

Génesis y evolución del factor reumatoide experimental

V. Rodríguez Valverde* y B. Fidalgo Vaquero

RESUMEN

Inmunizando conejos con extracto antigénico de *Streptococo Hemolítico grupo A*, o con gamma globulina autóloga desnaturalizada, se ha logrado producir anticuerpos en estos animales con características físicas y biológicas de F. R. La independencia de este F. R. y los anticuerpos antibacterianos se demostró por la persistencia de la actividad F. R. en los inmunoseros, tras su absorción con el antígeno bacteriano. La actividad F. R. va ligada a la fracción IgM con una constante de sedimentación de 19 S.

En todos los casos, el F. R. se negativizó a las 6-8 semanas de su aparición, debido al establecimiento de una posible parálisis inmunológica frente a la gamma globulina autóloga alterada, como parecen demostrar los estudios del aclaramiento del antígeno marcado con I^{131} .

Se sugiere la posibilidad de que el trastorno fundamental en la A. R., resida en una alteración del sistema inmunocompetente, en virtud de la cual, éste sería incapaz de desarrollar un estado de tolerancia frente a determinados antígenos.

El Factor Reumatoide (F. R.) es el rasgo serológico más constante y uno de los de mayor valor diagnóstico en la Artritis Reumatoide (A. R.). Su caracterización físico-química y propiedades biológicas son actualmente bien conocidas. Se sabe que es una gamma globulina, generalmen-

te de la clase M, con una constante de sedimentación de 19 S²⁵, y que se comporta como un autoanticuerpo para con la IgG 7 S¹⁷.

La consideración de la A. R. como enfermedad autoinmune, es un hecho suficientemente documentado^{14, 22}. Dentro de esta consideración, algunos autores, como Hollander y col.²³, le han atribuido un papel esencial al F. R. en la patogenia

* Trabajo realizado con una ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

de las lesiones presentes en esta enfermedad. Otros autores, en cambio, ante el hecho de la existencia de F. R. en procesos infecciosos crónicos²⁰, e incluso en individuos normales, lo consideran simplemente como un síntoma más de la enfermedad. Finalmente, ha sido también considerado como un agente protector que actuaría inhibiendo la fijación del complemento²⁰, e impidiendo de este modo la inflamación articular.

En los últimos años, Najjar y col. han desarrollado la Teoría de la Subcomplementariedad²¹, para explicar los mecanismos de reacción antígeno-anticuerpo. En relación con dicha teoría emitieron posteriormente, una hipótesis en relación con la patogenia de la A. R. Según dicha teoría, en la reacción antígeno-anticuerpo tanto la molécula del antígeno como la del anticuerpo, sufrirían una alteración en su estructura terciaria. Esta alteración en la estructura del primitivo anticuerpo (Ac₁) le conferiría un carácter de autoantigenicidad, desencadenándose la producción de una segunda serie de anticuerpos (Ac₂) dirigidos específicamente contra los Ac₁. Este segundo tipo de anticuerpos, por su propiedad de reaccionar con la gamma globulina autóloga, tendría la consideración de F. R. Parece lícito pensar que la capacidad funcional del Ac₁ quedaría notablemente disminuida o anulada al reaccionar con el Ac₂, y, por tanto, aunque el individuo posea una gran cantidad de gamma globulina circulante, ésta sería, en cierto modo, ineficaz en su función biológica, y existiría de hecho, una situación muy semejante a la de la agammaglobulinemia. De esta forma se podría explicar la paradoja de que los individuos afectados de agammaglobulinemia presenten en 1/3 de los casos un síndrome clínico completamente equiparable a la A. R.³, puesto que, en definitiva, ambos tipos de enfermos estarían en una situación funcional de déficit de gamma globulina.

La demostración experimental de la hipótesis enunciada exigiría, a nuestro juicio demostrar:

Que la reacción entre un antígeno exógeno y el anticuerpo correspondiente da lugar a una alteración estructural en la molécula de este último, convirtiéndolo en autoantigénico, e induciendo, consecuentemente, la producción de autoanticuerpos anti gamma globulina (F. R.).

La antigenicidad de la molécula de gamma globulina estructuralmente alterada, con la demostración subsiguiente de anticuerpos contra dicha gamma globulina.

Finalmente, comprobar si hay o no correlación entre la existencia de un F. R. circulante, y la producción de una artritis experimental semejante a la A. R. humana.

Al objeto de aclarar parte de los postulados anteriormente enunciados, hemos partido de dos situaciones experimentales diferentes:

1. En la primera, una serie de animales ha sido inmunizada con un antígeno bacteriano, obtenido a partir del estreptococo hemolítico grupo A.
2. La segunda situación ha sido originada por la inmunización de otra serie de animales con su propia gamma globulina, estructuralmente alterada por diferentes métodos.

En ambos casos se ha estudiado si el proceso de inmunización seguido daba lugar a la aparición de un F. R., y si la existencia de este F. R. circulante era capaz o no de producir artritis semejante a la A. R. humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Animales de experimentación.*

Conejos adultos de raza común sin distinción de sexo. Cada animal, previa-

mente a la inmunización, fue sometido a un período previo de sangrías, hasta obtener de cada uno un volumen de suero oscilante entre 100-150 ml.

2. Preparaciones antigénicas

a) Extracto antigénico de estreptococo hemolítico grupo A, obtenido tras cultivo en medio "Todd Hewitt Broth" (Difco), por precipitación con acetona a -20°C . en la proporción de un volumen de sedimento bacteriano por cada tres volúmenes de acetona. La pureza de los cultivos fue sistemáticamente controlada mediante tinción de Gram, reacción de la catalasa, y hemocultivo en placa de Petri.

b) Gamma globulina autóloga sometida a diferentes grados de desnaturalización por calor. La gamma globulina era obtenida a partir del suero de cada animal, por doble proceso de precipitación con $\text{SO}_2(\text{NH}_4)_2$ saturado al 33 % en baño de hielo a 0°C ., según la técnica descrita por Fidalgo y col.⁸. La concentración de proteínas contenida en la muestra de gamma globulina era determinada por espectrofotometría a $280\text{ m}\mu$, y diluída en salino o concentrada por evaporación en tubo de diálisis a 4°C ., hasta conseguir una concentración protéica de 8-10 mg/ml. La pureza de la fracción de gamma globulina obtenida, era comprobada por electroforesis en gel de agar, y en acetato de celulosa²⁸.

Se utilizaron tres diferentes preparaciones antigénicas de gamma globulina autóloga:

Gamma globulina intensamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C ., durante media hora en baño María.

