

Medición in situ de producción de Citoquinas por subpoblaciones de Linfocitos TH1 y TH2 en Úlceras Orales Recurrentes: Inmunomodulación por Furoato de Mometasona

ANGELA GARCÍA¹, ANGELA ZULUAGA DE CADENA², DIANA ISAZA³.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the immunopathogenic mechanism(s) responsible for recurrent aphthous ulcers (RAU). In situ cytokine production was evaluated in both active and remission phases of untreated RAU and in RAU treated with Mometasone Furoate 0.1% lotion. Clinical and histological alterations were also studied for both treatment groups.

12 patients with RAU were enrolled in a prospective, triple blind study. Each patient underwent biopsy of an untreated aphthous ulcer which was treated with either placebo or Mometasone Furoate twice daily for 3-4 days. Specimens were analyzed immunohistochemically for IL12, IL4, IL10 and INFgamma. Aphthae were also followed clinically.

¹ Dermatóloga

² Dermatóloga, Jefe del Departamento de Dermatología del Instituto de Ciencias de la Salud, CES
E-mail: azuluga@ces.edu.co

³ Instituto de Medicina Tropical, Medellín, Colombia

Cytokine patterns consistent with Th2 T cell predominance were found for aphthae in both active and remission phases in placebo and mometasone furoate treated groups.

Cytokine production was decreased by approximately 50% for both TH1 and TH2 T cell phenotypes in the Mometasone Furoate treated ulcers, supporting its immunosuppressive effect.

KEY WORDS:

Recurrent aphthous ulcers

Th1 and Th2 T cells

INTRODUCCIÓN

Las aftas orales recurrentes son úlceras inflamatorias de la mucosa oral, dolorosas, autolimitadas, de etiología no esclarecida. Múltiples factores causales han sido implicados incluyendo mecanismos inmunológicos. Se han utilizado diversos tratamientos con éxito terapéutico limitado, por lo tanto su manejo permanece siendo problemático. (1)

El furoato de mometasona ELOCOM R es un esteroide tópico con actividad antiinflamatoria local potente y mínima absorción sistémica. La aplicación tópica produce inmunosupresión local por inhibir la producción de mediadores inmunes tales como Interleukina 1 (IL-1) e Interleukina 2 (IL-2), entre otras. (2)

En este estudio, se analizaron los efectos del Furoato de Mometasona en la producción in situ de citoquinas. Se realizó un estudio experimen-

tal, prospectivo, triple ciego. Se incluyeron 12 pacientes con úlceras aftosas recurrentes, a quienes se les tomó biopsia de úlceras no tratadas y biopsia después de tratamiento con placebo o con Furoato de Mometasona, el material histológico fue sometido a análisis inmunohistoquímico para Interleukina 4 (IL-4), Interleukina 10 (IL-10), Interleukina 12 (IL-12) e Interferón gama.

Nuestro estudio permitió identificar una disminución de ambos patrones celulares TH1 y TH2 de producción de citoquinas tanto en la fase activa como en la fase de remisión de las úlceras aftosas recurrentes como resultado del tratamiento con Furoato de Mometasona

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, triple ciego en el Instituto de Ciencias de la Salud (CES) de Medellín, Colombia. Se incluyeron 12 pacientes de la consulta de odontología y dermatología. Los criterios de selección incluyeron pacientes mayores de 12 años, que tuvieran una o más aftas orales, de menos de 3 días de evolución, localizadas en cualquier sitio de la cavidad oral excepto en aquellos que estuviese adherida la mucosa del periostio. Se realizó historia clínica y examen físico completo para descartar otras enfermedades asociadas.

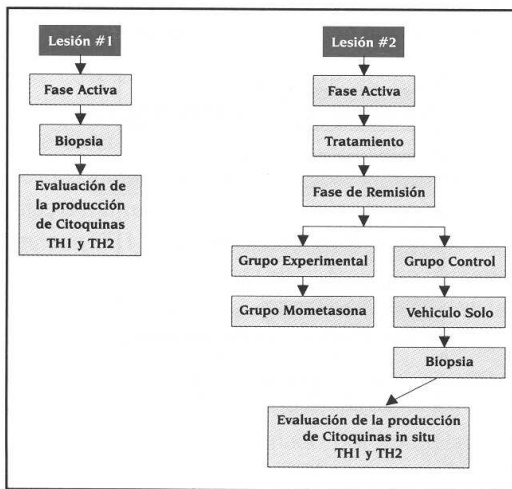
El estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética del CES, todos los pacientes recibieron la información adecuada y firmaron el consentimiento informado.

