gastrointestinal carcinoid tumours. J Clin Pathol 1989; 42: 371-377.
- 32.- Stockbrügger RW, Menon GG, Beilby JO, Mason RR, Cotton PB. Gastroscopic screening in 80 patients with pernicious anaemia. Gut 1983; 24: 1141-1147.
- 33.- Carmel R. Pepsinogens and other serum markers in pernicious anemia. Am J Clin Pathol 1988; 90: 442-445.
- 34.- Ihämäki T, Kekki M, Sipponen P, Siurala M. The sequelae and course of chronic gastritis during a 30- to 34- year bioptic follow-up study. Scand J Gastroenterol 1985; 20: 485-491.
- 35.- Atrah HI, Davidson RJL. Iron deficiency in pernicious anaemia: a neglected diagnosis. Postgrad Med J 1988; 64: 110-111.
- 36.- Carmel R, Weiner JM, Johnson CS. Iron deficiency occurs frequently in patients with pernicious anemia. JAMA 1987; 257: 1081-1083.
- 37.- Correa P. Clinical implications of recent developments in gastric cancer pathologic and epidemiology. Semin Oncol 1985; 12: 2-10.

- 38.- Weiß H, Gütz HJ, Schröter J, Wildner G-P. DNA distribution pattern in chronic gastritis. *Scan J Gastroenterol* 1989; 24: 643-648.
- 39.- Hernández L. Anemias. En: Foz M, Erill S, Soler-Argilaga C, eds. *Terapéutica en Medicina Interna*. Barcelona, Doyma, 1987; 583-597.
- 40.- Cooper BA. Megaloblastic anemia. En: Brain MC, Carbone PP eds. *Current Therapy in Hematology- Oncology*. 1985-1986. Toronto, BC Decker Inc, 1985; 8-11.
- 41.- Cheli R, Perasso A, Giacosa A. Chronic gastritis. Etiology. In: *Gastritis. A critical review*. Springer Verlag, 1987; 81-97.
- 42.- Cheli R, Giacosa A, Marengo G, Canepa M, Dante GL, Ghezzi L. Chronic gastritis and alcohol. *Z Gastroenterol* 1981; 19: 459-463.
- 43.- Giacosa A, Cheli R. Smoke and chronic gastritis. *Mount Sinai J Med* 1982; 49: 475-478.
- 44.- Caruso I, Bianchi G. Gastroscopic evaluation of anti-inflammatory agents. *Br Med J* 1980; 1: 75.
- 45.- Goodwin CS, Armstrong JA, Marshall BJ. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J Clin Pathol* 1986; 39: 353-365.
- 46.- Flejou J-F, Bahame P, Smith AC, Stockbrugger RW, Rode J, Price AB. Pernicious anaemia and *Campylobacter* like organisms; is the gastric antrum resistant to colonisation? *Gut* 1989; 30: 60-64.

- 47.- González D, Sancho FJ, Sainz S, Such J, Fernández M, Monés J. *Campylobacter pylori* and pernicious anaemia. *Lancet* 1988; 1: 57.
- 48.- Cheli R, Simon L, Aste H et al. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in asymptomatic Hungarian and Italian populations. *Endoscopy* 1980; 12: 105-108.
- 49.- Whittingham S, Ungar B, Mackay IR, Mathews JD. The genetic factor in pernicious anaemia. A family study in patients with gastritis. *Lancet* 1969; 1: 951-954.
- 50.- Varis K, Ihämäki T, Härkönen IM, Samloff IM, Siurala M. Gastric morphology, function, and immunology in first-degree relatives of probands with pernicious anemia and controls. *Scand J Gastroenterol* 1979; 14: 129-139.
- 51.- Kekki M, Siurala M, Varis K, Sipponen P, Sistonen P, Nevanlinna RH. Classification principles and genetics of chronic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22 (suppl.141): 1-28.
- 52.- Mawhinney H, Lawton JW, White AG et al. HLA-A3 and HLA-B7 in pernicious anaemia and autoimmune atrophic gastritis. *Clin Exp Immunol* 1975; 22: 47-53.
- 53.- Ungar B, Mathews JD, Tait BD, Cowling DC. HLA-DR patterns in pernicious anaemia. *Br Med J* 1981; 282: 768-770.
- 54.- Kaye MD, Whorwell PJ, Wright R. Gastric mucosal lymphocyte subpopulations in pernicious anemia and in normal stomach. *Clin Immunol Immunopathol* 1983; 28: 431-440.
- 55.- Fukuma K, Sakaguchi S, Kuribayashi K et al. Immunologic and clinical studies on murine experimental autoimmune gastritis induced by neonatal thymectomy. *Gastroenterology*

1988; 94: 274-283.

