

112422
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

CITOCINAS, CELULAS NK Y PENFIGO, SU RELACION CON
LAS MANIFESTACIONES CLINICAS. DEPARTAMENTO DE
DERMATOLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL
"DR. MANUEL GEA GONZALEZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN: DERMATOLOGIA

P R E S E N T A :

DRA. GABRIELA SOLIS LOPEZ



MEXICO, D. F.

OCTUBRE 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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones.

A mi esposo, por toda su paciencia, amor y apoyo infinito.

A mis padres, por no escatimar con su amor, dedicación, fe, ternura y todo lo que puede necesitar un hijo para sentirse completo.

A mis abuelitos, por ser una guía y un sostén cariñoso en toda mi vida.

A mi hermano, por ser mi compañero y amigo incondicional. A quién por supuesto también admiro.

A mi tío Fernando por orientarme y creer en mí toda la vida.

A mis primos por su cariño.

Al Dr. Luciano Domínguez y a la Dra. Ma. Teresa Hojyo por aceptarme y formarme como especialista.

A la Dra. Ma. Elisa Vega por ser una de las piedras angulares en mi formación dermatológica y en la realización de este trabajo.

Al Dr. Adalberto Mozqueda por su apoyo académico en mi residencia y para la realización de este trabajo.

A la Dra. Emma Verástegui, desde el inicio de mi formación médica y por que sin ella este trabajo no estaría aquí.

A las Dras. Judith Domínguez y Paty Pichardo por enseñarme todo lo que sé de cirugía dermatológica.

A los Dres. Roberto Arenas y Elsa Vázquez por su amistad y por su enseñanza.

A mis compañeros residentes, por su amistad.

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

[Handwritten signature]
DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

[Handwritten signature]
DR. GERMAN FAJARDO DOLCI
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

[Handwritten signature]
DR. MIGUEL ANGEL GARCIA GARCIA
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA

[Handwritten signature]
DR. LUCIANO DOMÍNGUEZ SOTO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE DERMATOLOGÍA

[Handwritten signature]
DRA. MA. ELISA VEGA MEMIJE
INVESTIGADOR RESPONSABLE

[Handwritten signature]
DRA. EMMA VERÁSTEGUI AVILÉS
INVESTIGADOR ASOCIADO

[Handwritten signature]
DR. ADALBERTO MOSQUEDA TAYLOR
INVESTIGADOR ASOCIADO



Hospital General
"Dr. Manuel Gea González"

Subdirección de Enseñanza

INVESTIGADORES:

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

DRA. MA. ELISA VEGA MEMIJE

Jefa del Servicio de Dermatopatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

DRA GABRIELA SOLÍS LÓPEZ

Residente del Servicio de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

INVESTIGADORES ASOCIADOS:

DRA. EMMA VERÁSTEGUI AVILES

Jefa del Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología

DR. ADALBERTO MOSQUEDA TAYLOR

Profesor Titular de Patología y Medicina Bucal. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

SEDE:

DIVISIÓN DE DERMATOLOGÍA, DEL HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

INDICE

Antecedentes.....	1
Marco de referencia.....	2
Planteamiento del problema.....	7
Justificación.....	8
Objetivos.....	9
Hipótesis.....	10
Diseño del estudio.....	10
Material y Métodos.....	11
Descripción de procedimientos.....	12
Citometría de flujo.....	13
Procedimiento.....	14
Calibración.....	14
Anticuerpos monoclonales.....	15
Parámetros de medición.....	15
Resultados.....	17
Evaluación clínica.....	17
Evaluación inmunológica.....	18
Evaluación de células NKT.....	18
Citocinas circulantes.....	19
Tablas y gráficas.....	20
Discusión.....	30
Conclusiones.....	32
Referencias.....	33

**CITOCINAS , CÉLULAS NK Y PÉNFIGO, SU RELACIÓN CON
LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS.**

ANTECEDENTES:

Los pénfigos son un grupo de enfermedades raras, de origen autoinmune, que se caracterizan por la producción de ampollas intraepiteliales que pueden involucrar la piel y las mucosas (1) . Se clasifican en pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo. En el primero, las ampollas se forman en la porción más profunda de la epidermis, inmediatamente por arriba de la capa basal, mientras que en el segundo las ampollas se forman en la capa granular (1,2).

Estas enfermedades se caracterizan histológicamente por la formación de ampollas intraepidérmicas secundarias a acantolisis (separación de células epidérmicas entre sí) e inmunológicamente por la presencia in vivo de inmunoglobulinas G (IgG) fijadas y circulantes contra la superficie de los queratinocitos. El blanco de dichos anticuerpos son las desmogleínas, que son las proteínas que forman parte del desmosoma e intervienen en la cohesión intercelular. El antígeno del pénfigo vulgar es una glicoproteína de 130 kDa (desmogleína 3) y el del pénfigo foliáceo es una glicoproteína de 160 kDa (desmogleína 1) (2,3). Los autoanticuerpos del pénfigo pertenecen a las IgG, y al isotipo IgG4, los cuales pueden provocar acantolisis aún sin fijación del complemento (4). Según el sustrato empleado para la inmunofluorescencia indirecta, más del 75% de los pacientes con pénfigo presentan anticuerpos IgG circulantes contra la superficie de las células epiteliales (2). El depósito de C3 también se ha observado en la piel dañada de los pacientes con pénfigo, aunque se desconoce su papel exacto (5). La inmunofluorescencia directa demuestra la presencia de C3 y otros componentes del complemento .

El pénfigo vulgar representa entre el 70 y 80% de los casos de pénfigo; se estima que ocurren 0.1 a 0.5 casos por 100,000 habitantes por año (6,7,9,10). En México, se ha reportado que un número importante de casos se desarrolla antes de los 40 años (6), pero en la mayoría de estudios de otros lugares del mundo la enfermedad generalmente se diagnostica después de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

50 años de edad (7,8,9,10, 11). En cuanto a la distribución por sexo, en general se considera que afecta más a mujeres que a hombres en una relación de 2:1 (1,6,12).

Los sitios de aparición inicial más frecuentes son la mucosa de boca, seguido de piel cabelluda, cara, cuello , axilas y genitales (13).

Las lesiones cutáneas del pénfigo vulgar consisten en ampollas flácidas que pueden aparecer en cualquier parte de la superficie cutánea; por lo general en piel de aspecto normal o eritematosa y se tornan flácidas rápidamente. Estas ampollas son frágiles, así que lo que se observa con mayor frecuencia son erosiones, a menudo dolorosas, secundarias a la ruptura de las ampollas. Estas últimas pueden inducirse aplicando presión lateral a la piel adyacente, lo que resulta en desprendimiento de la misma (signo de Nikolsky), signo que aunque no es específico de este padecimiento, es altamente sugestivo (2). Las lesiones orales pueden preceder a las de la piel hasta en un 70 % de los casos y se encuentran de manera concomitante en el 90% de los pacientes. La mayor prevalencia se observa en el paladar blando, aunque pueden ocurrir en cualquier lugar de la boca, principalmente en zonas expuestas a traumatismo constante. La lesión típica de la mucosa bucal es una ampolla que se rompe rápidamente y se vuelve dolorosa con difícil cicatrización. También pueden involucrarse la conjuntiva, genitales y el tracto respiratorio superior, así como esófago (14).

