

112442

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA  
IGNACIO CHAVEZ**

**D-PENICILAMINA E INDUCCION DE AUTOANTIGUERPOS  
EN ARTRITIS REUMATOIDE**



Director de Tesis:

**DR. PEDRO A. REYES LOPEZ**



Director del Curso:

**DR. MANUEL MARTINEZ LAVIN**

Jefe de Enseñanza:

**DR. IGNACIO CHAVEZ RIVERA**



**T E S I S R E C E P C I O N A L  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA  
P R E S E N T A L A D R A .  
MARIA DEL CARMEN AMIGO CASTAÑEDA**

MEXICO, D.F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**2002**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A la memoria de un hombre llamado  
Jorge, quien fue mi padre.

A mi madre, de quien aprendí  
el valor y la entrega, con  
profundo cariño.

A mis dos ilusiones, mis hijos  
Mary Carmen y Luis, queriendo  
compartir hoy y siempre con  
ustedes mis pequeños y grandes  
logros.

A mis hermanos, Jorge, Cristina, Javier y Fernando, por su cariño incondicional, como voto de unión entre nosotros.

A la memoria del Dr. Aurelio Gutiérrez Moyano, por el privilegio que fue para mí conocerle.

A los doctores Javier Robles Gil, Pedro A. Reyes López y Manuel Martínez Lavín con profunda gratitud por su amistad y participación en mi formación como especialista.

A mis amigos, por compartir.

A Egle y Geraldina, porque la entrega recíproca me ha enriquecido.

## I N D I C E

### D-Penicilamina e Inducción de Autoanticuerpos en Artritis Reumatoide

	Pág.
I. ARTRITIS REUMATOIDE	
Definición	1
Etiopatogenia	1
Enfoques Terapéuticos	6
II. D-PENICILAMINA	
Estructura	10
Farmacodinamia	11
Efectos Colaterales	13
III. OBJETIVO	16
IV. MATERIAL Y METODOS	17
V. RESULTADOS	22
VI. DISCUSION	24
VII. CONCLUSIONES	28
VIII. BIBLIOGRAFIA	29

## I. ARTRITIS REUMATOIDE (AR)

Es una enfermedad inflamatoria, crónica, sistémica, con afectación articular dominante. Su etiología es desconocida, pero son notables las alteraciones inmunológicas que incluyen la presencia de autoanticuerpos, mismas que tienen importancia en la patogenia de la inflamación, característica patológica central de la enfermedad.

### Etiopatogenia

Aunque la etiología de la AR es desconocida, se han estudiado factores hereditarios, ambientales y alteraciones inmunológicas del huésped para definir su papel en la etiología de la enfermedad, a todas luces multifactorial.

En relación al ambiente, el factor infeccioso fue el primero estudiado ya que la histopatología de las lesiones sinoviales recuerda superficialmente la de algunas infecciones crónicas y porque en el cerdo, la infección con *Erisipelotrix rhusopathiae* produce una sinovitis crónica remotamente parecida a la AR.

Numerosos estudios fallaron en la demostración de bacterias o protoplastos bacterianos (formas L) en las lesiones articulares o extra-articulares y nunca se cumplieron los postulados de Koch.

Sin embargo, recientemente se ha implicado al virus Epstein-Barr (VEB) en la etiología de la AR, al encontrarse que los enfermos tienen anticuerpos contra antígenos celulares determinados por la infección de linfocitos B con VEB, al encontrar que los linfocitos B infectados pueden producir factor reumatoide y que hay defectos en el control inmunológico de la infección

(2)

en enfermos con AR, pero no hay aún evidencia concluyente de la participación del VEB en la etiología del padecimiento.

Asimismo al encontrar agentes infecciosos parecidos a parvovirus, denominados virus RA I, en tejidos sinovial de pacientes con AR, ha hecho considerarlos potencialmente como agentes etiológicos.

Otros factores no infecciosos, considerados en la etiopatogenia de la AR, incluyen micronutrientes como el Zinc y el Cobre, sin embargo no existen hasta el momento resultados claros.

El factor heredo-familiar fue considerado desde que la observación clínica mostró agregación familiar de la enfermedad o al menos de alteraciones inmunológicas. El estudio del Complejo Mayor de Histocompatibilidad no reveló cambios de importancia en cuanto a antígenos HLA de clase I, pero se encontró que los de clase II D/DR sí tienen significado en la AR. El antígeno D/DR-4 se encuentra en 70% de pacientes y en 20% de sujetos controles. Un individuo que tenga estos antígenos tiene un riesgo relativo de desarrollar AR seis veces mayor que el individuo negativo para estos antígenos. Dado que en el humano el locus D/DR es equivalente al locus I del ratón encargado del control de la respuesta inmune, se considera significativo el hallazgo de esa característica inmunogenética, que es estudiada por diversos grupos en la actualidad.

El sistema inmune del enfermo con AR es anormal. Aunque no se sabe si esto es secundario o primario, sí se conocen defectos en circuitos de inmunoregulación con cambios en las poblaciones de linfocitos T reguladores, tal vez importantes en las manifestaciones autoinmunes de la AR que llegan a tener expresión clínica.

(3)

En suma, si bien no conocemos la etiología de la AR, se conocen factores que juegan un papel relevante en su génesis y es muy probable que todos en grado diferente participen en el desarrollo de esta enfermedad tan compleja. De esta manera es probable que en un individuo predispuesto genéticamente, la exposición a agente(s) infeccioso(s) lo haga susceptible de desarrollar la enfermedad que conocemos como artritis reumatoide.

