

11262  
1  
rej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO.

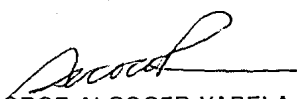
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS. SEDE SUR.

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN".

ESTUDIO DE LAS CITOCINAS (IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , y FNT  $\alpha$ )  
EN SANGRE, Y EN CAVIDAD ARTICULAR DE PACIENTES CON  
ARTRITIS REUMATOIDE.

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Médicas presenta:

OLIVA ORTIZ ALVAREZ.



Asesor: DR. JORGE ALCOCER VARELA.  
Co-asesor: DR. LUIS LLORENTE PETERS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

## INTRODUCCION.

Las enfermedades del tejido conectivo, fueron agrupadas inicialmente por Klemperer y cols. (1) basados en la lesión de los componentes extracelulares del tejido conectivo, que parecían ser afectados primariamente en estas enfermedades. Actualmente y como producto del estudio sistemático de ellas, se puede decir que las enfermedades del tejido conectivo en el humano, son el resultado de diversos trastornos de la inmunidad y que existe una alteración particular para cada una de ellas en cuanto al desarrollo de autoinmunidad (2-5).

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades más importantes del tejido conectivo en el humano que se caracteriza por inflamación crónica y cuya manifestación principal es el desarrollo de artropatía destructiva, si bien la patogenia no se limita a las articulaciones ya que con frecuencia se suelen afectar otros aparatos y sistemas (6-8).

### Etiología.

No cabe duda que varios mecanismos inmunológicos están íntimamente involucrados en la patogenia de la AR, sin embargo y pese a los recursos metodológicos actuales se desconoce aún la etiología de la misma. En los últimos años se ha intentado explicar la patogenia de la AR; se cree que la presentación de un antígeno relevante a un huésped genéticamente susceptible "dispara" la enfermedad. Se ha atribuido el papel de factor desencadenante a agentes infecciosos exógenos como virus, micobacterias

o fragmentos de la pared celular de algunas bacterias y a antígenos endógenos como colágena tipo II, proteoglicanos, moléculas DR e inmunoglobulinas alteradas (9-15).

- Agentes exógenos. El virus de Epstein-Barr se ha relacionado por más de 10 años como agente etiológico de la AR, debido a que se ha observado que el 80% de los pacientes con AR tienen anticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos específicos del virus y, al parecer, la respuesta a estos antígenos virales favorece la producción de los autoanticuerpos característicos de la enfermedad. (9-12).

Por otra parte, el virus de Epstein-Barr es un activador policlonal de los linfocitos B y por ello podría conducir a la sobreproducción de inmunoglobulinas, incluyendo al factor reumatoide. De hecho, se ha demostrado que los pacientes con AR presentan un porcentaje elevado de células B circulantes infectadas por el virus. El interés por relacionar al virus de Epstein-Barr con la AR ha resurgido con el concepto de "mimetismo molecular", ya que los anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína viral gp 110, reconocen la misma secuencia de péptidos en las cadenas beta de las moléculas DR4 y DR1 que pertenecen a la clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). El mimetismo molecular es el resultado del reconocimiento antigénico de la proteína viral gp 110 por parte de las células T en individuos con HLA DR4 y DR1. Así, en un intento por mantener la tolerancia a los antígenos propios, hay una respuesta citotóxica disminuída o nula por parte de las células T hacia el virus y las células infectadas por éste, dando con ello una expresión anormal de la infección que se manifestaría como AR (9, 15-18).

Otra de las áreas importantes de investigación con respecto a la etiología de esta

enfermedad ha relacionado a las micobacterias con la AR. Existen evidencias experimentales que demuestran que las micobacterias expresan proteínas de choque térmico, las cuales son factores artritogénicos en algunos modelos animales. Por otro lado se ha encontrado que los individuos con AR tienen títulos elevados de anticuerpos contra las proteínas de choque térmico (PCT) de las micobacterias. Además de esto, se suma el hecho de que en el líquido sinovial de estos pacientes hay un gran número de linfocitos T dobles negativos (CD4 y CD8 neg) que expresan el receptor T gamma-delta, que proliferan en respuesta a las PCT de las micobacterias. Así cabrían dos explicaciones al respecto, por un lado, el que la expresión de las proteínas de choque térmico sea tan solo una reacción de fase aguda y, por el otro, que la proliferación de los linfocitos T dobles negativos sea amplificada y perpetuada por la reactividad cruzada contra las proteínas de estrés de las células sinoviales (semejantes antigénicamente a las PCT) por el mecanismo de mimetismo molecular. Las investigaciones en esta área relacionan estas evidencias con la generación de la AR (19, 20).

- Agentes endógenos. Sin duda los fenómenos autoinmunes perpetúan el daño tisular en la AR, aunque no existen evidencias suficientes que apoyen que éstos sean la causa inicial de la enfermedad. La colágena y la inmunoglobulina G son las proteínas endógenas que con más frecuencia se han implicado en los fenómenos de autoinmunidad. La colágena es una causa directa de artritis en modelos animales experimentales, sin embargo, los datos de estudios en humanos no concuerdan con estas observaciones, ya que si bien es cierto que los pacientes con AR tienen títulos

elevados de anticuerpos contra colágena tipo II tanto en su forma nativa como desnaturalizada, éstos no preceden al cuadro clínico de la enfermedad. Por lo tanto, es probable que, cuando la sinovitis proliferativa invade y destruye el cartílago se despierte una respuesta inmune contra los epítopes de las porciones degradadas de la colágena. Luego, los complejos antígeno-anticuerpo junto con otros complejos (e.g. factor reumatoide), se precipitarían en las capas superficiales del cartílago funcionando, además, como quimioatrayentes para el tejido invasor (21-24).

El factor reumatoide usualmente acompaña a la enfermedad y se considera como factor de riesgo en ella, pero no hay evidencias sólidas que lo señalen como factor causal de la misma, por lo tanto, y como ya se mencionó, solo puede considerarse como un amplificador de la respuesta inflamatoria en la sinovitis reumatoide (24,25).

### **Histopatología.**

Normalmente la membrana sinovial es una capa delgada de tejido que recubre las superficies internas de las articulaciones. La capa de sinoviocitos se localiza entre la cavidad articular y los fibroblastos y tejido adiposo subyacente (subsinoia) y consiste de una a tres células de grosor. La composición celular de la membrana sinovial es heterogénea tanto en condiciones de normalidad como en enfermedad e incluye células que semejan a los macrófagos (sinoviocitos tipo A), células similares a los fibroblastos (sinoviocitos tipo B) y células dendríticas (26,27). En las articulaciones de

pacientes artríticos hay aumento en el grosor de la capa de células sinoviales, falta la demarcación de los límites de la membrana sinovial y frecuentemente existe una infiltración imperceptible de éstas células dentro de la subsinovia. Parece ser que en los fenómenos iniciales de la lesión reumatoide existe daño a la microvasculatura, edema de los tejidos subsinoviales y proliferación de las células sinoviales. El desarrollo de una extensa red de nuevos vasos sanguíneos es primordial para el desarrollo de la sinovitis reumatoide. Coincidiendo con esta neovascularización de la membrana, los linfocitos circulantes se adhieren al endotelio de las vénulas postcapilares sinoviales y, posteriormente, migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos y se agregan en forma característica alrededor de ellos y por debajo de la superficie sinovial (28,29).

La hiperplasia del tejido sinovial, así como la destrucción de la matriz extracelular, son hallazgos histopatológicos característicos de la AR. Estos fenómenos son consecuencia del incremento del número de los sinoviocitos tipo B, mismos que secretan concomitantemente mayor cantidad de productos involucrados en la destrucción tisular como prostaglandinas y colagenasas. Notablemente en la articulación reumatoide, el cartilago es invadido por éstos elementos tisulares agresivos que conducen, finalmente, a la destrucción articular. Además de este infiltrado, existe otro, acaso más importante, que consiste de un gran número de linfocitos T y macrófagos activados en la membrana sinovial circundante. Estas células son capaces de reclutar y/o influenciar a otros elementos (e.g. fibroblastos, células B, etc.) por medio de las citocinas que secretan, del tal forma que se favorece la hiperplasia sinovial, la angiogénesis, la proliferación y la diferenciación de las células B a células formadoras

de anticuerpos, lo que en suma, caracteriza a las sinovitis tempranas en AR (30-32).

### **Fisiopatología.**

En la actualidad aún se desconoce el mecanismo que lleva a la cronicidad de la sinovitis característica de la AR. No obstante esto, la mayoría de los investigadores coinciden en señalar a los macrófagos y sus productos solubles y en menor grado a los linfocitos T como los posibles responsables del daño tisular. Las razones son múltiples y procede comentarlas por separado.

- Linfocitos T. Como ya se ha mencionado, existe un importante infiltrado de linfocitos T en la membrana sinovial de los pacientes con AR. La presencia de estas células sugiere que opera un mecanismo antígeno-dependiente que conduce a la activación y proliferación de éstas, de tal manera que las células T antígeno específicas secretarían linfocinas reguladoras capaces de perpetuar el daño. A pesar de esto, muy poco es lo que se le puede atribuir al linfocito T como el responsable de lo que se observa en AR y esto se apoya en gran cantidad de observaciones y evidencias experimentales (31-36) a saber: a) no se ha encontrado gran densidad de expresión de antígenos de activación ( e.g. receptores de transferrina, receptores de IL-2) en la membrana de las células T. Más aún, el nivel del RNA mensajero que codifica para el receptor de IL-2 es similar al que expresan las células de sangre periférica en reposo. Todo lo anterior sugiere bien un estado de reposo o bien un estado de post-activación, b) los productos característicos de las células T activadas (IL-2, IL-3, IL-4 e IFN gamma)



no se encuentran en concentraciones importantes en el líquido sinovial de los pacientes con AR, c) no se ha observado restricción clonal de las células T presentes en sinovia, lo que sugiere ausencia de especificidad a un antígeno particular.

- Macrófagos. Contrariamente a lo que se observa en las células T, los macrófagos que infiltran la sinovia presentan marcadores francos de activación y gran cantidad de producción de citocinas, lo que sugiere que la activación de los macrófagos y la liberación de sus productos son parte fundamental de la lesión en AR. De esta forma, la reacción inflamatoria se iniciaría con la activación de los macrófagos del intersticio sinovial, los cuales, al interactuar con los linfocitos y en presencia de un antígeno, darían inicio a la secreción de citocinas con la consiguiente activación de las células sinoviales para producir prostaglandinas y colagenasas. Así, la inflamación y la consecuente sinovitis en la articulación, se mantendrían con factores solubles producidos por los macrófagos y fibroblastos sinoviales tanto en forma autócrina como parácrina (figura 1)(39-43).

- Factores solubles. Otra de las importantes áreas de investigación en la AR se ha centrado en los diversos mecanismos de interacción entre macrófagos, linfocitos y células endoteliales con las de citocinas y el efecto del resultado de esta interacción sobre la cavidad articular ya que ésta se considera el órgano blanco de lesión en AR (44-49). La mayoría de los estudios realizados se han enfocado a evaluar los efectos de citocinas individuales, aunque los hay también que han estudiado el o los efectos de varias citocinas en conjunto.