Entre los factores predisponentes se ha considerado de manera importante a la susceptibilidad genética y dentro de ésta se estima una posible participación entre los HLA-A10, HLA DR4 y DRW6 en Caucásicos.(8,11), mientras que en pacientes mexicanos se ha encontrado que el HLA-DR14 es más común , sobre todo en pénfigo vulgar y HLA DR1 para desarrollo de pénfigo foliáceo(12).

La fisiopatología del pénfigo es poco conocida; pero se postula que la pérdida de la cohesión o contacto entre las células inicia con la separación de los tonofilamentos de los desmosomas y se ha sugerido que es la IgG la que

induce los cambios, pues se ha logrado reproducir acantolisis en piel cultivada sólo con anticuerpos sin presencia del complemento (4,13,15); por ello, se piensa que el primer paso para la formación de ampollas es la presencia de autoanticuerpos, en individuos portadores de los haplotipos antes mencionados (8); sin embargo, aún no se comprende la forma en que interactúan diversos factores en la expresión de esta enfermedad. Además de los autoanticuerpos, se ha involucrado a otros sistemas inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa y citocinas inflamatorias como la interleucina 6, que se han encontrado en piel afectada. También se ha encontrado interleucina 1, tromboxano B2 y leucotrieno B4 en los fluidos de las ampollas.

Se han hecho reportes en donde se sugiere el involucro de factores ambientales en la fisiopatología de esta enfermedad y se discute sobre la existencia de pénfigo iatrogénico, ambiental o asociado a drogas. El primer reporte al respecto fue publicado en 1969 por Degos. Actualmente se ha involucrado a fármacos como el captopril, piroxicam, tiopironas, penicilina, rifampicinas, fenobarbital, piritinol, heroína y penicilamina; pensando que esto promueva la producción de neoantígenos. (11). Incluso se ha propuesto que el riesgo de pénfigo vulgar es menor en exfumadores y fumadores que en pacientes que nunca han fumado; también se ha asociado con mayor riesgo la exposición a pesticidas y vapores de metales (15).

La terapia del pénfigo en sus inicios fue insatisfactoria y la enfermedad alcanzaba una mortalidad del 90% hasta 1950, pero con la introducción de la terapia esteroide la mortalidad disminuyó a niveles entre 15-45% (5,11). El tratamiento es necesariamente prolongado, por lo que los pacientes frecuentemente tienen que enfrentar serias complicaciones (osteoporosis, sepsis, fenotipo Cushinoide, etc); por lo que se han propuesto numerosas terapias alternativas y adyuvantes que incluyen azatioprina, ciclofosfamida, sales de oro, metotrexate, clorambucil, cliclosporina y más recientemente mofetil micofenolato, dapsona, antimaláricos y diversos antibióticos sistémicos (16). Algunos autores han llegado a manejar incluso fotoféresis extracorpórea, plasmaféresis, corticosteroides intravenosos en pulsos con o sin ciclofosfamida

sin remisión clínica importante (16). En la actualidad, con la terapia combinada se considera que la mortalidad se ha abatido a niveles de 5 a 15 %. (5)

MARCO DE REFERENCIA

Las enfermedades mediadas por anticuerpos son producidas por un exceso de inmunoglobulinas circulantes, cuando éstas no son aclaradas de manera eficiente o cuando se depositan en los tejidos. (17)

La producción de autoanticuerpos presumiblemente requiere de la participación de células autorreactivas T-cooperadoras que regulan el isotipo de la inmunoglobulina que reconocen los epitopes de la porción extracelular de la desmogleína 3 y secretan citocinas como interferon gamma, TNF, interleucina 4, interleucina 6 e interleucina 10, pues se han encontrado expresadas alrededor de las lesiones en pacientes con pénfigo y no así en la piel sana (3).

Considerando que el pénfigo es una enfermedad autoinmune, debemos tener en cuenta que; las propiedades fisicoquímicas de los antígenos y anticuerpos como la carga, la valencia y el isotipo de inmunoglobulina, pueden influir en la formación del complejo inmunológico y su depósito. En forma adicional a la formación de anticuerpos, los linfocitos T juegan un doble papel; regulando la formación de anticuerpos y el isotipo de éstos y actuando como células efectoras. En estos casos los linfocitos T pueden causar daño por reacciones de hipersensibilidad retardada o por lesión directa a las células blanco.

Así mismo, existe una población de linfocitos T, llamadas células natural killer (NK), las cuales inicialmente fueron caracterizadas por su habilidad de lisar células tumorales e infectadas por virus; en la actualidad se les reconoce como células involucradas en un amplio espectro de funciones inmunes; filogenéticamente, es posible que las células NK aparecieran antes que los linfocitos T (18,19).

Los mecanismos de activación de las células NK empiezan a ser caracterizados, comparten mecanismos similares de lisis a los de los linfocitos

T citotóxicos (20). Las células NK producen grandes cantidades de interferon gamma, factor de necrosis tumoral (TNF) , factores estimuladores de colonias e IL-3, IL10 e IL-5 . Expresan receptores para IL-2, IL-12 , IL-5 y TNF; los cuales al igual que los receptores específicos para estas células; pudieran influenciar su función (21).

La expresión de CD56 por células NK no es compartida con otras células hematopoyéticas; ésta es una molécula de 140 kDa, producto del procesamiento alternativo del gen que codifica para la molécula de adhesión neuronal (NCAM) que esta involucrada en el desarrollo del sistema nervioso central y de interacciones célula-célula (22) . CD 57 es expresado también por algunos subtipos de células NK y por células neuronales.

Entre las células NK, también existe una subpoblación llamada células NKT, este subtipo celular inicialmente fue caracterizado en ratones como células NK 1.1 ; que produce grandes títulos de citocinas y expresan un repertorio restringido del receptor para antígeno de la célula T. Un subgrupo celular expresa : CD4+CD8- y produce IL-4 y otro subtipo de células expresa TCR+ CD4-CD8- (23). Se postula que una de las funciones que estas células poseen es la regulación, posiblemente negativa de la respuesta inmune. (23).

Las células NKT , coexpresan en la superficie alguna moléculas presentes tanto en linfocitos como en células NK clásicas, tienen la capacidad de reconocer antígenos glicolipídicos en el contexto de moléculas parecidas a clase I (Clase I "like"), CD1d, a través de su cadena invariante V.2J.Q. Al unir el antígeno a través de su receptor, las células NKT producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias TH1 (IFN Y TNF) y Th2 (IL-4 e IL-10), lo que hace difícil entender cuáles son las repercusiones en el individuo; es posible que estas células sean importantes en funciones inmunes antitumorales (24) . No se conoce como sucede esta dicotomía, sin embargo, antígenos con alta afinidad para el receptor de células T (RCT) , pudieran inducir principalmente respuestas TH1, estimulando a células CD4 convencionales a secretar citocinas TH2 (25) Este mecanismo tendría un efecto anti-autoinmunidad, posiblemente mediado por IL-13. Este efecto protector en autoinmunidad pudiera , en individuos con tumor, evitar la destrucción del tumor (25).