En esta enfermedad, en la membrana sinovial, que normalmente está formada por tejido conjuntivo y escasas células mononucleares, ocurre infiltración y proliferación celular de células inmunocompetentes, con desarrollo de folículos linfoides funcionantes, con síntesis in situ de inmunoglobulinas, algunas con actividad de autoanticuerpo: antigamaglobulina (factor reumatoide) o antiDNAss o anti nucleoproteína soluble (NPs) (anticuerpos antinucleares).

Se han identificado dos zonas de infiltrado celular en la membrana sinovial de enfermos con artritis reumatoide, utilizando anticuerpos monoclonales "marcadores" de linfocitos cooperadores o supresores/citotóxicos. Una zona perivascular densa, contiene linfocitos T OKT4 (cooperadores), macrófagos y células dendríticas con relativa poca actividad sintética. La otra zona, menos definida en su morfología, presenta un infiltrado compuesto de linfocitos T OKT 5/8 (supresores), macrófagos, células plasmáticas y ocasionalmente organización de folículos germinales. Esta zona produce activamente anticuerpos y células citotóxicas, que migran a las capas superficiales de la membrana sinovial y eventualmente al líquido sinovial.

De modo que en el seno de la membrana sinovial, hay una inflamación crónica con participación inmune y generación de mediadores humorales y celulares de inflamación. Al llegar éstos a la superficie sinovial, se produce exudación en la cavidad articular, la cual no posee drenaje linfático, de tal manera que hay acúmulo progresivo de proteínas y otros mediadores humorales, tanto derivados de la circulación como por síntesis local. Entre los elementos más conspicuos en este exudado se encuentran los autoanticuerpos FR y AAN, que encuentran abundante cantidad de antígenos por la lesión tisular evolutiva, generándose complejos antígeno-anticuerpo de diferente tamaño y con capacidad inflamatoria a través de interacción con sistemas amplificadores. Por otro lado, aún en ausencia de tales mediadores, el complejo inmune puede, a través del fragmento Fc de IgG, unirse a receptores específicos presentes en la membrana de células flagógenas citotóxicas, como macrófagos, sinoviocitos A, células asesinas naturales y leucocitos polimorfonucleares; además que algunos de ellos responden también a fragmentos de componentes del complemento y de fibrinógeno, con activación, movilización y extrusión del contenido lisosomal.

Las células inflamatorias se activan ante el contacto de receptores específicos en su membrana para diferentes agentes biológicos, derivados de los sistemas amplificadores y del tejido mismo lesionado. A nivel de membrana celular, hay varios sistemas enzimáticos que metabolizan ácidos grasos esenciales, nucleótidos cíclicos y generan radicales oxidantes. El ácido araquidónico, un ácido graso no saturado, de 20 carbonos, derivado del ácido linoleico dietético, es liberado de su enlace éster de fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa y es metabolizado por ciclo-oxigenasa hacia prostaglandinas y tromboxanos o por la lipo-oxigenasa hacia hidroxiácidos y leucotrienos. Estos eicosanoides tienen efectos muy variados en permeabilidad vascular, quimiotaxis y activación celular. Los

nucleótidos cíclicos son derivados de la acción de adenil y guanil ciclasas, enzimas de la membrana celular y son importantes en reacciones de fosforilación de componentes celulares como microtúbulos y microfilamentos que participan en la movilización de gránulos intracitoplásmicos y de la célula in toto y por consecuencia en fenómenos inflamatorios.

La activación celular se acompaña de cambios energéticos-metabólicos y generación de radicales oxigenados reactivos (-O<sub>2</sub>, O<sub>1</sub>, OH, COO-) que tienen capacidad de establecer enlaces químicos con distintos componentes celulares y modificar profundamente la función e incluso la estructura de los componentes tisulares, siendo por tanto importantes en la inflamación.

La progresión clínica de la enfermedad es la consecuencia natural de este proceso inflamatorio de la membrana sinovial. La proliferación de pannus sinovial y la inflamación crónica de los tejidos articulares, conducen a erosiones del hueso y tendones adyacentes. El dolor de las articulaciones reduce el grado de movilidad y el resultado final frecuentemente es la contractura en flexión, subluxación e inestabilidad articular con la consiguiente limitación funcional.

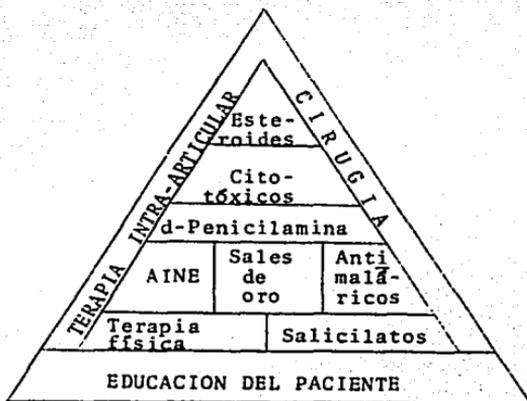
La AR generalmente es una enfermedad crónica y progresiva, sin embargo pueden presentarse períodos prolongados de remisión.

Durante los períodos activos, que tienen duración variable, ocurre cierto grado de daño irreparable y por esto la magnitud de la destrucción articular está íntimamente ligada a la duración de los períodos de actividad. El control de la inflamación probablemente reduce el grado de destrucción articular y por tanto, es aquí, donde el tratamiento adquiere importancia fundamental, en tanto no podamos influir en las causas primeras del padecimiento.

