

11245



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
ORTOPEDIA

“ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE TEJIDO
SINOVIAL DE RODILLA EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO DE MONOARTRITIS INESPECÍFICA
COMO AUXILIAR PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA
DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
CIRUJANO ORTOPEDISTA

PRESENTA:

Dr. RAÚL ALEJANDRO GARCÍA LOZANO

Facultad de Medicina



MEXICO D.F.,

SEPTIEMBRE 2005

0348127



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



Salud

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
ORTOPEDIA



TESIS

Dr. RAÚL ALEJANDRO GARCÍA LOZANO
PARA OBTENER EL TITULO DE
CIRUJANO ORTOPEDISTA

***“ANALISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE TEJIDO
SINOVIAL DE RODILLA EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO DE MONOARTRITIS INESPECÍFICA
COMO AUXILIAR PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA
DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES”***

México D.F. a 13 de Septiembre del 2005



DR. LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA

DIRECTOR GENERAL INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION.



DR. JUAN ANTONIO MADINAVEITIA VILLANUEVA

DIRECTOR ADJUNTO ORTOPEDIA.



DRA. MATILDE ENRIQUEZ SANDOVAL

DIRECTORA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION.



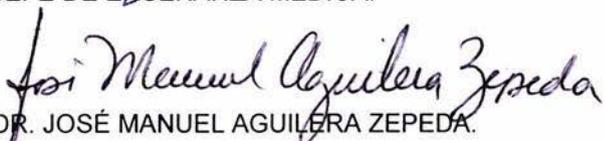
DR. SAÚL R. LEÓN HERNÁNDEZ.

JEFE DE DIVISIÓN DE ENSEÑANZA.



DR. LUIS GÓMEZ VELÁZQUEZ

JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA.



DR. JOSÉ MANUEL AGUILERA ZEPEDA.

PROFESOR TITULAR CURSO DE ORTOPEDIA.



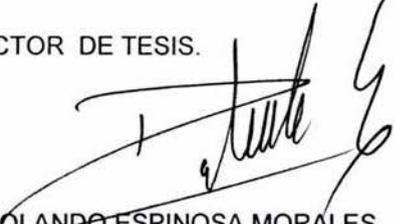
Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Raúl Alejandro
García Lozano

FECHA: 22/09/05

FIRMA: 

DIRECTOR DE TESIS.



DR. ROLANDO ESPINOSA MORALES
JEFE DEL SERVICIO DE REUMATOLOGIA

ASESORES DE TESIS



DRA ERÉNDIRA ESTRADA VILLASEÑOR
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



DR. FRANCISCO CRUZ LOPEZ
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE ARTROSCOPIA



DR ANDRES A. GUTIÉRREZ LÓPEZ
JEFE DE SERVICIO EN TERAPIA CELULAR

INDICE

AGRADECIMIENTOS

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACION

OBJETIVOS

HIPOTESIS

RECURSOS

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFÍA

Agradecimientos

“Cuando las cosas se ponen mas difíciles, es cuando empezamos a luchar por ellas”

Esta frase ha estado en mi cabeza desde que mi padre me la dijo cuando tenía 20 años y me vio cansado y desesperado por el exceso de trabajo que tenía durante el internado. Y a partir de entonces esa frase me ha acompañado siempre que he tenido momentos difíciles y estoy de acuerdo con mi Padre, ya que cuando las cosas se ponen difíciles es cuando empezamos a luchar por ellas.

Le agradezco enormemente a mi padre Rodolfo de Jesús García Herver, por la educación que me brindó y por el ejemplo que me dio para luchar día con día por llegar a mis metas, por darme siempre el amor y el ejemplo de cómo debe ser una persona en la vida para poder triunfar. Gracias por ser mi padre Papa.

Le agradezco también a la persona que más he amado y que más me ha amado que es mi Madre Esther Elizabeth Lozano de García, gracias por una vida de sacrificios y amor por tus hijos, por enseñarnos lo que es el amor de una madre y por haberme apoyado en todo con mi carrera, gracias por tus preocupaciones y noches de desvelos. A ti te dedico mi vida, mi amor y mi alma, todos los triunfos logrados son pensados en ustedes, y mis logros son sus logros, espero nunca defraudarte a ti y a mi padre. Y si nunca se los he dicho, aquí quiero decírselos. “Los amo Papa y Mama”.

A mi hermano Rodolfo Agustín García Lozano por ser mi gran ejemplo y porque el ha estado conmigo en mis momentos mas difíciles y sin tener ninguna duda ni titubeo me apoyaste con todo, Eres la persona en la que mas confío y admiro

Gracias por tu confianza y apoyo. Siempre lo recordare y espero algún día poder corresponderte de la misma manera.

A mi tía Iris Lucía Lozano Cid, quien es como mi segunda madre, gracias por aceptarme como si fuera tu hijo, por darme todo el apoyo en todos los sentidos, por motivarme a seguir adelante y por ayudarme a prepararme mejor, tu has creído en mí y me has apoyado a pesar de que a veces he cometido errores, gracias por creer una vez más en mí y se que nunca me faltará nada mientras tu estés a mi lado. Gracias otra vez tía o Mama, como prefieras que te diga, porque te has ganado el título que prefieras que te diga.

A mi abuelo Agustín Lozano Villavicencio, quien en paz descanse. Como hubiera querido que vieras este día abuelo, tu fuiste para mí algo más que mi abuelo, fuiste como un padre para mí, me enseñaste a luchar por mis ideales y por mis metas, me enseñaste que la vida no es fácil, pero con trabajo y honestidad uno puede lograr cosas muy grandes; Gracias por creer en mí y ayudarme a crear el Centro de Atención Médica ORTHOSPORT. Que es un lugar por el que voy a luchar y trabajar día a día para que te sientas orgulloso de mí. Perdóname por no haber estado ese último día a tu lado, ojala pudiera regresar el tiempo y acompañarte siempre que me lo pidieras, pero no puedo. Solo quiero agradecerte y decirte que te Amé como a un Padre.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación.- El hospital donde llegué siendo un médico general y salí como especialista en Ortopedia, gracias a todos mis maestros por la educación y el apoyo brindado en mi enseñanza, gracias por enseñarme como debe ser y practicarse la medicina, con humanismo y entrega, con Calidad y Calidez.

Introducción.

La Monoartritis se define como la inflamación de una articulación.

La monoartritis representa un reto diagnóstico aun para los médicos más experimentados.

Generalmente no se puede llegar a un diagnóstico posterior a la evaluación inicial de pacientes con monoartritis, motivo por el que los pacientes requieren un estudio más amplio y un tratamiento en ocasiones inmediato para prevenir progresión de la enfermedad como en el caso de sospechar artritis séptica

Es importante diferenciar una verdadera monoartritis entre varias otras patologías que cursan con sintomatología a nivel de la rodilla

El dolor de rodilla puede ser causado por múltiples patologías, como puede ser lesión de tejidos blandos, bursitis, ligamentos, tendones, o de la misma articulación o de los huesos.