Se seleccionó una primera lesión en forma aleatoria al momento del ingreso al estudio, se

realizó una biopsia con sacabocado y se le hizo estudio histológico e inmunohistoquímico, analizando el patrón de producción de citoquinas por linfocitos TH1 (IL-12, Interferón gamma) y TH2 (IL-4, IL-10)

El tratamiento con furoato de Mometasona (loción al 0.1%) o su vehículo se administró a una segunda lesión (lesión #2) por 3 a 5 días. Al finalizar el tratamiento las lesiones fueron evaluadas clínicamente y se tomó biopsia de la lesión # 2, para analizar los mismos patrones. (Figura N° 1).

Figura N° 1
Diagrama de Evaluación de las Lesiones



Se obtuvo un total de 12 biopsias pretratamiento y 10 biopsias postratamiento para procesamiento inmunohistoquímico, fueron embebidas en OCT (Miles Scientific Naplesville, ILL, USA) y almacenadas en nitrógeno líquido.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN gamma (R & D system, USA), todos a concentración de 50 ug/ml.

La tinción para inmunoperoxidasa fue hecha utilizando la técnica de Avidina-biotina. Las mediciones de citometrías se hicieron usando microscopía de luz con objetivo 100X, el microscopio fue calibrado con un micrometro ocular (Swift instrument, San José, CA, USA) y todas las medidas fueron determinadas en número de células por mm². Sólo se contaron las células con tinción periférica y núcleo visible.

Se realizaron varios cortes de la misma muestra para tinción con hematoxilina eosina que luego fueron comparados. El número de células mononucleares observadas con hematoxilina eosina fue utilizado como línea de base para la determinación posterior de resultados con la inmunoperoxidasa. Para el análisis estadístico utilizamos el test de Snedecor F (similar a T de Student) y ANOVA, con una significancia estadística del 5% (p<0.05).

RESULTADOS

Características de los pacientes

De los 10 pacientes que se incluyeron en el estudio, 6 recibieron Furoato de Mometasona y 4 placebo. El promedio de edad fue de 25.9 años, con un mínimo de 16 y un máximo de 43 años. Con una distribución por sexo de 6 mujeres y 4 hombres. Todos tenían aftas menores. Las características comunes de la población estudiada se muestran en la tabla N° 1. La región más frecuentemente afectada fue la superficie interna del labio inferior (6 aftas) seguido por el sulcus inferior (3 aftas) y el borde lateral de la lengua (3 aftas). Con respecto a la citometría para evaluar la producción de citoquinas, que define los fenotipos de los linfocitos TH1 (IL-12, IFN gamma) y TH2 (IL-4, IL-10) en la fase activa de la enfermedad antes del tratamiento, encontramos que predominaron los TH2 (IL-4, IL-10). (Figura N° 2)

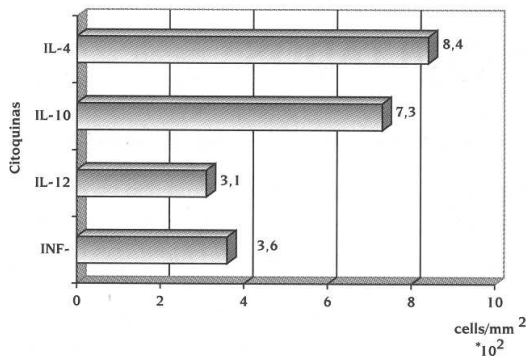
Tabla N°1. Características comunes de la población estudiada

Caso No.	Edad/ Sexo	Tratamiento	Duración en días	Mometasona Furoato		Placebo		Dolor pre mm	Dolor post mm
				Tamaño pre mm	Tamaño post mm	Tamaño pre mm	Tamaño post mm		
1	26/F	MF	4	2.5	2.0			M	L
2	43/M	P	4			2.0	0.5	S	L
3	33/M	P	4			3.0	2.5	S	L
4	16/F	MF	3	3.0	0.0			M	L
5	28/M	MF	4	6.0	4.0			S	L
6	27/F	MF	4	3.0	0.5			S	-
7	22/F	P	3			2.0	1.5	W	L
8	32/F	MF	4	4.0	2.0			M	L
9	22/M	MF	4	9.8	8.0			S	-
10	20/F	P	4			6.0	5.0	S	M

n = 10

MF: Mometasona Furoato P: Placebo L: Leve M: Moderado S: Severo

Figura N°2. Distribución de las citoquinas en la fase activa de la enfermedad, antes del tratamiento