Enfoques terapéuticos

El tratamiento adecuado de la AR tiene por objeto conservar y/o rehabilitar el estado funcional del paciente para que viva en armonía con el medio ambiente. Está implícito el alivio del dolor y la preservación de la función articular. Trasladar estos objetivos a cada paciente en forma individual es la meta de la reumatología clínica.

Las medidas generales que se deben tomar en cuenta son el reposo, la fisioterapia y la rehabilitación. Se ha empleado esta representación gráfica (figura) para mostrar las modalidades terapéuticas que se utilizan en el tratamiento de la AR.



En esta presentación me referiré en forma sucinta al tratamiento de la AR. No mencionaré el tratamiento quirúrgico de la misma y sólo brevemente comentaré las modalidades del tratamiento médico, excepción hecha del tratamiento con D-Penicilamina, motivo de este estudio.

### Tratamiento médico

En forma general se consideran dos grupos de medicamentos en el tratamiento de la AR. Uno está formado por agentes anti-inflamatorios que no tienen acción sobre la(s) causa(s) de la enfermedad. En este grupo se encuentran los salicilatos y los anti-inflamatorios no esteroideos así como los corticosteroides, drogas que no son curativas, cuyo modo de acción sólo es parcialmente conocido y que en ocasiones tienen efectos indeseados.

Se ha intentado evitar esa situación buscando drogas alternativas y así el otro grupo comprende agentes con mecanismos de acción menos conocidos, también con efectos indeseados, pero que son capaces de inducir remisión de la enfermedad y no sólo controlar la inflamación. Se consideran aquí cloroquina, sales de oro y D-Penicilamina.

Los salicilatos son la piedra angular del tratamiento médico de la AR. Su acción anti-inflamatoria se lleva a cabo al bloquear la síntesis de prostaglandinas, mediante la inhibición de la ciclo-oxigenasa.

Los anti-inflamatorios no esteroideos al igual que los salicilatos, bloquean la síntesis de prostaglandinas y quizás actúen a otros niveles del complejo proceso de la inflamación. Parecen ser menos efectivos pero mejor tolerados que la aspirina

y su forma de administración es más fácil. Posiblemente sean más seguros que los salicilatos, exceptuando a la fenilbutazona y oxifenbutazona.

Los corticoesteroides inhiben liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana celular, por inducción de una lipomodulina, como resultado de sus efectos sobre la transcripción de la información genética. A pesar de la supresión de la inflamación y de la mejoría sintomática con el empleo de los corticoides sistémicos, no existe evidencia de que detengan la progresión de la enfermedad. Además, los efectos indeseables conocidos, hacen que en términos generales no se aconseje su uso en una enfermedad crónica como la artritis reumatoide.

Por otra parte, el uso juicioso de corticoides intra-articulares es una valiosa ayuda dentro del tratamiento de la enfermedad.

Entre los agentes capaces de inducir remisión, estudios controlados confirman la eficacia de la cloroquina e hidroxicloroquina en el tratamiento de la AR. Su mecanismo de acción es desconocido y su empleo se ve limitado por sus efectos tóxicos potenciales.

En 1980, Koch reportó la inhibición del bacilo tuberculoso por sales de oro. Desde entonces, basados en la hipótesis de que el oro poseía efectos anti-microbianos, fue utilizado en diversos procesos infecciosos y por esto Forestier pensando que la etiología de la AR era infecciosa, inició su empleo en la AR, con resultados favorables. Su mecanismo de acción aún se desconoce. Tiene efectos tóxicos principalmente en piel, médula ósea y riñón. En la actualidad su uso queda restringido a pacientes con AR poliarticular seria, que no es controlada

(9)

con medicamentos anti-inflamatorios, así como algunos casos de artritis crónica juvenil, artritis psoriática y excepcionalmente en casos severos de reumatismo palindrómico. También puede ser una alternativa terapéutica en pénfigo.

## II. D-PENICILAMINA

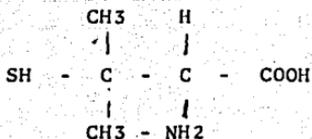
Se ha utilizado en el tratamiento de diversas condiciones clínicas. Por sus propiedades quelantes Walshe inicialmente la utilizó en la enfermedad de Wilson y posteriormente se usó en la intoxicación por plomo y mercurio. Es la base del tratamiento de la cistinuria porque forma un disulfuro soluble con cisteína.

En 1963, Jaffe introdujo su uso en la artritis reumatoide.

### Estructura

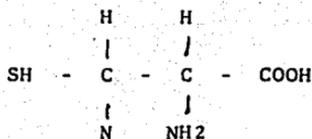
La D-Penicilamina es la  $\alpha, \beta$  - dimetil-cisteína. Su estructura química se muestra en la siguiente figura (a). Es un análogo estructural del amino-ácido cisteína, en donde grupos metilo reemplazan a los H en el carbón en posición beta (b).

Figura A



Penicilamina

b



Cisteína

La D-Penicilamina es componente de la molécula de Penicilina y puede obtenerse a partir de ésta mediante degradación hidrolítica o bien se obtiene en forma sintética. Sin embargo,

la molécula madre no posee los efectos farmacológicos de la D-Penicilamina, limitados a la forma dextrógira de la droga.