- 56.- Imamura N, Fujimura K, Kuramoto A. Lymphocyte subpopulations in pernicious anemia. *N Engl J Med* 1984; 311: 56.
- 57.- Wodzinski MA, Forrest MJ, Barnett D, Lawrence ACK. Lymphocyte subpopulations in patients with hydroxocobalamin responsive megaloblastic anaemia. *J Clin Pathol* 1985; 38: 582-584.
- 58.- Soler J, Remacha A, Nieto M, Gimferrer E. Lymphocyte subpopulations in patients with untreated pernicious anaemia. *Scand J Haematol* 1985; 35: 377.
- 59.- Carmel R, Boone D, Parker JW. Lymphocyte surface phenotypes in pernicious anemia. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 846-850.
- 60.- Taylor KB, Roitt IM, Doniach D et al. Autoimmune phenomena in pernicious anaemia; Gastric antibodies. *Br Med J* 1962; 2: 1347-1354.
- 61.- Masala C, Smurra G, De Prima MA et al. Gastric parietal cell antibodies: demonstration by immunofluorescence of their reactivity with the surface of the gastric parietal cells. *Clin Exp Immunol* 1980; 41: 271-280.
- 62.- Tanaka N, Glass GBJ. Effect of prolonged administration of parietal cell antibodies from patients with atrophic gastritis and pernicious anemia on the parietal cell mass and hydrochloric acid output in rats. *Gastroenterology* 1970; 58: 482-493.
- 63.- Lopes JD, Ito H, Glass GBJ. Inhibition of parietal and peptic cell proliferation by parietal cell and intrinsic

- factor antibodies. *Gastroenterology* 1976; 70: 910.
- 64.- Loveridge N, Bitensky L, Chayen J et al. Inhibition of parietal cell function by human gammaglobulin containing gastric parietal cell antibodies. *Clin Exp Immunol* 1980; 41: 264-270.
- 65.- De Aizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, Toh BH. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. *N Engl J Med* 1983; 309: 625-629.
- 66.- De Aizpurua HJ, Ungar B, Toh BH. Autoantibody to the gastrin receptor in pernicious anemia. *N Engl J Med* 1985; 313: 479-483.
- 67.- Burman P, Mårdh S, Norberg L, Karlsson FA. Parietal cell antibodies in pernicious anemia inhibit H^+ , K^+ -adenosine triphosphatase, the proton pump of the stomach. *Gastroenterology* 1989; 96: 1434-1438.
- 68.- Garrido-Pinson GC, Turner MD, Crookston JU et al. Studies of human intrinsic factor autoantibodies. *J Immunol* 1966; 97: 897-912.
- 69.- Jacob E, Glass GBJ. Localization of intrinsic factor and complement-fixing intrinsic factor-intrinsic factor antibody complex in parietal cell of man. *Clin Exp Immunol* 1971; 8: 517-527.
- 70.- Inada M, Glass GBJ. Effect of prolonged administration of homologous and heterologous intrinsic factor antibodies on the parietal and peptic cell masses and secretory function of the rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1975; 69: 396-408.