Uno de los algoritmos que se pueden utilizar para el estudio de los pacientes con monoartritis de rodilla es el descrito en el cuadro 1

También puede ser un dolor referido o causado por una neuropatía o alguna patología originada en alguna otra articulación como en la artritis de cadera

La artritis que afecta a una articulación diartroidea causa rigidez, y reducción en los arcos de movilidad, dolor durante su uso normal, por lo tanto las causas *inflamatorias* de artritis producen rigidez en la articulación que es más notorio en la mañana o posterior a cierto periodo de inactividad la cual disminuye con el movimiento. Generalmente se asocia a síntomas sistémicos como es la fiebre o malestar general. Cuando es secundario a factores *mecánicos* generalmente aumenta la sintomatología con el movimiento, disminuye con el reposo y no se acompaña de otras sintomatologías como fiebre o malestar general

Dentro de las causas inflamatorias puede ser por infecciones, alteraciones metabólicas, alteraciones inmunológicas,

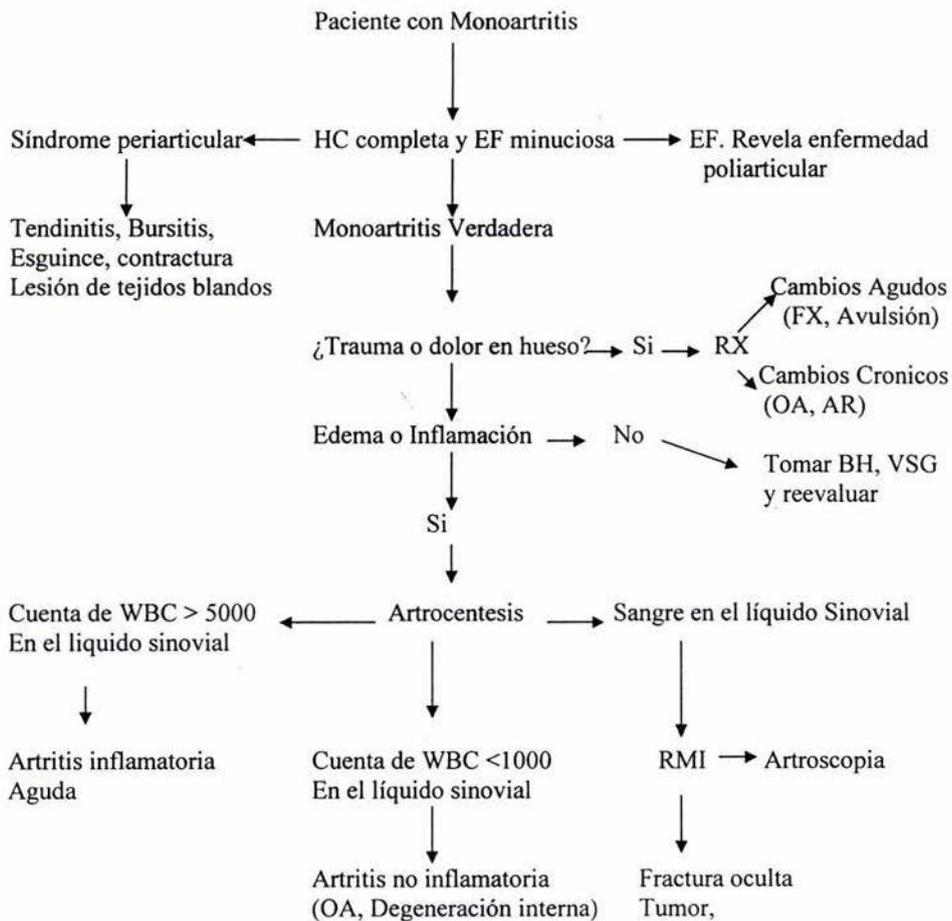
Dentro de los factores mecánicos tenemos a las plicas, lesiones de meniscos, lesión de Ligamento Cruzado Anterior, Ligamento Cruzado Posterior, etc.

Durante la exploración física es importante comparar ambas rodillas en busca de anormalidades, (edema, calor local, enrojecimiento). La presencia de aumento del tejido sinovial no indica específicamente que haya inflamación a menos que se presente aumento en el número de glóbulos blancos.

Los diagnósticos diferenciales en los pacientes que tienen afección monoarticular y/o poliarticular son muy diversos. En la Tabla 1 se mencionan los diagnósticos diferenciales.

(Cuadro 1)

ALGORITMO PARA LA EVALUACIÓN DEL PACIENTE CON MONOARTRITIS



(Tabla 1)

Diagnósticos diferenciales de la Monoartritis

MONOARTICULARES

Artritis séptica.
Bacterial
Tuberculosa
Fungica
Enfermedad de Lyme
Enfermedad acompañada de cristales
Gota
Pseudogota
Lesiones Internas en la rodilla
Hemartrosis
Coagulopatía
Warfarina
Trauma
Osteocondritis disecante.
Neuropática
Microfracturas por estrés
Osteomielitis
Artritis idiopática Juvenil
Enfermedades neuropáticas
Osteocondritis disecante
Disfrtrofia simpático Refleja
Hemoglobinopatías
Cuerpos extraños intraarticulares
Enfermedad de Pager
Fracturas por Stress
Osteomielitis
Sarcoma Osteogénico
Tumor Metastático
Osteocondromatosis Sinovial
Sinovitis villonodular pigmentado
Sinovioma
Mieloma

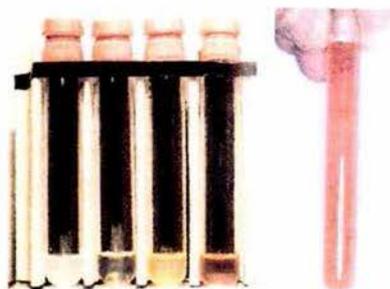
POLIARTICULARES

Artritis reumatoide
Artritis psoriasisica
Síndrome de Reiter's
Enfermedad por depósitos de pirofosfato de calcio
Hemorragia articular crónica
Artritis idiopática juvenil
Púrpura de Henoch-Schönlein
Lupus eritematoso sistémico
Enfermedad de Lyme
Parvovirus
Artropatía por diálisis
Enfermedad indiferenciada del tejido conectivo

Es generalmente aceptado que en casos de monoartritis aguda un diagnóstico preciso puede obtenerse de la historia clínica, exploración física y exámenes de sangre así como un análisis del líquido sinovial y cultivo (12). Las características macroscópicas y de laboratorio del líquido sinovial que nos pueden ayudar en el diagnóstico de la monoartritis se describen en la tabla 2. En estadios subagudos o crónicos el diagnóstico se vuelve más difícil porque hay cambios en las manifestaciones clínicas así como también en las biopsias sinoviales, así es que pacientes con monoartritis inespecífica son vistos frecuentemente en la clínica y necesitan estar bajo observación con algún tratamiento analgésico conservador. En las fases iniciales de la Artritis Reumatoide algunas veces ocurre en conjunto con monoartritis y por lo tanto presenta histológicamente cambios inflamatorios inespecíficos (13-15)



Aspirado de líquido sinovial con técnica aséptica



Ejemplo de diferentes claridades del líquido sinovial

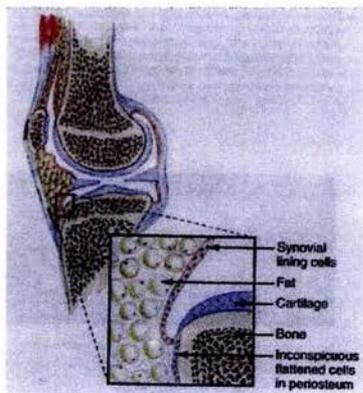
Tabla 2

Análisis del líquido sinovial

Examen	Normal	No inflamatorio	Inflamatorio	Séptico
Macroscópico				
Volumen (ml) Rodilla	< 3.5	>3.5	>3.5	>3.5
Viscosidad	Alta	Alta	Baja	Variable
Claridad	Transparente	Transparente	Translucido	Opaco
WBC (MM3)	< 200	200-2000	2000-75000	>100000
PMN Leucocitos	<25%	<25%	>50%	>75%
Cultivo	(-)	(-)	(-)	(+)
Glucosa	Casi igual A la sangre	Casi igual a la sangre	< 50 mg abajo sangre	< 50 mg abajo de la sangre
		OA Osteocondritis Disecante Osteocondritis	AR Lupus Anquilosis Gota	Bacteria

Histología y función de la sinovial normal

Las articulaciones están cubiertas por una fina capa de tejido sinovial.