Se absorbe bien en el tracto gastro-intestinal. Se excreta rápidamente por la orina. Es relativamente estable in vivo, porque contrariamente a la cistina, es en parte resistente al ataque por disulfidasas u oxidasas.

Se han demostrado en el humano 3 propiedades bioquímicas mayores con el uso de la D-Penicilamina:

1. Acción reductora de sulhdrilos.
2. Acción quelante.
3. Antagonismo con piridoxina y acción latirogénica.

Acción reductora de sulhdrilos:

Por tener esta acción, Jaffe la introdujo en el tratamiento de la AR, intentando reducir el nivel de factor reumatoide sérico.

La capacidad para disociar complejos inmunitarios in vitro, con o sin factor reumatoide, justifica aún su empleo en AR, ya que está demostrado el papel patogénico de los complejos inmunitarios in situ.

Acción quelante:

La inflamación reumatoide se acompaña de actividad enzimática de colagenasa y diversas proteasas, metaloenzimas dependientes de cobre. Por otro lado, en la membrana sinovial hay un aumento de los depósitos de hierro y es conocido que los enfermos tienen una anemia hipocrómica por defecto en la utilización de hierro.

La D-Penicilamina es un agente quelante y puede remover cobre. Se han observado niveles elevados de cobre sérico en pacientes con AR y la administración de esta droga produce un aumento en la excreción urinaria de cobre. No se conoce con precisión el significado de esos hallazgos.

Se ha observado también, en casos de AR en tratamiento con D-Penicilamina, un aumento de la hemoglobina y se atribuye a la movilización de hierro desde el sistema monocito-macrófago incluyendo la membrana sinovial y su utilización por la médula ósea.

#### Antagonismo con piridoxina:

La D-Penicilamina y el fosfato de piridoxal forman un compuesto nuevo, la tiazolidina que es antagonista de la acción de coenzima de la vitamina B6 esencial en la producción de energía metabólica en el ciclo de Krebs a partir de grasas y carbohidratos. Aunque no se conoce la razón, los animales deficientes en vitamina B6 tienen defectos inmunológicos. Sin embargo, no se conoce este efecto en humanos y ni los suplementos de vitamina B6 ni las antivitaminas B6 modifican sensiblemente la respuesta inmune.

#### Latirogénesis:

Los grupos aldehído de la molécula de colágena reaccionan con D-Penicilamina formando tiazolidina, esta reacción inhibe el entrecruzamiento de las fibras estructurales de la molécula de colágena "madura". Este efecto, notable sobre todo en colágena cutánea (tipo I) dió base al uso terapéutico de la D-Penicilamina en la esclerosis sistémica progresiva.

**Efectos colaterales:**

El empleo de la D-Penicilamina se ve limitado por la alta incidencia de efectos adversos y reacciones tóxicas, algunas de las cuales parecen ser debidas a mecanismos inmunológicos.

Los principales efectos adversos de la D-Penicilamina se encuentran en la tabla.

**Efectos adversos de la D-Penicilamina****Hematológicos**

Leucopenia  
Trombocitopenia

**Renales**

Proteinuria  
Hematuria  
Síndrome nefrótico

**Cutáneas**

Prurito  
Rash  
Mococutáneas

**Síndromes autoinmunes**

Pénfigo  
Goodpasture  
Miastemia Gravis  
Polimiositis  
LES  
Bronquiolititis obliterativa

**Varios**

Estomatitis  
Hipogeusia  
Gigantismo mamario  
Fiebre

Dentro de los efectos adversos de la D-Penicilamina, quizá los más frecuentes son las lesiones cutáneas y muco-cutáneas, que son variables en cuanto a tipo y patogénesis pero que generalmente desaparecen al reducir la dosis, emplear anti-histamínicos o al suspender temporalmente la droga.

En ocasiones, la toxicidad cutánea por D-Penicilamina es más seria, siendo capaz de producir reacciones vesico-bulosas incluyendo pénfigo.

El primer informe de pénfigo inducido por D-Penicilamina fue en un paciente con enfermedad de Wilson. La mayoría de los reportes subsecuentes han sido en pacientes con AR. Esto quizá refleje únicamente el empleo frecuente de la D-Penicilamina en esta enfermedad tan común.

Se han descrito pénfigo vulgar, foliáceo y eritematoso en relación a D-Penicilamina. Clínicamente las lesiones no difieren del pénfigo clásico y se dice que todo paciente que desarrolle bulas cutáneas mientras recibe D-Penicilamina, se debe considerar que tiene pénfigo hasta no demostrar lo contrario.

Aunque las úlceras orales sin lesiones cutáneas son un efecto adverso de la D-Penicilamina, la mayoría de casos de enfermedad bulosa inducida por D-Penicilamina, no están asociados con lesiones erosivas orales.

La biopsia de las bulas cutáneas muestra acantolisis intraepidérmica con depósitos intercelulares de inmunoglobulinas. La inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos contra la sustancia intercelular epitelial es positiva hasta en 70 por ciento de los casos en algunas series.

Ocasionalmente los hallazgos son de pénfigoide buloso con depósito de inmunoglobulinas en la unión dermoepidérmica y presencia de anticuerpo circulante contra la membrana basal.

En términos generales, al discontinuar la D-Penicilamina, disminuyen los títulos de anticuerpos, asociado esto con resolución clínica de las lesiones. Sin embargo, algunos pacientes requieren el empleo de esteroides y drogas inmunosupresoras.