Calentamiento a 45°C ., durante una hora. ra.

Sin sufrir ningún proceso de desnaturalización por calor.

3. Proceso de inmunización

Los animales fueron divididos en series diferentes, según el diferente proceso de inmunización a que fueron sometidos. Siempre fueron inmunizados por vía intramuscular, y en presencia de coadyuvante completo de Freund (Difco).

Serie A: Inmunizados con extracto antigénico de estreptococo homolítico grupo A. Tres inoculaciones semanales. Semanas 1.^a y 2.^a: 60 mg de antígeno bacteriano por inyección, 3.^a y 4.^a: 120 mg por inyección, 5.^a semana 240 mg por inyección, A continuación, un mes de descanso, seguido de tres inyecciones semanales de 120 mg, durante 4 semanas.

Serie B: Inmunizados con gamma globulina autóloga, desnaturalizada por calentamiento a 100°C . Tres inoculaciones semanales. Semanas 1.^a - 5.^a: 4.5 mg de gamma globulina por inyección. A partir de la 6.^a: 8-10 mg por inyección.

Serie C: Sensibilizados con gamma globulina autóloga, sometida a $45^{\circ}\text{C}/1\text{ h}$. Una inyección semanal. Semanas 1.^a y 2.^a: 4.5 mg de gamma globulina por inyección. Semanas 3.^a - 14.^a: 8-10 mg por inyección.

Serie D: Inmunizados con gamma globulina autóloga sin desnaturalizar por calor. Se siguió idéntica pauta de inmunización que en la serie C.

Serie C₁: Constituída por los animales n.^o 22, 31 y 32 pertenecientes a la serie C, que tras haber sufrido su proceso de inmunización con gamma globulina autóloga durante 14 semanas, sin obtenerse en ellos ninguna respuesta, fueron sometidos a un proceso mixto de inmunización consistente en una inyección semanal de 8-10 mg de gamma globulina autóloga y, simultáneamente, 3 inyecciones semanales con antígeno estreptocócico con una pauta similar a la seguida en

la serie A, pero sin ninguna pausa en el proceso de inmunización.

Serie D₁: Constituida por los animales n.º 29 y 34 de la serie D, que sufrieron idéntico proceso mixto de inmunización.

4. Detección del F. R. Experimental

La existencia de F. R. fue investigada a través de las siguientes reacciones:

Test de Látex sobre portaobjetos, según técnica de Singer y Plotz²⁴.

Hemaglutinación pasiva de Boyden según el método de Lewis y Kessel¹⁵. Cada inmunosero fue testado con hemátides de carnero, sensibilizados con gamma globulina preinmune del mismo animal. Como control positivo utilizábamos suero de carnero antigamma globulina de conejo, y como control negativo el suero preinmune del mismo animal, cuya negatividad en cuanto a actividad F. R. había sido previamente controlada mediante el test de Látex.

Inmunodifusión (I. D.), e Inmunolectroforesis (I. E. F.), del suero inmune frente a la gamma globulina autóloga preinmune, desnaturalizada en igual grado a como se había utilizado en el proceso de inmunización.

El título de anticuerpos antiestreptococo se determinó por I. D. en gel de agar. Para la I. D. hemos seguido la técnica de Crowle⁶, modificada por Norman y Kagan¹³. La I. E. F. según técnica de Grabar¹⁰.

Absorción de los sueros antiestreptococo con Antígeno Bacteriano: los anticuerpos antiestreptococo fueron removidos por precipitación con antígeno estreptocócico, hasta conseguir que el sobrenadante no diese ninguna reacción por I. D. o I. E. F. frente al antígeno bacteriano. En general fueron necesarios 80 mg de antígeno por ml de suero para obtener una completa absorción.

Ultracentrifugación analítica: Realizada en Ultracentrifuga Spinco Modelo E (Beckman), con rotor analítico modelo D, sistema óptico de Schlieren. Las células han sido de sector simple cuando se pretendía calcular la constante de sedimentación de las muestras sometidas a centrifugación, y de sector compartimentado para separar la fracción IgC 7 S, de la más rápida IgM 19 S. Velocidad de centrifugación: 59.780 r.p.m. Las muestras sometidas a centrifugación fueron: a) Suero diluido al 1/2 en ClNa 0.15 M, b) Fracción gamma globulina obtenida de los inmunoseros tras doble proceso de precipitación con SO₄(NH₄)₂, con una con una concentración protéica de 10-15 mg/ml. Los coeficientes de sedimentación fueron determinados por el método diferencial.

Cromatografía: Se realizó cromatografía en Sephadex G-200 (Pharmacia, Upsala), con eluente ácido clorhídrico-glicocola 0.2 M, pH 3.0, con objeto de separar las fracciones gamma M y gamma G. Se ha seguido la técnica descrita por Bluestone y col.² La fracción gamma M aislada, tras ser restituida a su pH habitual por diálisis contra buffer fosfato sódico 0.15 M, pH 7.35, y posterior diálisis contra ClNa 0.15 M., fue concentrada por evaporación en tubo de diálisis a 4°C, hasta alcanzar una concentración de 1-1.5 mg/ml. La pureza de la fracción gamma M así obtenida, era controlada mediante ultracentrifugación analítica.

Curva de aclaramiento antigénico con gamma globulina autóloga marcada con I¹³¹: Cada animal fue inyectado por vía intravenosa con 5-10 mg de gamma globulina autóloga marcada con I¹³¹. El marcaje se realizó según la técnica de Talmage y Glaman²⁶. Después de la inyección cada 24 h, se recogía una muestra de sangre y orina de cada animal. Las muestras de 1 ml de suero y orina fueron leídas en un contador de centelleo "Well

Type". La lectura de la radioactividad sérica existente a las 24 h de la inyección, fueron consideradas el 100 % de radioactividad para cada animal determi-

nado. Con relación a este 100 %, se calculó el porcentaje de radioactividad sérica persistente en los días siguientes del experimento según la fórmula:

$$\% \text{ del día } n = \frac{\text{cuentas/min/ml de suero en el día } n \times 100}{\text{cuentas/min/ml de suero en el día } 1.^\circ}$$

Hemos determinado asimismo en cada animal lo que hemos denominado coeficiente —, en el cual el numerador corres-

- anticuerpos anti estreptococo.
- anticuerpos anti gamma globulina autóloga (F. R.).

ponde a cuenta/min/ml de orina eliminada en 24 h, y el denominador a cuentas/min/ml de suero existentes en el suero al cabo de estas 24 h. Durante la ejecución de las experiencias de aclaramiento antigénico, se realizó determinación diaria de proteinuria por el método de Biuret¹².