- 71.- Finlayson NDC, Fauconnet MH, Krohn K. In vitro demonstration of delayed hypersensitivity to gastric antigens in pernicious anemia. *Am J Dig Dis* 1972; 17: 631-638.
- 72.- Whittingham S, Youngchaiyud U, Mackay IR, Buckley JD, Morris PJ. Thyrogastric autoimmune disease. Studies on The cell-mediated immune system and histocompatibility antigens. *Clin Exp Immunol* 1975; 19: 289-299.
- 73.- Goldstone AH, Calder EA, Barnes EW, Irvine W J. The effect of gastric antigens on the in vitro migration of leukocytes from patients with atrophic gastritis and pernicious anaemia. *Clin Exp Immunol* 1973; 14: 501-508.
- 74.- MacCuish AC, Urbaniak SJ, Goldstone AH, Irvine WJ. PHA responsiveness and subpopulations of circulating lymphocytes in pernicious anemia. *Blood* 1974; 44: 849-855.
- 75.- Kätkä K. Immune functions in pernicious anaemia before and during treatment with vitamin B12. *Scand J Haematol* 1984; 32: 76-82.
- 76.- Bagget RT, Welsh JD. Observations on effects of glucocorticoid administration in pernicious anaemia. *Am J Dig Dis* 1970; 15: 871-881.
- 77.- Jorge AD, Sánchez D. The effect of azathioprine on gastric mucosal histology and acid secretion in chronic gastritis. *Gut* 1973; 14: 104-106.
- 78.- Alvarez-Mon M, Durántez A. Fisiopatología de las linfocinas y monocinas. *Med Clin (Barc)* 1987; 89: 387-393.
- 79.- Nossal GJV. The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 1987; 316: 1320-1325.

- 80.- Haseman CA, Capra JB. Immunoglobulins: structure and function. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. New York, Raven Press, 1989; 209-233.
- 81.- Acuto O, Reinherz EL. The human T-cell receptor. Structure and function. *N Engl J Med* 1985; 312: 1100-1111.
- 82.- Finkel TH, Kubo RT, Cambier JC. T-Cell Development and Transmembrane Signaling: Changing Biological Responses through an Unchanging Receptor. *Immunol Today* 1991, 12: 79-85.
- 83.- Robinson MA, Kindt TJ. Major histocompatibility complex antigens and genes. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. New York, Raven press, 1989; 489-539.
- 84.- Yewdell JW, Bennink JR. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 1990; 62: 203-206.
- 85.- Davis MM, Bjorkhan PJ. T-cell receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402.
- 86.- Terhorst C, Alarcon B, de Vries J, Spits H. T lymphocyte recognition and activation. In: Hames BD, Glover DM, eds. *Molecular Immunology*. Oxford: Irc Press, 1988; 145-188.
- 87.- Editorial. Gamma/Delta T-Cell Receptors. *Lancet* 1991; 337: 207-208.
- 88.- Makgoba MW, Sanders ME, Shaw S. The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: Relevance to T-cell recognition. *Immunol Today* 1989; 10: 417-422.
- 89.- Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol* 1989; 44: 265-311.

- 90.- Mossman TR, Coffman RL. Two types of mouse helper T-cell clones. *Immunol Today* 1987; 8: 223-227.
- 91.- Cooper MD. B lymphocytes, normal development and function. *N Engl J Med* 1987; 317: 1452-1456.
- 92.- Zola H. The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol Today* 1987; 8: 308-315.
- 93.- Hayakawa K, Hardy RR. Normal, autoimmune and malignant CD5+ B cells: the LY-1 B lineage? *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 197-218.
- 94.- Unanue ER. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. New York, Raven Press, 1989: 95-115.
- 95.- Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 1987; 42: 181-211.
- 96.- Hercend T, Schmidt RE. Characteristics and uses of natural killer cells. *Immunol Today* 1988; 9: 291-293.
- 97.- Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Soc Exp Biol Med* 1966; 122: 1167-1171.
- 98.- Schimpl A, Wecker E. Replacement of T cell function by a T cell product. *Nature* 1972; 237: 15-17.
- 99.- Shimizu A, Honjo T. Immunoglobulin class switching. *Cell* 1984; 36: 801-803.