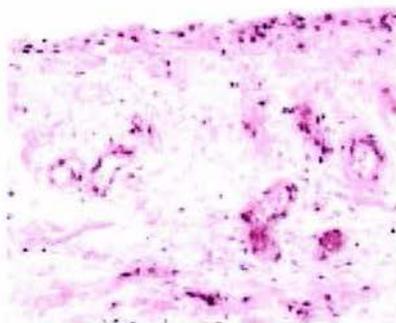
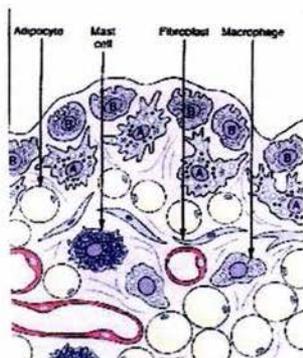


Capa de tejido sinovial

La membrana sinovial normal esta formada por 2 capas, una capa íntima y una capa subíntima.

La capa íntima esta formada por sinoviocitos. Los sinoviocitos forman de una a cuatro capas celulares y se clasifican en sinoviocitos A (similares a macrófagos que son fagocíticas y sintetizan ácido hialurónico) y sinoviocitos B similares a fibroblastos que producen distintas proteínas.

La capa subíntima que se encuentra en el intersticio, esta formado principalmente por vasos sanguíneos, células adiposas, fibroblastos y ocasionalmente macrófagos



La membrana sinovial funciona adicionalmente como tejido linfoide elaborando su respuesta inmune.

Se ha observado en diferentes estudios que la composición del infiltrado inflamatorio (respuesta inmune) presente en la sinovial varía y en ocasiones es patognomónico de algunas enfermedades articulares.

Pitkeathly(16) así como Bywates y Ansell (17) observaron que algunos pacientes con manifestaciones monoarticulares iniciales posteriormente desarrollaron Artritis reumatoide. Por lo tanto la artritis reumatoide puede iniciar su sintomatología semejando una monoartritis. Por lo que es importante observar el curso clínico y hacer un seguimiento de esas monoartritis inespecíficas, especialmente para la identificación temprana, diagnóstico y prevención de secuelas en pacientes con artritis reumatoide

El diagnóstico y el tratamiento temprano puede ser la mas grande esperanza para reducir la incapacidad asociada a pacientes con artritis reumatoide, en pacientes con AR temprana el diagnóstico puede ser retrasado por un acceso limitado a especialistas, evolución lenta de las manifestaciones clínicas y el vacío para tener un criterio diagnóstico definitivo. Sin embargo reactivos para la fase aguda, el estudio del factor reumatoide y el análisis inmunohistológico del tejido sinovial puede ser la base para diferencial a la AR de otras artritis. (6)

Artritis Reumatoide (AR)

La artritis reumatoide que es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune se caracteriza por inflamación del tejido sinovial en múltiples articulaciones hasta llegar a la destrucción de la articulación (3). Una característica prominente es la infiltración por células mononucleares consistente principalmente en linfocitos y células plasmáticas. Otras características incluyen el aumento de la vascularidad, hiperplasia de la membrana basal sinovial y fibrosis intersticial. (7)

Existe la observación de que un número importante de pacientes con AR tienen signos de destrucción del cartilago al momento del diagnóstico.

En estudios realizados se ha encontrado que durante el primer mes de estudio del tejido sinovial en pacientes que posteriormente presentaron los criterios para el diagnóstico de AR o AR Juvenil se encontraron lesiones vasculares prominentes del tejido sinovial así como inflamación principalmente de células plasmáticas, Mientras que los títulos de factor reumatoide fueron bajos, los niveles de gammaglobulina fueron elevados, también el conteo de leucocitos fue generalmente mas bajo comparado con paciente con AR crónica (2)

Entre las características histológicas de la sinovial en la Artritis Reumatoide como se puede ver en la figura 1 A a 1 G son:

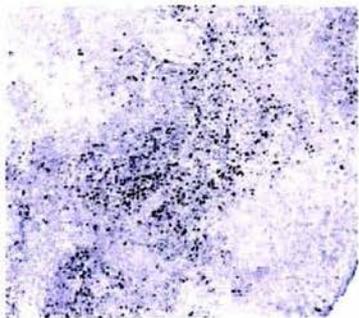
- Presencia de estructuras papilares
- Hiperplasia de sinoviocitos
- Proliferación vascular
- Infiltrado inflamatorio difuso o focal
- Presencia de centros germinales
- Células gigantes de Grimley y Sokolff

La artritis reumatoide se caracteriza por anomalías inmunohistológicas bien definidas de la membrana sinovial (8) con un infiltrado bien diferenciado. Una característica que se presenta es un infiltrado de células mononucleares, principalmente linfocitos y células plasmáticas. Otras características incluyen aumento de vascularidad, hiperplasia de la membrana basal y fibrosis intersticial. La población de linfocitos en el tejido sinovial ha sido estudiada ampliamente, usando anticuerpos monoclonales, se ha encontrado el linfocito predominante es el linfocito T ayudador/inductor. (9-11)

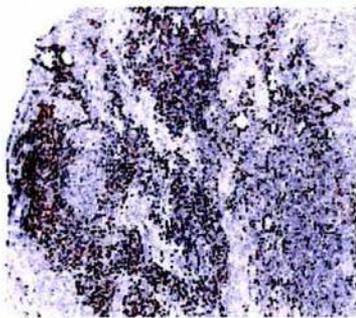
Se ha encontrado gran variedad entre los reportes del porcentaje de Células T ayudadoras vs T supresoras, encontrando ratios de asociación a veces aumentada y a veces disminuída de acuerdo al estadio de la enfermedad así como del tratamiento otorgado

En la población de Norteamérica se ha demostrado que (18):

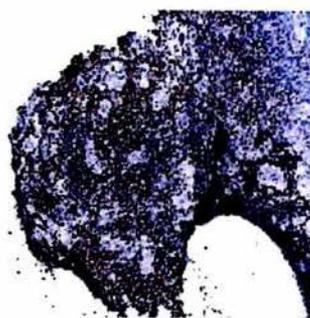
- Cuando se presenta valores altos de CD38 y CD68 se puede predecir un diagnóstico de enfermedad autoinmune
- Expresiones mínimas de CD38 y CD68 indican otros diagnósticos que no sean de enfermedad autoinmune



CD 22 (linf B) en Artritis reumatoide



CD 38 (Céls plasmáticas) en Artritis Reumatoide

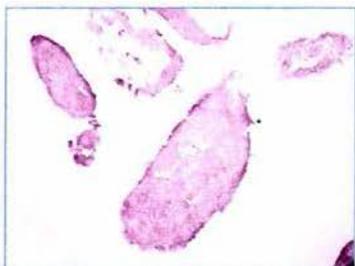


CD 68 (macrófagos) en Artritis Reumatoide

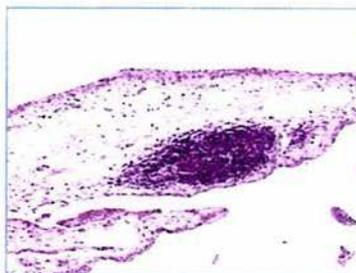
Ejemplo de marcadores inmunohistoquímicos de AR con CD22, CD38 y CD68

(Figura 1 A a 1 G)