Los resultados de los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que el papel

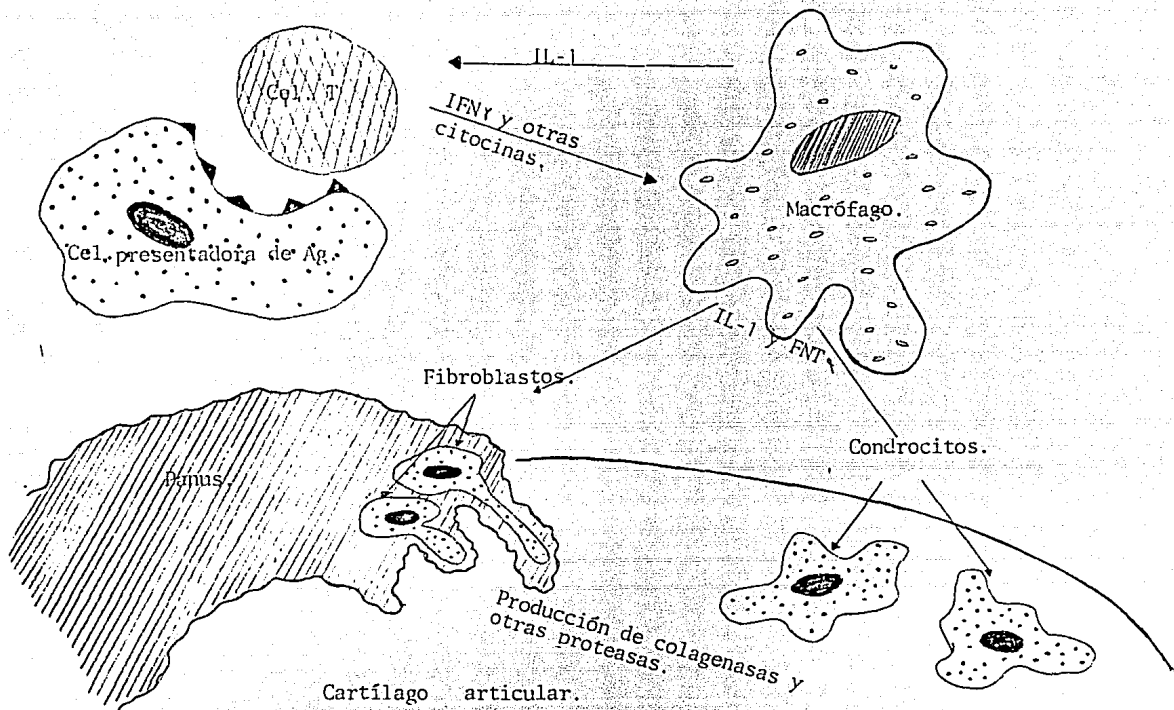


Figura 1. Efectos de las citocinas en las interacciones célula-célula, que favorecen la sinovitis reumatoide.

IL-1 = interleuquina 1. FNT $\alpha$  = factor de necrosis tumoral alfa.  
 IFN $\gamma$  = interferon gama.

fisiopatológico de las citocinas en la lesión sinovial puede resultar de una producción excesiva o bien de inhibición inadecuada de su producción. Por tanto, los efectos netos serían el resultado de la suma algebraica de las concentraciones relativas de varias citocinas y sus respectivos inhibidores en el ambiente pericelular (49-55).

Dentro de las citocinas que se han investigado en relación con el daño articular se encuentra en primer lugar la interleuquina (IL)-1, la cual tiene un peso molecular de 17 Kd, y es producida principalmente por los monocitos y macrófagos, aunque hay otros tipos celulares capaces de producirla. Se han descrito dos tipos de la molécula, la IL-1 beta -la principal forma de secreción de los monocitos humanos que representa el 90% de la totalidad de IL-1 en los sobrenadantes de los cultivos de células estimuladas-, y la IL-1 alfa -molécula generalmente anclada en la membrana-. Ambas isoformas comparten el mismo receptor celular en las células blanco y promueven el mismo espectro de actividades biológicas; sin embargo, se unen con afinidades diferentes a sus receptores, los cuales, además, pueden ser expresados en forma diferencial en los diversos tipos celulares (55-57).

Por lo que respecta a sus actividades biológicas, la IL-1 produce efectos generalizados a través de su acción sobre el sistema nervioso central, médula ósea y vasos sanguíneos. Sin embargo, en AR sus efectos locales son los más importantes y entre estos se incluye el aumento de las funciones de los linfocitos T y B así como la quimiotaxis de neutrófilos, linfocitos y monocitos. De igual forma, promueve además la proliferación de los fibroblastos, así como la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y colagenasa por estos y por los condrocitos sinoviales. Como la gran mayoría de

las IL descritas, la IL-1 es también capaz de promover la secreción de otras citocinas (57,58).

En las etapas tempranas de la lesión reumatoide la IL-1 puede favorecer la migración de otras células y estimular diversas respuestas en las células endoteliales, como la expresión de moléculas de adhesión celular (e.g. ICAM-1, ELAM) y la inducción de antígenos asociados con la función linfocitaria, sobre todo LFA 3 (55-59). En fases tardías, sus efectos sin embargo son más amplios e incluyen la promoción de la reabsorción ósea y la alteración de la síntesis de colágena en condrocitos, i.e., bajo su estímulo éstos pasan de sintetizar colágena tipo II a colágena tipo I y III. Asimismo, actúa directa e indirectamente sobre los fibroblastos haciéndolos proliferar por un lado e induciendo la síntesis de factores de crecimiento por el otro. En esta fase por tanto se tiene como consecuencia, reabsorción ósea, destrucción del cartilago, fibrosis, cicatrización y debilidad articular debida a la síntesis anormal de colágena (60-63).

Otra citocina que se ha involucrado importantemente en el daño articular en la AR es el factor de necrosis tumoral (FNT). Esta citocina es una proteína glicosilada de 157 aminoácidos, con peso molecular de 17 Kd. Al igual que la IL-1, existe en dos isoformas, el FNT alfa -uno de los principales productos de secreción de los macrófagos- y el FNT beta -producido principalmente por linfocitos-. El FNT alfa se sintetiza y secreta simultáneamente con la IL-1, aunque el control de la síntesis y secreción de ambas parece ser regulado en forma independiente, ya que cuando los monocitos maduran a macrófagos, disminuye su capacidad de secretar IL-1, mientras que la producción de FNT no se afecta. El FNT comparte muchas de las actividades

biológicas con la IL-1, pero se une a receptores diferentes.

Las diversas actividades biológicas del FNT incluyen efectos antivirales y antineoplásicos. Es un importante modulador de la respuesta inflamatoria y de la generación de los reactantes de fase aguda. Sus acciones sobre el crecimiento de diversas estirpes celulares pueden ser estimuladoras (fibroblastos) o inhibitoras (células neoplásicas). Se ha observado también que promueve la diferenciación celular, modulando la expresión de antígenos de superficie. Sobre el tejido conectivo favorece la activación de los fibroblastos con lo que induce en ellos la expresión de moléculas DR , proliferación y producción de prostaglandinas y colagenasas, con los que se explica el daño articular (63-65).

Tanto la IL-1 como el FNT alfa actúan de forma autócrina sobre los macrófagos para promover su propia transcripción, así como la producción del uno por el otro (65-67).

El interés por el estudio del FNT alfa y la IL-1 proviene de estudios previos que han encontrado concentraciones elevadas de estas citocinas en la cavidad articular de pacientes con artritis. Estos estudios carecen por un lado de la comparación respectiva de lo que ocurre a nivel articular con la sangre periférica, o bien se han encausado a comparar las concentraciones de IL-1 alfa, beta y FNT alfa por separado en ambos compartimentos, sin hacer la correlación respectiva de las concentraciones de ellas en ambos sitios. Dado que las alteraciones inmunológicas que se encuentran en la sangre de los pacientes con AR son mínimas si se les compara con las alteraciones de la cavidad articular y debido a que la lesión reumatoide parece ser la resultante de las

interacciones de diversas citocinas a éste nivel, es importante menester el estudio de circuitos inmunorreguladores en el compartimento sinovial de estos pacientes. Es por ello que nos interesó estudiar al factor de necrosis tumoral alfa y a la interleuquina 1 en la sangre y en la cavidad articular de los pacientes con AR, con el propósito de lograr una visión global y poder relacionar lo que ocurre a nivel generalizado con el sitio propio de la lesión.

## OBJETIVOS.

1.- Cuantificar al factor de necrosis tumoral alfa en el líquido sinovial y en los sobrenadantes de los cultivos de sangre, líquido y membrana sinoviales de pacientes con AR y sujetos con osteoartritis (OA) ó gota mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y bioensayo específicos para esta citocina.

2.- Cuantificar la IL-1 alfa en el líquido sinovial y en los sobrenadantes de los cultivos de células monocleares de sangre periférica, líquido y membrana sinoviales de los pacientes con AR, OA o gota, mediante ELISA específico para esta citocina.

3.-Cuantificar la IL-1 beta en el líquido sinovial y en los sobrenadantes de cultivos de líquido y membrana sinoviales de pacientes con AR, OA o gota, mediante radioinmunoanálisis (RIA) específico.

4.-Comparar los resultados de las mediciones y demostrar que la cantidad de FNT alfa, IL-1 alfa y beta son mayores en la cavidad articular de pacientes con AR que en la de los sujetos con OA o gota.

5.-Demostrar que no existe diferencia cuantitativa en la producción de citocinas FNT alfa e interleuquina 1 alfa por las células de sangre periférica en los grupos estudiados.

## HIPÓTESIS.

1.- La producción del factor de necrosis tumoral alfa y de la interleuquina 1 (alfa y beta) es mayor en el líquido sinovial y en los sobrenadantes de cultivos de las células de la cavidad articular de los pacientes con AR, que en los pacientes con OA o gota.

2.- No hay diferencia en la producción de citocinas por las células de la sangre de los pacientes con AR y la de los pacientes con OA o gota.



## MATERIALES Y METODOS.

Se estudió un total de 89 pacientes, procedentes de la consulta externa del departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición y del Servicio de Ortopedia en miembro pélvico II del Hospital de Ortopedia Magdalena de las Salinas del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Se formaron dos grupos de estudio: en el grupo I se incluyeron 56 pacientes en quienes se tomó en forma simultánea líquido sinovial mediante artrocentésis de rodilla y 20 ml de sangre venosa periférica; el grupo II estuvo formado por 42 pacientes en quienes se tomó en forma intercurrente, durante la cirugía electiva para la colocación de prótesis articular, la membrana sinovial y 20 ml de sangre venosa periférica. Del grupo I, se eliminaron las muestras de 20 pacientes y del grupo II, 23, ya que después del procesamiento de las mismas la celularidad obtenida fue insuficiente para llevar a cabo los ensayos proyectados.

Como se aprecia en la tabla 1, los diagnósticos de los pacientes en el grupo I fueron: artritis reumatoide en 27 casos, osteoartritis en 14, gota en 5 y lesiones de menisco en 10, en tanto que en el grupo II, los diagnósticos fueron de artritis reumatoide en 19 pacientes, en 17 el diagnóstico fue osteoartritis y 6 tuvieron lesiones de menisco. Finalmente el grupo I quedó integrado por 36 pacientes y el grupo II por 19 pacientes.

Todos los pacientes del grupo I fueron candidatos a artrocentésis de rodilla por presentar aumento de volúmen de la articulación, limitación funcional, dolor intenso y/o duda diagnóstica. En este grupo los 25 pacientes con diagnóstico de AR tuvieron una edad promedio de  $44.36 \pm 14$  años ; 24 se encontraban activos según los criterios de

Tabla 1. PACIENTES ESTUDIADOS.

---

Grupo	Dx.	N	Muestras útiles.	Fuente
I	AR	27	25	LS
	OA	14	7	y
	Gota	5	4	
	Meniscopatía	10	0	SP
II	AR	19	10	MS
	OA	17	9	y
	Gota	6	0	SP.

---

AR= artritis reumatoide OA= osteoartrosis  
 LS= líquido sinovial MS= membrana sinovial  
 SP= sangre periférica.

Ritchie (68) y, 15 de estos solo recibían tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINES) en el momento de la toma de la muestra. Los hallazgos de estos pacientes se contrastaron con un grupo control integrado por 11 pacientes, 7 de ellos con diagnóstico de OA y 4 con gota, los cuales tuvieron una edad promedio de  $51.2 \pm 20.6$  años y sólo 6 de ellos recibían tratamiento con AINES en el momento del estudio. Tabla 2.