Las células NKT pueden ser CD3+CD4+CD8+ o bien CD3+CD4-CD8-. La distribución de estas células es similar a la de las células CD4+ convencionales, sin embargo, al ser estimuladas las células NKT CD4+, estas producen grandes cantidades de IL-4 e IL-13 (25). Estudios en modelos animales sugieren que la IL-13 tiene un papel importante en la supresión de respuestas citotóxicas contra tumores. La IL-13 no se une en forma directa a células T, por lo que, la inhibición debe estar mediada por células con receptores para IL-13/IL-4, como macrófagos o células dendríticas (25).

Las células NKT pudieran ser consideradas el brazo regulatorio de las respuestas T, de manera específica (25).

Además de los anticuerpos, la participación de otros sistemas inflamatorios en la patogénesis del pénfigo vulgar es aún desconocido, y es por esa razón que en el presente estudio examinaremos el papel de las citocinas como la IL-4, IL-6 e IL-10, así como del TNF.

En base al papel que la disfunción inmune juega en la génesis del pénfigo se justifica el uso de inmunosupresores; el papel de éstos en la modulación del sistema inmune no está perfectamente caracterizado. Se sabe que existe una disminución en el número de linfocitos en mayor o menor grado dependiendo del tipo de agente utilizado, sin embargo, la correlación clínica no siempre es igual. El mecanismo de acción de estos medicamentos no es muy claro; pero se sabe que los esteroides regulan la transcripción génica, lisan y probablemente redistribuyen linfocitos; también disminuyen los niveles de IL 1 e IL6, activan los linfocitos T citotóxicos y se ha observado una pobre quimiotaxis de neutrófilos y monocitos; así como una disminución en la lisis enzimática. En cuanto a la azatioprina; es un derivado de la 6-mercaptopurina y se incorpora al DNA de la célula e inhibe la síntesis de novo de purinas, no se sabe exactamente que efecto tiene sobre los linfocitos. La ciclofosfamida es un agente alquilante que interrumpe la síntesis del DNA y la división celular, tampoco se sabe el efecto sobre los linfocitos (26). Otros medicamentos, como ya se comentaba en párrafos anteriores, se han utilizado en el tratamiento de esta entidad, pero de la mayoría el efecto es pobremente conocido.

En base a lo anterior, el planteamiento del problema fue: ¿Existe relación directa o inversa entre el nivel de citocinas circulantes y de células NK con la mejoría clínica en pacientes con pénfigo?

La justificación del estudio entonces fue : si esto es afirmativo, se entenderá mejor la fisiopatología del pénfigo vulgar y se podría orientar la terapéutica a bloquear los mecanismos directamente responsables de este padecimiento.

El objetivo fue conocer los niveles de citocinas y células NK y analizar su relación con los cambios clínicos y terapéuticos de pacientes con pénfigo .

La hipótesis que se planteó fue: al estudiar distintas poblaciones celulares T , NK y los niveles séricos de IL4 e IL 8 en pacientes con pénfigo y correlacionarlos con sus manifestaciones clínicas , será posible identificar niveles sanguíneos de actividad y su probable correlación con los distintos tratamientos utilizados.

El diseño del estudio fue de un estudio descriptivo, abierto, observacional, prospectivo y longitudinal; doble ciego.

MATERIAL Y MÉTODO

Se incluyeron a 31 pacientes con diagnóstico confirmado por biopsia, de pénfigo , que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital "Dr. Manuel Gea González", del 1º de julio del 2001 al 1º de julio del 2002.

Se eliminaron del estudio 4 pacientes que no acudieron a las citas o se rehusaron a tomar los exámenes de laboratorio que se les solicitaron o la muestra fue insuficiente para su procesamiento.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Se recolectaron mediante veno-punción , 20 ml. de sangre; utilizando vacío en tubos de vidrio estériles cubiertos con heparina (Vacutainer Systems Beckton Dickinson, Franklin Lakes NJ). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente . Se recibieron y procesaron el mismo día de su toma y en el laboratorio de inmunología del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)

Obtención de las células mononucleares:

La sangre se diluyó en 2 volúmenes de PBS, previos a realizarse el gradiente. En tubos estériles cóncos de 50 o 15 ml. Se colocaron 15 o 5 ml de Ficoll/ Hypaque (Ficoll-Paque Pharmacia, Uppsala Sweden). La sangre diluida (35 ml) se dispensaron sobre el Ficoll/ Hypaque, hasta completar 35 ml de la suspensión celular, evitando romper el gradiente.

Colección de células mononucleares:

Se obtuvo la capa intermedia ("buffy coat") , utilizando una pipeta estéril. Esta se transfirió a un tubo cónico. Las células mononucleares se resuspendieron con un volumen de 25 ml de PBS y se centrifugaron 10 minutos a 300 g, sin utilizar freno; el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió. El procesamiento se repitió 3 veces, al final de lo cuál se procedió a contar las células utilizando azul trypan , ajustando el número de células requerido.

Inmunotipificación:

Se realizó obteniendo las células mononucleares mediante gradiente de Ficoll/Hypaque o bien, lisando los eritrocitos y marcando directamente los leucocitos . Se ajustó la concentración celular a 5×10^5 en 100 μ l de RPMI, colocándose en tubos de 12x 75 mm (Beckton Dickinson) rotulados con el número de muestra y el anticuerpo a emplearse .A cada tubo se añadió 1 μ g/ml

del anticuerpo correspondiente y se centrifugó a 1000 rpm por 5 min , éstos se colocaron en hielo y se incubaron durante 30 min. Posteriormente, las células se lavaron en 2 ocasiones con PBS y finalmente se resuspendieron en 500 -l de PBS/2% formaldehído. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de analizarse en el citómetro. Para cada análisis se tuvo el control negativo (células sin anticuerpo y/o fluorescencia) y control de isotipo (células mas el fluorocromo correspondiente para los anticuerpos utilizados) Holmes K 1991.

CITOMETRIA DE FLUJO

Incluye un sistema de flujo que expone a las células de la muestra a un haz de luz excitador en una sola fila. Se recolectó a luz y cualquier fluorescencia emitida por esta interacción es detectada, así como el uso de colorantes para teñir moléculas intracelulares específicas; convirtiéndose estas en señales eléctricas , para su posterior análisis brindando información cuantitativa sobre las características específicas de la célula en estudio.

Mediante la citometría se pudieron realizar medidas físicas y químicas .a) las medidas físicas son: tamaño, volumen, índice de refracción, viscosidad, granularidad; y b) las medidas químicas son: contenido de ADN, ARN, proteínas, enzimas, etc. A partir de una suspensión celular, en el citómetro de flujo se pudieron analizar diversas medidas de manera simultánea a velocidad de más de 5000 cél / seg.

La combinación de fluorocromos acoplados a un anticuerpo , permite la fluorescencia y que haya una identificación y difiere en una célula. El uso de fluorocromos de 2 o más colores distintos, acoplado a cada anticuerpo particular, permite la fluorescencia simultánea de dos colores en células individuales.