- 100- O'Garra A. Interleukins and the immune system 1. Lancet 1989; 1: 943-947.
- 101- O'Garra A. Interleukins and the immune system 2. Lancet 1989; 1: 1003-1005.
- 102- Balkwill FR. Interferons. Lancet 1989; 1: 1060-1063.
- 103- Di Giovine FS, Duff GW. Interleukin 1: the first interleukin. Immunol Today 1990; 11 : 13-20.
- 104- Sipe JD. The molecular biology of interleukin 1 and the acute phase response. Adv Intern Med 1989; 34: 1-20.
- 105- Durum SK, Oppenheim JJ. Macrophage-derived mediators: Interleukin 1, tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon and related cytokines. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. New York, Raven Press, 1989; 639-661.
- 106- Chiplunkar S, Langhorne J, Kaufman SHE. Stimulation of B cell growth and differentiation by murine recombinant interleukin 1. J Immunol 1986; 137: 3748-3752.
- 107- Smith KA. Interleukin-2 : inception, impact and implication. Science 1988; 240: 1169-1176.
- 108- Smith KA. The interleukin-2 receptor. Adv Immunol 1988; 42: 165-179.
- 109- Ress RC, Wiltrot RH. The biology and Clinical Applications of Interleukin 2. Immunol Today 1990; 11: 36-38.
- 110- Valge VE, Wong JGP, Datlof BM, Sinskey AJ, Rao A. Protein kinase C is required for responses to T cell receptor ligands but not to interleukin-2 in T cells. Cell 1988; 55: 101-112.

- 111- Jelinek DF, Splawski JB, Lipsky PE. The roles of interleukin-2 and interferon gamma in human B cell activation, growth and differentiation. *Eur J Immunol* 1986; 16: 925-932.
- 112- Alvarez-Mon M, Casas J, Laguna R, Toribio ML, O de Landazuri M, Durantez A. Lymphokine induction of NK-like cytotoxicity in T cells from B-CLL. *Blood* 1986; 67: 228-232.
- 113- Alvarez-Mon M, Casas J, Laguna R, Jorda J, Durantez A. Clinical signification of natural killer activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1987; 38: 268-273.
- 114- Schrader JN. The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin 3). *Ann Rev Immunol* 1986; 4: 205-230.
- 115- Yokota T, Arai N, de Vries J, et al. Molecular biology of interleukin-4 and interleukin-5 genes and biology of their products that simulate B cells, T cells and hemopoietic cells. *Immunol Rev* 1988; 102: 137-187.
- 116- Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. Regulation of IgG₁ and IgE production by interleukin 4. *Immunol Rev* 1988; 102: 29-56.
- 117- Hu-Li J, Shevach EM, Mizuguchi J, Ohara J, Mosman T, Paul WE. B-cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165:157-172.
- 118- Paul WE, Ohara J. B-cell stimulatory factor-1/ interleukin 4. *Ann Rev Immunol* 1987; 5: 429-459.

- 119- Billiau A. Interferon-beta 2 as a promoter of growth and differentiation of B cells. *Immunol Today* 1987; 8: 84-87.
- 120- Hirano T, Akira S, Taga T, Kisimoto T. Biological and Clinical Aspects of Interleukin 6. *Immunol Today* 1990; 11: 443-449.
- 121- Henney CS. Interleukin-7: effects on early events in lymphopoiesis. *Immunol Today* 1989; 10: 170-173.
- 122- Hamilton PA, Adams DO. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 1987; 8: 151-158.
- 123- Rabin EM, Mond JJ, Ohara J, Paul WE. Interferon gamma inhibits the action of B cell stimulatory factor (BSF-1) on resting B-cells. *J Immunol* 1986; 137: 1573-1576.
- 124- Romagnani S, Giudizi MG, Biagiotti R et al. B cell growth factor activity of interferon gamma. Recombinant human interferon gamma promotes proliferation of anti-mu-activated human lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 3513-3516.
- 125- Le TBT, Queen C, Fauci AS. Interferon gamma induces light chain synthesis in interleukin-2-stimulated human B cells. *Eur J Immunol* 1986; 16: 547-550.
- 126- Rudle NH. Tumor necrosis factor and related cytotoxins. *Immunol Today* 1987; 8: 128-130.
- 127- Barrajon E. Factor de necrosis tumoral. *Med Clin (Barc)* 1989; 93: 147-155.
- 128- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is a endogenous pyrogen and induces