El porcentaje de las citoquinas mencionadas relacionado con el número total de mononucleares fue de la siguiente forma: IL-4 = 8.4%, IL-10 = 7.3%, IL-12 = 3.1%, IFN gamma = 3.6%. En la fase activa pretratamiento ambos grupos mostraron una prevalencia de linfocitos TH2 a expensas de IL-4 e IL-10; sus densidades celulares fueron 677 y 541 respectivamente, comparado con la IL-12 y el IFN gamma cuyas densidades fueron 213 y 333. Las densidades celulares fueron 677 linfocitos TH2 y 541 linfocitos TH1.

El patrón de citoquinas en la fase de remisión, tanto en el grupo de estudio como en el grupo control se muestra en la figura N° 3. El Furoato de Mometasona indujo una reducción de la secreción de citoquinas de los linfocitos TH1 y TH2, en ambos grupos, presentándose un efecto mayor en la IL-10 y la IL-12. En la tabla N° 2 se observa una marcada disminución de la IL-12 cuando se administró Furoato de Mometasona, con una $p < 0.05$. Finalmente cuando se compara la respuesta de linfocitos TH1 y TH2 antes y después del tratamiento para ambos grupos se encuentra una prevalencia de linfocitos TH2 en ambas fases con una $p = 0.03$.

Figura N°3. Patrón de citoquinas en el grupo control y el grupo de estudio

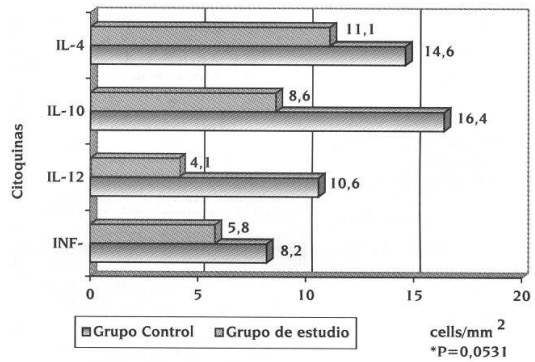


Tabla N°2. Valores de TH1 y TH2 según etapas

GRUPO	TH1		TH2	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
Etapa Activa Pre-tratamiento Ambos grupos	6.65	5.84	15.76	5.95
Etapa Remisión Post-tratamiento Grupo Control - Placebo	18.83	16.61	31.05	19.64
Etapa Remisión Post-tratamiento Grupo de Estudio Elocon	9.92	6.73	9.76	6.41
	P = 0.0599 F de Snedecor = 2.99		P = 0.00376 F de Snedecor = 3.80	

Tabla N°3. Producción de Citoquinas en el grupo de tratamiento y en el grupo control

Citoquinas	ESTUDIO -ELOCOM-	CONTROL -PLACEBO-	P	T
IL - 4	11.18 ± 4.71	14.60 ± 9.36	0.267	0.7747
IL - 10	8.58 ± 3.84	16.40 ± 10.34	0.5937	0.07058
IL - 12	4.10 ± 2.94	10.68 ± 8.38	*0.0531	1.8061
INF - γ	5.82 ± 4.52	8.23 ± 8.25	0.2841	0.6029

* p < 0.5

DISCUSIÓN

Aunque el factor disparador de las aftas orales recurrentes no se conoce, puede existir un desbalance en el sistema inmune (1,2,3,4). En enfermedades como la leishmaniasis, la cura o la diseminación de la enfermedad han sido asociados con la expansión clonal de linfocitos T ayudadores, tipo TH1 y TH2 respectivamente (5). Este efecto es detectado por medio del patrón de citoquinas producido por cada una de las células durante la fase inicial (6), las más importantes son TH1 (IL2, IL12 e IFN gamma) y TH2 (IL4, IL5, IL6, IL10) (4). En las aftas orales se han analizado por medio de citometría de flujo, las subpoblaciones de linfocitos TH1 Y TH2 en sangre periférica, tanto en la fase activa como en la de remisión, y se encuentra un incremento en el número de TH2 acompañado por una disminución de los TH1. (7,8,9) Basados en estos hallazgos decidimos establecer la producción de citoquinas in situ por estas subpoblaciones de linfocitos para las aftas orales. Basados en este estudio, encontramos que en la evolución natural de las aftas orales recurrentes (pretratamiento) hay una repuesta mixta de linfocitos TH1 y TH2, con una prevalencia de IL4 e IL10 (15.76%) comparado con IFN gamma e IL12 (6.55%). Generalmente en la fase activa como en la de remisión, la producción de IL4 e IL10 fue mayor que la de IFN gamma e IL12 juntas, mostrando una clara prevalencia de linfocitos TH2 sobre los TH1.