El análisis de las muestras se realizó en un FACSort equipado con un laser de 15 mW de argón, enfriado con aire, de 488 nm.El equipo se calibró utilizando semillas CALBRITE TM y ajuste , utilizando el programa Auto COMP TM (Todo Becton-Dickinson, San Jose California). El tamaño y la granularidad

fueron los parámetros inicialmente utilizados para la localización de las poblaciones de linfocitos. En los casos en los cuales se identificó más de una población celular, el análisis de cada una de ellas se realizará por separado. Los distintos fluorocromos fueron leídos utilizando los siguientes filtros, 518 nm (fluorescencia verde), 560 nm (fluorescencia naranja) y 650 nm (fluorescencia roja). Se utilizó una compensación electrónica para eliminar la fluorescencia superpuesta. Los resultados de 10 000 eventos fluorescentes detectados se mostraron en escala logarítmica de 4 decenas, utilizando el citómetro Beckton Dickinson FACSort conectado a una computadora Hewlett-Packard 340 . El análisis se realizó utilizando el programa LYSYS II software (Becton Dickinson Immunocytometry systems). El resultado en el caso de ganglios linfáticos, se expresó como la media del porciento +/- desviación estándar (SD) . Los resultados obtenidos de células mononucleares se reportaron como números absolutos de células / mm³.

PROCEDIMIENTO

La suspensión celular se pasó a través de una boquilla en un flujo , rodeado de solución salina o agua. La vibración de la punta de la boquilla originó que el flujo se rompiera en una serie de gotas, cuyo tamaño permitió el paso de una sola célula. Las células marcadas con distintos fluorocromos se excitaron por un haz de luz laser, la cual emitió señales fluorescentes que fueron cargadas eléctricamente en un campo de alto voltaje entre placas de reflexión, separándose así en tubos colectores:

CALIBRACIÓN

En un tubo se añadió 1 gota de microesfera sin marcar (blanco) + 1 ml de PBS, al siguiente tubo 1 gota de cada una de las microesferas con los distintos fluorocromos empleados + 1 ml de PBS, se agitaron suavemente con un vortex por unos segundos y se ingresaron al programa AutoCOMP. Mediante este procedimiento se ajustó el voltaje de los tubos multiplicadores (tubo del blanco) se compensaron las fluorescencias y se probó la sensibilidad utilizando el tubo 2. Una vez que se realizó esto, se procedió a leer las muestras.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para caracterizar las subpoblaciones de linfocitos T: CD2, CD3, CD4 y CD8, marcados con FITC, RPE o RPE-Cy5 (DAKO Carpintería CA). Anticuerpos que detectan los receptores de célula T para el reconocimiento del antígeno alfa /beta y gama/delta (CATALOG Burlingame CA). Anti- CD45rO-RPE, CD45RA-FITC (CATALOG Burlingame CA). Se utilizan para determinar la proporción de células naive y de memoria. La presencia de células NK se demostró con anticuerpos anti-CD16 (DAKO FITC o RPE) y CD57-FITC (serotec, Kidlington, Oxford, England) se utilizó para evaluar células NKTs. Los linfocitos B se detectaron utilizando anti- CD19-RPE (DAKO)] Se utilizaron controles negativos que incluyen IgG1-FITC, TgG1-RPE/CY5 (DAKO), IgG2b

El análisis estadístico se realizó en el programa InStatGraph™. Aplicando la prueba apropiada en cada caso.

PARÁMETROS DE MEDICIÓN

Se consideró recaída si el paciente presentaba lesiones nuevas con respecto a su visita anterior y se consideró enfermedad activa si el paciente no mejoraba y presentaba lesiones nuevas. El tratamiento inmunosupresor se seleccionaba de la siguiente manera: se iniciaba con esteroide de 0.5 a 1 mg por kg de peso según la severidad de la enfermedad; además de azatioprina 50-100 mg al día. Posteriormente se disminuía la dosis del esteroide si el paciente no presentaba recaída, hasta la suspensión del mismo; y posteriormente se disminuía la dosis de azatioprina; hasta su suspensión. Finalmente se mantenía en observación al paciente; algunos enfermos a los que no se podía disminuir el esteroide por presentar recaída se les agregó dapsona a 100 mg por día o talidomida a 100 mg por día.

Los criterios clínicos de inmunosupresión fueron control del pénfigo y presencia de enfermedades oportunistas.

La evaluación clínica de la enfermedad se hizo de la siguiente manera:

- a) el % de superficie corporal, considerando como 100% la superficie afectada en forma inicial
- b) el número de recaídas y recidivas en un periodo de tiempo (1 año)
- c) extensión de acuerdo a control fotográfico

La medición de citocinas se hizo:

- a) por unidades por ml en el caso de las citocinas
- b) por número o porcentaje de células por ml.

RESULTADOS

Se estudiaron a 27 pacientes; 19 (.70) mujeres y 7 (.30) hombres (Fig1). 26 de ellos con pénfigo vulgar y uno con diagnóstico de pénfigo foliáceo, todos confirmados con estudio histológico. Con un rango de edades de 22 a 59 años, con un promedio de 36.96 años (desviación standard 11.9).(Fig.2)

Del total de la muestra; cuatro, se encontraban bajo seguimiento, sin lesiones activas ni tratamiento sistémico Doce se encontraban en tratamiento con corticoides sistémicos y azatioprina. Cinco sólo tomaban azatioprina.Tres tomaban corticoides, azatioprina y talidomida. Un paciente ingirió únicamente corticoide sistémico; uno más corticoide, azatioprina y dapsona,Otro paciente sólo está bajo tratamiento con ciclofosfamida .(Fig.3)

EVALUACIÓN CLINICA

Todos los pacientes evolucionaron hacia la mejoría en diferentes porcentajes, como es esperado mejoraron inicialmente las lesiones en piel y persistieron en mucosa bucal que es el último sitio donde desaparecen, en estos casos se tuvieron que corregir los factores que lo sostienen como serían mala oclusión, traumatismos, bordes cortantes. El esquema de tratamiento inicial fue de esteroides sistémicos y azatioprina y en general se conservó a lo largo del estudio excepto en un paciente que presentó anemia y trombocitopenia y se atribuyó a mielosupresión por azatioprina; por lo que se sustituyó este fármaco con ciclofosfamida y una paciente presentaba cuadros intermitentes discretos de lesiones orales que se controlaban con dosis bajas de esteroide.

En este estudio se observó la presencia de candidosis oral como única manifestación de enfermedades oportunistas; tres pacientes (3/27) presentaron

impétigo secundario. Una paciente presentó reacción leucemoide, falla orgánica múltiple y fue trasladada a otra institución.

EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA

Las muestras iniciales de los pacientes mostraron valores normales de leucocitos, linfocitos; así como de los porcentajes de células T CD3, CD4, y CD8 (7073 \pm 922.1; 1805 \pm 334.0; 56.45% \pm 7.097; 31.96% \pm 3.826; y 27.21% \pm 4.268 [mediana \pm error standard]) (Fig 4)

Al analizar los valores de estos tipos celulares durante la evolución de la enfermedad, en relación con el porcentaje de superficie corporal afectada y de acuerdo al tratamiento recibido, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$ por análisis de varianza). (Fig.5)

En los pacientes con afección de mucosas se observó un incremento relativo de linfocitos T que expresaban el receptor para antígeno $\gamma\delta$ (3.1 vs 9.7 $P > 0.05$ por análisis de varianza), este porcentaje celular disminuyó en este grupo de pacientes en forma importante respuesta al tratamiento Fig.6) sin embargo, la disminución no tuvo significancia estadística. También se estudió el resto de las subpoblaciones y no se encontró relación (Fig 6.A)

Con objeto de correlacionar la evolución de la enfermedad, el tipo de tratamiento y los parámetros inmunológicos habitualmente estudiados, se analizaron leucocitos, linfocitos, porcentajes de células CD3, CD4 y CD8 en los siguientes grupos de pacientes: paciente con pénfigo activo sin tratamiento (momento del diagnóstico); pacientes con pénfigo inactivo, sin tratamiento, pacientes recibiendo esteroides; ciclofosfamida; diferentes dosis de azatioprina (en combinación con esteroides, talidomida, dapsona o sola) y los resultados se ilustran en la figura 7. Como se puede observar no existieron diferencias significativas en la evaluación de estos parámetros ($p > 0.05$ por análisis de varianzas), en relación a la actividad del pénfigo o tratamiento utilizado.

EVALUACIÓN DE CELULAS NKT

El porcentaje de este subtipo celular fue bajo en todos los casos, se analizaron los diferentes subtipos de células NKT y se pudieron observar algunas modificaciones en células NKT CD4+CD57+.

En forma inicial se evaluó el porcentaje de estas células en individuos normales, sin patología aparente ya que no se contaba con un parámetro de referencia. El porcentaje de estas células fue de 0.42 ± 0.19 . Al evaluar los porcentajes de estas células en los grupos de pacientes antes mencionados, se encontró una correlación en el incremento de estas células y la administración de inmunosupresores ($p < 0.01$ por análisis de varianzas) (Fig.8.). A nuestro juicio fue más importante la observación de que el incremento en el porcentaje de estas células se correlacionaba con la inducción de control del pénfigo ($P = < 0.02$ unpaired t test) (Fig.9.).

En los paciente tratados con talidomida se pudo observar un aumento progresivo en el porcentaje de estas células y el control de la enfermedad. ($P < 0.0005$ unpaired t test) (Fig.10).

Citocinas circulantes

Se analizaron sueros de pacientes antes y después de tratamiento. IL4, en todos los casos fue de 0 Pg/ml.

Se midieron los niveles de IL8 y se encontró que los niveles de esta citocina en general correlacion con la actividad de la enfermedad. (Fig.11)

En cuanto al factor de crecimiento epidérmico (FCE), se pudo observar una correlación entre la superficie corporal afectada y su presencia.(Fig.12); no se obtuvieron datos estadísticos debido a que la muestra era muy pequeña.

TABLAS Y GRÁFICAS

Distribución de pacientes con pénfigo según el sexo

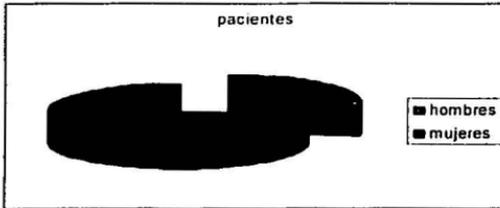


Fig.1

Esta figura corresponde al .7 de afección al sexo femenino y al .3 de afección a hombres

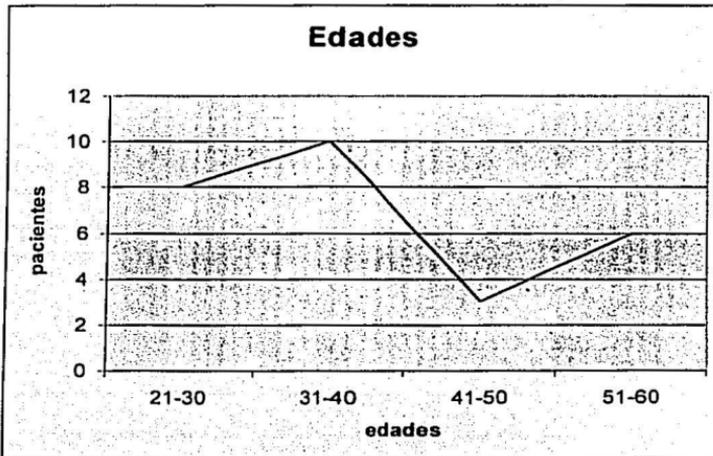


Fig.2

En esta gráfica se observa una curva bimodal de afección en cada década de la vida

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tratamientos empleados en cada paciente durante el estudio

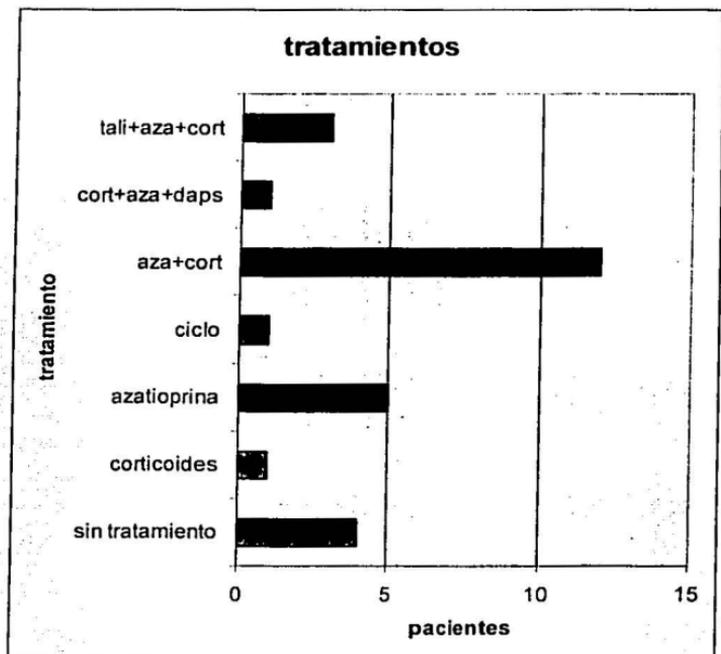


fig 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Porcentaje celulares en pacientes con pénfigo activo
Relación con superficie corporal afectada**