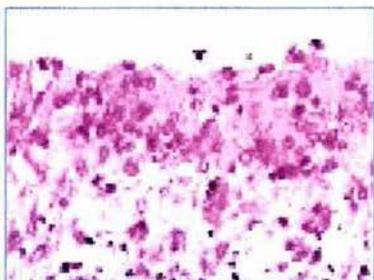
Características histológicas de la sinovial en la Artritis Reumatoide



1 A. Estructuras papilares



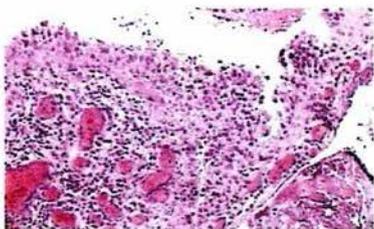
1 E Infiltrado inflamatorio focal



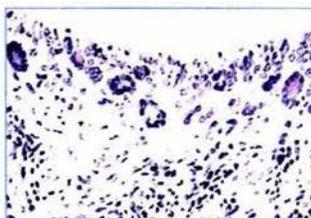
1 B. Hiperplasia de sinoviocitos



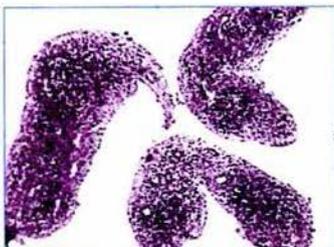
1 F. Centros germinales



1 C. Proliferación Vascular



1 G. Células gigantes de Grimley y Sokoloff



1 D. Infiltrado inflamatorio difuso

Angiogénesis y artritis reumatoide.

La expansión del tejido sinovial en las articulaciones con AR y la invasión subsecuente del pannus en pacientes con AR necesita forzosamente un incremento en el aporte vascular al tejido sinovial. La formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) está reconocida como una clave importante en la formación del pannus.

La angiogénesis juega un papel importante en la patofisiología de la artritis inflamatoria.

La angiogenina es uno de los inductores más potentes en la neovascularización en modelos in vivo. La concentración de angiogenina fue más alta en pacientes con sinovitis aguda o crónica (AR, Artritis inducida por cristales) que en pacientes con osteoartritis.

En la AR hay muchos leucocitos adyacentes al tejido sinovial. La neovascularización es importante para que ingresen los leucocitos al tejido sinovial si no hay formación de nuevos vasos sanguíneos no pueden ingresar esos leucocitos.

Inmunohistoquímica

Corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.

El espectro de anticuerpos disponibles comercialmente crece día a día y actualmente es posible encontrar marcadores para una amplia gama de antígenos (Tabla 3)

Tabla 3

EJEMPLOS DE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS	
Anticuerpo	Células/antígenos detectados
CD1a	célula de Langerhans
CD4	linfocito T de auxilio
CD8	linfocito T citotóxico
CD30	célula de Reed-Sternberg
CD45	leucocitos
CD68	macrófagos
S100	células de Schwann
HMB-45	melanocitos
AE1	citoqueratinas de bajo peso molecular
AE3	citoqueratinas de alto peso molecular
DESMINA	células musculares
GFAP	glía
CEA	antígeno carcino-embriionario
AFP	alfa-fetoproteína
REN	receptores nucleares de estrógenos
VIM	sarcomas

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten una localización más precisa de los antígenos presentes en la célula y los tejidos, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. El material así estudiado puede archivararse por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica. Desventajas existen: presencia de reacción inespecífica, especialmente cuando se utilizan anticuerpos policlonales, algunos reactivos son potencialmente carcinógenos y su manipulación debe ser cuidadosa, requieren estandarización precisa y estricto control de calidad. Existen diversos tipos de técnicas, cuya indicación dependerá del anticuerpo a utilizar (monoclonal o policlonal), material disponible (fresco, congelado o fijado en formalina) y antígenos a estudiar (de superficie o membrana, citoplasmáticos o nucleares). Estas técnicas necesitan de controles internos o paralelos, usualmente positivos y negativos.

El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario. Existen sistemas automatizados que permiten la tinción de un gran número de casos simultáneamente con la ventaja de pasos definidos y estandarización de las variables usuales con costo relativamente bajo y en mucho menor tiempo.

La inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en identificación de diferenciación y de marcadores pronósticos de neoplasias y como ayudante en enfermedades autoinmunes que se presentan en el tejido sinovial

Un elemento importante a considerar es la óptima preservación del tejido y por ende de los antígenos. La mayoría de los antígenos se conservan adecuadamente después de la fijación en formalina e inclusión en parafina. Algunos son más lábiles y sólo se detectan en cortes de congelación.

Uno de los problemas actuales con estas técnicas no es la técnica en sí, manual o automatizada, o la posibilidad de acceder a los numerosos anticuerpos existentes, sino la interpretación de los resultados. Los errores de interpretación disminuyen a nivel aceptable cuando el patólogo y sus colaboradores tienen experiencia en estas técnicas y los resultados se analizan a la luz de los demás hallazgos clínico-patológicos.

En el caso del tejido linfoide la inmunohistoquímica es de utilidad para identificar el inmunofenotipo de los linfocitos y/o células mononucleares.

La expresión y la localización de angiogenina en tejido sinovial así como en otros tejidos también pueden valorarse mediante esta técnica

Justificación

-La artroscopia y la toma de biopsia de sinovial juega un rol importante en el diagnóstico de la monoartritis crónica inexplicable

-El análisis inmunohistoquímico del tejido sinovial puede tener utilidad en la orientación diagnóstica temprana de enfermedades inflamatorias autoinmunes e inflamatorias no autoinmunes en pacientes con un diagnóstico histopatológico de sinovitis crónicas inespecíficas

-La artritis reumatoide es una enfermedad que afecta al 1% de la población mundial, afecta principalmente a mujeres con una relación 3:1 y sus secuelas son tan incapacitantes que llegan a requerir los pacientes prótesis para su tratamiento

-El diagnóstico temprano acompañado de un tratamiento oportuno nos dará como resultado cambios en la historia natural de una enfermedad, en este caso de enfermedades inflamatorias autoinmunes como la artritis reumatoide

Objetivo

Comparar los marcadores inmunohistoquímicos:

- CD68 (macrófagos),
- CD5 (linfocitos T)
- Células plasmáticas
- CD20 (linfocitos B)
- angiogenina

que se presentan en los infiltrados de tejido sinovial de pacientes con diagnóstico histológico de tejido sinovial normal, monoartritis inespecífica (Sinovitis Crónica Inespecífica) y enfermedad inflamatoria autoinmune (Artritis Reumatoide), en búsqueda de una asociación entre el grupo de sinovitis crónica inespecífica y los pacientes con artritis reumatoide que nos permita diagnosticar tempranamente y tratar oportunamente a estos pacientes

Hipótesis

El estudio inmunohistoquímico del tejido sinovial de rodilla de pacientes con diagnóstico de monoartritis inespecífica puede compartir características inmunohistoquímicas y de angiogenesis parecidas con los casos ya establecidos de enfermedad reumática autoinmune (AR).

Hipótesis nula

No se encontrará asociación en el estudio Inmunohistoquímico de las biopsias de tejido sinovial con diagnóstico de monoartritis inespecífica con enfermedades reumáticas autoinmunes

Tipo de estudio

Estudio Retrospectivo, transversal, comparativo, observacional

MATERIAL Y MÉTODO

Criterios de Inclusión

Se investigará de la bitácora del servicio de Patología todas las biopsias de sinovial tomadas en el año 2001 hasta Diciembre del 2004 en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Se utilizaran 3 grupos poblacionales comparativos:

- Tejido sinovial normal
- Monoartritis de rodilla
- Enfermedades autoinmunes (ejemplo: AR).