El Furoato de Mometasona ejerció su efecto inmunosupresor sobre las 4 citoquinas estudiadas, resaltando su efecto sobre la IL12 (10,11,12). En la evolución natural de las aftas, durante la fase de remisión y sin ejercer ningún efecto externo sobre ellos, los linfocitos de tipo TH1 realizan una mayor activación a expensas de la IL12, sugiriendo que dicha interleuquina puede estar relacionada con la remisión de la úlcera. Podríamos entonces explicar las características de la úlcera de la siguiente forma: Los niveles disminuidos de los linfocitos TH1 conducen a la ausencia de la supresión de la reactividad contra nuestros propios tejidos; o por el incremento de los linfocitos TH2, presentarse una sobreproducción de citoquinas o factores de crecimiento, conduciendo a una reacción inmune anormal para los tejidos. (13,14,15).

CONCLUSIÓN

En las aftas orales recurrentes, se identificaron en ambas biopsias patrones de citoquinas correspondientes a linfocitos TH2, tanto en la fase activa como en la fase de remisión, cuando fueron tratadas con furoato de mometasona o con placebo.

El tratamiento con Furoato de Mometasona produjo una inhibición de casi el 50% de la producción de citoquinas en ambos grupos, TH1 y TH2 (Tabla N° 3). Estos hallazgos se correlacionan con los efectos inmunosupresivos locales del Furoato de Mometasona (ELOCOM®)

AGRADECIMIENTOS

A laboratorios Schering Plough por su producto ELOCOM®

BIBLIOGRAFÍA

1. Pedersen A, Hougen HP, Kenrad S. T-lymphocyte subsets in oral mucosa of patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med.* 1992 Apr; 21(4):176-80.
2. Veta E, Umazume M, Yamamoto T, Osaki T. Leukocyte dysfunction in oral mucous membrane diseases. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22: 193-202.
3. Landesberg R., Falion M, Insel R. Alterations of T Helper/inducer and T suppressor/inducer cells in patients with recurrent aphthous ulcer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990 Feb; 69(2): 205-8.
4. Mosmann TR. Cytokine secretion phenotypes of TH Cells: How many subsets, how much regulation?. *Res Inmunol* 1991 Jan; 142(1): 9-13
5. Martinez-Arendz A., Tapia FS, Caceres G et al. Inmuno-cyto-chemical characterization of immune cells in lesions of American Cutaneous Leishmaniasis: Using Novel T Cell marker. *Apta tropica* 1991; 49: 271-80
6. Caceres G, Dittmar FJ, Tapia MA, et al. Determination of the cytokine profile in American leishmaniasis using the polimerase chain reaction. *Clin Exp Inmunol.* 1993; 91: 500-5
7. Eversole LR. Review of the literature In: Millar HD, Mason DF. *Workshop on oral Medicine* Chicago: Year book medical 1988; 52-8
8. Mosmann JP, Cherwinski MW, Bond MA et al. Two types of murine helper cell clone: Definition according to Profiles of lymphokine activities and secret proteins. *Inmunol.* 1986; 2348 – 57.
9. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines In: *Cellular and molecular immunology.* 1994; 256-7.
10. Pimlott SJ, Walker DM. A controlled clinical trial of the efficacy of topically applied fluocinonide in the treatment of the RAU. *Br Dent J* 1983;154: 174-7
11. Trinchieri G, Scott P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Inmunology Today* 1994; 10: 335-463
12. Bergman SA. Topical application of hidrocortisone acetate, in the treatment of aphthous ulcers. *Dent digest* 1954; 60: 60 -1
13. Gallagher GT. Biology and Pathology of oral mucosa. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K et al de. *Dermatology in General Medicine.* 4^a ed New York. Mc GrawHill Inc, 1993; 2355-2417.
14. Ochoa MT et al. Presentación clínica y producción de citoquinas en lepra tuberculoide y lepromatosa. *Revista Colombiana de Dermatología* 1995; 4: 95-100.
15. Lombardi T, Hauser C, Budtz-Jorgensen E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 193-202.