Los pacientes del grupo II se sometieron a cirugía ortopédica electiva para colocación de prótesis articulares por presentar incapacidad funcional. El grupo constó de 19 pacientes, 10 con diagnóstico de AR y edad promedio de  $48 \pm 15$  años 1 de ellos estaba sin tratamiento en el momento de la toma de la muestra, 3 recibían tratamiento con AINES únicamente y 6 inductores de remisión y/o esteroides. En estos pacientes el tiempo de evolución con la enfermedad fué de  $9.6 \pm 5.2$  años; el subgrupo de pacientes con los que se contrastó se integró con 9 pacientes con diagnóstico de OA, con edad promedio de  $58 \pm 21.3$  años, de los cuales solo 3 recibían tratamiento con AINES en el momento de la cirugía. Tabla 3 .

## METODOS.

Grupo I.- De este grupo de pacientes se tomó líquido sinovial mediante artrocentésis de rodilla con técnica estéril, en jeringa heparinizada y 20 ml de sangre por punción venosa periférica.

### Líquido Sinovial.

Las muestras de líquido sinovial se recolectaron en tubos estériles y se centrifugaron

Tabla 2. CARACTERISTICAS CLINICAS. GRUPO I.

Dx.	N	Sexo M/F	Edad $\bar{x} \pm DS$	Trat.* A/E	Edo.clinico** A / I	Evol.t
AR	25	4/21	44.4 $\pm$ 14	25/10	24/ 1	5.9 $\pm$ 4.7
OA	7	2/5	52.9 $\pm$ 22	3/0		2.0 $\pm$ 2.3
Gota	4	4/0	48.3 $\pm$ 19	3/0		5.9 $\pm$ 4.4

AR = artritis reumatoide      OA = osteoartrosis  
 \* A= antiinflamatorios no esteroideos E= esteroides o  
 inmunosupresores.  
 \*\* A= activo      I= inactivo.  
 t= años  $\bar{x} \pm DE$ .

Tabla 3. CARACTERISTICAS CLINICAS DEL GRUPO II.

Dx.	N	Sexo M/F	Edad x±DE	Trat.* A/E	Edo.Clin** A/I	Evol.† x±DE
AR	10	2/8	48±15	9/6	6/4	10±4.5
OA	9	2/7	58±21	3/0		3.3±3.2

AR= artritis reumatoide. OA = osteoartrosis.

\* A= antiinflamatorios no esteroideos. E= esteroideos o inductores de remisión.

\*\* A= activos. I= inactivos.

†= años.

a 1500 rpm durante 10 min, (se guardaron alícuotas del líquido en congelación a -70°C hasta la medición de las citocinas) ; el botón celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, glutamina 2 mM, penicilina (100 u/ml) y estreptomina (1 µg/ml) (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo) ( medio completo) posteriormente se separaron las células mononucleares mediante gradientes de ficoll-hypaque de acuerdo a la técnica descrita por Boyum (69). En breve, las células mononucleares (CMN) se incubaron durante 2 hrs en cajas de Petri a 37°C en atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5%, a fin de lograr una población rica en macrófagos, dada la propiedad de éstos de adherirse al vidrio. Estas células enriquecidas con macrófagos se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml y, se cultivaron en dos condiciones: a) basal y b) estimulada. La condición basal correspondió a las células resuspendidas en el medio de cultivo completo y la condición estimulada describe a las células que se estimularon con 20 µg/ml de lipopolisacárido de E. Coli (Sigma).

Las células se cultivaron durante 20 hrs, a 37°C en incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez transcurrido este tiempo, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se mantuvieron en congelación a -70°C, hasta la medición de las citocinas.

#### Sangre Periférica.

Las muestras de sangre se diluyeron con igual volúmen de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), y se separaron las CMN mediante gradientes de ficoll-hypaque, de acuerdo a la técnica de Boyum. Para enriquecer con macrófagos el cultivo, las células que se obtuvieron con este procedimiento, se adhirieron al vidrio durante 2 hrs.

La población celular que se obtuvo con este método se ajustó a una concentración de

2 x 10<sup>6</sup> células por ml y se cultivó durante 20 hrs en las condiciones señaladas previamente en el apartado correspondiente al líquido sinovial.

GRUPO II. En estos pacientes se obtuvo la membrana sinovial durante el acto quirúrgico y momentos previos a la misma se tomaron 20 ml de sangre venosa periférica.

#### Membrana Sinovial.

Las muestras de membrana sinovial se recolectaron en PBS. En todas ellas se quitó el tejido adiposo excedente y con un bisturí se cortó en fragmentos de aproximadamente 3 mm. de diámetro. Estos fragmentos de tejido se digirieron enzimáticamente durante 4 hrs con una mezcla de colagenasa tipo II (5 mg/ml), desoxirribonucleasa (DNA-asa 0.15mg/ml) y hialuronidasa (0.1mg/ml), (Sigma Chemical Co.). Para ello se agregó 1ml de la mezcla de enzimas por cada 5g de tejido. La digestión se llevó a cabo a 37°C agitando la muestra en forma intermitente y enérgica.

Una vez terminado el proceso de digestión, las muestras se homogeneizaron y tamizaron. El eluido que se obtuvo, se centrifugó durante 10 min a 1400rpm en medio de cultivo completo y las células que se obtuvieron con este procedimiento, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en RPMI completo.

Para separar las células mononucleares de esta suspensión celular se usaron gradientes de ficoll-hypaque y se centrifugaron durante 30 min a 1500 rpm. Las células que se obtuvieron se ajustaron a concentración de 2 x 10<sup>6</sup> por ml y se cultivaron durante 20 hrs, en incubadora a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%, en las dos condiciones ya establecidas (basal y estimuladas con LPS). Los sobrenadantes de los cultivos se

recolectaron a las 20 hrs. y se mantuvieron en congelación a - 70°C hasta las mediciones pertinentes.

En todos los cultivos realizados se verificó la viabilidad celular mediante la exclusión del colorante azul tripán y se cuantificó el porcentaje de macrófagos por muestra mediante la tinción de peroxidasa.

#### ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS.(ELISA).

Las mediciones de las citocinas IL1 alfa y FNT se hicieron mediante ensayos inmunoenzimáticos con estuches comerciales apropiados para las mismas.

##### Determinación de Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

Se utilizó el estuche comercial TNF ELISA (E-TNF Endogen Inc. Boston Ma.) . La sensibilidad es de 10 pg/ml y es específico para esta citocina, pues utiliza un anticuerpo monoclonal murino anti- FNT humano como reactivo de captura y dos anticuerpos polivalentes procedentes de dos especies distintas (conejo y cabra), uno de ellos conjugado con fosfatasa alcalina, la cual cuando reaccionó con el sustrato adecuado, dió como resultado un cambio de coloración que se midió como absorbancia en el espectrofotómetro.

El ensayo consistió en cubrir una placa de cultivo de 96 pozos con un anticuerpo monoclonal (Ac. Mo) murino dirigido contra FNT alfa humano, el cual funcionó como reactivo de captura y constituyó la fase sólida del ensayo. Después de un proceso de sensibilización con este anticuerpo (12 hrs). se agregaron por duplicado, 100  $\mu$ l de los



sobrenadantes de cultivos, de las alícuotas de líquidos sinoviales y de los sueros en donde interesaba medir esta citocina y se les incubó durante toda la noche, con el propósito de que el FNT alfa presente en las muestras, se uniera a la fase sólida a través del Ac. Mo. El material que no se unió, se eliminó por medio de 4 lavados consecutivos. Después de éstos, se realizó una segunda incubación de 1 hr. con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra diferentes epítopes del FNT alfa humano; nuevamente el anticuerpo que no se unió, se eliminó por lavados consecutivos de la placa. Finalmente en una tercera incubación, de una hora, se adicionó un anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina dirigido contra el anticuerpo de conejo contra FNT alfa. La unión específica del anticuerpo contra FNT alfa se cuantificó a través del cambio de coloración, producto de la reacción enzimática de la fosfatasa alcalina con su sustrato: para-nitrofenil fosfato (p-NPP) y se leyó como absorbancia, en un espectrofotómetro con un filtro de 405 nm.

En cada placa se incluyeron un control negativo (medio de cultivo) y 5 estándares que contenían concentraciones conocidas de la citocina; con estas determinaciones se construyó una curva estándar, teniendo en el eje de las abscisas las concentraciones de la citocina y en el de las ordenadas, las densidades ópticas. La cantidad de FNT alfa presente en las muestras probadas, se obtuvo al extrapolar el promedio de los duplicados de las absorbancias en la curva mencionada. (Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron menores del 5%).

#### Determinación de la Interleuquina 1 alfa.

Se utilizó para ello, un estuche comercial de ELISA, específico para esta citocina (E-IL 1a Endogen Inc. Boston Ma), cuya sensibilidad es de 50 pg/ml. La técnica es la misma que la empleada para FNT (ver arriba).

#### Determinación de Interleuquina 1 beta.

Para la medición de esta citocina se utilizó un radioinmunoanálisis (RIA) específico para IL-1 beta. Esta técnica se basó en la competencia de la IL-1 beta contenida en las muestras, con la IL-1 beta marcada con <sup>125</sup>I, por los sitios de unión de un anticuerpo específico para esta citocina, de tal forma que la concentración de IL-1 beta en las muestras, es inversamente proporcional a la concentración de IL-1 beta marcada radiactivamente.

Brevemente esta técnica consiste en poner en contacto un anticuerpo policlonal de conejo, dirigido contra IL-1 beta, con las muestras en donde se deseaba medir esta citocina; se les incubó durante 4 hrs, después de las cuales se agregaron concentraciones conocidas de IL-1 beta recombinante, marcada con <sup>125</sup>I y se incubaron durante 20 hrs.

Después de esta incubación se agregó un segundo anticuerpo (de burro), dirigido contra el anticuerpo de conejo; este anticuerpo tenía la peculiaridad de estar unido a partículas poliméricas, metálicas, susceptibles de ser atraídas por magnetismo; con este anticuerpo se incubaron las muestras durante 10 min y posteriormente se colocaron en una placa magnética durante 15 min, con el propósito de que las

partículas metálicas que se unieron a los anticuerpos, fueran atraídas por magnetismo a la placa, después de ello se decantaron los sobrenadantes y se midió la cantidad de radiactividad presente en las partículas adheridas al fondo del tubo, con un contador de centelleo para radiaciones gamma.

Se construyó una curva utilizando para ello concentraciones conocidas de IL-1 beta recombinante, graficando en papel semilogarítmico, en el eje de las abscisas las concentraciones conocidas de IL-1 beta y en el eje de las ordenadas, el promedio de las desintegraciones por minuto (dpm) de los duplicados de ellas. Las cantidades de IL-1 beta de las muestras, se obtuvieron al extrapolar el promedio de las dpm de los duplicados de cada una de ellas en la curva.

Bioensayo para la medición de FNT alfa.

Para probar la actividad biológica del FNT alfa, se utilizó un ensayo citolítico colorimétrico, descrito inicialmente por Mosman y modificado posteriormente por Green (70,71). En éste se utiliza la línea celular L 929, que es un fibrosarcoma murino, cuya peculiaridad estriba en la susceptibilidad específica al efecto citolítico del FNT.

El principio del ensayo de bioactividad, se basa en la capacidad del FNT de producir lisis de ciertas líneas tumorales (L 929), en proporción directa a su concentración, si se suma a ello el hecho de que las células vivas son capaces de incorporar el 3-4,5 dimetiliazol, 2-1-2,5 bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y transformarlo en azul de formazán, se tiene una forma de cuantificar objetivamente esta citocina por un método colorimétrico en unidades de absorbancia que se captan en un espectrofotómetro con

el filtro apropiado (570 nm), de tal suerte que las unidades de absorbancia son directamente proporcionales a la cantidad de células vivas presentes en la muestra e inversamente proporcionales a la concentración de la citocina.