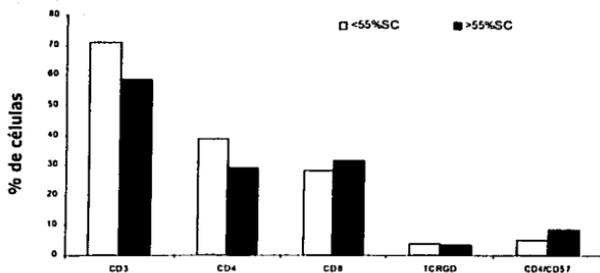
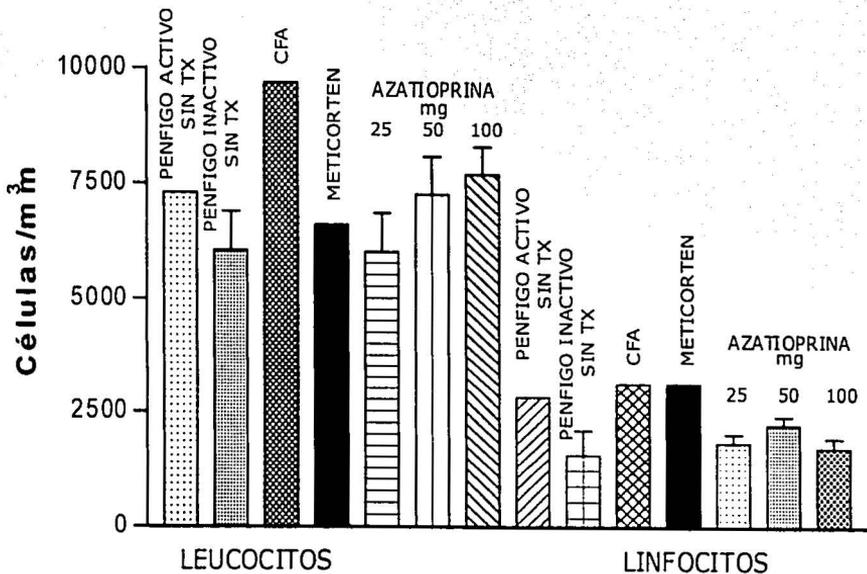


Fig.4

EXEMPLES CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5

VALORES DE LEUCOCITOS Y LINFOCITOS



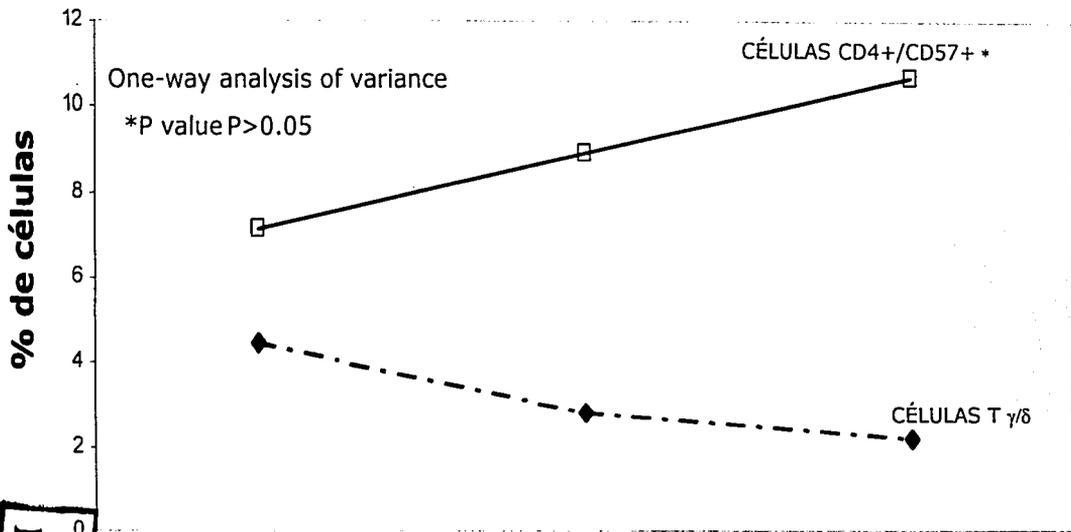
P>0.05

Córrrelación de leucocitos y linfocitos según el tratamiento empleado, Analizado estadísticamente con análisis de varianza

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6

Evolución inmune de pacientes con afección a mucosas



TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

ACTIVE

INTX

INACTIVE

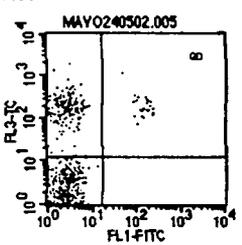
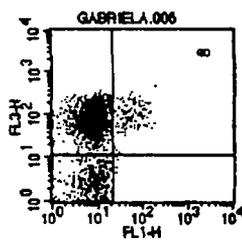
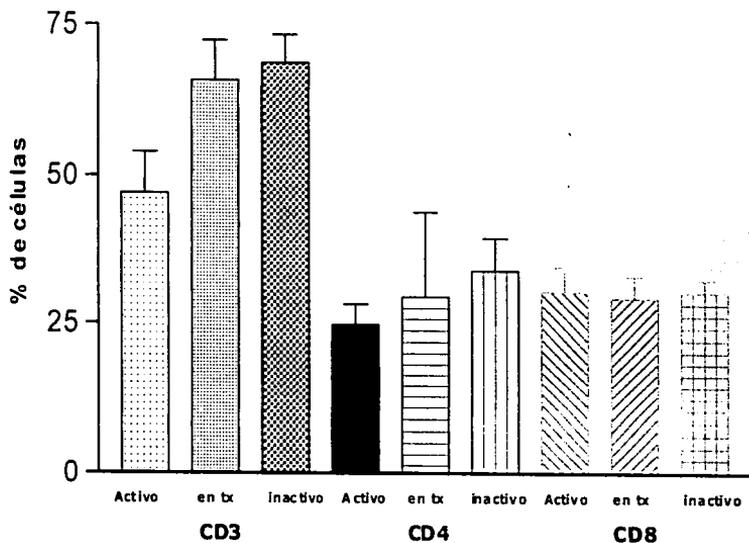


Fig.6.A

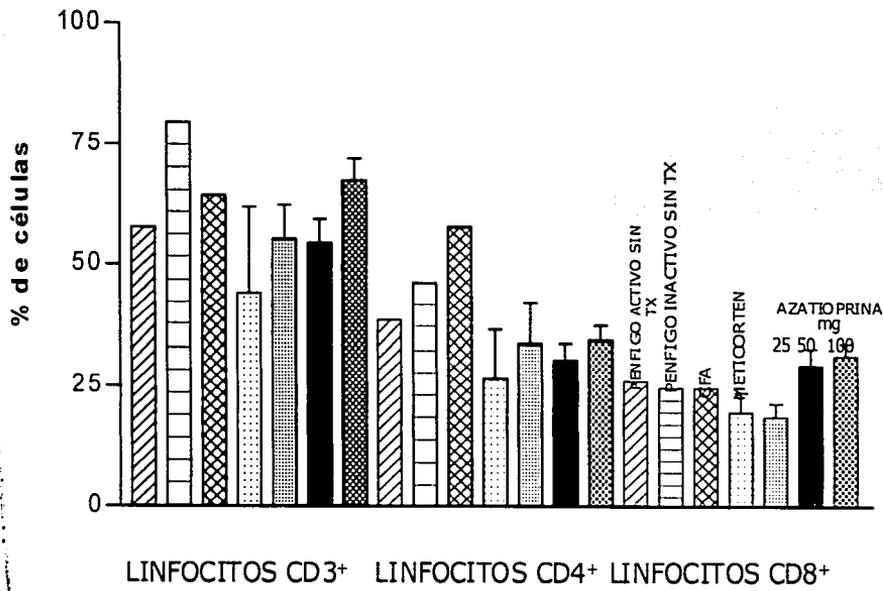
Evolución inmune de pacientes con afección a mucosas