(15)

El potencial de la D-Penicilamina como inductora de respues  
ta auto-inmune cutánea y a otros niveles, justificó este tra-  
bajo.

### III. OBJETIVO

Determinar si estudios in vitro usando técnicas de inmunofluorescencia indirecta de gran sensibilidad, tienen valor pronóstico o utilidad en el diagnóstico temprano de lesiones cutáneas vesico-bulosas.

Además se estudió la inducción de otros auto anticuerpos para conocer si la droga tiene alguna selectividad en sus efectos.

## IV. MATERIAL Y METODOS

## Pacientes:

Se colectaron 33 casos de pacientes de la consulta de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología con diagnóstico de artritis reumatoide clásica o definida y artritis reumatoide juvenil poliarticular, de acuerdo a los criterios de la American Rheumatism Association.

Fueron 29 mujeres y 4 hombres, con un rango de edad de 20 a 61 años (promedio 41 años).

Se consideraron la clase anatómica y la clase funcional de cada paciente de acuerdo a las respectivas clasificaciones de Steinbrocker. (Tabla I).

Tabla I  
CARACTERISTICAS DE LOS CASOS

Número de casos:	33				
Diagnóstico:	A.R.*: 29 (Clásica: 25 Definida: 4)				
	A.R.J.*: 4 Poliarticular				
Clase anatómica:	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>	<u>Total</u>
Número de casos:	17	11	5	0	33
Clase funcional:					
Número de casos:	3	13	16	1	33
Sexo:	29 Femenino - 4 Masculino. Relación 7:1				
Edad:	20-61 años. Promedio 41 años.				

\* Seropositivos (F.R.)

Veinte pacientes recibían D-Penicilamina (grupo experimental). Once pacientes estaban en crisoterapia (grupo control) y dos pacientes recibían anti-inflamatorios no esteroideos (grupo control).

**Determinación de autoanticuerpos:**

Se obtuvo sangre venosa y se separó el suero manteniéndolo congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio.

La búsqueda de autoanticuerpos contra músculo liso, cel. parietal, mitocondrias y sustancia intercelular epitelial se hizo por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando como sustratos tejidos de mamífero (rata Wistar, 200 g, peso promedio). Después del sacrificio del animal, se evisceró y se tomaron muestras de hígado, riñón, lengua y estómago que se incluyeron en OCT y se congelaron en nitrógeno líquido. (Tabla II).

Tabla II  
INVESTIGACION DE ANTICUERPOS  
Métodos

<u>ANTICUERPO</u>	<u>METODO</u>
1. Antinucleares	IFI - Hígado de rata
2. A músculo liso	IFI - Mucosa gástrica de rata
3. A. cel. parietal	IFI - Mucosa gástrica de rata
4. A mitocondrias	IFI - Riñón de rata
5. A sust. intercelular	IFI - Lengua de rata
6. A membrana basal	IFI - Lengua de rata
7. Anti-DNA <sub>n</sub>	IFI - C. lucilae
8. Anti-Sm, RNP-n, SS-B	CIE - Extracto salino de IDD núcleos

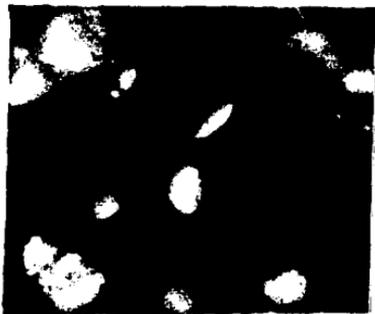
Posteriormente se hicieron cortes de cuatro  $\mu$  en el criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aplicando cada uno de los tejidos a una lámina porta-objetos tratada con metasilicato de sodio al 2.5%.

**Inmunofluorescencia indirecta:**

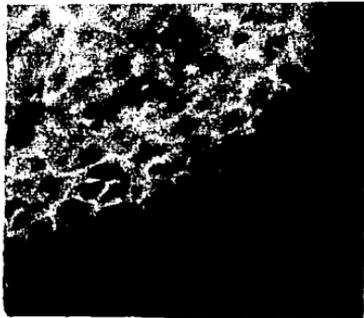
Las láminas se fijaron en acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se cubrieron con suero del paciente diluido 1/10 en solución salina amortiguada con fosfato pH 7.2 y se incubaron en cámara húmeda durante 30 minutos. Se procedió entonces al lavado con agitación mecánica y se añadió una preparación de anticuerpo anti IgG humana monoespecífica preparada en chivo y conjugada a isotiocianato de fluoresceína. La relación F/P es de 2.5. Se incubó nuevamente durante 30 minutos, se lavó y cubrió con una solución alcalina de glicerol.

Estas preparaciones se examinaron en un microscopio Zeiss equipado con un sistema de epifluorescencia (Plüem).

Un ejemplo de los resultados positivos se muestra en las siguientes fotografías:



Anticuerpos antinucleares  
IFI. Hígado de rata.



Anticuerpos contra sustancia  
intercelular IFI. Lengua de  
rata.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En cada examen se incluyeron controles positivos y negativos.

#### Anticuerpos anti-DNA nativo:

Se investigaron usando la técnica de IFI descrita por Aarden, que utiliza como sustrato el flagelado *Crithidia Lucilae*, que posee un cinetoplasto formado por DNA circular sin fragmentos monocatenarios. El método es similar al descrito para la determinación de autoanticuerpos por IFI.