Para el ensayo se ajustaron las células L 929 a una concentración de  $3 \times 10^5$  cel. por ml. y se agregaron 0.5  $\mu\text{g}$  de actinomicina D por cada ml de esta suspensión celular. En placas de cultivo se sembraron 100  $\mu\text{l}$  por pozo de la suspensión celular a los cuales se agregaron por triplicado, 100  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes de cultivos, sueros o líquidos sinoviales en donde se deseaba medir esta citocina y se incubaron durante 24 hrs. Al término de esta incubación, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de MTT (5mg/ml) y se les incubó durante 3 hrs más. Al finalizar esta incubación, se centrifugaron las placas de cultivo durante 10 min a 1600 rpm; después de ello se decantaron los sobrenadantes y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de alcohol isopropílico-HCl; con el propósito de disolver los cristales de azul de formazán y homogeneizar el contenido de los pozos. Las placas de cultivo se agitaron durante 5 min, transcurridos los cuales se procedió a medir cada una de ellas, con un espectrofotómetro, en absorbancia, con filtro de longitud de onda de 570 nm. En cada placa se colocaron concentraciones conocidas de FNT humano recombinante y, de esta forma fué posible construir una curva de citotoxicidad, graficando en el eje de las ordenadas las densidades ópticas y en el de las abscisas las cantidades de FNT recombinante, en dicha curva se extrapolaron posteriormente los promedios de los triplicados de las densidades ópticas de cada uno de los problemas y, con ello se obtuvo la concentración de FNT de la muestra. El coeficiente de variación inter e intraensayo fué menor del 5%.

## RESULTADOS.

### FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA.

#### a) Líquido Sinovial.

La concentración del factor de necrosis tumoral alfa (FNT) se midió en el líquido sinovial de 34 pacientes, utilizando para ello un bioensayo específico con la línea celular L 929 y en 11 de estas muestras también se midió mediante un ELISA específico para esta citocina.

La concentración ( $\bar{x} \pm ee$ ) del FNT, fue mayor en el líquido sinovial de los sujetos con AR (n=24) que en el de los pacientes con OA o gota (n=11) (AR  $\bar{x} = 94.3 \pm 21.41$ , vs OA o gota  $\bar{x} = 44.35 \pm 12.35$  pg/ml), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa al comparar los grupos por análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis  $p > 0.5$ ), probablemente por la gran dispersión de los valores obtenidos; esto se aprecia en la figura 2. Al analizar como un solo grupo a los pacientes con osteoartritis y a los sujetos con gota, y contrastarlo mediante la prueba estadística U de Mann Whitney, con los pacientes con AR, se encontró que éstos tenían mayor cantidad de FNT que los sujetos con OA o gota ( $p < 0.05$ ). Esta diferencia es la misma que se observó en las muestras analizadas mediante el ELISA específico para esta citocina (AR n = 6 y OA n = 5) en donde el promedio de la concentración de FNT en AR fue de  $3693.9 \pm 935.46$  pg/ml, en tanto que no fue detectable en los líquidos de los pacientes con OA (la sensibilidad de este ensayo es de 10 pg/ml). A este respecto vale la pena comentar que existió correlación positiva en los valores obtenidos por ambos tipos de mediciones (ELISA y bioensayo) (r Spearman de 0.85  $p < 0.01$ ), (tabla

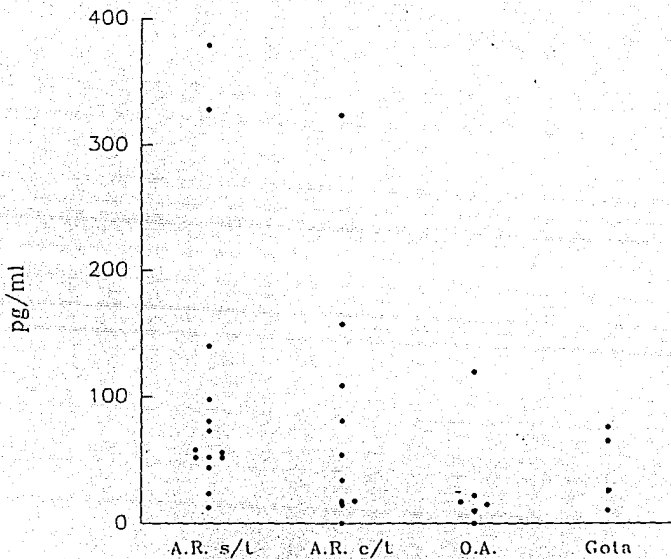


Figura 2. Cuantificación del factor de necrosis tumoral alfa en las alícuotas de líquido sinovial. (Bioensayo).

A.R.s/t= artritis reumatoide sin tratamiento.

A.R.c/t= artritis reumatoide con tratamiento.

O:A = osteoartritis.

4), pero no puede decirse que los valores sean similares en ambas mediciones. Observamos también que los pacientes con AR que no recibían tratamiento con esteroides o inductores de remisión en el momento del muestreo tuvieron las concentraciones más altas de esta citocina - como grupo -, sin embargo no son diferentes a lo obtenido en las muestras de pacientes con AR que recibían además esteroides o inductores de remisión en el momento de la toma del líquido sinovial (U Mann Whitney  $p > 0.05$ ).

b). Producción por las células del líquido sinovial.

Al cuantificar la producción del factor de necrosis tumoral alfa por las células obtenidas del líquido sinovial de 25 pacientes con AR y compararla con la de los sujetos con OA o gota ( $n=11$ ), se encontró que los pacientes con AR produjeron mayor cantidad de esta citocina que los pacientes con osteoartritis o gota (AR  $16.4 \pm 4.6$  VS Gota  $8.7 \pm 6.02$  pg/ml) ( $p < 0.02$  U de Mann Whitney), (fig.3). En este grupo, los sujetos con gota fueron los que produjeron menor cantidad de FNT de todos los pacientes estudiados, (tabla 5). Esta diferencia fue más evidente al comparar la producción de FNT de los cultivos celulares estimulados con lipopolisacárido de los pacientes con AR Vs la de los pacientes con osteoartritis o gota (AR  $29.2 \pm 6.08$  Vs OA o gota  $9.65 \pm 7.62$  pg/ml) ( $p < 0.01$  U de Mann Whitney). Cabe mencionar también que los cultivos celulares de los pacientes con AR, no solo produjeron mayor cantidad de FNT al estimularlos con LPS, que los de los sujetos con osteoartritis o gota, sino que además, la intensidad de esta respuesta fue mayor en AR que la observada en el segundo grupo; de hecho, cuando se compararon la producción basal de FNT con la

Tabla 4.MEDICION DE FNT EN LIQUIDO SINOVIAL.  
COMPARACION DE ELISA Y BIOENSAYO.

---

Dx.	N	Método de medición.	Cantidad*(pg/ml) $\bar{x} \pm E.E.$
AR	6	ELISA	3693.9 $\pm$ 935.47
AR	14	Bioensayo	103.9 $\pm$ 29.57
OA	5	ELISA	No detectable
OA	5	Bioensayo	44.3 $\pm$ 18.3

$r = 0.77$   $p, < .05$

---

AR= artritis reumatoide OA= osteoartrosis.  
EE= error estándar.



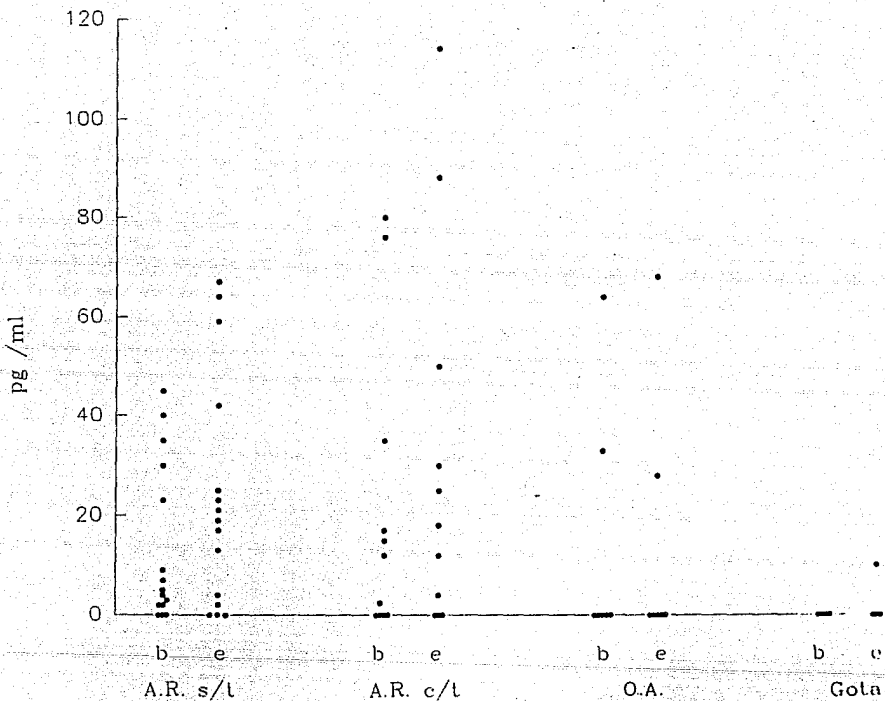


Figura 3. Producción de factor de necrosis tumoral alfa, por las células del líquido sinovial. (Bioensayo).

b = basal e = estimuladas con LPS.

AR = artritis reumatoide OA= osteoartritis.

c/t = con tratamiento (esteroides o inductores de remisión).

s/t = sin tratamiento.

Tabla 5. PRODUCCION DE FNT POR LAS CELULAS DEL LIQUIDO SINOVIAL.

Dx.	N	Basal pg/ml( $\bar{x}$ ±EE)	Estimulada. pg/ml ( $\bar{x}$ ±EE)	
AR s/tratamiento	15	10.7 ± 4.06	20.9 ± 5.5	p<0.05 Wilco- xon
AR c/tratamiento	10	21.4 ± 9.18	36.5 ± 11.9	
Osteoartrosis	7	13.7 ± 9.47	13.7 ± 9.9	p>0.05 Wilco- xon.
Gota	4	0	3.2 ± 2.4	

AR vs OA + Gota p< 0.05 U de Mann Whitney.

FNT= factor de necrosis tumoral alfa.

AR = artritis reumatoide

OA = osteoartrosis.

EE = error estándar.

producción bajo estímulo con LPS en cada grupo de pacientes mediante la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon, se encontró que las células de los pacientes con AR respondieron al estímulo del LPS incrementando la producción de esta citocina ( $p < 0.05$ ), en tanto que las células de los pacientes con OA o gota no respondieron en forma significativa al estímulo ( $p > 0.05$ ). La figura 4, ilustra esta diferencia. Los valores máximos observados correspondieron a los pacientes con AR que se encontraban bajo tratamiento con esteroides o inductores de remisión en el momento del muestreo, como grupo sin embargo estos pacientes no fueron diferentes de los pacientes con AR que solo recibían AINES al momento de la toma de la muestra.

Las muestras de 14 pacientes con Dx de AR, de 4 pacientes con OA y la de un paciente con gota, también se probaron por ELISA específico para la detección del FNT encontrando la misma tendencia ya descrita con el bioensayo, esto es, mayor producción de FNT por las células de los pacientes con AR (AR basal  $\bar{x} = 139.9 \pm 68.18$  Vs OA o gota  $\bar{x} = 15 \pm 10$  pg/ml) y en los cultivos estimulados con LPS (AR  $\bar{x} = 165.7 \pm 88.5$  Vs OA o gota  $20.5 \pm 16.35$  pg/ml).

c).- Producción por las células de la membrana sinovial.

