

Desmielinización in vitro inducida por inyección endoneural de suero y líquido céfalo-raquídeo de pacientes con síndrome de Guillain Barré, evidenciada por difracción de rayos X

Drs. Juan Carlos Guedes, Maritza Cotua S, Eva Vonasek, Leonardo Mateu, Julio Borges, Sarkis Postalian, Krikor Postalian

Cátedra de Neurología. Hospital Universitario de Caracas. Universidad Central de Venezuela. Laboratorio de Estructura Molecular. Centro de Biofísica y Bioquímica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

RESUMEN

Estudiamos la desmielinización inducida por suero y líquido céfalo-raquídeo de 12 pacientes con síndrome de Guillain-Barré en fase aguda, inyectados en el nervio ciático derecho de ratas Lewis. En siete casos el material se había almacenado congelado a -70°C hasta su uso, en los otros cinco, el material se utilizó inmediatamente después de su obtención; como control se usó el nervio ciático contra-lateral. Además, se inyectó un grupo de ratas con solución salina y otro con suero de personas sanas para comprobar que la inyección "per se" y la inoculación de suero humano normal no produce daño de la mielina. Para demostrar la desmielinización se usó la técnica de difracción de rayos X que mide la distancia de repetición D entre dos lamelas contiguas de mielina y el porcentaje de mielina total. Los nervios inyectados con solución salina y suero de personas sanas no mostraron variaciones en relación a los controles, como tampoco los nervios inyectados con suero y líquido céfalo-raquídeo de pacientes con síndrome de Guillain-Barré congelado previamente. En los nervios inyectados con suero en fresco, el valor de D fue de 173,3 Å en comparación con 171,3 Å de los controles; el porcentaje de mielina total fue de 0,51% en relación a los controles (0,62%). La D de los nervios inyectados con líquido céfalo-raquídeo en fresco en promedio fue mayor (174,3 Å) y el porcentaje de mielina total fue menor (0,54%) que el valor de los controles (171,3 Å y 0,62% respectivamente).

Palabras clave: Síndrome de Guillain-Barré. Desmielinización in vitro. Difracción de rayos X.

SUMMARY

We studied the demyelination induced by serum and cerebrospinal fluid from 12 patients with an acute stage of Guillain-Barré syndrome, injected to the right sciatic nerve of Lewis rats. In seven cases the material was stored frozen at -70°C until use, in the other five, it was used immediately after obtained; contralateral sciatic nerve was used as a control. Another group of rats was injected with saline and other with serum from healthy people in order to check the injection "per se" and if the inoculation of normal human serum do not induce myelin damage. Demyelination was demonstrated by the X rays diffraction technique measuring the distance of D repetition between two myelin adjacent lamelas and the percentage of total myelin. There was no variation in nerves injected with saline and serum from healthy people compared to controls, as well as in nerves injected with serum and cerebral spinal fluid of patients with Guillain-Barré syndrome previously frozen. In nerves injected with fresh serum, D value was 173.3 Å in comparison with 171.3 Å from the controls; the percentage of total myelin was 0.51% compared to controls (0.62%). D of nerves injected with fresh cerebrospinal fluid in average was higher (174.3 Å) and the percentage of total myelin was lower (0.54%) than the controls (171.3 Å and 0.62% respectively).

Key words: Guillain-Barré syndrome. Demyelination in vitro. X rays diffraction.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Guillain Barré (SGB), o polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, se caracteriza clínicamente por parálisis flácida de instalación aguda, simétrica, acompañada de arreflexia, aumento de proteínas en el líquido céfalo-raquídeo (LCR) y disminución de la velocidad de conducción nerviosa.

Su etiología no está totalmente aclarada, pero hay evidencias que sugieren que la desmielinización de los nervios es mediada inmunológicamente. Se ha encontrado elevación de los anticuerpos contra la mielina de los nervios periféricos entre la primera a tercera semana del inicio de los síntomas (1); el efecto beneficioso de la plasmaféresis y de la inmunoglobulina G intravenosa (2), y la demostración del efecto desmielinizante *in vitro* del suero de pacientes en fases iniciales de la enfermedad (3,5).