Técnicas histopatológicas: Se estudió en cada animal la cápsula sinovial de la articulación de la rodilla. Las sinoviales, tras fijación en formol, deshidratación, e incluso en parafina siguiendo técnicas standard, fueron teñidas con hematoxilina-eosina y examinadas al microscopio de luz.

RESULTADOS

1. Serie inmunizada con antígeno estreptocócico.

En la tabla I se exponen los resultados obtenidos. A las 5-6 semanas de comenzada la inmunización se pudo evidenciar en el 100 % de los casos la existencia de un F. R. demostrable por el test de Látex, hemaglutinación e I. D. (fig. 1). Los sueros tras su absorción con antígeno estreptocócico, continuaban en posesión de una prácticamente inalterada actividad F. R. (tabla II), demostrándose de esta forma la existencia en los inmunosueros de dos tipos diferentes de anticuerpos:

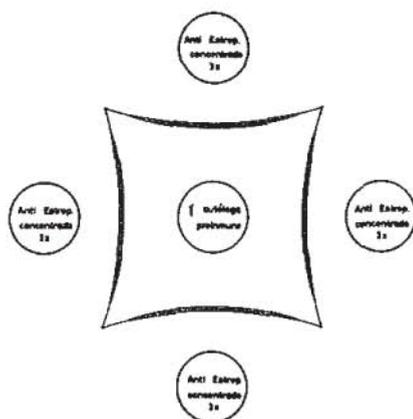
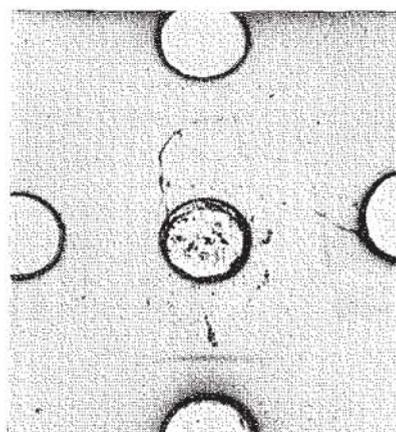


Fig. 1. Reacción de precipitación en agar, entre gamma globulina autóloga preinmune y suero inmune antiestreptococo, tras 48 h. de difusión.

TABLA I

EVIDENCIA DE ANTICUERPOS SERICOS CON CARACTERES DE F.R. EN LOS ANIMALES INMUNIZADOS CON ANTIGENO ESTREPTOCOCICO

Conejo n.º	Título de anticuerpos anti estreptococo (1)	Test de Látex	Título en hemaglutinación (2)	I. D. (3)	I. E. F. (3)
6	1/8	++++	1/160	Positiva	Negativa
8	1/16	++++	1/160	Positiva	Negativa
9	1/8	++++	1/160	Positiva	Negativa
10	1/16	++++	1/320	Positiva	Negativa
12	1/16	++++	1/1.280	Positiva	Negativa
35	1/8	++++	1/160	Positiva	Negativa
38	1/16	++++	1/160	Positiva	Negativa
39	1/16	++++	1/160	Positiva	Negativa

TABLA II

DEMOSTRACION DE LA INDEPENDENCIA DE LOS ANTICUERPOS CON ACTIVIDAD F.R. Y DE LOS ANTICUERPOS ANTI ESTREPTOCOCO

Conejo n.º	I.D. e I.E.F. frente a antígeno estreptocócico	Test de Látex	Título en Hemaglutinación
6	Negativas	++++	1/160
8	Negativas	++++	1/160
9	Negativas	++++	1/80
10	Negativas	++++	1/320
12	Negativas	++++	1/640
35	Negativas	++++	1/160
38	Negativas	++++	1/80
39	Negativas	++++	1/160

Resultados obtenidos actuando con los inmunoseros tras su absorción con antígeno estreptocócico.

Resultados correspondientes a la Serie A.

- (1) Determinado por I. D. en gel de agar.
- (2) Realizada frente a hematíes de carnero, sensibilizados con gamma globulina autóloga preinmune, sin desnaturalizar por calor.
- (3) Realizada con inmunosero concentrado 3X, frente a gamma globulina autóloga preinmune, sin desnaturalizar por calor.

2. *Series inmunizadas con gamma globulina autóloga.*

En la tabla III, se exponen los resultados obtenidos en las diferentes series. La existencia de un F. R. se hizo demostrable en un porcentaje variable de animales,

mediante el test de Látex, y en algunos casos por hemaglutinación, I. D., e I. E. F., estando siempre por este último método el arco de precipitación en la zona correspondiente a las gamma globulinas, (fig. 2). La respuesta a la inmunización

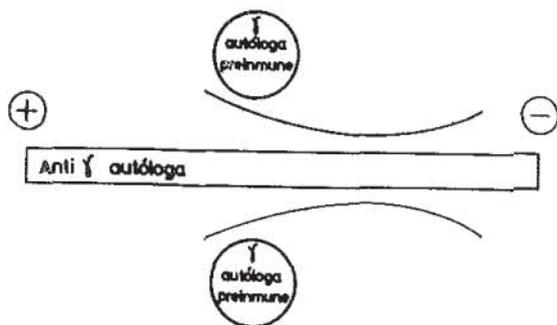
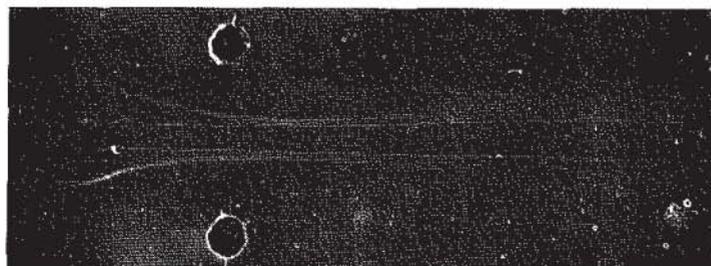


Fig. 2. I. E. F. en agar, entre el inmunosuero del animal n.º 2, y la gamma globulina autóloga preinmune del mismo animal, desnaturalizada por calentamiento a 100º C. (6-8 v./cm. de agar durante 75 minutos).

fue más intensa, cuanto mayor había sido la desnaturalización de la gamma globulina utilizada como antígeno.

3. *Caracterización físico-química del F. R. experimental*

En una muestra de gamma globulina perteneciente al animal n.º 1, la fracción

macroglobulina exhibió una constante de sedimentación de 22 S (fig. 3). Esta es la que clásicamente se ha atribuido a los complejos formados por una molécula de F. R. (19S), y 5-6 moléculas de IgG (7 S),⁹. En todas las demás muestras examinadas, la fracción macroglobulina exhibió una constante de 19S.