- production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; 163: 1433-1450.
- 129- Scheurich P, Thoma B, Ucer V, Pfizenmaier KL. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of the receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cells response. *J Immunol* 1987; 138: 1786-1790.
- 130- Old LJ. Tumor necrosis factor. *Sci Am* 1988; 258: 59-75.
- 131- Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP, Weinman R, Perussia B, Trinchieri G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 1581-1594.
- 132- Kehrl JH, Alvarez-Mon M, Delsing GA, Fauci AS. Lymphotoxin is an important T cell-derived growth factor for human B cells. *Science* 1987; 238: 1144-1146.
- 133- Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is a important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986; 137: 3855-3860.
- 134- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986; 163: 1037-1050.
- 135- Larsson EL, Iscove NN, Coutinho A. Two distinct factors are required for induction of T-cell growth. *Nature* 1980; 283: 664-666.

- 136- Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985; 317: 359-361.
- 137- Scheurich P, Ucer U, Wrann M, Pfizenmaier K. Early events during primary activation of T cells: antigen receptor cross-linking and interleukin 1 initiate proliferative response of human T cells. *Eur J Immunol* 1985; 15: 1091-1095.
- 138- Weiss A. T lymphocyte activation. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. New York, Raven Press, 1989; 359-384.
- 139- Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233: 305-312.
- 140- Gardner P. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 1989; 59: 15-20.
- 141- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984; 312: 315-321.
- 142- Baniyash M, Garcia-Morales P, Luong E, Samelson LE, Klausner RD. The T-cell antigen receptor zeta chain is tyrosine phosphorylated upon activation. *J Biol Chem* 1988; 263: 18225-18230.
- 143- Rudd CE. CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine Kinase receptor. *Immunol Today* 1990; 11: 400-406.
- 144- Tonks NK, Charbonneau H, Diltz CD, Fischer EH, Walsh KA. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 1988; 27: 8701-8706.

- 145- Kishimoto T, Hirano T. B lymphocyte activation, proliferation and immunoglobulin secretion. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. New York, Raven Press, 1989; 385-441.
- 146- Abbas AK. A reassessment of the mechanisms of antigen-specific T-cell-dependent B-cell activation. Immunol Today 1988; 9: 89-94.
- 147- Golay JT, Clark EA, Beverley PCL. The CD20 (Bp35) antigen is involved in activation of B cells from the G0 to the G1 phase of the cell cycle. J Immunol 1985; 135: 3795-3801.
- 148- Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens Bp35 and Bp50. Proc Natl Acad Sci Usa 1986; 83: 4494-4498.
- 149- Cambier JC, Ramson JT. Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. Annu Rev Immunol 1987; 5: 175-199.
- 150- Berke G. Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and Natural Killer Cells. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. New York, Raven Press, 1989; 735-764.
- 151- Young JD-E, Cohn ZA. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. Adv Immunol 1987; 41: 269-332.
- 152- Liu CC, Steffen M, King F, Young JDE. Identification isolation, and characterization of a novel cytotoxin in murine cytolytic lymphocytes. Cell 1987; 51: 393-403.

- 153- Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP, Weinmann R, Perussia B, Trinchieri G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 1581-1594.
- 154- Wright SC, Bonavida B. Studies on the mechanisms of Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. VII. Functional comparison of Human Natural Killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 138: 1791-1798.
- 155- Allbritton NL, Verret CR, Wolley RC, Eisen HN. Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cell destruction by murine cloned cytotoxic T Lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 514-527.
- 156- Dealtry GB, Maylor MS, Fiers W, Balkwill FR. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1987; 17: 689-694.
- 157- Golstein P. Cytolytic T-cell melodrama. *Nature* 1987; 327: 12.
- 158- Ortaldo JR, Longo DL. Human natural lymphocyte effector cells: definition, analysis of activity, and clinical effectiveness. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 999-1010.
- 159- Herberman RB, Hiserodt J, Vujanovic N et al. Lymphokine-activated killer cell activity. Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol Today* 1987; 8: 178-181.
- 160- Ortaldo JR, Mason A, Overton R. Lymphokine-activated killer (LAK) cells: analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med* 1986; 164: 1193-1205.