#### Anticuerpos contra antígenos nucleares extraíbles:

Se preparó un extracto de timo de conejo de acuerdo a métodos previamente descritos. En breve, se colocó el extracto de timo en polvo y se añadió solución salina amortiguada con  $\text{Po}_4$  agitando a  $4^\circ\text{C}$  durante cuatro horas, se centrifugó a  $10\text{ K}$  a  $4^\circ\text{C}$  y se tomó el sobrenadante. La concentración proteica se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Lowry y la actividad antigénica usando inmunodifusión doble contra un suero prototipo. El extracto de timo de conejo contiene  $10\text{ mg/ml}$  y antígenos Sm, RNP y SS-B.

La búsqueda de anticuerpos en el suero de pacientes con AR se llevó a cabo en dos fases: a) contra inmunolectroforesis (CIE) de acuerdo al método descrito por Kurata incluyendo siempre un control positivo, b) los sueros que fueron positivos en CIE se estudiaron por inmunodifusión doble para lograr la identificación del (los) sistema(s) Ag-Ac.

Un una placa de agarosa  $0.4\%$  en solución salina amortiguada con  $\text{Po}_4$  pH 7.3, se cortaron 7 pozos de  $3\text{ mm}$ , a  $4\text{ mm}$  de distancia, uno central y 6 periféricos. En los pozos 1 y 4 se depositó suero prototipo Sm, RNPn y SS-B, en los pozos restantes suero problema sin diluir y en diluciones progresivas.

(21)

Se incubó a temperatura ambiente y se leyeron líneas de precipitación a las 24 y 72 horas, lecturas que se repitieron después de lavar con citrato de sodio 0.17 M para evitar precipitación no específica Ca dependiente.

Los sueros que mostraron identidad inmunológica con el prototipo, se identificaron de acuerdo a la especificidad de éste.

## V. RESULTADOS

Tabla III  
R E S U L T A D O S

<u>Autoanticuerpos</u>	<u>No. pos/No.est.</u>	<u>1</u>	
Antinucleares	17/33	52	Titulos 1/10(6), 1/40(8), 1/160(3). Patrón homogéneo; fi- brilar, nucleolar
Anti DNA nativo	0/13	0	
Anti-antígenos nuclea- res extraíbles	7/30	23	Anticuerpo positivo en CIE, no identificable en IDD
Anti-músculo liso	1/33	3	
Anti-célula parietal	6/33	18	
Anti-mitochondrias	1/33	3	
Anti-sust. intercelular	2/33	6	En Tx. con D-Penicila- mina
Anti-membrana basal	0/33	0	

Nuestros resultados mostraron que 52% de pacientes presentaron AAN a títulos de 1/10, 1/40 y 1/160, con patrón homogéneo, fibrilar y nucleolar. En la literatura se reportan en un porcentaje que varía del 10 al 70% de pacientes con AR dependiendo del sustrato utilizado y de los títulos que se consideren positivos.

Como era de esperarse en ningún caso se encontró anticuerpo contra DNA nativo.

En 23% de casos encontramos Ac. contra antígenos extraíbles del núcleo mediante CIE un método sensible, pero al efectuar inmunodifusión doble (IDD), ninguno de los casos fue positivo. Si consideramos que la sensibilidad de la CIE es aproximadamente cien veces mayor que la de la IDD, se explica que en la pri-

mera se reconozcan cantidades menores de anticuerpo que no se detectan con la segunda prueba. De hecho, la frecuencia de anticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo ha sido muy baja en diferentes estudios. En la literatura se reporta en un solo estudio, el Ac. contra RNPn en 10% y el Ac. contra SS-B en 1.7% de pacientes con AR.

Los anticuerpos contra músculo liso y contra mitocondrias, se encuentran en porcentaje muy bajo, lo que está de acuerdo con lo encontrado por otros autores y esto refuerza que sean marcadores inmunológicos de hepatopatías crónicas.

En contraste, el 18% de nuestros pacientes tuvieron Ac. contra las células parietales de la mucosa gástrica. Con esta técnica pueden encontrarse hasta en 16% de sujetos sanos mayores de 60 años y la mayoría de los pacientes se encontraba más allá de la quinta década de la vida y ninguno tenía evidencia clínica de padecer alguna de las condiciones a las que se asocia este Ac. como son anemia perniciosa, tiroiditis crónica, gastritis atrófica o úlcera gástrica, aunque en este estudio no se investigaron intencionalmente.

Dos pacientes presentaron Ac. contra la sustancia intercelular epitelial. Los dos se encontraban bajo tratamiento con D-Penicilamina y habían tenido antecedente de reacción cutáneo-mucosa. No fue posible continuar su estudio pues por falta de recursos económicos suspendieron el tratamiento.

## VI. DISCUSION

La introducción de nuevos medicamentos en el tratamiento de la artritis reumatoide es un hecho frecuente, dado que no se conoce la etiología de la enfermedad y el tratamiento actual es empírico.

En 1963, Jaffe introdujo el empleo de la D-Penicilamina en AR para tratar las manifestaciones extra-articulares y más adelante se observó que la droga era útil en AR que no se controlaba con el tratamiento básico con anti-inflamatorios y se usó como droga inductora de remisión.

Como sucede frecuentemente, la introducción de un nuevo medicamento en la terapéutica se acompaña de una fase de optimismo y sólo al irse acumulando experiencia con el uso del medicamento, se van conociendo los efectos indeseables del mismo.