Cuando se midió la producción del FNT en los sobrenadantes de los cultivos celulares procedentes de las membranas sinoviales de 10 pacientes con AR y las de 9 sujetos con OA, mediante el bioensayo específico, se encontró que las células de los pacientes con AR tuvieron, en condiciones basales, mayor cantidad de esta citocina que los pacientes con OA (AR  $\bar{x} = 16.2 \pm 6.23$  Vs OA  $\bar{x} = 3.2 \pm 2.47$  pg/ml) ( $p < 0.03$

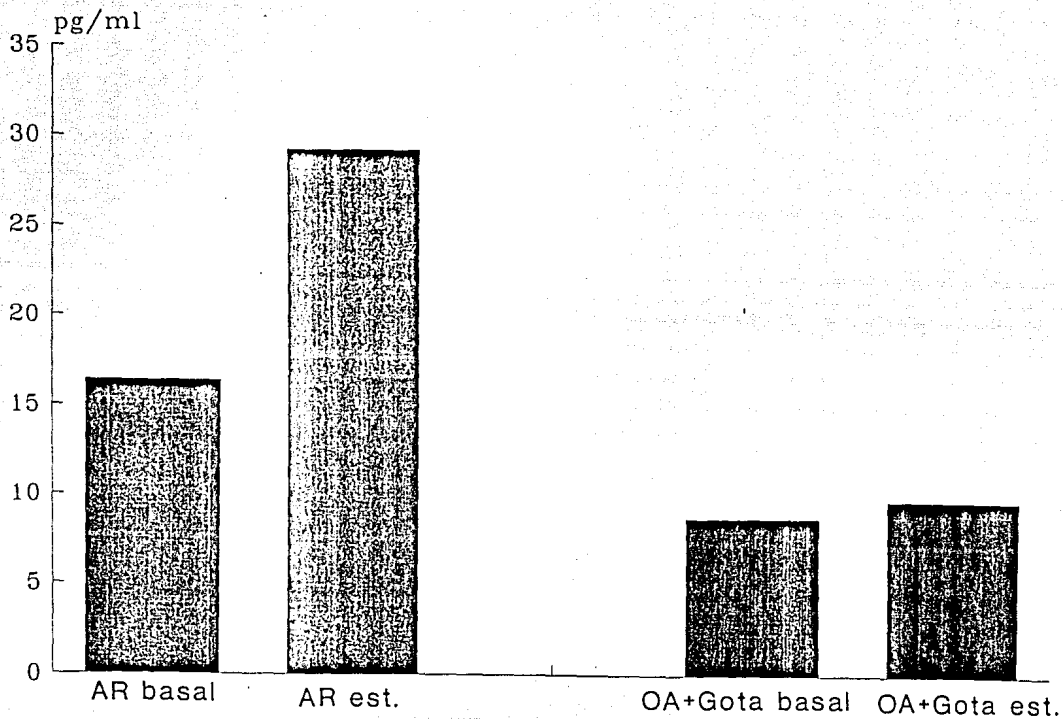


Figura 4. Producción de factor de necrosis tumoral alfa por las células del líquido sinovial, comparación de la producción basal y estimulada con LPS, en los dos grupos de estudio.

AR basal Vs AR estimulada =  $p < 0.05$  (Wilcoxon)

OA + Gota basal Vs OA + Gota estimulada =  $p > 0.05$  (Wilcoxon)

arthritis - osteoarthritis

U Mann Whitney). Esta diferencia no se mantuvo al contrastar la producción de FNT por las células de membrana sinovial de los pacientes con AR contra las de OA, en los cultivos estimulados con LPS (AR  $\bar{x} = 27.1 \pm 8.64$  vs OA  $\bar{x} = 7.2 \pm 2.97$  pg/ml) ( $p > 0.05$  U Mann Whitney), si bien esta diferencia no fue significativa desde el punto de vista estadístico, los máximos valores registrados se encontraron en el grupo de pacientes con artritis reumatoide y 7 de los 9 casos de pacientes con OA produjeron menos de 10 pg/ml de esta citocina, en tanto que esta situación solo se observó en 4 de los 10 casos de AR. (Fig 5). Asimismo, se encontró que las células de la membrana sinovial de los pacientes con AR respondieron en forma más activa al estímulo con LPS que las células de los pacientes con OA; en ambos grupos estudiados hubo diferencia en la producción basal del FNT cuando se le comparó con la producción bajo estímulo con LPS. (fig.6). Encontramos que las células de los pacientes que recibían esteroides o inductores de remisión al momento de la toma de la muestra produjeron mayor cantidad de FNT que los pacientes que solo recibían AINES al momento del muestreo, sin embargo el tamaño de la muestra no permitió validar esta observación. En los casos estudiados no se observó diferencia en la producción de esta citocina de acuerdo a la actividad de la enfermedad. Se probaron también por ELISA específico para esta citocina los sobrenadantes de cultivos de 5 pacientes con diagnóstico de AR y los de 4 pacientes con OA y en ninguno de los casos se detectó la presencia de la misma.

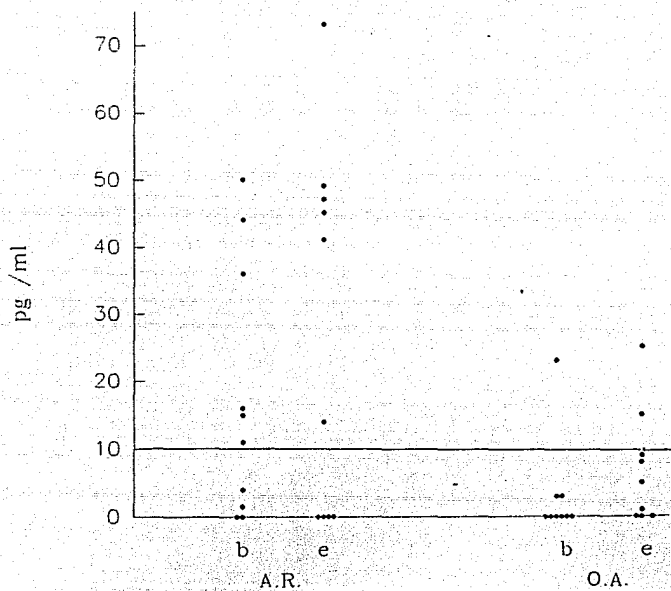


Figura 5. Producción de factor de necrosis tumoral alfa por las células de la membrana sinovial. (Bioensayo).  
 b = basal e = estimuladas con LPS.  
 A.R. = artritis reumatoide OA = osteoartritis.

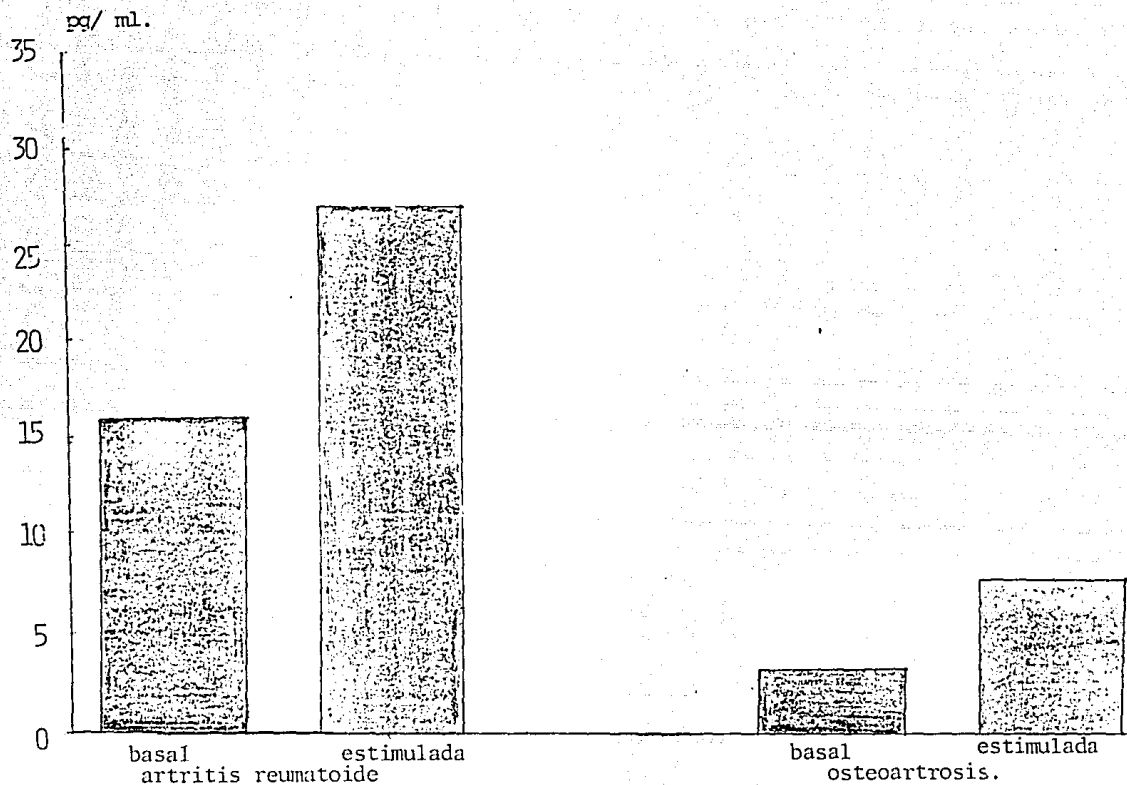


Figura 6. Producción de factor de necrosis tumoral alfa, por las células de la membrana sinovial. Comparación entre producción basal y bajo estímulo con LPS. Basal Vs estimulada tanto en AR como en OA  $p < 0.05$  (Wilcoxon).

d).- Producción por las células de la sangre periférica.

En este estudio se observó que las células de la sangre periférica de los pacientes con AR, tanto en condiciones basales como bajo el estímulo del LPS produjeron mayor cantidad del factor de necrosis tumoral que los pacientes con OA o gota, y aunque existió gran dispersión en los valores que se obtuvieron esto fue principalmente a expensas del grupo de pacientes con AR (fig.7). En los pacientes analizados no se detectaron diferencias en la producción de esta citocina, entre los sujetos con AR que recibían tratamiento con esteroides y/o inductores de remisión y aquellos que solo estaban tratados con AINES; en la tabla 6 se enlistan los promedios de producción de esta citocina tanto en condición basal como bajo el estímulo con LPS. en ella se aprecia que los pacientes con AR respondieron al estímulo con LPS, incrementando la producción del FNT en tanto que en los pacientes con OA y gota, no respondieron al mismo. Se probaron por ELISA específico para factor de necrosis tumoral alfa los sobrenadantes de cultivos de 18 sujetos con AR y de 5 pacientes con OA y de 3 pacientes con gota. Se observó, al igual que con el bioensayo, que los pacientes con AR producían mayor cantidad del factor ( AR basal  $\bar{x} = 67.1 \pm 23.29$  Vs OA no detectable y en gota 16.25 pg/ml) y algo similar se obtuvo de los cultivos estimulados con LPS ( AR  $\bar{x} = 161.34 \pm 65.23$  vs no detectable en OA y en gota 98.5 pg/ml). Al igual que en el bioensayo, en las muestras analizadas por ELISA no fué posible detectar diferencias entre la producción basal y la estimulada con LPS en el grupo de pacientes con OA. La tabla 7 resume los resultados de las muestras analizadas por ambos métodos.