En este trabajo nos proponemos comprobar el poder desmielinizante, no sólo del suero, sino también del LCR provenientes de pacientes con diagnóstico de SGB, mediante la técnica de difracción de rayos X para poner de manifiesto la alteración estructural de la mielina, según los algoritmos matemáticos diseñados por Luzzati y Mateu (6), método que permite el estudio del nervio sin tratamientos previos, tales como fijación, deshidratación y tinción, que son usados en las técnicas histológicas, al tiempo que permiten detectar diferentes estados estructurales, y obtener información promedio, mientras que la microscopía óptica y electrónica sólo permiten observar una sección transversal del nervio, en un determinado estado estructural.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo suero y líquido céfalo-raquídeo de doce pacientes con síndrome de Guillain-Barré diagnosticado según los criterios establecidos por Asbury y col. (7), tomados durante la primera semana del inicio de los síntomas. En siete casos el material obtenido se congeló a 70°C hasta su uso; en los otros cinco el material se utilizó en fresco. Además se obtuvo suero de 10 controles sanos.

Como animal de experimentación se usaron ratas Lewis género mutante consanguíneo que desarrollan neuritis alérgica experimental (NAE) con facilidad (8), con peso de 200 a 300 g y de un mes aproxi-

madamente de vida, distribuidas en los siguientes grupos:

Grupo I. Doce ratas inyectadas con solución salina, sacrificadas a los 1, 3, 5 y 7 días luego de inyección, con extracción del nervio ciático para su estudio por difracción de rayos X. Este grupo es para demostrar que la introducción de la aguja en el nervio sólo causa daño local por el pinchazo, sin modificar la estructura de la mielina.

Grupo II. Diez ratas inyectadas con suero de personas sanas, estudiadas a los 5 y 10 días después de inoculación, para demostrar que el material biológico "*per se*" no provoca daño estructural de mielina.

Grupo III. Catorce ratas inyectadas con suero congelado de pacientes con SGB, examinadas siete días después de la inyección.

Grupo IV. Doce ratas inyectadas con líquido céfalo-raquídeo congelado de pacientes con SGB, observadas a los siete días de inyección.

Grupo V. Cinco ratas inyectadas con suero fresco, estudiadas a los cinco días.

Grupo VI. Cinco ratas inyectadas con LCR en fresco, observadas 7 días después.

El procedimiento para la inyección endoneural del nervio ciático en cada grupo de ratas fue el siguiente:

1. Anestesia con tiopental sódico vía intraperitoneal, dosis de acuerdo al peso.
2. Disección del muslo derecho hasta visualizar el nervio ciático en un campo de unos dos centímetros de longitud.
3. Inyección intraneural de 50 microlitros del material correspondiente al grupo, con aguja de precisión N° 30, en sentido disto-proximal, marcando el sitio de la inyección con tinta china.
4. Sutura de la incisión.

Una vez transcurrido el período de observación para cada grupo, se sacrificaron las ratas y se extrajeron el nervio ciático inyectado (lado derecho) y el contralateral que se usó como control. Se colocó el nervio en una lámina porta-nervio, irrigado con solución de Ringer a pH 7 para evitar la desecación. Cada nervio fue sometido al proceso de

difracción de rayos X en la cámara de difracción marca ELLIOT del Laboratorio de Estructura Molecular, Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Se almacenaron los datos, y posteriormente se procesó esta información mediante los algoritmos matemáticos diseñados por Luzzati y Mateu (6) que proveen información estructural sobre el arreglo periódico de la mielina.

Para este trabajo se consideraron los siguientes parámetros: distancia de repetición D, es la distancia de separación entre dos lamelas contiguas de la capa mielina, expresada en unidades Amstrong (\AA), a mayor valor, mayor desarreglo; sigma de D: es el promedio de todas las distancias de repetición; alfa myel o mielina total: es el porcentaje de mielinización y de orden en una estructura de mielina. A mayor valor mayor desorden o daño.

Todos estos parámetros miden el grado de orden-desorden de la mielina.

RESULTADOS

Los nervios inyectados con solución salina no mostraron variaciones importantes en el valor promedio de D, ni en el porcentaje de la mielina total en relación a los controles (Cuadro 1), lo que demuestra que la introducción de la aguja no induce daño de la mielina, excepto el efecto local.

En el Cuadro 2 vemos el valor promedio de D y el porcentaje de mielina total de las ratas inyectadas con suero de personas sanas; en este grupo tampoco notamos cambios significativos de los valores considerados, demostrando que la inoculación del material biológico normal no altera la mielina.