Población objetivo 1

Pacientes Masculinos y femeninos que estén llevando su atención médica en el Instituto Nacional de Rehabilitación, y que sean pacientes que ingresaron a cirugía artroscópica para realizarse algún procedimiento y se les tome biopsia de tejido sinovial y el resultado del estudio histopatológico e inmunohistoquímico sea de tejido sinovial de características normales

Población objetivo 2

Pacientes Masculinos y femeninos que estén llevando su atención médica en el Instituto Nacional de Rehabilitación, y que ingresaron al Instituto de Ortopedia ya sea por urgencias o por consulta externa con un diagnóstico de Monoartritis de rodilla sin tener un diagnóstico de Artritis ya sea autoinmune o degenerativa y que se les haya realizado una cirugía artroscópica como apoyo diagnóstico y tenga un reporte histopatológico de Sinovitis crónica inespecífica,

Población objetivo 3

Pacientes Masculinos y femeninos que estén llevando su atención médica en el Instituto Nacional de Rehabilitación, y que para poder entrar al grupo 3 (enfermedades autoinmunes) cumplan con los criterios de la asociación Americana de Reumatismo y que su enfermedad tenga menos de 7 años de evolución y que hayan sido operados de artroplastia total de rodilla en este hospital, de ahí se tomaran los bloques que contengan tejido sinovial y que tengan un reporte histopatológico de sinovitis crónica inespecifica compatible con Artritis Reumatoide .

Criterios de exclusión

Pacientes con infiltración de esteroides en rodilla 30 días antes de la artroscopia.

Pacientes que tengan el diagnóstico de alguna enfermedad inmunosupresora.

Pacientes que estén tomando corticosteroides sales de oro, penicilamina, medicamentos antimalaria, drogas inmunosupresoras

Pacientes con material histológico escaso e insuficiente para poder realizar los estudios inmunohistoquímicos de tejido sinovial

Recursos

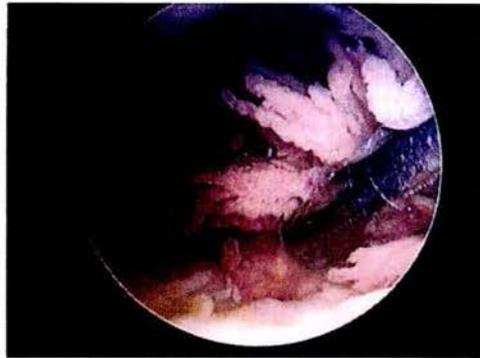
- Infraestructura del servicio de Patología
- Apoyo por parte del servicio de Reumatología
- Laboratorio de biología molecular
- Marcadores inmunohistoquímicos en el CNR
- Biopsias enviadas por el Servicio de artroscopia.
- Biopsias enviadas por el servicio de Reconstrucción articular

Toma de biopsias

Las biopsias de tejido sinovial se tomaron de pacientes de los servicios de artroscopia y del servicio de reconstrucción articular, con equipo del Instituto Nacional de Rehabilitación, y enviadas al servicio de Patología, en donde fueron procesados y analizados. (Figura 3)



Muestra de tejido sinovial
enviado a Patología



Biopsia artroscópica de Tejido
Sinovial

Figura 3

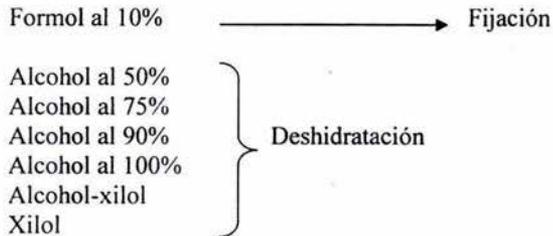
Muestras de las
laminillas en estudio



Las biopsias fueron examinadas por 1 observador en este caso fue por la Dra. Eréndira Estrada

Proceso:

1. Fijación en formol al 10% (24hrs)
2. Inclusión en bloques de parafina



Bloques de parafina

Cortes a 5 micras de espesor

Montaje en laminillas silanizadas y/o con carga positiva

Tinción con Hematoxilina y Eosina (HE)

Se estudiaron todas las biopsias con los siguientes marcadores inmunohistoquímicos:

Anticuerpos antinucleares contra:

- CD5 (Linfocitos T)
- CD20 (Linfocitos B)
- Células plasmáticas
- CD 68 Macrófagos/histiocitos

Marcador angiogenico

Anticuerpo monoclonal Antiangiogenina humana

Las características histológicas que se evaluaron en cada uno de los cortes están descritas en la tabla 4

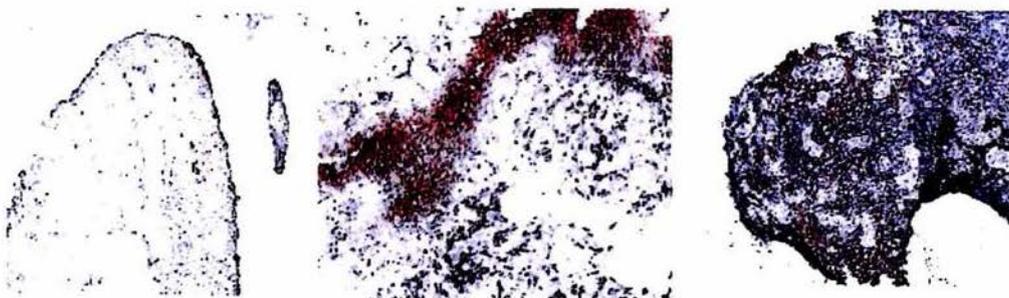
Análisis microscópico

Todas las biopsias fueron analizadas con hematoxilina y eosina, Se le dio un valor en escala a los infiltrados los cuales dependían de la cantidad del infiltrado siendo + el infiltrado leve, ++ el infiltrado moderado y +++ el infiltrado intenso (Figura 4)

En el caso de la Tinción por Angiogenina

- Intensidad de la positividad (leve, moderado o intenso)
- Localización de la positividad (tipo de célula)

Figura 4 . Intensidad del Infiltrado



LIGERO (+)

MODERADO (++)

INTENSO (+++)

Tabla 4

CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS A EVALUAR

Cantidad de infiltrado inflamatorio () ligero () moderado () intenso
Disposición del infiltrado inflamatorio () focal () difuso

OTRAS

() Centros germinales
() Vasos
() Hiperplasia de sinoviocitos

Cantidad de vasos: () ligera () Moderada () Intenso

Fenotipo del infiltrado inflamatorio:

CD20 (+) _____ (-) _____
CD5 (+) _____ (-) _____
Céls Plasmáticas (+) _____ (-) _____
CD 68 (+) _____ (-) _____

Disposición del infiltrado inflamatorio

Céls B y Céls T dispuestas en forma aleatoria ()
Céls B centrales y Céls T periféricas ()
Otra ()

Angiogenina (+) _____ (-) _____
En caso de positividad localización _____
Tipo de célula positiva _____
Intensidad de positividad _____
Cantidad de vasos _____

En caso de células plasmáticas (+)

Localización de las céls plasmáticas: _____

Relación Céls T / Céls B:

Relación 1:1 ()
Relación 1:2 ()
Relación 2:1 ()