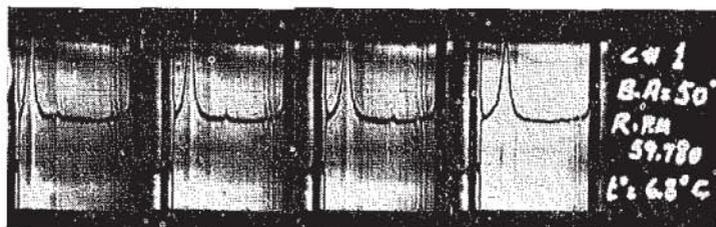


Fig. 3. Ultracentrifugación analítica de una muestra de gamma globulina, perteneciente al animal n.º 1 F. R. positivo. La fracción macroglobulina exhibe una constante de sedimentación de 22 S.

TABLE III
ANTICUERPOS SERICOS OBTENIDOS CON GAMMA - GLOBULINA

Animal n.º	Globulina desnaturalizada	Test de Látex	Título en hemaglutinación (1)	I. D. (2)	I. E. F. (2)
1	a 100° C	++++	1/160	+	+
2	"	++++	1/320	+	+
3	"	(-)	(-)	(-)	(-)
17	"	(-)	(-)	(-)	(-)
18	"	++	1/80	(-)	(-)
19	"	+	(-)	(-)	(-)
22	a 45° C	+++	1/360	(-)	(-)
23	"	(-)	(-)	(-)	(-)
26	"	(-)	(-)	(-)	(-)
27	"	(-)	(-)	(-)	(-)
28	"	+	(-)	(-)	(-)
31	"	(-)	(-)	(-)	(-)
32	"	(-)	(-)	(-)	(-)
33	"	++++	1/720	+	+
20	sin desnat.	(-)	(-)	(-)	(-)
21	"	+++	1/160	(-)	(-)
24	"	++	1/160	(-)	(-)
25	"	(-)	(-)	(-)	(-)
29	"	(-)	(-)	(-)	(-)
30	"	(-)	(-)	(-)	(-)
34	"	(-)	(-)	(-)	(-)

- (1) Hemaglutinación realizada con hematíes de carnero sensibilizados con globulina autóloga preinmune sin desnaturalizar por calor.
- (2) Realizadas frente a globulina autóloga preinmune desnaturalizado en igual grado a como se había utilizado en el proceso de inmunización.

Por ultracentrifugación en célula de sector compartimentado, aislamos la fracción IgG (fig. 4), y pudimos observar mediante test de Látex y hemaglutinación, que estaba desprovista de actividad

F. R., de donde deducimos que en nuestro trabajo los anticuerpos anti gamma globulina (F. R.), van ligados a la fracción 19 S.

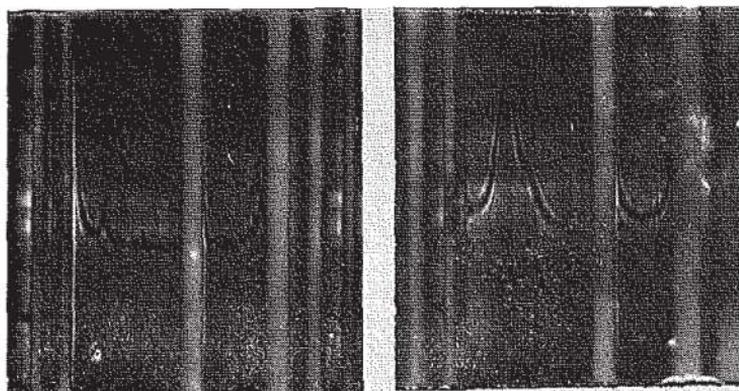


Fig. 4. Ultracentrifugación en célula de sector compartimentado, demostrando la separación de la fracción 7 S. Suero diluido al 1/2 en ClNa 0.15 M. Fotografías tomadas a los 4 y 44 min. respectivamente.

4. Series C₁ y D₁

Estos animales no habían mostrado ninguna respuesta serológica a la inmunización durante tres meses con gamma globulina autóloga, salvo en el n.º 22, en el

que el F. R. había estado presente durante 7 semanas, y posteriormente se había negativizado. En todos los casos, salvo en el n.º 34, al ser inmunizados con antígeno bacteriano, se hizo ostensible la existencia de un F. R. (tabla IV).

TABLA IV

DEMOSTRACION DE LA CAPACIDAD DEL ANTIGENO ESTREPTOCOCICO PARA INDUCIR LA PRODUCCION DE F. R. EN ANIMALES PREVIAMENTE INOCULADOS CON GAMMA GLOBULINA AUTOLOGA, ANTE LA CUAL NO HABIAN MOSTRADO NINGUNA RESPUESTA SEROLOGICA.

Conejo n.º	Título de anticuerpos anti estreptococo (1)	Test de Látex	Título en hemaglutinación (2)	I. D. (3)	I. E. F. (3)
22	1/8	++++	1/160	Positiva	Negativa
29	1/16	++++	1/160	Negativa	Negativa
31	1/16	++++	1/80	Negativa	Negativa
32	1/16	++++	1/160	Negativa	Negativa
34	1/8	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Resultados correspondientes a la serie C₁.

Resultados correspondientes a la serie D₁.

- (1) Determinado por I. D. en gel de agar.
- (2) Realizada con hemafes de carnero, sensibilizados con gamma globulina autóloga preimmune sin desnaturalizar por calor.
- (3) Realizada con inmunosuero concentrado 3X, frente a gamma globulina autóloga preimmune sin desnaturalizar por calor.