Así, la D-Penicilamina ha sido relacionada con el desarrollo de síndromes autoinmunes, dentro de los cuales se encuentra el pénfigo, enfermedad vesico-bulosa autoinmune que afecta piel y membranas mucosas, en donde hay autoanticuerpos séricos que reaccionan con la sustancia intercelular del epitelio escamoso estratificado pudiendo demostrarse por inmunofluorescencia indirecta.

El papel del anticuerpo en la génesis de la enfermedad vesico-bulosa ha sido controversial pues es cuestionable si este Ac. está directamente relacionado a la enfermedad o es un epifenómeno. Las observaciones recientes sugieren que el Ac. epitelial intercelular es responsable de la génesis de la enfermedad, pudiendo ser por efecto indirecto de activación de enzimas que digieren la sustancia intercelular, ocasionando de esta forma acantolisis y el cuadro clínico e histológico que conocemos como pénfigo.

En el X Congreso Mexicano de Dermatología, Avalos, E. y cols. informaron un estudio prospectivo de doce pacientes con AR bajo tratamiento con D-Penicilamina, en donde 42% presentó biopsia de piel positiva para inmunoreactantes en inmunofluorescencia directa (IFD), así como la presencia de anticuerpos antiepiteliales y solamente dos pacientes tenían lesiones bulosas que desaparecieron al suspender la D-Penicilamina. Concluyeron que la D-Penicilamina es un medicamento potencialmente inductor de pénfigo probablemente a través de la formación de anticuerpos antiepiteliales.

Este trabajo sugirió que la presencia de autoanticuerpos contra epitelio, precede al desarrollo de enfermedad clínica.

Además de esos aspectos pragmáticos, sugirió también que la droga, que tiene efectos latirogénicos en piel, podría de alguna manera inducir un fenómeno autoinmune específico contra antígenos cutáneos. Esta situación, de confirmarse, ofrecería grandes posibilidades en el estudio de enfermedades autoinmunes.

En nuestro servicio, un grupo sustancial de pacientes con AR, reciben tratamiento supresor con D-Penicilamina y aunque la frecuencia de las reacciones indeseables clínicamente detectadas es baja, decidimos investigar mediante un examen simple y rápido, la presencia de autoanticuerpos órgano-específicos en estos pacientes, ante la posibilidad de que las alteraciones serológicas precedan a las manifestaciones clínicas.

Además de investigar la presencia de autoanticuerpos relacionados a lesiones cutáneas como son el anticuerpo contra la sustancia intercelular y el anticuerpo contra la membrana basal, estudiamos la frecuencia de anticuerpos no órgano-específicos, como son la AAN y anticuerpos órgano-específicos no relacionados a lesiones cutáneas, para definir de esta manera, la especificidad de los anticuerpos contra la piel, si estos existieran.

Al estudiar veinte pacientes con AR bajo tratamiento con D-Penicilamina, nuestros resultados mostraron:

1) que no tiene valor clínico la investigación de autoanticuerpos circulantes en enfermos que reciben D-Penicilamina, puesto que la frecuencia con que se observan estos anticuerpos, no es en modo alguno distinta a la esperada por azar en un grupo de edad y sexo comparable a nuestros enfermos;

2) que no hay correlación clínica, los dos únicos pacientes en nuestra serie con anticuerpos contra la sustancia intercelular epitelial, tenían antecedente de reacción mucosa que desapareció a pesar de seguir recibiendo la droga, aunque a dosis menores. En contraste, dos enfermos bajo tratamiento con D-Penicilamina, que en el momento del estudio tenían eritrodermia generalizada y ulceraciones mucosas, no tenían anticuerpo demostrable en este estudio. Estos pacientes suspendieron el tratamiento por razones económicas, no pudiendo volver a buscar en su suero la presencia de autoanticuerpos;

3) las reacciones tóxicas de la D-Penicilamina, parecen ser una respuesta individual de tipo idiosincracia. En enfermedad de Wilson y en Cistinuria, se ha reportado el mismo espectro de reacciones tóxicas y ya que en estas enfermedades no existen alteraciones inmunológicas, las reacciones tóxicas parecen ser debidas a hipersensibilidad y no relacionadas a la enfermedad de base por la cual está siendo administrado el medicamento. De hecho, el primer caso de pénfigo inducido por D-Penicilamina, ocurrió en un paciente con enfermedad de Wilson y los reportes subsecuentes han sido en pacientes con AR, lo que refleja el uso amplio de esta droga en una enfermedad tan frecuente como lo es la artritis reumatoide.

La observación inicial de Avalos y cols., posiblemente fue resultado de factores accesorios que aumentaron la positividad de sus resultados, entre estos que - el sustrato empleado, labio de conejo, es un epitelio con mucha queratina y tiene mayor fluorescencia inespecífica. El sustrato usado por nosotros, lengua de rata, mostró en estudios preliminares ser superior al labio de conejo y es uno de los sustratos usuales en estudios inmunopatológicos de pacientes con enfermedades vesico-bulosas.

En apoyo a nuestra observación, Benveniste y cols. informaron de cinco casos de pénfigo inducido por D-Penicilamina en una serie de 180 pacientes con AR tratados con esta droga. En este mismo estudio se buscó la presencia de anticuerpo contra la sustancia intercelular epitelial en 40 pacientes asintomáticos, no encontrándolos en ningún caso.