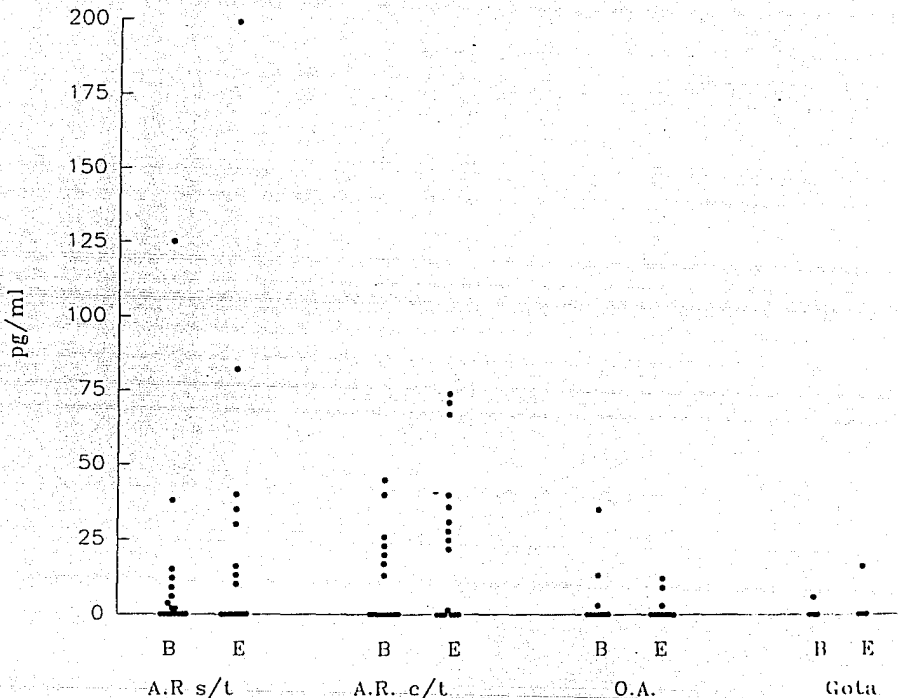


Figura 7. Producción de factor de necrosis tumoral alfa por las células de la sangre periférica.  
 B = basal      E = estimulada.      A.R. = artritis reumatoide.  
 O.A. = osteoartritis. s/t = sin tratamiento con esteroides o inductores de remisión. c/t = con tratamiento (esteroides o inductores de remisión).

Tabla 6. PRODUCCION DE FNT POR LAS CELULAS SANGRE PERIFERICA.

Diagnóstico	N	Basal pg/ml( $\bar{x}$ ±EE)	Estimulada pg/ml( $\bar{x}$ +EE)
AR s/tratamiento	17	12.09 ± 7.62	24.9 ± 5.53
AR c/tratamiento	16	13.02 ± 4.08	24.7 ± 12.12
Osteoartrosis	10	4.92 ± 3.59	2.2 ± 1.39
Gota	4	1.38 ± 1.38	4.0 ± 4.00
Basal vs Estimulada	p < 0.05 en AR y p > 0.05 en OA y Gota (Wilcoxon).		
AR vs OA + Gota	p < 0.05 (U de Mann Whitney).		

AR = artritis reumatoide      OA = osteoartrosis.  
 FNT= factor de necrosis tumoral alfa      EE= error estándar.

Tabla 7. PRODUCCION DE FNT POR CELULAS DE SANGRE PERIFERICA. COMPARACION ENTRE ELISA Y BIOENSAYO.

Dx	N	Técnica	Condición.	
			Basal (pg/ml) ( $\bar{x} \pm EE$ )	Estimulada (pg/ml) ( $\bar{x} \pm EE$ )
AR	33	Bioensayo	11.8 $\pm$ 4.27	24.8 $\pm$ 6.95
AR	18	ELISA	67.1 $\pm$ 23.30	161.4 $\pm$ 65.24
OA	10	Bioensayo	4.9 $\pm$ 3.58	2.2 $\pm$ 1.39
OA	5	ELISA	no detectable	no detectable.
Gota	4	Bioensayo	1.4 $\pm$ 1.4	4.0 $\pm$ 4.0
Gota	3	ELISA	16.3 $\pm$ 4.22	98.5 $\pm$ 54.2

Basal vs Estimulada  $p < 0.05$  en AR (ELISA y Bioensayo)

Basal vs Estimulada  $p < 0.05$  en Gota (ELISA) (Wilcoxon)

AR= artritis reumatoide OA= osteoartritis FNT= factor de necrosis tumoral alfa. EE= error estándar.

Con el fin de explorar si la producción de FNT en el compartimento sinovial era diferente de lo obtenido en las células de sangre periférica, se compararon los datos observados, tanto en condiciones basales como por estímulo con LPS, de cada una de las fuentes celulares (sangre, líquido sinovial y membrana sinovial) en cada grupo de pacientes; se encontró en los pacientes con AR una franca tendencia a producir mayor cantidad de factor de necrosis tumoral por las células del líquido sinovial ( $P < 0.05$ ), lo cual no fué observado en el grupo de pacientes con osteoartritis o gota. En cada uno de los cultivos realizados, se verificó que la viabilidad celular (mediante la exclusión del azul tripán) fuera mayor del 95%. Asimismo se estimó el porcentaje de macrófagos en cultivo, por medio de la tinción con peroxidasa. En promedio en los cultivos de células procedentes de líquido sinovial hubo 76 % de monocitos, 74% en membrana sinovial y 60% en los cultivos de sangre periférica.

#### INTERLEUQUINA 1 BETA.

##### a).- Líquido sinovial.

Se probaron por radioinmunoanálisis específico para la detección de interleuquina 1 beta, las alícuotas de líquido sinovial de 4 pacientes con artritis reumatoide, quienes solo recibían AINES al momento de la artrocentesis y las muestras de 4 pacientes con diagnóstico de gota y se observó que no hay diferencia estadísticamente significativa en el contenido de interleuquina  $1\beta$  entre estos pacientes (AR  $\bar{x} = 35.8 \pm 10.05$  Vs gota  $\bar{x} = 21.5 \pm 3.1$  pg/ml  $p > 0.05$  U Mann Whitney)). Aunque existió cierta tendencia en los pacientes con AR a tener mayores concentraciones de esta citocina, el número

de pacientes fué pequeño y la dispersión de los resultados amplia, por lo que no se logró demostrar alguna diferencia, figura No.8.

b).- Producción por las células del líquido sinovial.

Al comparar los resultados de las mediciones de la producción de interleuquina 1  $\beta$ , por los cultivos celulares de líquido sinovial de 4 pacientes con AR contra la de 3 sujetos con gota, se encontró que los pacientes con AR producían mayor cantidad de IL 1 beta que los pacientes con gota ( AR  $x = 126.5 \pm 37.42$  Vs Gota  $20.3 \pm 0.67$  pg/ml ) tanto basalmente como estimulados con LPS (AR  $x 199.75 \pm 64.59$  vs  $22.67 + 3.22$  pg/ml), sin embargo no se encontró diferencia al comparar la producción basal con la estimulada en cada grupo de pacientes (Tabla 8).

c).- Producción por las células de la membrana sinovial.

Se midió también la producción de esa citocina por los cultivos de células de membranas sinoviales de 2 pacientes con OA y se comparó con la producción por las células de membrana sinovial de 3 pacientes con AR, se observó gran dispersión de los resultados obtenidos, que impiden incluso hablar de tendencias, en la Tabla 9 se aprecia esta noción.

Determinación de interleuquina 1 alfa.

a) Líquido Sinovial.

Se midió con ELISA específico para la detección de IL1 alfa, la concentración de esta citocina en el líquido sinovial de 6 pacientes con AR, quienes solo recibían AINES al momento del muestreo, en el de 3 pacientes con OA y en el de 3 pacientes con gota

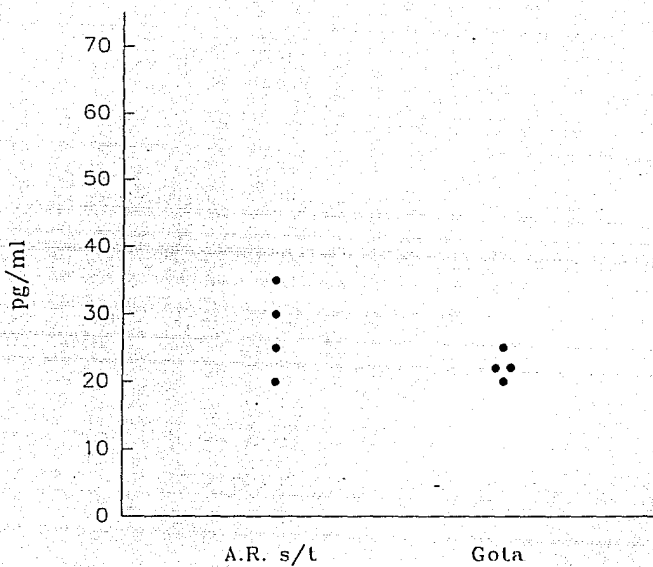


Figura 8. Cuantificación de interleuquina 1 en las alícuotas de líquido sinovial. AR s/t = artritis reumatoide sin tratamiento con esteroides o inductores de remisión.

Tabla 8. PRODUCCION DE IL- 1 BETA POR  
 LAS CELULAS DEL LIQUIDO SINOVIAL.

---

Dx.	N	Basal pg/ml( $\bar{x}$ ±EE)	Estimulada pg/ml( $\bar{x}$ ±EE)
AR	4	126.5 ± 37.40	199.8 ± 64.60
Gota	3	20.3 ± 0.87	22.7 ± 3.69

Basal vs Estimulada  $p > 0.05$  (Wilcoxon)

AR vs Gota  $p < 0.05$  ( U de Mann Whitney)

---

AR= artritis reumatoide  
 IL-1= interleuquina 1.

OA= osteoartrosis  
 EE= error estándar.

Tabla 9. PRODUCCION DE INTERLEUQUINA 1 BETA  
POR LAS CELULAS DE LA MEMBRANA SINOVIAL.

---

Dx.	N	Basal (pg/ml)*	Estimulada. (pg/ml)*
AR	3	21.67 ± 5.24	26.67 ± 7.87
OA	2	195.5 ± 188.77	229.5 ± 223.16

Basal vs Estimulada  $p > 0.05$  (Wilcoxon)

AR vs OA  $p > 0.05$  (U de Mann Whitney)

---

AR= artritis reumatoide

OA= osteoartrosis.

IL-1= interleuquina 1

\*=  $\bar{x} \pm$  error estándar.



y se encontró que los pacientes con AR tuvieron en promedio  $393.12 \pm 199.34$  pg/ml de esta citocina, en tanto que no fué detectable en OA y en gota se obtuvo  $16 \pm 8.03$  pg/ml, esta diferencia fué significativa desde el punto de vista estadístico ( $p < 0.05$  U de Mann Whitney) (Tabla 10).

b).- Producción por las células del líquido sinovial.

Por lo que respecta a la producción de interleuquina 1 alfa, por las células del líquido sinovial, se midió en 10 pacientes con AR, 3 pacientes con OA y 3 pacientes con gota; se encontró que en AR, el promedio de producción basal de esta citocina fué de  $83.6 \pm 27.37$  pg/ml, al estimularlas con LPS la producción se incrementó a un promedio de  $187.03 \pm 53.26$ , en tanto que los pacientes con OA y gota no produjeron cantidades detectables en ambas condiciones ( $p < 0.02$  U de Mann Whitney) (Tabla 11).

c).- Producción por las células de sangre periférica.

La producción de interleuquina 1 por las células de la sangre periférica se midió en 13 pacientes con AR, 5 pacientes con OA y 2 pacientes con gota. Se encontró que en condiciones basales los pacientes con AR produjeron  $177.4 \pm 47.51$ , los pacientes con OA  $85.6 \pm 58.97$  y no fué detectable en los pacientes con gota, pese a que se observó tendencia a una mayor producción por las células de AR en condiciones basales, esta diferencia no fué estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Bajo el estímulo con LPS las células en AR incrementaron su producción a  $257.8 \pm 54.14$ , en en OA se incrementó a  $134.2 \pm 82.09$  y nuevamente no fué detectable en gota, al analizar como un solo

Tabla 10. CONCENTRACION DE IL- 1 ALFA  
EN EL LIQUIDO SINOVIAL.