Cuadro 1

Grupo 1. Ratas inyectadas con solución salina: valores de D y porcentaje de mielina total

Grupo	Nº ratas	Promedio D	% mielina total
I	12	178,5 \AA	0,69%
Control	26	178,2 \AA	0,69%

Cuadro 2

Grupo II. Ratas inyectadas con suero de personas sanas: valores de D y porcentaje de mielina total

Grupo	Nº ratas	Promedio D	% miel. total
II	10	177,7 \AA	0,67%
Control	20	178,10 \AA	0,69%

Al analizar los valores de D y del porcentaje de la mielina total en los nervios inyectados con suero congelado de pacientes con SGB (Cuadro 3), y con LCR también previamente congelado (Cuadro 4), no hubo diferencias importantes al compararlos con los valores de los controles.

Cuadro 3

Grupo III. Ratas inyectadas con suero congelado de pacientes con SGB: valores de D y porcentaje de mielina total

Identificación	Nº ratas	Promedio D (\AA)	Miel. total %
Control	14	176,1	0,69
FZ	2	177,8	0,69
CM	2	177,4	0,66
LV	2	177,7	0,68
OD	2	177,6	0,73
FM	2	176,7	0,66
MB	2	176,8	0,67
WI	2	177,6	0,67
Promedio		177,3 \AA	0,69%

Cuadro 4

Grupo IV. Ratas inyectadas con LCR congelado de pacientes con SGB. Valores D y porcentaje de mielina total

Identificación	Nº ratas	Promedio D (\AA)	Miel total %
Control	12	176,1	0,69
FZ	2	176,6	0,68
CM	2	175,9	0,72
LV	2	176,9	0,66
OD	2	178,9	0,65
FM	2	174,4	0,71
MB	2	175,0	0,66
WI	2	176,8	0,69
Promedio		176,3 \AA	0,67%

El valor promedio de D en los nervios inyectados con suero en fresco de pacientes con SGB evidencia un aumento discreto en relación a los controles (173,3 y 171,3 Å, respectivamente). El mayor valor se obtuvo en el paciente CS (174,6 Å) quien tuvo el cuadro clínico más severo. Se observó una disminución marcada del valor promedio del porcentaje de mielina total (0,51%) en comparación a 0,62% de los controles, que fue igualmente más evidente en el paciente CS (0,43%) (Cuadro 5).

Cuadro 5

Grupo V. Ratas inyectadas con suero fresco de pacientes con SGB. Valores de D y porcentaje de mielina total

Identificación	Nº ratas	Promedio D (Å)	Miel. total %
Control	5	171,3	0,62
GB	1	172,3	0,45
CS	1	174,6	0,43
CB	1	173,4	0,60
LV	1	173,2	0,50
JR	1	173,0	0,58
Promedio		173,3 Å	0,51%

El valor promedio de D en los nervios de las ratas inyectadas con LCR en fresco, se encontró aumentado (174,3 Å) comparado con los controles (171,3 Å). De igual manera, hay disminución de la mielina total, 0,54% en el grupo experimental y 0,62% en el grupo control. Estos cambios fueron más notorios en el paciente CS (Cuadro 6).

Cuadro 6

Grupo VI. Ratas inyectadas con LCR en fresco de pacientes con SGB. Valores de D y porcentaje de mielina total

Identificación	Nº ratas	Promedio D (Å)	Miel. total %
Control	5	171,3	0,62
GB	1	173,7	0,48
CS	1	176,8	0,48
CB	1	174,8	0,54
LV	1	173,5	0,57
JR	1	172,7	0,63
Promedio		174,3 Å	0,54%

DISCUSIÓN

El efecto desmielinizante del suero de pacientes con síndrome de Guillain-Barré, tomado en la fase aguda, cuando se inyecta en nervio ciático de ratas, ha sido demostrado por varios autores, lo que se ha atribuido a la presencia de anticuerpos contra la mielina de los nervios periféricos.

Harrison y col. (3), encontraron evidencias electrofisiológicas e histológicas, en nervio ciático de ratas Wistar, de desmielinización inducida por suero de pacientes con SGB en fase aguda, que se produjo sólo con el material en fresco y no con el almacenado congelado.

Saida y col. (4) observaron que la inyección endoneural de suero más complemento, de pacientes con SGB indujo desmielinización en 11 de 27 casos (41%), resultados significativamente mayores que en los controles. En este estudio los nervios fueron examinados con microscopio óptico y electrónico.