En todas las series estudiadas tuvo lugar un hecho inesperado, consistente en que el F. R. tras persistir circulante 6 u 8 semanas por término medio, desapareció en el 100 % de los casos. A partir de este momento, fue imposible detectarlo por ninguna de las técnicas utilizadas en nuestro estudio. Esta negativización del F. R. fue un hecho específico, y en los animales inmunizados con antígeno estreptocócico, los sueros, a pesar de haber perdido su actividad como F. R., continuaban en posesión del mismo título de anticuerpos anti estreptococo, tanto cuantitativa como cualitativamente, como pudimos observar por I. D. e I. E. F. (figs. 5 y 6). Esta negativización del F. R., tuvo lugar a pesar de no haberse interrumpido el proceso de inmunización. En la serie A, la negativización tuvo lugar precisamente a las 3-4 semanas de haberse reanudado la estimulación antigénica. Por consiguiente la negativización del F. R.,

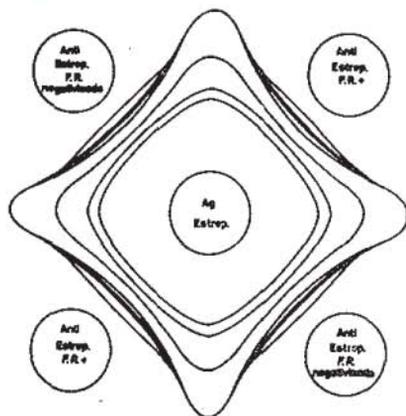
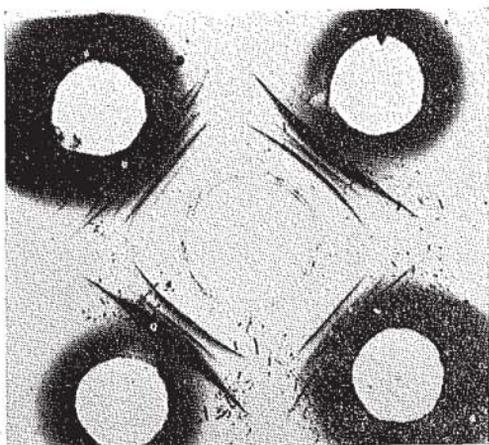


Fig. 5. I. D. en agar de un suero antiestreptococo, durante la fase de positividad del F. R., y tras la negativización de éste, frente al antígeno estreptocócico. Obsérvese la identidad de reacción de ambos sueros con el antígeno bacteriano.

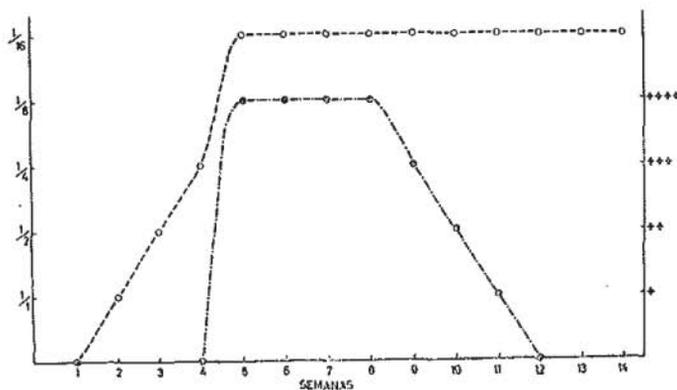


Fig. 6. Evolución del título de anticuerpos anti estreptococo determinado por I. D. en agar —ordenada izquierda—, y anticuerpos anti gamma globulina determinado mediante el test de Látex —ordenada derecha—, en los animales inmunizados con antígeno estreptocócico.

creemos no puede atribuirse a la ausencia de estímulo antigénico.

Ultimamente se viene insistiendo sobre la existencia de A. R. seronegativas por la existencia de un inhibidor sérico del F. R., que se inactivaría en condiciones de pH ácido. En estos casos la fracción gamma M aislada por cromatografía con eluyente ácido, tras ser restituida a su pH habitual, muestra intensa actividad F. R.²

Con objeto de estudiar si la negativización del F. R. en nuestras experiencias, era debida a la aparición de un inhibidor sérico de este tipo, realizamos cromato-

grafía de la fracción gamma globulina total de los sueros F. R. negativizado, con objeto de aislar la fracción gamma M en las condiciones ya indicadas (fig. 7), y esta fracción gamma M fue testada en cuanto a actividad F. R. por hemaglutinación, I. D. e I. E. F., dando una reacción negativa frente a la gamma globulina autóloga preinmune por todos estos métodos. Por tanto, no pudimos evidenciar la existencia de un inhibidor sérico responsable de la negativización del F. R. La posibilidad de que esta negativización fuese debida a una saturación de la capacidad reactiva del F. R. por la IgG circulante, tampoco nos parece ade-

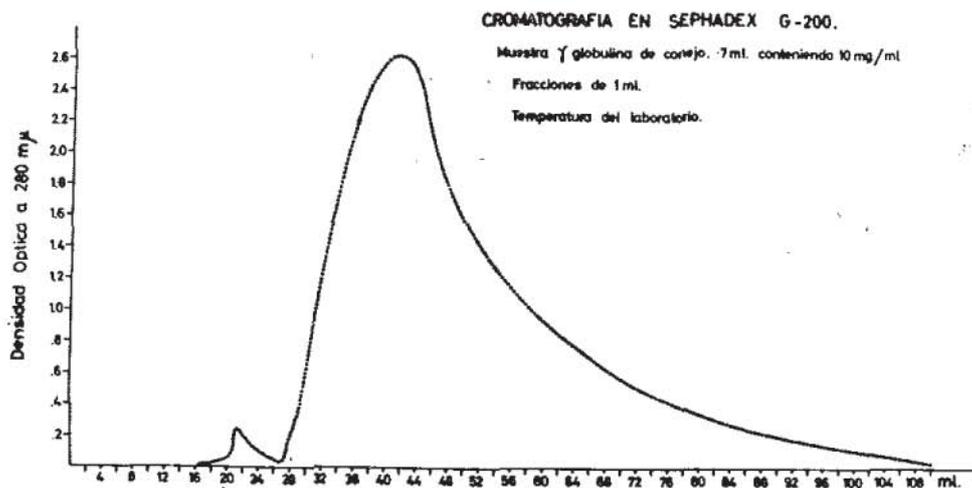


Fig. 7. Cromatografía en Sephadex G-200, de una muestra de gamma globulina procedente de un suero F. R. negativizado. Eluyente ácido clorhídrico-glicocola pH 3.0.

cuada, pues en ese caso la fracción gamma M aislada, hubiese debido mostrar su actividad como F. R. Por otra parte si este supuesto fuese cierto, se hubiesen debido observar por ultracentrifugación analítica los típicos complejos 22 S, re-

sultantes de la agregación del F. R., y la IgG. Sin embargo, en todas las muestras de suero y gamma globulina examinadas, correspondientes a los animales F. R. negativizado, la fracción macroglobulina exhibió una constante de sedimen-

tación de 19 S (fig. 8), y en ningún caso pudimos observar tales complejos 22 S.

5. *Aclaramiento de la gamma globulina marcada con I^{131}*

Establecimos, en primer lugar, una curva patrón realizada en animales normales, con objeto de referir a ella los valores hallados para los animales F. R. positi-

vos, y F. R. negativizado. En los animales normales, y expresándonos en valores medios, persistía circulante un 62,26 % del antígeno al 2.º día, un 47,04 % al 3.º día, y un 37,00 % al 4.º (fig. 9). El valor del cociente O/S era de 0.627, indicándonos la escasa eliminación urinaria del radioelemento.