RESULTADOS

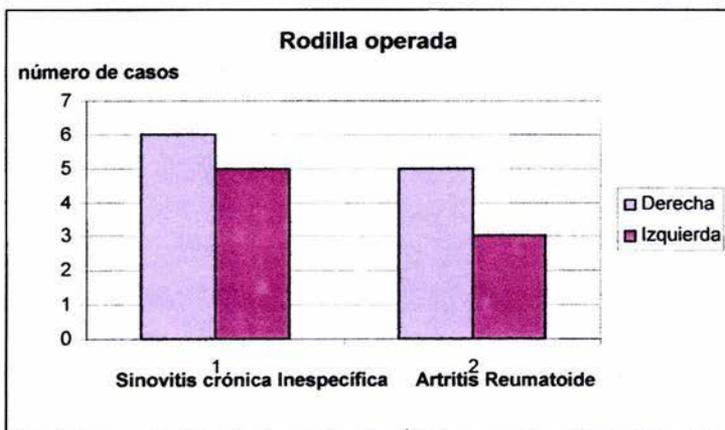
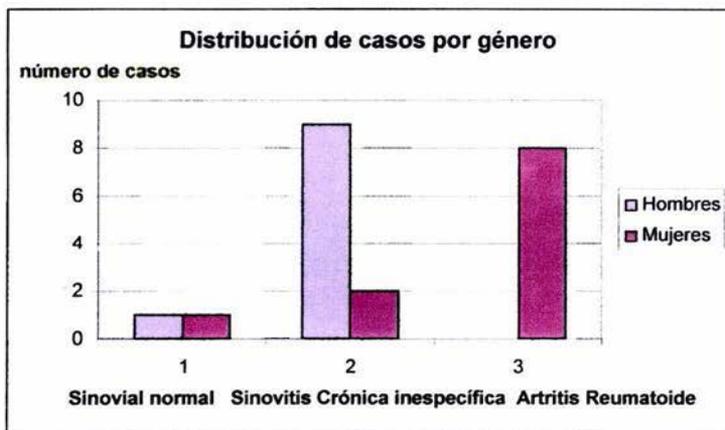
Se estudiaron en total 23 Biopsias de tejido sinovial de rodilla las cuales fueron tomadas de la bitácora del servicio de anatomía patológica:

- 2 pacientes con tejido sinovial normal
- 11 pacientes con el diagnóstico de monoartritis inespecífica (sinovitis crónica inespecífica)
- 10 pacientes con el diagnóstico de enfermedad autoinmune (AR). De los cuales dos se eliminaron por no haber una cantidad adecuada de tejido sinovial para poder teñir con los diferentes anticuerpos inmunohistoquímicos

Las características generales de los pacientes estudiados son resumidos en la Tabla 5, siendo el género masculino predominante en los casos de sinovitis crónica inespecífica de este estudio y el género femenino el predominante en los casos de artritis reumatoide en este estudio; la rodilla que fue operada en este estudio fue de predominio derecha en las sinovitis crónicas inespecíficas así como en la artritis reumatoide; el tiempo promedio de la sintomatología dolorosa en rodilla fue de 10 meses en la sinovitis crónica inespecífica y de 42 meses en la artritis reumatoide previo a su cirugía

Tabla 5 Datos clínicos de los pacientes del estudio

Sexo	S. Normal (1)	SCI (2)	AR (3)
hombres	1	9(81%)	0(0%)
Mujeres	1	2(19%)	8(100%)
Total	2	11	8
Rodilla operada			
Derecha	2	7(63%)	5(62%)
izquierda		4(37%)	3(38%)
Total	2	11	8
Tiempo sintomatología		10meses (5 a 18 meses)	42meses (12 a 62meses)



Dentro de los resultados obtenidos en la tabla 5 podemos encontrar que hay una diferencia importante entre las personas que padecen de sinovitis crónica inespecífica (monoartritis) comparado con los que presentan Artritis Reumatoide encontramos que las sinovitis crónicas inespecíficas son mas comunes en los hombres que en las mujeres, siendo un porcentaje del 81% de predominio en hombres y las mujeres fue un 100% de casos para artritis reumatoide, por lo que no hay una asociación entre el sexo presentado entre nuestros casos de SCI y Artritis reumatoide.

Sobre la rodilla con mayor afectación en los dos casos fue la derecha la que presentó el predominio de la sintomatología, en un 63 y un 62% por lo que hay predilección por afectar la rodilla derecha o presentar mayos sintomatología en la rodilla derecha que la izquierda pero esto se puede asociar a que la mayoría de las personas son diestras y prefieren su cirugía de la rodilla que mayor sintomatología causa y en este caso puede ser la derecha.

Sinovial normal

Como se puede ver en las figuras 5 A a 5 E en el estudio inmunohistoquímico del tejido sinovial, se encontró ausencia de infiltrado inflamatorio o en cantidad muy escasa

Fig 5 A Tejido sinovial normal HE a 10 x



Fig. 5 D Células CD 5

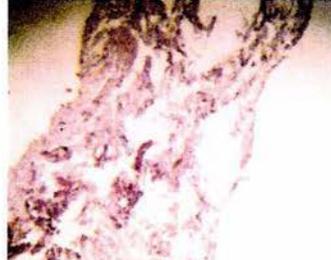


Fig 5 B Células Plasmáticas

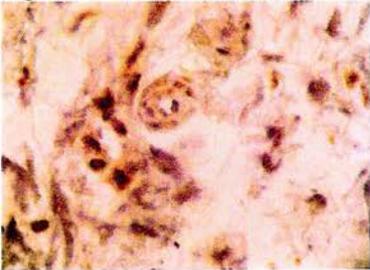


Fig. 5 E Células CD 20



Fig 5 C Células CD 68



Sinovitis crónica inespecífica

A diferencia de la sinovial normal, en las sinovitis crónicas inespecíficas se observó un infiltrado inflamatorio que tendía a ser de leve a moderado, con una disposición del infiltrado inflamatorio de forma difusa, acompañado de hiperplasia de sinoviocitos, sin centros germinales, y con una cantidad de vasos moderada como se observa en las figuras 6 A a 6 F

Fig. 6 A Tejido sinovial HE

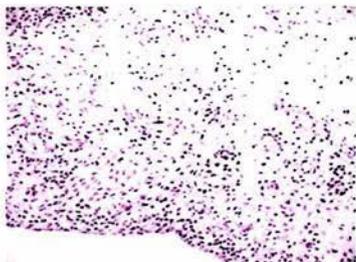


Fig 6 B Células Plasmáticas



Fig. 6 C Células CD 68 en sinoviocitos e intersticio

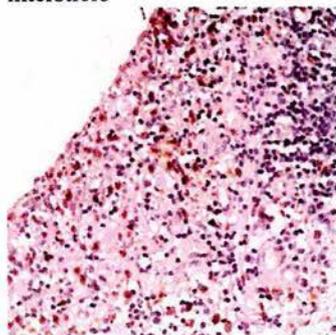


Fig. 6 D Células CD 5-

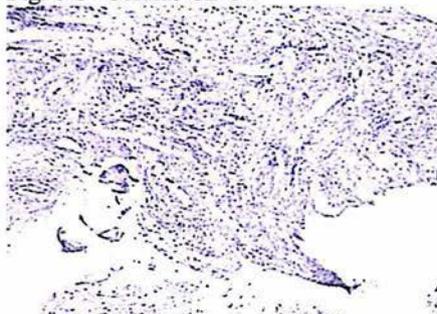


Fig. 6 E Células CD 20

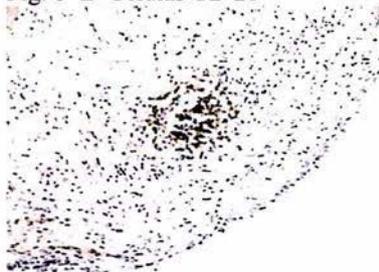


Fig. 6 F Angiogénesis



Artritis Reumatoide

Las características observadas en los casos de artritis reumatoide fueron un infiltrado de leve a moderado con una disposición del infiltrado local, con hiperplasia de sinoviocitos, además se observan casos con centros germinales, una cantidad de vasos de predominio moderada y positividad en la angiogenina como se observa en la figura 7 A a 7 F