Dentro de este contexto, son válidas las siguientes consideraciones:

- en ausencia de signos clínicos de pénfigo, no se detectan anticuerpos contra la sustancia intercelular epitelial;
- los pacientes que tienen anticuerpos contra la sustancia intercelular epitelial, muy probablemente tienen pénfigo;
- la posibilidad de encontrar anticuerpo contra la sustancia intercelular epitelial en ausencia de lesión cutánea de cualquier tipo, justifica suspender el tratamiento;
- por el contrario, ante una erupción durante tratamiento con D-Penicilamina, la negatividad del anticuerpo no permite descartar la aparición ulterior de pénfigo.

VII. CONCLUSIONES

1. La administración de D-Penicilamina a los enfermos con artritis reumatoide, a las dosis habituales, no se acompaña de enfermedad cutánea y la frecuencia de efectos indeseables es baja.
2. La D-Penicilamina no es un inductor potencial de autoanticuerpos, más que en situaciones de excepción.
3. En las condiciones habituales de empleo de la D-Penicilamina en artritis reumatoide, no hay justificación para investigar en forma rutinaria autoanticuerpos séricos.
4. La D-Penicilamina es una droga que puede usarse en casos seleccionados de artritis reumatoide bajo vigilancia apropiada, sin riesgos mayores para el paciente.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aarden, L.A., de Groot ER and Feltkamp TEW: Immunology of DNA III. Crithidia lucilae. A simple substrate for the detection of anti-ds-DNA with the immunofluorescence technique. Ann N.Y. Acad Sci 254:505, 1975.
- Aitcheson CT, Peebles C, Joslin F and Tan EM: Characteristics of Antinuclear Antibodies in Rheumatoid Arthritis. Arth & Rheum 23, No 5: 528-538, May 1980.
- Avalos E, Herrera R & Guzmán L: Pénfigo y Penicilamina. X Congreso Mexicano de Dermatología. Zacatecas, Zac. Oct. 1981.
- Benveniste M, Crouzet J, Homberg JC, Lessana M, Camus JP and Hewitt J: Pemphigus induits par la D-Penicillamine dans la Polyarthrite Rheumatoide. La Nouvelle Presse Medicale 4: 3125-3128, 20 Dic. 1975.
- Camus JP, Crouzet J, Bach JF and Homberg JC: Autoantibodies Occurring During Treatment of Rheumatoid Arthritis by D-Penicillamine. VIIIth European Congress of Rheumatology, Helsinki, 1975.
- Dobloug JH, Forre O, Kass E and Thorsby E: HLA antigens and Rheumatoid Arthritis. Arth & Rheum 23: 309-313, March 1980.
- Fellner MJ, Fukoyama K, Mosheh A and Klaus HV: Intercellular antibodies in blood and epidermis. Brit J. Dermatol 89:115, 1973.

- Jaffe IA: Comparison of the Effect of Plasmapheresis and Penicillamine on the Level of Circulating Rheumatoid Factor. Ann Rheum Dis 22:71-76, 1963.
- Jaffe IA: The Effect of Penicillamine on the Laboratory Parameters in Rheumatoid Arthritis. Arth & Rheum 8: 1064-1079, 1965.
- Jaffe IA: Penicillamine Treatment of Rheumatoid Arthritis: Effect of Immune Complexes. Ann NY Acad Sci 256:330-357, 1975.
- Jaffe IA: D-Penicillamine. Bull Rheum Dis 28:948-953, 1978.
- Jaffe IA: Therapeutic Strategy in RA. The Journal of Rheumatology Supp 7:3, 124-145, Jan-Feb 1981.
- Kean WF, Dwosh IL, Anastassiades TP, Ford PM and Kelly HG: The Toxicity Pattern of D-Penicillamine Therapy: A Guide for its Use in Rheumatoid Arthritis. Arth & Rheum 23: 158-163, Feb. 1980.
- Kurata N. and Tan EM: Identification of Antibodies to Nuclear Acidic Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. Arth & Rheum 19: 574-580, 1976.
- Livden JK, Naeudal A and Milde EJ: Pemphigus in Rheumatoid Arthritis Treated with Penicillamine. Scand J Rheum 10: 95-96, 1981.
- Manthorpe R, Teppo A, Bendixen G and Wegelius O: Antibodies to SS-B in Chronic Inflammatory Connective Tissue Diseases. Arth & Rheum 25: 662-667, 1982.

- Miescher PA, Muller-Eberhard HJ: Rheumatic Arthritis. Springer Seminars in Immunopathology 4: No. 2, 1981.
- Multicenter Trial Group: Controlled Trial of D-Penicillamine in Severe Rheumatoid Arthritis. Lancet 1: 275-280, 1973.
- Notman DD, Kurata N and Tan EM: Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann Int Med 83: 464-469, Oct. 1975.
- Ropes MW, Bennet EA, Cobb S, Jacox R and Jessar R: Diagnostic Criteria for Rheumatoid Arthritis. Bull Rheum Dis 9: 175, 1958.
- Simpson RW, Mc Ginty L, Simon L, Smith CA, Godzeski CW and Boyd RJ: Association of Parvoviruses with Rheumatoid Arthritis of Humans. Science 223: 1425-1428, March 1984.
- Steinbrocker O, Traeger CH and Batterman RC: Therapeutic Criteria in Rheumatoid Arthritis. JAMA 140: 659, 1949.
- Tan EM, Christian C and Holman HR: Antitissue Antibodies in Rheumatic Diseases: Standardization and Nomenclature. Arth & Rheum 20: 1919-1920, 1977.