En los animales F. R. negativizado, la curva de aclaramiento fue prácticamente

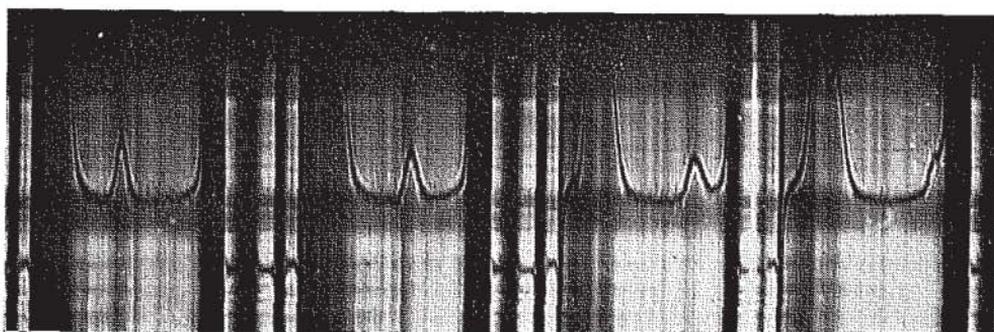


Fig. 8. Ultracentrifugación analítica de un suero F. R. negativizado, diluido al 1/2 en C1Na 0.15 M., perteneciente al animal n.º 10. La facción macroglobulina exhibe una constante de sedimentación de 19 S. Fotografías tomadas a los 24, 32, 40 y 48 min.

igual que en los controles (fig. 9), persistiendo un 63,30 % de antígeno circulante al 2.º día, un 47,19 % al 3.º, y un 35,64 % al 4.º, siendo el valor del cociente O/S 0.644.

Por el contrario, los animales F. R. positivos, muestran una eliminación mucho más rápida del antígeno marcado (fig. 9), con una persistencia de sólo un 30,88 % al 2.º día, un 11,49 % al 3.º día, y un 6.27 % al 4.º. La diferencia entre ambos tipos de curva es estadísticamente significativa ($p < 0.01$). El valor del cociente O/S fue de 23,316, mucho más elevado que en los controles y en los

animales F. R. negativizado, siendo éste expresión indirecta de la intensa eliminación sérica existente en estos animales F. R. positivos del antígeno marcado. En la tabla V se exponen, comparativamente, los resultados del cociente O/S y la determinación de proteinuria en los diferentes animales, durante la ejecución de la curva de aclaramiento antigénico. Se puede observar cómo no existe correlación alguna entre grado de proteinuria y eliminación urinaria de radiactividad. A la vista de estos datos, podemos excluir el que la eliminación urinaria del radioelemento, venga condicionada por la proteinuria. El diferente grado de eliminación del antígeno marcado, se hace

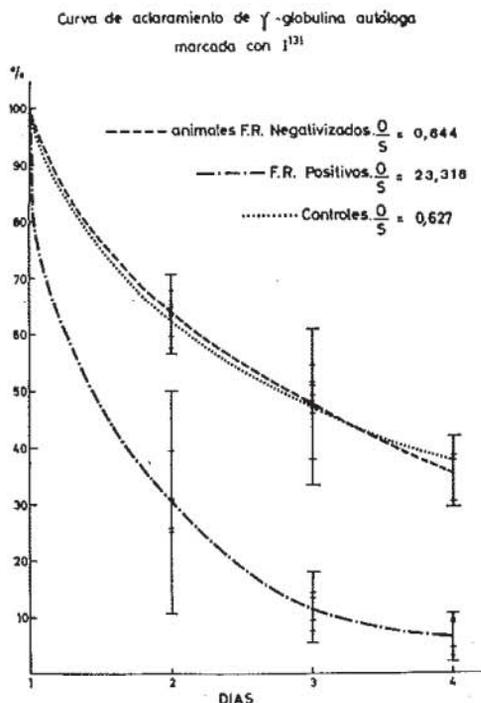


Fig. 9. Representación de la curva de aclaramiento antigénico de gamma globulina autóloga, en los animales control, en los F. R. positivo, y en los F. R. negativizado.

TABLA V

EXPOSICION COMPARATIVA DE LOS VALORES MEDIOS DEL COCIENTE $\frac{O}{S}$ Y PROTEINURIA EN CADA ANIMAL DURANTE LA EJECUCION DEL ESTUDIO DE ACLARAMIENTO DE GAMMA GLOBULINA AUTOLOGA MARCADA CON ^{131}I .

Conejo n.º	F. R.	Proteinuria mg %	Cociente
			$\frac{O}{S}$
21	Negativizado	63 mg	0.29
22	Positivo	57 mg	23.37
23	Positivo	72 mg	27.18
28	Negativizado	48 mg	1.36
29	Positivo	93 mg	2.05
31	Positivo	112 mg	7.24
31	Negativizado	85 mg	0.477
32	Negativizado	107 mg	0.678
34	Sin respuesta F. R.	0 mg	0.415
35	Positivo	75 mg	51.85
35	Negativizado	45 mg	0.530
38	Negativizado	96 mg	0.76
39	Positivo	78 mg	28.21
43	Control normal	0 mg	0.391
44	Control normal	0 mg	0.363

especialmente ostensible si examinamos la curva de aclaramiento en un mismo animal, durante la fase de positividad del F. R., y tras su negativización (fig. 10).

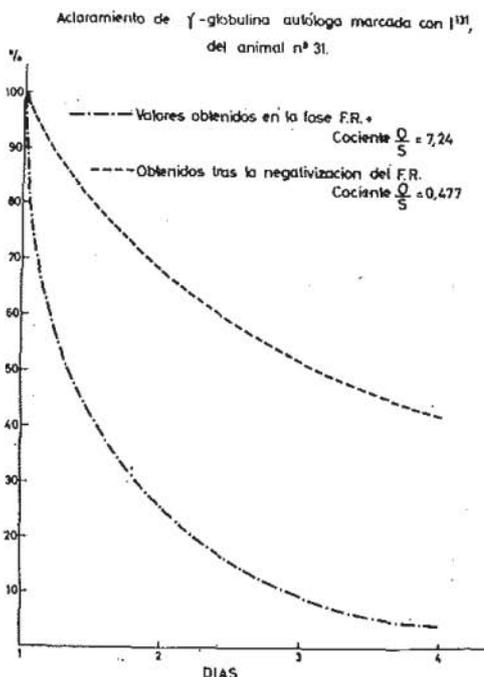


Fig. 10. Curva de aclaramiento de gamma globulina autóloga en el animal n.º 31 durante la fase de positividad del F. R. y tras la negativización del mismo.