Fig. 7 A Tejido sinovial HE a 20 x

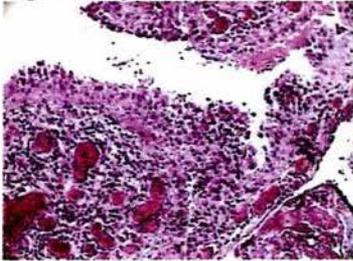


Fig. 7 B Células Plasmáticas



Fig. 7 C Células CD 68 en centro germinal

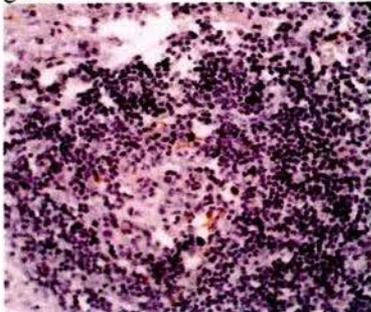


Fig. 7 D Células CD 5

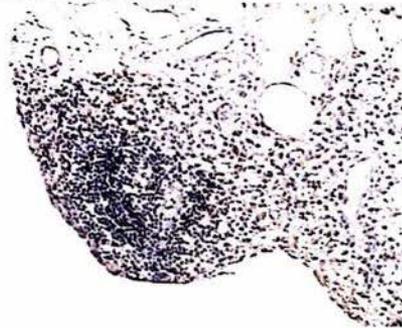


Fig. 7 E Células CD 20

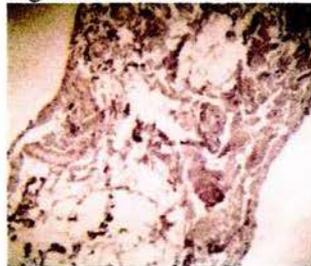


Fig. 7 F Angiogénesis



Los resultados inmunohistoquímicos que obtuvimos al analizar nuestras muestras de tejido sinovial normal debido a la ausencia de infiltrado inflamatorio fueron negativos.

Sinovitis crónica inespecífica. Resultados.

En los casos de sinovitis crónica inespecífica obtuvimos un total de 11 muestras de las cuales 7 fueron leves, 3 moderadas y solo 1 caso resultó intenso para el infiltrado inflamatorio, por lo que el mayor número de infiltrado se localizo en los casos leves y moderados, posteriormente en la disposición del infiltrado inflamatorio obtuvimos 4 casos con disposición local y 7 casos con disposición difusa, dándonos un total de 11 casos, una característica que nos llamo mucho la atención es que en 5 casos encontramos hiperplasia de sinoviocitos y en 6 casos no los hubo, siendo la hiperplasia de sinoviocitos una de las características de la Artritis reumatoide.

Encontramos que los 11 casos no presentaron centros germinales a comparación de los casos de artritis reumatoide que si los presentaron en 3 casos.

Con respecto a la cantidad de vasos de las 11 muestras analizadas encontramos que 5 casos presentaban una cantidad ligera de vasos, 3 moderada y 3 intenso.

Dentro del fenotipo del infiltrado inflamatorio encontramos positividad para los diferentes grupos celulares observando que en 9 casos había células plasmáticas, 10 casos se encontró linfocitos B, 7 casos linfocitos T.

La angiogenina se encontró positiva en 5 casos y negativa en 2, 4 muestras no fueron valorables.

Artritis Reumatoide. Resultados.

En los casos de Artritis reumatoide encontramos que la cantidad de infiltrado inflamatorio era también de predominio leve y moderado con un total de 7 casos y un solo caso fue intenso, la disposición del infiltrado inflamatorio fue de predominio focal con 5 casos y solo 3 difuso, se observo además hiperplasia de sinoviocitos en 5 casos y ausencia de esta en 3 casos. Presencia de centros germinales en 3 casos y ausencia en 5, La cantidad de vasos tuvo un predominio de ligero a moderado con un total de 7 casos y un solo caso fue intenso. El fenotipo del infiltrado inflamatorio fue de 6 en células plasmáticas, 8 para linfocitos B, 8 para macrófagos, 1 para linfocitos T, y para la angiogenina solo un caso fue positivo y 2 negativos, teniendo 5 casos no valorables.

Los resultados del análisis inmunohistoquímico son resumidos en la tabla 6

Tabla 6. Resultados

	Normal	Inespecífica	AR
Cantidad Infiltrado Inflamatorio			
Sin infiltrado inflamatorio	2	0	0
Leve	0	7	3
Moderado	0	3	4
Intenso	0	1	1
Total	2	11	8
Disposición del infiltrado inflamatorio			
Local	0	4	5
Difuso	0	7	3
Total	0	11	8
Hiperplasia de sinoviocitos			
Si	0	5	5
No	0	6	3
Total	0	11	8
Centros Germinales			
Si	0	0	3
No	0	11	5
Total	0	11	8
Cantidad de vasos			
Ligero	0	5	3
Moderado	0	3	4
Severa	0	3	1
Total	0	11	8
Fenotipo del infiltrado inflamatorio			
Céls plasmáticas	0	9	6
CD20	0	10	8
CD 68	0	7	8
CD 5	0	2	1
No valorable	0	0	0
Angiogenina			
Positivo	0	5	1
Negativo	0	2	2
No valorable		4	5
Total	0	11	8

Se realizó una prueba de chi cuadrada para poder investigar la asociación entre dos variables categóricas con una misma población encontrando las siguientes asociaciones la cual se resume en la tabla 7 y 8

Tabla 7

	ARTRITIS REUMATOIDE	SIN. CRONICA INESP.	P
Infiltrado inflamatorio			
leve-moderado	87.50%	90.90%	0.52
Disposición del infiltrado			
Difuso	62.50%	63.60%	0.66
Centros germinales (no)			
No	75%	100%	0.16
Cantidad de vasos			
leve-moderado	87.50%	72.70%	0.54
Hiperplasia de sinoviocitos			
No	62.50%	54.50%	0.55
CD20			
leve-moderado	62.50%	81.80%	0.03*
CD5			
Sin presencia	87.50%	72.70%	0.29
CD68			
leve-moderado	60%	100%	0.04*
intenso	40%	0%	
Células Plasmáticas			
Leve-moderado	37.50%	100%	0.018*
intenso	25%	0%	
Angiogenina			
No hay (-)			
leve	66.60%	100%	0.17
Moderado	33.30%	0%	

* casos con significancia estadística

10 parámetros

significativos = 30%

no significativos = 70%

En esta tabla se compararon 10 características entre el grupo de artritis reumatoide y el grupo de sinovitis crónica inespecífica.

Dentro de los resultados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las características histológicas valoradas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), en cuanto a la cantidad de linfocitos CD20 (linfocitos B), macrófagos (CD 68) y células plasmáticas entre el grupo de artritis reumatoide y el grupo de sinovitis crónica inespecífica.