Sawan-Mate y col. (5), estudiaron la actividad desmielinizante del suero de 7 pacientes con SGB con títulos altos de anticuerpos contra la mielina de los nervios periféricos, comparándola con el suero de pacientes en fase de recuperación y controles sanos, en cultivo de ganglios de la raíz dorsal de roedores. Todos los sueros de pacientes en fase aguda indujeron desmielinización que se correlacionó con los niveles de anticuerpos y era dependiente del complemento. En un trabajo posterior, se demostró además, que el suero de algunos pacientes produce citólisis de las células de Schwann (9).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en estos trabajos; ponen en evidencia la actividad desmielinizante, no sólo del suero en fresco de pacientes con SGB en fase aguda, sino también del LCR, cuando se inyecta en nervio ciático de ratas Lewis, mientras que el material almacenado congelado no demostró mayor actividad desmielinizante que la solución salina y el suero de individuos sanos. En este trabajo se constató la alteración de la mielina por medio de la técnica de difracción de rayos X, que a diferencia de las técnicas histológicas, no requiere de tratamiento previo del material; asimismo, permite detectar diferentes estados estructurales de la mielina y obtener información promedio en un tiempo corto, mientras que por microscopía sólo se obtiene información de una sección transversal del nervio.

En los nervios inyectados con suero y LCR en fresco, proveniente de pacientes con SGB, se encontraron evidencias de desmielinización, expresada por el aumento de la distancia de repetición D y por la disminución del porcentaje de la mielina total. Estos resultados ponen de manifiesto la validez y utilidad de los algoritmos matemáticos para la determinación de los parámetros de desmielinización y para la interpretación de la estructura molecular de la mielina. Aunque el número de pacientes es bajo, parece existir una correlación entre la severidad de la enfermedad y los cambios detectados en la mielina por la difracción de rayos X, puesto que, en los pacientes clínicamente más afectados, se encontró el mayor grado de desorden y de disminución del porcentaje de la mielina total.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que, tanto el suero como el LCR de pacientes con SGB en fase aguda y cuando se inoculan en fresco, tienen actividad desmielinizante que parece correlacionarse con la severidad de la enfermedad, así como la utilidad de la difracción de rayos X como método para evaluar estos estados de desmielinización.

REFERENCIAS

1. Kosky CL, Gratz E, Sutherland F, Mayer R. Clinical correlation with anti-peripheral nerve myelin antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1986;19(6):573-577.
2. Raphael JC, Chevret S, Jars-Guinestre MC, Chastang C, Gajdos P. Syndrome de Guillain-Barré: Indications respectives des échanges plasmatiques et des immunoglobulines. *Ann Med Interne* 1993;144(8):526-531.
3. Harrinson BM, Hansen LA, Pollard JD, Mcleod JG. Demyelination induced by serum from patients with Guillain-Barré Syndrome. *Ann Neurol* 1984;15:163-170.
4. Saida T, Saida K, Lisak R, Brown M, Silberberg DH, Asbury AK. In vivo demyelinating activity of sera from patients with Guillain-Barré Syndrome. *Ann Neurol* 1982;11:69-75.
5. Sawant-Mane S, Clark MB, Kosky CL. In vitro demyelination by serum antibody from patients with Guillain-Barré Syndrome requires terminal complement complexes. *Ann Neurol* 1991;29:397-404.
6. Luzzati V, Mateu L. Order-disorder phenomena in myelinated nerve sheaths. I: a physical model and its parametrization. Exact and approximate determination of the parameters. *J Mol Biol* 1990;215:373-384.
7. Asbury A, Arnason B, Karp H, MacFarlen DE. Criteria for diagnosis of Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1978;3:565-566.
8. Vonasek EM, Morán O, Mateu L. An X-ray diffraction study of changes in myelin structure during experimental allergic neuritis. *J Neurocyt* 1987;16:105-114.
9. Sawant-Mane S, Estep III A, Kosky EL. Antibody of patients with Guillain-Barré Syndrome mediates complement-dependent cytolysis of rat Schwann cells: susceptibility to cytolysis reflects Schwann cells phenotype. *J Neuroimmunol* 1994;49:145-152.

Dra. Maritza Cotua S. Servicio de Neurología. 4° piso. Hospital Universitario de Caracas, Venezuela.