6. Inducción de Artritis Experimental

En un caso —animal n.º 10 F. R. positivo— se pudo observar una artritis, con existencia de un tejido de granulación y abundante infiltración, constituida por linfocitos y células plasmáticas (fig. 11).

Esta artritis es comparable a la existente en las fases precoces de la A. R. humana. En el resto de los casos, tanto en los que el examen anatomopatológico se realizó durante la fase de positividad del F. R., como en aquellos en que se realizó tras su negativización, las cápsulas sinoviales fueron consideradas histológicamente normales, salvo en el n.º 17 —sin respuesta F. R.— y en el n.º 33 —F. R. negativizado—, en los que se observó una artritis inespecífica, con un infiltrado in-

flamatorio constituido, casi exclusivamente, por polinucleares neutrófilos.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que, tanto por inmunización con antígeno bacteriano, como con gamma globulina autóloga desnaturalizada, se induce la producción de anticuerpos, capaces de reaccionar con la gamma globulina autóloga y heteróloga, y, por tanto, con la característica biológica fundamental del F. R.². Estos anticuerpos en el caso de los animales inmunizados con antígeno estreptocócico, son diferentes de los anticuerpos antibac-

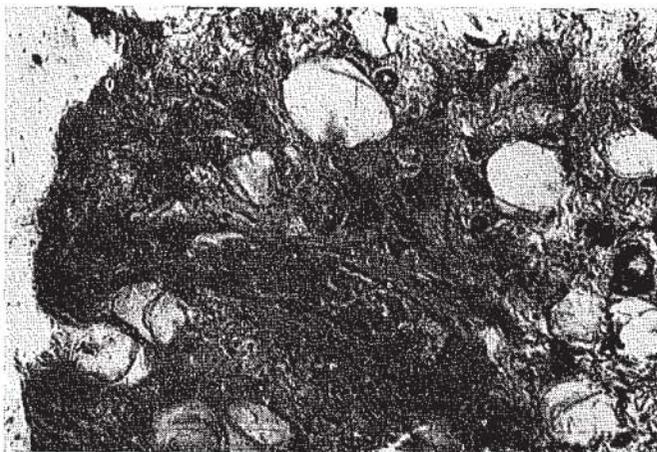
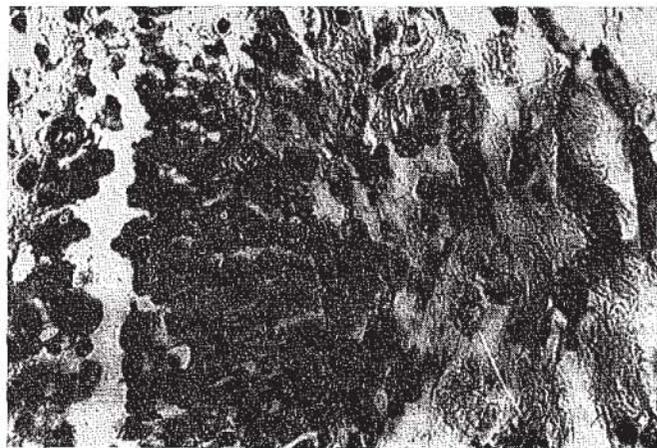


Fig. 11. Lesiones histopatológicas halladas en la cápsula sinovial de la rodilla de animal n.º 10. La infiltración celular está constituida por linfocitos y células plasmáticas.

terianos, como hemos podido demostrar por la persistencia de la actividad F. R., tras la absorción de los inmunoseros con el antígeno bacteriano. En este aspecto, nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores, tales como Abruzzo y Christian^{1,5}, y Eyquem y col.⁷.

El F. R. experimental va ligado en nuestras observaciones a la fracción IgM 19 S. La producción de F. R. en las diferentes series de animales, la interpretamos sobre la base de que la molécula de gamma globulina autóloga, sufriría una altera-

ción estructural que la convertiría en autoantigénica, desencadenándose subsiguientemente la formación de autoanticuerpos anti gamma globulina (F. R.). Esta desnaturalización vendría condicionada en el caso de los animales inmunizados con antígeno bacteriano, por la reacción del antígeno con el anticuerpo antibacteriano (Ac), según la hipótesis sustentada por Najjar²¹; y en el caso de los animales inmunizados con su propia gamma globulina, creemos al igual que Milgrom y Witebsky¹⁸, y Williams y Kunkel³⁰, que la alteración estructural sería producida por la desnaturalización

que el simple hecho de su obtención por precipitación salina, y los procesos de congelación y descongelación a que es sometida durante su utilización. A esta desnaturalización, se sumaría la producida intencionadamente por la acción del calor.

Hemos encontrado que la intensidad de la respuesta inmune, está en relación directa con el grado de desnaturalización sufrido por la molécula de gamma globulina, habiendo sido más intensa en aquellos que fueron sensibilizados con gamma globulina intensamente desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 1/2 h. La existencia de un F. R. circulante, únicamente en un caso coincidió con una artritis equiparable a la encontrada en las fases precoces de la A. R. humana⁴. Sin embargo, dado que el F. R. sólo persistió circulante 6-8 semanas, negativizándose al cabo de este tiempo, no nos consideramos autorizados para deducir una conclusión en este sentido, pues cabe pensar que de haber persistido durante más tiempo, hubiese sido capaz de inducir artritis en mayor número de animales.

La negativización del F. R., la interpretamos en base a nuestros estudios de aclaramiento antigénico, como producida por el establecimiento de un estado de parálisis inmunológica selectiva hacia la gamma globulina autóloga desnaturalizada. En efecto, hemos podido observar como en los animales F. R. negativizado, la eliminación del antígeno se realizó siguiendo un patrón idéntico al de los animales control, indicando que su eliminación de la circulación viene condicionada exclusivamente por los procesos fisiológicos de catabolismo a que está sometida la gamma globulina al ser un componente normal de la economía.

En los animales F. R. positivo, la eliminación de la gamma globulina autóloga marcada con I¹³¹ es mucho más rápida,

debido a la existencia de una tasa de eliminación inmunológica, por la existencia de anticuerpos dirigidos contra ella (F. R.) que condicionan su rápido aclaramiento de la circulación, y en consecuencia, la intensa eliminación del radioisótopo por la orina.