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Correlación de subpoblaciones y actividad del páncreo

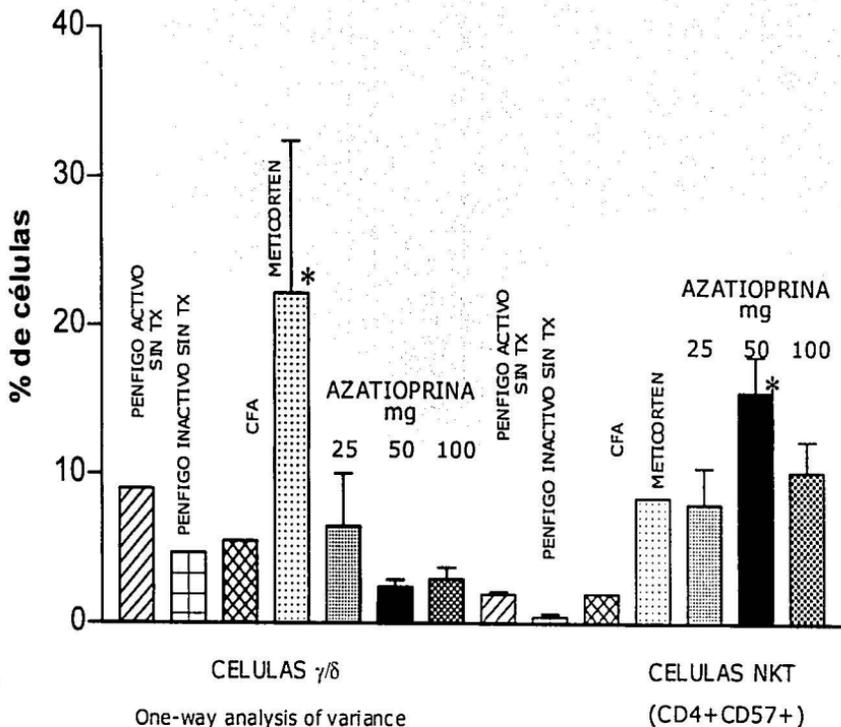
Fig.7 Relación de subpoblaciones de linfocitos y
Tratamientos inmunosupresores
SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS



P > 0.05

INSTITUTO
 DE INVESTIGACIONES
 CIENTÍFICAS
 DEL
 ESTADO DE
 GUATEMALA

Fig.8

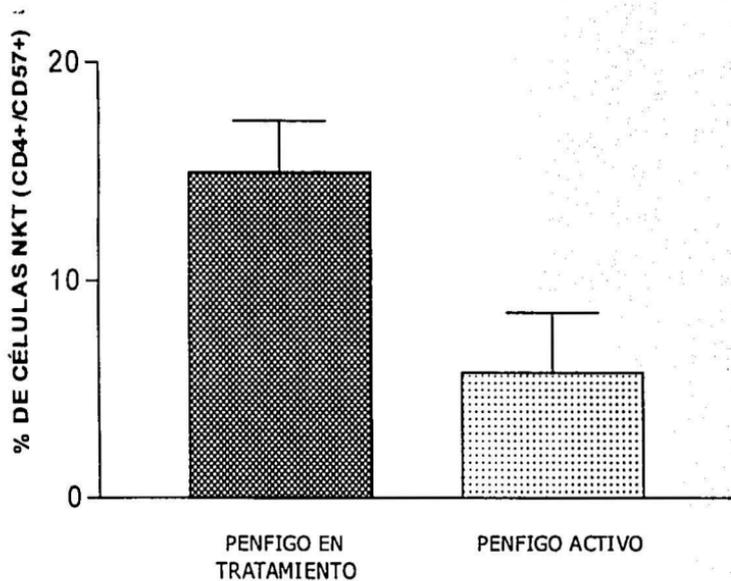


FÁBULA DE ORIGEN
 1985
 2001

Relación de tratamientos inmunosupresores y células NKT, α y β

Fig.9

Relación de células NKT y actividad del pénfigo



Unpaired t test

P value 0.0232

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

22-A

INDUCCION DE CELULAS CD4+/CD57+ POR TALIDOMIDA

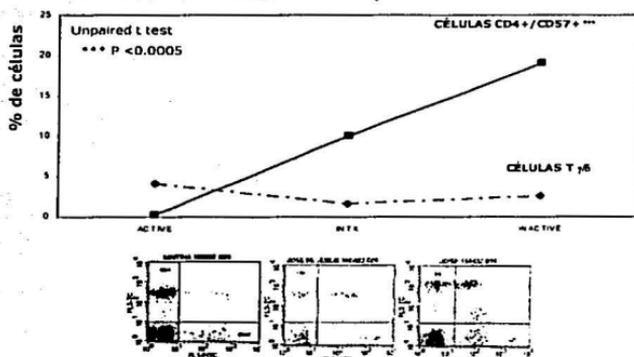


Fig.10

Muestra	IL8 Pg/ml	Actividad del péñfigo
1	134.17	Inactivo
2	118.30	Inactivo
3	352.97	Inactivo
4	433.33	Activo
6	210.26	Activo
7	89.28	Inactivo
8	0	Activo
9	0	Inactivo
10	0	Inactivo
11	0	Inactivo
12	0	Inactivo
13	0	Inactivo
14	0	Inactivo
15	0	Activo
16	82.58	Inactivo

Fig 11

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Paciente	Factor de crecimiento epidérmico	Actividad del pénfigo
1	261.81	Inactivo
2	311.75	Activo
3	16.93	inactivo

Fig. 12

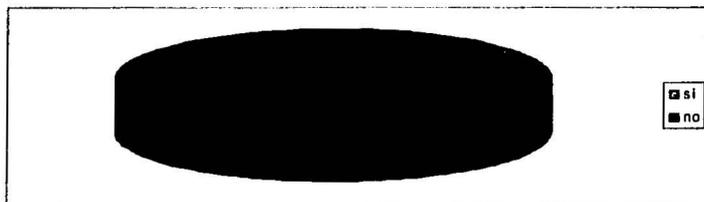


Fig 13 Afección a mucosa oral

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En este estudio se observó que los pacientes con pénfigo presentaron una mayor incidencia en la tercera y cuarta década de la vida, de acuerdo con lo observado en estudios de pacientes mexicanos (7); y a diferencia de lo reportado en la literatura mundial (7,8,9,10,11), en la que se comentó una mayor incidencia después de los 50 años. En cuanto a la distribución por sexo se ha reportado que el padecimiento afecta más a mujeres que a hombres en una relación de 2:1 (1,6,12) y nosotros encontramos, igualmente, una mayor afección de mujeres que de hombres; pero con una relación de 3:1.