---

Dx.	N	pg/ml ( $\bar{x} \pm EE$ )
AR	6	393.1 $\pm$ 199.35
OA	3	no detectable.
Gota	3	16 $\pm$ 8.03

AR vs OA + Gota  $p < 0.05$  (U de Mann Whitney).

---

AR= artritis reumatoide  
IL-1= interleuquina 1.

OA= osteoartrosis.  
EE= error estándar.

Tabla 11. PRODUCCION DE IL-1 ALFA POR LAS CELULAS DEL LIQUIDO SINOVIAL.

---

Dx	N	Basal(pg/ml) *	Estimulada(pg/ml) *
AR	10	83.6 ± 50.0	187.03 ± 97.27
OA	3	n.d.	n.d.
Gota	3	n.d.	n.d.

AR vs OA y Gota  $p < 0.0119$  ( U de Mann Whitney).

Basal vs Estimulada en AR  $p < 0.05$  (Wilcoxon).

---

AR=artritis reumatoide OA=osteoartrosis IL-1=interleuquina 1  
\* ( $\bar{x} \pm$  error estándar).

grupo a los pacientes con OA y gota y contrastarla con los pacientes con AR se encontró que la producción de esta citocina era mayor en este grupo que en el grupo control (Wilcoxon  $p < 0.049$ ) (Tabla 12).

Por la dispersión de los datos y el tamaño de la muestra analizada, no fué posible determinar si existe diferencia entre la producción de IL 1 alfa por las células de la sangre periférica comparadas con la de las células del líquido sinovial, pero si es posible afirmar que la cantidad de IL-1 alfa en el líquido sinovial de los pacientes con AR es mayor a la cantidad producida por las células de sangre periférica y por las del líquido sinovial.

#### DISCUSION.

Las citocinas son polipéptidos que afectan las funciones de diversas células. Entre otras, favorecen la comunicación intercelular, promueven la síntesis y secreción de otros factores solubles, modulan la expresión de antígenos de superficie, conducen a crecimiento y diferenciación celular y pueden amplificar respuestas inflamatorias.

Estas moléculas y en particular el FNT alfa y la IL-1, tienen un papel relevante en la patogenia de la AR. Esto se puede afirmar por las observaciones hechas tanto *in vivo* como *in vitro* de sus efectos sobre el cartílago articular, en donde resaltan la promoción de la síntesis de prostaglandinas y colagenasas, la proliferación de los fibroblastos y la síntesis anormal de colágena; modulan diversas interacciones célula-célula, que resultan en un incremento de la adhesión por parte de los neutrófilos y

TABLA 12. PRODUCCION DE IL-1 ALFA POR LAS  
 CELULAS DE SANGRE PERIFERICA.(ELISA).

---

Dx.	N	Basal(pg/ml) *	Estimulada(pg/ml) *
AR	13	177.4 ± 47.5	257.8 ± 53.98
OA	5	85.6 ± 58.9	134.2 ± 82.09
Gota	2	n.d.	n.d.

AR vs OA + Gota p< 0.049 (Wilcoxon).

---

AR=artritis reumatoide OA=osteoartrosis IL-1=interleuquina 1  
 \*( $\bar{x} \pm$  error estándar).

linfocitos a la pared endotelial, lo que facilita su migración y acúmulo en los sitios de inflamación, propiciando el daño tisular. Se ha propuesto por este mecanismo fisiopatológico que la lesión reumatoide es el resultado biológico de las concentraciones de diversas citocinas en el ambiente pericelular.

El propósito de este estudio fué estudiar las citocinas que con mas frecuencia se han implicado en la sinovitis reumatoide - FNT e IL-1 - y comparar sus concentraciones en sangre con las de la cavidad articular, como órgano blanco de la AR.

Encontramos mayor concentración de FNT en la cavidad articular de los pacientes con AR cuando se les comparó con los controles. Este hallazgo concuerda con reportes previos al respecto y apoya la noción de que esta citocina participa activamente en la producción de sinovitis crónica.

Observamos tambien que las células del líquido sinovial de los pacientes con AR produjeron mayor cantidad de este péptido tanto de manera espontánea como con la estimulación por LPS, que las de individuos con OA o gota. Esto sugiere que existen alteraciones en los mecanismos de inmunorregulación que conducen a: 1) incremento en la producción espontánea de FNT y, 2) mayor respuesta a un estímulo externo como lo es el LPS.

Llama la atención el hecho de que los pacientes con AR que recibían tratamiento con esteroides o inductores de remisión, produjeran mayor cantidad de esta citocina, que aquellos que solo estaban tratados con AINES. Esto indicaría, bien la existencia de diversos mecanismos de regulación en la producción del FNT - que no se modifican

por el tratamiento - y/o alteraciones en la biodisponibilidad de los medicamentos, que se reflejan en su falta de efecto en la producción de mediadores de inflamación a nivel articular.

Por otra parte, a nivel de las células de la membrana sinovial, encontramos que los pacientes con AR producen, en condiciones basales, mayor cantidad de FNT que las de los pacientes con OA. Sin embargo, al estimular con LPS esta diferencia no se mantuvo (desde el punto de vista estadístico), aunque sí se observó tendencia a mayor producción de la citocina por parte de las células de los pacientes con AR. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que las células del compartimento sinovial en la AR se encuentran estimuladas *in vivo* y que, además, tienen alteraciones en sus mecanismos regulatorios que las hacen secretar mayor cantidad de FNT, lo cual contribuiría al daño articular crónico .

En cuanto a la producción de FNT por células mononucleares de sangre periférica, esta mostró una gran dispersión en sus niveles en los tres padecimientos estudiados. Al comparar los resultados obtenidos mediante el análisis de variación, no encontramos diferencias entre los tres grupos, con lo que se vio apoyada la noción de que la sangre periférica no es representativa de lo que ocurre a nivel articular. Esto resultó más evidente al comparar las concentraciones del FNT en los dos compartimentos, i.e., sangre periférica *versus* líquido sinovial, en donde observamos una franca y clara diferencia a expensas de mayor concentración en el líquido sinovial. No obstante, esta diferencia no se documentó cuando comparamos la sangre periférica con las células

de la membrana sinovial. Este hallazgo paradójico podría ser reflejo de distintos orígenes de las células del líquido y de la membrana sinovial o bien que durante su liberación de la misma, hayan adquirido características funcionales que las distinguen de las células sinoviales.

Al analizar nuestro grupo de pacientes con AR de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad, observamos que esto no modificaba la producción de FNT. Aparentemente, las alteraciones observadas en AR están presentes desde que se inicia el daño articular y se mantienen a lo largo de su evolución. La presencia de FNT en el líquido sinovial podría estar manteniendo la cronicidad del padecimiento.

Como parte complementaria del estudio se cuantificó la IL-1 en sus dos isoformas, la alfa y la beta. Se encontró mayor cantidad de IL1 alfa en el líquido sinovial de los pacientes con AR, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa. Al igual que con el FNT, las células de este sitio lo produjeron en mayor proporción tanto en forma espontánea como bajo el estímulo con LPS. Por otro lado, en las células de la membrana sinovial no se logró detectar la secreción de esta citocina en todas las muestras estudiadas y lo observado en sangre periférica fue similar a lo encontrado con FNT, i.e., una gran dispersión sin tendencia clara en células no estimuladas. Sin embargo, cuando las células se estimularon con LPS se logró observar una mayor producción de esta citocina por parte de las células de los pacientes con AR. No obstante no haber encontrado diferencia significativa en la concentración de IL-1 alfa en líquido sinovial el resto de los hallazgos con este factor fueron del todo similares a



los observados con el FNT, por lo que se puede pensar que la alteración en los mecanismos de regulación de la producción de esta citocina, son similares a los de FNT. Al igual que lo observado con FNT, no encontramos diferencia en las concentraciones de IL-1 alfa de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad.

Con lo que respecta a la isoforma beta de la IL-1 en el líquido sinovial, no encontramos diferencias entre pacientes con AR y controles. Esto se explica por el tamaño de la muestra analizada. En cambio, las células obtenidas del líquido sinovial de los pacientes con AR produjeron mayor cantidad de esta interleuquina tanto en forma espontánea, como estimuladas con LPS. Basados en esto se podría sugerir la existencia de un mecanismo de regulación alterado que al igual que con IL-1 alfa y FNT conduce a mayor producción de esta citocina. Sin embargo, cabe considerar que quizá exista un incremento en el consumo autócrino o parácrino de la IL-1 beta, que se refleja en los bajos niveles detectados en el líquido sinovial y que contrasta con los altos niveles de producción por parte de las células aisladas del mismo. Por lo que respecta a la producción de esta citocina por las células de la membrana sinovial, no se encontraron diferencias, pero dado el tamaño de la muestra y la dispersión observada, no es posible afirmar nada al respecto. Suponemos, sin embargo que al igual que con las otras citocinas estudiadas, las células del líquido sinovial de alguna forma se encuentran activadas, a diferencia de las células de la membrana sinovial y esto conduce a las primeras a secretar mayor cantidad de éstos mediadores. Por lo anterior, se puede sugerir que existe una participación activa de estos factores en el daño articular.

En cuanto al origen de estas moléculas, si bien son producidas por macrófagos y células afines, recientemente se ha demostrado que las células T son capaces de producir IL-6, TNF alfa y factor estimulador de colonias, y en particular aquellas células del subgrupo de ayuda con fenotipo CD4, CD45. Estos hallazgos abren nuevamente la discusión acerca del papel de las células T en la lesión de la membrana sinovial reumatoidea. Es conocido que el infiltrado inflamatorio durante las fases temprana de formación del panus es rico en células T CD4+, en contraste, están diversos trabajos que muestran una cantidad pobre de linfocinas producidas por estas células (IL-2, IL-3, IFN  $\tau$ ). Es posible que la célula T y sus productos solubles, participen en la regulación de las fases tempranas de la respuesta inmune, bien sea en la activación per se del macrófago, del polimorfonuclear y/o de las células endoteliales. La perpetuación del daño sinovial estará a cargo de las consecuente participación de los macrófagos y sus factores liberados.

Los hallazgos de este estudio no nos permiten hablar de una secuencia de eventos fisiopatológicos, ya que ello ameritaría un abordaje distinto de los pacientes, en donde por razones éticas no se puede tener un perfil en el tiempo, de la secreción de cada una de las citocinas, en incluso dado que todos ellos se tomaron en el momento de presentar datos clínicos, no podemos caracterizar la lesión temprana en AR.

A la luz de nuestros datos y de algunos reportes previos, parece ser que los medicamentos de uso actual que tienden a modificar el curso de la AR, no lo hacen a través de estos mecanismos. De hecho en la actualidad, se ensayan nuevas modalidades terapéuticas que incluyen el uso de bloqueadores de la acción de

citocinas (IL-1 principalmente y de moduladores de la activación de las células CD4+ (anti CD4), con resultados promisorios.