El que este fenómeno de negatividad del F. R. no se haya presentado en trabajos similares, tales como los de Williams y Kunkel³⁰, Milgrom y Witebsky¹⁸ y McCluskey¹⁶, creemos puede ser debido a que en ninguno de estos experimentos, se llegó a administrar a ningún animal la dosis mínima de gamma globulina autóloga que ha sido necesaria en los nuestros para inducir este estado de parálisis, y que ha oscilado según los diferentes animales entre 80 mg como mínimo, y 270 mg como máximo. En este sentido, es conocida la importancia que tiene la dosis del antígeno administrada, en la producción de un estado de tolerancia¹⁹.

Desconocemos las razones por las que esta negativización del F. R. tampoco tuvo lugar en las experiencias de Abruzzo y Christian^{1,5}, en animales inmunizados con gérmenes gram negativos. Quizás sea debido al diferente antígeno bacteriano utilizado en su trabajo, y a la diferente pauta y vía de inmunización utilizada por este autor.

El hecho tan constante en nuestras experiencias de la negativización del F. R., debido al posible establecimiento de una parálisis inmunológica frente a la gamma globulina autóloga estructuralmente alterada, contrasta vivamente con el de los enfermos de A. R., los cuales muestran títulos persistentemente elevados de F. R. y en los que, por tanto, no se establece una parálisis o tolerancia inmunológica frente a su propia gamma globulina estructuralmente alterada. Esta diferencia de comportamiento ante un autoantígeno entre el animal normal y el enfermo de A. R., junto con el hecho de

la existencia de múltiples autoanticuerpos en estos enfermos, tales como anticuerpos antinucleares²⁷, y anti tiroideos¹¹, nos induce a pensar que quizás el trastorno fundamental en la O. R., residiría en una alteración de los mecanismos reguladores de la inmunidad, que impediría el establecimiento de un estado de tolerancia frente a un autoantígeno. Como conse-

cuencia, se producirían una serie de fenómenos autoinmunes que al autopertuarse, conducirían a la enfermedad autoinmune.

En la actualidad, tenemos en preparación una serie de trabajos orientados en este sentido, al objeto de comprobar si la hipótesis anterior es o no verosímil.

SUMMARY

Experimental rheumatoid factor production

Antibodies with physical and biological characteristics, the same as those of RF, have been produced by immunizing rabbits with either an antigenic extract of hemolytic streptococci group A or denatured autologous gamma globulin. The activity of the RF was closely tied to the Ig M fraction having a sedimentation constant of 19 S. Through I¹³¹ marked antigen clearance studies it was shown

that in all cases the RF became non reactive six to eight weeks after its appearance. This phenomenon was explained on the basis of an immunological paralysis triggered by a structurally altered autologous gamma globulin. The possibility of a fundamental disturbance in the tolerance regulating mechanisms has been suggested as an etiological factor in RA.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABRUZO, J. L. y C. L. CHRISTIAN. *J. Exp. Med.*, 114: 791, 1961.
2. BLUESTONE, R., L. S. GOLDBERG y A. CRACCHIOLO. *Lancet*, 878, 1969.
3. BRIDGES, R. A. y R. A. GOOD. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 86: 1089, 1960.
4. COOPER, N. S. *Med Clin. N. Amer.*, 52: 607, 1968.
5. CRISTIAN, C. L. *J. Exp. Med.*, 118: 827, 1963.
6. GROWLE, A. J. *J. Lab. Clin. Med.*, 52: 784, 1958.
7. EYQUEM, A., J. N. GUYOT y L. PODLIACHOUK. *Ann. Inst. Pasteur*, 96: 295, 1959.
8. FIDALGO, V. B., V. A. NAJJAR y J. C. OVERALL. *Hopkins Med. J.*, 121: 73, 1967.
9. GLYNN, L. L. y E. J. HOLBOROW. *Autoimmunity and Disease*. Pág. 135. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1965.
10. GRABAR, P. y P. BURTIN. *Immuno-electroforesis*. Toray-Masson, Barcelona, 1968.
11. HIJMANS, W., D. DONIACH, I. M. ROIT y E. J. HOLBOROW. *Brit Med. J.*, 2: 908, 1961.
12. KABAT, E. A. y M. M. MAYER. *Experimental Immunochemistry*. Pág. 559. Charles C. Thomas, Springfield, 1964.
13. KAGAN, I. G. y L. NORMAN. *Amer. J. Trop. Med.*, 10: 727, 1961.
14. KUNKEL, H. G. y R. C. WILLIAMS. *Ann. Rev. Int. Med.*, 15: 37, 1964.
15. LEWIS, W. P. y J. S. KESSEL. *Arch Ophthalmol.*, 66: 471, 1961.
16. MCCLUSKEY, R. T., R. MILLER y B. BENACERRAF. *J. Exp. Med.*, 115: 253, 1962.
17. MILGROM, F., E. WITEBSKY, R. GOLDSSTEIN y V. LOZA. *J. A. M. A.*, 181: 476, 1962.
18. MILGROM, F. y E. WITEBSKY. *J. A. M. A.*, 174: 56, 1960.
19. MITCHINSON, N. A. *Regulation of the antibody response*. Pág. 54. Editado por Cinnader, Charles C. Thomas. Springfield, 1968.
20. MOSKOWITZ, R. W. *Clin Med. N. Amer.*, 52: 263, 1968.
21. NAJJAR, V. A. *Physiol. Rev.*, 42: 243, 1963.
22. PETERSON, R. y R. A. GOOD. *Ann. Rev. Med.*, 14: 1, 1963.

23. RAWSON, A. J., N. M. ABELSON y J. L. HOLLANDER. *Ann. Int. Med.*, 62: 281, 1965.
24. SINGER, J. M. y Ch. M. PLOTZ. *J. A. M. A.*, 168: 180, 1958.
25. SVART, N., L. A. CARSON, K. SCHLOSSMAN y A. ERHENBERG. *Acta Med. Scand.*, 160: 87, 1958.
26. TALMAGE, D. W. y GLAMAN. *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Vol. I, pág. 390. Academic Press, Nueva York, 1968.
27. WHEIR, D. M., M. A. HOLBOROW y G. D. JONSHON. *Brit. Med. J.*, 1: 933, 1961.
28. WILLIAMS, C. A. y M. W. CHASE. *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Pág. 20. Academic Press, Nueva York, 1968.
29. WILLIAMS, R. C. y H. G. KUNKEL. *J. Clin. Inv.*, 41: 666, 1962.
30. WILLIAMS, R. C. y H. G. KUNKEL. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 112: 554, 1963.