En el pénfigo vulgar la afección inicial en mucosas o acompañando las lesiones cutáneas se ha reportado en diversas cifras que van desde el 5 al 75% (8,9); nosotros encontramos en este estudio afección a mucosa bucal en un 38% (Fig. 13)

La evaluación de la repercusión de las terapias inmunosupresoras en este grupo de pacientes es compleja; como se pudo observar, los parámetros habitualmente utilizados para documentar inmunosupresión, no se modificaron en estos pacientes. Es posible que el tamaño de la muestra y las dosis utilizadas justifiquen la falta de correlación, sin embargo en la práctica clínica es indispensable conocer si el tratamiento empleado es útil en todos los casos.

Como nos muestra este estudio, la evaluación clínica representa la mejor manera de dar seguimiento a estos pacientes, sin embargo, se pudo observar una mejor correlación al evaluar las células NKT, este subtipo celular esta aun pobremente caracterizado fenotípica y funcionalmente, sin embargo como se muestra en el estudio represento u mejor parámetro para evaluar el éxito del tratamiento; por lo que en un futuro, probablemente ayude a dilucidar mejor la fisiopatología y el comportamiento de esta enfermedad.

Los pacientes que recibieron talidomida presentaron aumento progresivo en el porcentaje de células NKT, que estuvo relacionado con la mejoría clínica.

Este medicamento se ha utilizado como ahorrador de esteroides y en algunos casos sustituyéndolo, la utilidad podríamos explicarla por el aumento de las células referidas.

Otro aspecto importante es la presencia de linfocitos gama/delta como marcadores de enfermedad en mucosas. Se sabe que este tipo celular tiene una distribución restringida en piel y mucosas y un porcentaje muy bajo se encuentra en circulación. Como se muestra en párrafos anteriores la presencia de estas células circulantes se correlacionó con enfermedad particularmente en mucosas, lo que nos permitirán utilizarlas como marcadores de péñfigo oral.

La evaluación de citocinas circulantes resultó compleja y sumamente costosa y no se encontró una clara correlación. Las causas de esto pudieran ser los muy bajos niveles de estas en circulación y la modificación por los tratamientos utilizados.

Nosotros consideramos que aunque la muestra es pequeña y los pacientes analizados se encontraban recibiendo diferentes terapias inmunosupresoras, es necesario ampliar en el conocimiento de los mecanismos de inmunosupresión de diferentes fármacos; sin embargo, es posible que el análisis de células NKT pudiera ser un parámetro para evaluar la inducción de inmunomodulación de este grupo de pacientes.

Un estudio prospectivo con un número mayor de pacientes debe ser considerado.

CONCLUSIONES

Al estudiar las células NKT e IL 8 en suero de pacientes con pénfigo; si existe correlación con sus manifestaciones clínicas y los diferentes tipos de tratamiento utilizados; y no sucede esto con los niveles de IL4.

REFERENCIAS

- 1.- Asaleh A, Nanda A., LI-Baghli N. , Dvorak R. Pemphigus in Kuwait. Int J of Dermatol 1999;38:351-6.
- 2.- Fitzpatrick T., Eisen A., Wolff K., Freedberg I., Austen K., Austen F. Dermatología en medicina general. 1997, 4ª ed. 638-45.
- 3.- Eming R., Búdinger L., Riechers R., Christensen O., Bohlen H., Kalish R., et al. Frequency analysis of autorreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay. Br J Derm 2000;143:1279-82.
- 4.- López-Robles E, Avalos-Díaz E, Vega-Memije E., Hojyo-Tomoka T., Villalobos R., Domínguez-Soto L., et al. TNF alfa and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus. Int J Dermatol 2001;40:1-5.
- 5.- Korman N. Pemphigus: an update. Progress In Dermatol 1990;24(1):1-4.
- 6.- Leon G, Blancas F. Deflazacort en el tratamiento de los pénfigos . Dermatología Rev Mex 1995;39(5):268-70.
- 7.- Vega-Memije M, Villatoro V, Mosqueda A. Pénfigo vulgar. Dermatología Rev Mex 1998;42(6):244-9.
- 8.- Robinson JC, Lozada-Nur F, Frieden I. Oral pemphigus vulgaris. A review of the literature and a report on the management of 12 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997;84:349-55.
- 9.- Pisanti S. , Sharav Y, Kaufman E, Posner L. Pemphigus vulgaris: Incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex and initial lesion. Oral Surg 1974;78(3):382-7.
- 10.- Micali G., Musumicci M, Nasca M. Epidemiologic analysis and clinical course of 84 consecutive cases of pemphigus in eastern Sicily. Int J Dermatol 1998;37:197-200.
- 11.- Thivolet J. Pemphigus: Past, Present and Future. Dermatology 1994;189(suppl 2):26-9.
- 12.- Vega-Memije M, Saez M, Cortés-Franco R., Domínguez-Soto L., Granados-Arriola J. Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. Gac Med Méx 2001;137: 535-40
- 13.- Odom R., James W., Berger T., Diseases of the skin. Clinical Dermatology. 2000. 9ª Ed. 574-85.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 14.-Mignona M, Lo Muzio L, Galloro G, Satriano R., Rucco V., Bucci E. Oral pemphigus: Clinical significance of esophageal involvement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997;84:179-83.
- 15.-Brenner S., Tur E., Shapiro J., Rucco V., D'Avino M., Rucco E., et. al. Pemphigus vulgaris: environmental factors. Occupational, behavioral, medical and qualitative food frequency questionnaire. *Int J Dermatol* 2001;40: 562-9.
- 16.-Ahmed R., Sami N. Intravenous immunoglobulin therapy for patients with pemphigus foliaceus unresponsive to conventional therapy. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:42-49.
- 17.-Abbas A., Lichtman A., Pober J. *Cellular and Molecular Immunology*, 4^a Ed. 2000, 1-553.
- 18.-Savary C., Lotsova E., Phylogeny and ontogeny of NK cells. *Immunobiology of Natural Killer Cells*. 1986. 1,45-60.
- 19.-Trichieri G., *Biology of natural Killer Cells*. *Adv Immunol*;1989, 47:187-376.
- 20.-Berke G., The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: Molecular and cellular Aspects. *Annu Rev Immunol*; 1994, 12:135-73.
- 21.-Perussia B., Lymphokine-activate killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol.*; 1991,3:49-51.
- 22.-Hercend T., Griffin J.D., Bensusan A., Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone: characterization of two natural killer associate antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Inves*; 1985, 75:932.
- 23.-Vicari A. P., Zlotnik A. Mouse NK1.1- T cells: a new family of T cells. *Immunol Today*. 1996, 17; 71-76.
- 24.-Yoshimoto T., Bendelac A., Watson C., Hu-Li J., Paul We. Rol of NK 1.1 T cells in Th2 response and immunoglobulin IgE production. *Science* 1995, 270;1845-1847.
- 25.-Terabe M., Matsui S., Noben-Trath N., Chen H., NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000, 1:515-520.
- 26.-Hardman J.G., Limbrid L. *The pharmacological basis of therapeutics* . 9^a. Ed. 2001.1463-1475.