Tabla 8. Distribución celular del infiltrado inflamatorio

En artritis reumatoide (8 casos)

CD20 *	
En zonas de acumulo focal	6
En la periferia	3
CD 5	
Zonas de infiltrado inflamatorio Difuso	3
Céls plasmáticas	
Alternado con el resto del infiltrado inflamatorio	8
CD 68 *	
En sinoviocitos	7
Centros germinales porción central	1
A nivel de la subíntima	1

*algunos casos compartían infiltrados en uno o más grupos celulares por eso da más casos que el número original (8)

En Sinovitis crónica inespecífica (11 casos)

CD20*	
En zonas de acumulo focal	6
En forma difusa	10
CD 5	
Zonas de infiltrado inflamatorio Difuso	2
Céls plasmáticas	
Alternado con el resto del infiltrado inflamatorio	11
CD 68 *	
En sinoviocitos de la íntima	10
Centros germinales porción central	0
A nivel de la subíntima	1
Céls intersticiales	2

*algunos casos compartían infiltrados en uno o más grupos celulares por eso da más casos que el número original (11)

Discusión y conclusiones

En este trabajo se compararon 3 grupos poblacionales, en el primer grupo de sinovial normal, no se observa infiltrado inflamatorio y por lo tanto los marcadores inmunohistoquímicos que realizamos fueron negativos en todos los casos; Al analizar los marcadores inmunohistoquímicos en la población de artritis reumatoide y sinovitis crónica inespecífica encontramos el resultado de 3 variables que tenían un nivel de significancia estadística ($p < 0.05$), y esto fue en las poblaciones de células Plasmáticas, CD 68 (macrófagos) y CD20 (linfocitos B) lo que nos da a conocer que en estos grupos poblacionales de infiltrado inflamatorio si hubo una diferencia entre un grupo y el otro, ahora como vimos previamente es de esperarse que en la artritis reumatoide se presente un aumento en la población de células plasmáticas y CD68 (macrófagos) sin embargo las sinovitis crónicas inespecíficas que valoramos no comparten estas características, por lo tanto si nos basamos en la observación previa (18) en la cual en aquellos casos de sinovitis con valores altos de CD38 y CD68 se puede predecir un diagnóstico de enfermedad autoinmune, nosotros al no encontrar estas mismas características, no podemos afirmar que en nuestros casos de sinovitis crónica inespecífica vayan a presentar un riesgo aumentado de desarrollar enfermedad autoinmune.

Queríamos relacionar en este estudio el hecho de que si los pacientes que diagnosticamos como monoartritis inespecífica y se les realiza una biopsia de tejido sinovial, si sus cambios podrían asociarse a cambios inmunohistoquímicos presentes en la artritis reumatoide, pero al desarrollar nuestro protocolo NO encontramos cambios definitivos que nos permitan confirmar una asociación entre los pacientes con sinovitis crónica inespecífica y los pacientes con artritis reumatoide.

Por lo que nuestra hipótesis inicial resulta falsa y nuestra hipótesis nula resulta verdadera. Este trabajo tiene como limitante que solo se utilizaron 11 casos de sinovitis crónica inespecífica y 8 de artritis reumatoide, por lo que la población que se estudió fue muy pequeña.

El presente estudio nos muestra variaciones importantes en el infiltrado inflamatorio entre el grupo de sinovial normal, sinovitis crónica inespecífica y artritis reumatoide. Se encontraron variaciones inmunohistoquímicas principalmente en el número de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos B.

Todas las biopsias fueron tomadas de rodilla en los casos de monoartritis inespecífica fue por vía artroscópica y en los casos de artritis reumatoide fue por vía abierta por artroplastía total de rodilla. Siendo excluidos los casos manejados con infiltraciones o toma de corticoesteroides.

Para cuantificar el número de células expresadas en los diferentes marcadores inmunohistoquímicos se utilizaron escalas semicuantitativas. Usando métodos similares a los utilizados por otros grupos de investigadores (9, 11, 15, 18)

Histológicamente la sinovial de la artritis reumatoide esta caracterizada por hiperplasia sinovial, y por acumulación de células plasmáticas, linfocitos T, linfocitos B y por un número bajo de otros grupos celulares como los Polimorfonucleares y mastocitos.

Estudios previos empleando métodos inmunohistoquímicos para estudiar el tejido sinovial en paciente con artritis reumatoide en un número pequeño de pacientes fallaron para demostrar cambios histológicos que sean específicos en estadios tempranos de la artritis reumatoide. Schumacher y Kitridou reportaron cambios como hiperplasia sinovial y cambios vasculares así como acumulación de linfocitos y ocasionalmente células plasmáticas en una serie de 6 pacientes con Artritis reumatoide de menos de 3 meses de evolución.

La realización posterior de un estudio más extenso con una mayor cantidad de casos, permitirá llegar a conclusiones más certeras.

Este trabajo servirá de base para realizar protocolos prospectivos siguiendo los algoritmos previamente descritos y así poder dar un diagnóstico temprano y una atención oportuna a los pacientes con enfermedades autoinmunes y sinovitis crónicas inespecíficas

Bibliografia

- (1)- Rheumatology "Joseph McCune and Joseph Golbus" Pag 367-377
- (2) Schumacher Ralph et al "Synovitis of recent onset a clinicopathologic study during the first Month of Disease". Arthritis and rheumatism, Vol 15, No 5 (sept. Oct 1972)
- (3) Sokoloff L, Hough AJ. "Pathology of rheumatoid arthritis and allied disorders". Arthritis and allied conditions Tenth Edition, Edited by DJ Mc Carty. Philadelphia, Lea & Febiger, 1985
- M.C. Kraan, J.J Haringman et al Immunohistological análisis of synovial tissue for differential diagnosis in early arthritis. Rheumatology 1999;38: 1074-1080
- Smeets TJM, Dolhain RJEM, Breedveld FC, tak pp. Analysis of the ceullar infiltrates and expression fo citoykines in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and reactive arthritis. J Pathol 1998; 186: 75-81
- Tak PP, Smeets TJM, Daha MR et al. Analysis of the synovial cellular infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to disease activity. Arthritis Rheum 1997; 40:217-25
- (6) Breshnihan Barry "Treatin Early Rheumatoid Arthritis in the younger patient" The Journal of Rheumatology 2001, Volume 28, supplement 62 pp
- (7) Rooney Madeleine et al "Changes in lymphocyte infiltration of the synovial membrane and the clinical course of rheumatoid arthritis" Arthritis and Rheumatism 1989, vol, 32, No. 4 361- 369
- (8) Sokoloff L, Hough AJ: Pathology of rheumatoid arthritis and allied disorders Arthritis and Allied Conditios. Tenth edition, Edited by DJ McCarty, Philadelphia, Lea & Febiger, 1985
- (9) Janossy G et al. Rheumatoid arthritis: a disease of T lymphocyte/macrophage immunoregulation. Lancet II:839-842, 1981
- (10) Forre O, Thoen J et al. Detection of T Lymphocyte subpopulations in the periphereal blood and synovium of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. Scand J Immunol 15;221-226, 1982
- (11) Meijer CJLM, et al. In situ localization of lymphocyte subsets in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. J Rheumatol 9: 359-365, 1982
- (12) Freed J. F, et al Acute monoarticular arthritis. A diagnostic approach. JAMA 243:2314, 1980
- (13) Kulka, J.P et al Early joint lesions of rheumatoid arthritis, Arch. Pathol. 59:129,1955
- (14) Pollard et al Chronic monoarticular arthritis in adults. Arthritis Rheum. 5:315, 1962
- (15) Rasmussen, G et al Monoarthritis, clinical an dhistological examination. Scand. J. Rheumatol 2:65, 1973.
- (16) Pitkeathly et al: Monoarthritis A study of forty-five cases. J. Bone Joint Surg. 46B: 685, 1964
- (17) Bywaters et al: Monoarticular arthritis in children. Ann. Rheum Dis. 24:116, 1965
- (18) Kraan MC, Versendaal H, Jonker M et al. Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. Arthritis Rheum 1998;41: 1481-8
- Linblad s, Hedfors E. Arthoroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. Arthritis Rheum 1987; 30:1081-8
- Tetsuhiro Iguchi, Tsukasa Matsubara, et al. Clinical and histologic Observations of Monoarthritis. Clinical orthopaedics 1990; 241-246