- 161- Gillis S, Ferm M, Ou W, Smith K. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 1987; 120: 2027-2032.
- 162- Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45: 321-334.
- 163- Muraguchi A, Kishimoto T, Keentani T, Kailda T, Yoshiraki K, Yamamura Y. T-cell replacing factor (TRF)-induced IgG secretion on a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* 1981; 127: 412-416.
- 164- Böyum AJ. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21(suppl 9): 77-89.
- 165- Jondal M, Holm G, Wigzell H. Surface markers of human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 1972; 136: 207-215.
- 166- Kaplan ME, Woodson M, Clark C. Detection of human T Lymphocytes by rosette formation with AET-treated sheep red cells. In: Blom BR, David JR, eds. *In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*. New York, Academy Press, 1976: 83.
- 167- Parks DA, Herzenberg LA. Flow Cytometry and fluorescence-activated cell sorting. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. New York, Raven Press, 1989: 781-802.
- 168- Alvarez J, Silva A, Ortiz de Landazuri M. Human T cell growth factor I. Optimal conditions for its production. *J Immunol* 1979; 123: 977-983.

- 169- Bonilla F, Alvarez-Mon M, Merino F et al. Interleukin-2 induces cytotoxic activity in lymphocytes from regional axillary-nodes of breast cancer patients. *Cancer* 1988; 61: 629-634.
- 170- Remacha A, Mones J, Gonzalez D, Llobet JM, Brunet S, Gimferrer E. Estudio clínico-biológico de 45 pacientes con anemia perniciosa. *Sangre* 1986; 31: 708-717.
- 171- Gonzalo MA, Abreu L, Alvarez-Mon M et al. El pepsinógeno I en la gastritis crónica atrófica. *Gastroenterol-Hepatol* 1986; 9: 437-440.
- 172- Samloff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M, Rotter JJ. Relation-ship among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II and gastric mucosal histology. *Gastroenterology* 1982; 83: 204-209.
- 173- Bins M, Burgers PICJ, Schuyt-Van Etten T et al. Parietal cell antibodies in relation to basal serum gastrin in a normal population. *Clin Exp Immunol* 1983; 53: 619-622.
- 174- Eriksson S, Clase L, Moquist-Olson I. Pernicious anemia as a risk factor in gastric cancer. The extent of the problem. *Acta Med Scand* 1981; 210: 481-484.
- 175- Talley NJ, Chute CG, Larson DE, Epstein R, Lydick EG, Melton III LJ. Risk for colorectal adenocarcinoma in pernicious anemia. A population-based cohort study. *Ann Intern Med* 1989; 111: 738-742.
- 176- Ales-Martinez JE, Alvarez-Mon M, Merino F et al. Decreased TcR-CD3+ T cell numbers in healthy aged humans. Evidence that T cells defects are masked by a reciprocal increase of TcR-CD3⁺CD2⁺ natural killer cells. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1827-1830.

- 177- Sakane T, Takada S, Kotani H, Tsunematsu T. Effects of methyl-B12 on the in vitro immune functions of human T lymphocytes. *J Clin Immunol* 1982; 2: 101-109.
- 178- Kätkä K, Salonen R, Nikoskelainen J. Interferon-gamma and pernicious anaemia. *Scand J Haematol* 1986; 36: 412-413.
- 179- Elson CO. Do Organ-Specific supressor T Cells prevent autoimmune gastritis? *Gastroenterology* 1990; 98: 226-229.
- 180- Trinchieri G, Murphy M, Perussia B. Regulation of Hematopoiesis by T Lymphocytes and natural killer cells. *Crc Crit Rev Oncol Hematol* 1987, 7: 219-265.
- 181- Ritz J. The Role of Natural Killer Cell in Immune Surveillance. *N Engl J MED* 1989; 320: 1748-1749.
- 182- Carballido J, Alvarez-Mon M, Solovera J, Menéndez-Ondina L, Duránte A. Clinical Significance of Natural Killer Activity in Patients with Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *J Urol* 1990; 143: 29-33.
- 183- Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe Herpesvirus Infections in a Adolescent without Natural Killer Cells. *N Engl J Med* 1989; 320: 1731-1735.