Posiblemente y apoyado también en nuestros datos, el blanco de acción de cualquier droga debería ser el macrófago, puesto que su activación y la excesiva producción de moléculas al ser bloqueadas, contribuiría a frenar el daño articular.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alarcón-Segovia,D., Alcocer- Varela, J., Díaz-Jouanén,E.: The connective tissue diseases as a disorders of immune-regulation. Clin Rheum Dis. 1985;11(3):451-69.
- 2.- Alcocer-Varela,J, Martínez-Cordero,E., Alarcón-Segovia,D.: Spontaneous production of and defective response to interleukin-1 by peripheral blood mononuclear cells from patients with scleroderma. Clin Exp Immunol.1985; 59(2):666-72.
- 3.- González-Amaro,R., Alarcón-Segovia,D., Alcocer-Varela,J., y cols.: Mononuclear cell and fibroblast interactions in scleroderma. 1988; 46(2):412-20.
- 4.- González-Amaro,R., Alcocer-Varela,J., Alarcón-Segovia,D.: Natural killer cell activity in dermatomyositis-polimiyositis. J Rheumatol 1987;14(2):307-10.
- 5.- Abud-Mendoza,A.,Ruiz-Argüelles,A., Díaz-Jouanen,E., Alarcón-Segovia,D.: Caracterización de subpoblaciones de linfocitos circulantes en pacientes con diversas enfermedades del tejido conjuntivo. Rev Invest Clin 1979;31:11-9.
- 6.- Krane M.S.,Simon S.L.: Cuadro clínico y mecanismos patógenos en la artritis reumatoide. Clin Med NA. 1986;2:271-94.
- 7.- John,J.Jr., Hough,A., Serget,JS.: Pericardial disease in rheumatoid arthritis. Am J Med. 1979;66:385-90.
- 8.-Jurik,AG., Davidsen,D., Graudal,H.: Prevalence of pulmonary involvement in rheumatoid arthritis and its relationship to some characteristics of the patients. Scand J Rheumatol.1982.;11:217-24.

- 9.- Harris,E.Jr.: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Kelley WN, Harris ED.Jr., Ruddy,S., Sledge C.,eds. Textbook of rheumatology. 3rd ed. Vol.1. Philadelphia: W.B. Saunders. 1989:905-42.
- 10.- Fox,I., Lotz,M., Rhodes,G., et al: Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis. Clin Rheum Dis. 1985;11:665-88.
- 11.- Depper,JM., Zvaifler,NJ.: Epstein-Barr virus its relationships to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.1981;24:755-61.
- 12.- Zvaifler, NJ.: Rheumatoid arthritis, epidemiology, etiology, rheumatoid factor, pathology, pathogenesis.In: Radolph Schumacher and associate editors. Primer in the Rheumatic Diseases. 9th edition. 1990:83-87.
- 13.- Rowley,M., Tait,B., Mackay,IR., Cunningham,T., Phillips,B.: Collagen antibodies in rheumatoid arthritis; significance of antibodies to denatured collagen and their association with HLA-DR4. Arthritis Rheum.1986;29:174-84.
- 14.- Harris,E.Jr.: Rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 1990;322(18):1277-89.
- 15.- Maini ,RN.: Exploring immune pathways in rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol.1988;XXVIII(6):466-79.
- 16.- Roudier,J., Rhodes,G., Petersen,J., Vaughan,JH., Carson DA.: The epstein-barr virus glycoprotein gp 110, a molecular link between HLA-DR4, HLA-DR1 and rheumatoid arthritis. Scand J Immunol.1988;27:267-71.
- 17.- Zvaifler,NJ.: Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Lea & Febinger: Arthritis and Allied Conditions. Mc Carty, DJ.11th ed. 1989: 659-73.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 18.- Venables,P.: Epstein-Barr virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*.1988;47:265-9.
- 19.- Lindquist,S.: The heat shock proteins. *Annu Rev Genet*.1988;22:631-77.
- 20.- Rook,GA.: Rheumatoid arthritis, mycobacterium antigens and agalactosyl IgG. *Scand J Immunol*. 1988;28: 487-93.
- 21.- Ziff,M.: Rheumatoid arthritis its present and future. *J Rheumatol*.1990;17(2):127-33.
- 22.- Londei,M., Savill,CM., Verhoef,A., et al .: Persistence of collagen type II specific T cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*.1989;86: 636-40.
- 23.- Ranges,GE., Sriram,S., Cooper, SM.: Prevention of type II collagen induced arthritis by in vivo treatment with anti- L3T4. *J Exp Med*.1985;162:1105-10.
- 24.- Smiley,JD., Hoffman,WC., Moore,SC., Paradis, LH.: The humoral immune response of the rheumatoid synovium. *Semin Arthritis Rheum*.1985;14(3):151-62.
- 25.- Milgrom,F.: Development of rheumatoid factor research through 50 years. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1988;75:2-12.
- 26.- Fox,RI., Lotz,M., Carson, DA.: Structure and function of synoviocytes. In: Kelley,WM., Harris,ED.Jr. Ruddy,S., Sledge,CB. eds. *Textbook of rheumatology*. 3rd ed. Vol 1. Philadelphia: W.B. Saunders.1989:850-88.
- 27.- Simkin, PA.: Joints structure and function.In: Schumacher,R., associate editors. *Primer in rheumatic diseases*. 9th ed.1990:18-23.
- 28.- Browey,M., Wooley,DE.: Hystopathology of the rheumatoid lesion, identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum*.1984;27(8):857-64.

- 29.- Schrieber,L., Manolios,N., Shim,ST., Geczy,C., Breet,A.: Hypothesis lymphocyte trafficking in inflammatory rheumatic disease. A role for receptor mediated homing. *J Rheumatol.* 1987;14:194-6.
- 30.- Howat,B.: Possible origin of synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis. *J Royal Soc Med.* 1987;80:477-9.
- 31.- Nakao,H., Eguchi,K., Kawakami,A., et al: Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. Analysis of lymphocytes isolated from minced synovial tissue by dual immunofluorescent staining. *J Rheumatol.* 1990;17(2):142-8.
- 32.- Duke,O., Panayi,GS., Janossy,G., Poulter,L.: An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1982;49:22-30.
- 33.- Fox,D., Millard,J., Kan,L., Zildes,W., Davis,W., Hogge,J., Emmrich,F., Kinne,R.: Activation pathways of synovial T Lymphocytes. *J Clin Invest.* 1990;86:1124-36.
- 34.- Firestein,GS., Zvaifler,NJ.: How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(6):768-73.
- 35.- Firestein,GS., Xu,D., Twmsend,K., et al : Cytokines in chronic inflammatory arthritis.I. Failure to detect T cell lymphokines (IL-2 and IL-3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatic synovitis. *J Exp Med.* 1988;168:1573-86.

- 36.- Nykanen,P., Bergroth,V., Roumno,P., Nordstrom,D., Kouttinen,Y.: Phenotypic characterization of <sup>3</sup>H- thymidine incorporating cells in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Rheumatol Int.*1986;6:269-71.
- 37.- Firestein,GS., Zvaifler,NJ., Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol.*1990;144:3347-53.
- 38.- Houssian,F., Nagaut de Deuxchaisnes; Cytokines and inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum.*1988.433-9.
- 39.- Haynes,B., Grover,B., Whichard,L., Hale,L., Runley,J., McCollum,s., Singer,K.: Synovial microenviroment T cell interactions. *Arthritis Rheum.*1988;31 (8):947-56.
- 40.- Cavender,D., Haskard,D., Yu,CL., et al.: Pathways to chronic inflammation in rheumatoid synovitis. *Fed Proc.*1987;46:113-17.
- 41.- Delker,J., Malone,D., Haraoni,B., et al : Rheumatoid arthritis evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Ann Intern Med.* 1984;101:810-24.
- 42.- Oppenheimer,M., Ziff,M.: Binding of normal human mononuclear cells to blood vessels in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Arthritis Rheum.*1986;29:789-92.
- 43.- Goto,M., Sasano,M., Yamanaka,H., et al : Spontaneous production of an interleukin 1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long term culture. *J Clin Invest.*1987;80: 595-604.
- 44.- Dinarello,CA.: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.*1989;44: 153-205.
- 45.- Le,J., Vilcek,J.: Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest.*1987;56(3):234-48.



- 46.- Hollander,A., Atkins,R., Eastwood,D., Dieppe,P., Elson,C.: Human cartilage is degraded by rheumatoid arthritis synovial fluid but not by recombinant cytokines in vitro. Clin Exp Immunol.1991;83:52-7.
- 47.- Zvaifler,N., Steinman,R., Kaplan,G., Lau,L., Rivelis,M.: Identification of immunoestimulatory dendritic cells in the synovial effusion of patients with rheumatoid arthritis. J Clin Invest.1985;76:789-806.
- 48.- Duff,G.: Peptide regulatory factors in non malignant disease. Lancet.1989;24:1432-4.
- 49.- Arend,W., Dayer,J.: Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1990;33(3):305-15.
- 50.- Fujii,F., Shingu,M., Nobunaga,M.: Monocyte activation in early onset rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis.1990;49:497-503.
- 51.- Westacott,CI., Whicher,TJ., Barnes,CI., Thompson,D., Swan,IA., Dieppe,AP.: Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. Ann Rheum Dis.1990;49:676-81.
- 52.- Brennan,FM., Chantry,D., Turner,M., Foxwell,B., Maini,R., Feldmann,M.: Detection of transforming growth factor-beta in rheumatoid arthritis synovial tissue: lack of effect on spontaneous cytokine production in joint cell cultures. Clin Exp Immunol.1990;81:278-85.
- 53.- Hopkins,S., Humpreys,M., Jayson,M.: Cytokines in synovial fluid I. The presence on biologically active and immunoreactive IL-1. Clin Exp Immunol.1988;72:422-7.
- 54.- Alvaro-Gracia,J., Zvaifler,NJ., Firestein,GS.: Cytokines in chronic inflammatory arthritis V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha

on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes.

J Clin Invest 1990;86:1790-8.

55.- Alvaro-Gracia,J., Zvaifler,NJ., Brown,C., Kaushansky,K., Firestein,GS.: Cytokines in chronic inflammatory arthritis VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . J Immunol.1991;146(10):3365-75.

56.- Miossec,P.: The role of interleukin 1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol.1987;5:305-8.

57.- Dayer,J., Rochemonteix,B., Burrus,B., Demczuk,S., Dinarello,C.: Human recombinant interleukin1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. J Clin Invest.1986;77:645-8.

58.- Burchett,S., Weaver,W., Westall,J., Larsen,A., Kronheim,S., Wilson,C.: Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes.1988;140(10):3473-81.

59.- Pober,J.: Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Amm J Pathol.1988;133(3):426-33.

60.- Goldring,M., Birkhead,J., Sandell,L., Kimura,T., Krane,S.: Interleukin 1 supresses expression of the cartilage specific types II and IX collagens and increases type I and III collagens in human chondrocytes. J Clin Invest.1988;82:2026-37.

61.- Arner,E., Pratta,M.: Independent effects on interleukin-1 on proteoglycan

breakdown, proteoglycan synthesis and prostaglandin E2 release from cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum.* 1989;32:288-97.

62.- Pettipher,E, Higgs,G., Henderson,B.: Interleukin-1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:8749-53.

63.- Shore,A., Jaglal,S., Keystone,E.: Enhanced interleukin-1 generation by monocyte in vitro is temporally linked to an early event in the onset or exacerbation of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1986;65:293-302.

64.- Beutler,B., Cerami,A.: Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature.* 1986;320(17): 584-88.

65.- Yocum,D., Esparza,L., Dubry,S., Benjamin,J., Volz,R., Scuder,P.: Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 1989;122:131-45.

66.- Dayer,J., Beutler,B., Cerami,A.: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med.* 1985;162:2163-8.

67.- Sherry,B., Cerami,A.: Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol.* 1988;107:1269-1277.

68.- Ritchie,DM., Boyle,JA., Meignes,JM., et al: Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med.* 1968;37:393-406.

69.- Boyum,A.: Mononuclear cell separation by ficoll-hipaque gradients. *Scand J Clin Lab Invest.* 21(suppl 97).1968.

70.- Mosmann,T.: Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth.1983;6:55-63.

71.- Green,L, Reade,J, Wore,C.: Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J Immunol Meth.1984;70:257-68.