



03062
5
201

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO**

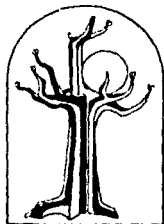
**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA SINOVIAL EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA

GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA



FACULTAD DE MEDICINA

México D.F. 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

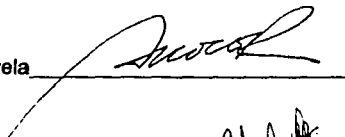
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Raúl Mancilla Jiménez
SECRETARIO: Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez
VOCAL: Dr. Jorge Alcocer Varela
SUPLENTE: Dr. Enrique Ortega Soto
SUPLENTE: Dr. Pablo Pacheco Cabrera

ASESOR DEL TEMA: Dr. Jorge Alcocer Varela



SUSTENTANTE: Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda



Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

¡Escucha! Oye el canto del pájaro,
el viento entre los árboles,
el estruendo del océano...;
mira un árbol, una hoja que cae o una flor,
como si fuera la primera vez.

Puede que, de pronto,
entres en contrato con la Realidad,
con ese Paraíso del que
nos ha arrojado nuestro saber
por haber caído desde la infancia.

"Trata de probar a qué sabe
la ausencia de saber"

"Oración de la Rana I", Anthony de Mello.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	2
2. RESUMEN	4
3. INTRODUCCIÓN	6
4. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVOS GENERALES	15
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	15
5. JUSTIFICACIÓN	16
6. HIPÓTESIS	17
7. MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS	18
7.2 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE LAS MUESTRAS DE LA MEMBRANA SINOVIAL Y LAS CMNSP	19
7.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA , PCR Y ELECTROFORESIS DEL ADN	20
7.4 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA	21
7.5 DETECCIÓN DE LA IL-10 POR ELISA	25
7.6 INMUNOHISTOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LA IL-8 Y LA IL-10	26
7.7 INMUNOHISTOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN VCAM-1 E ICAM-1	27
7.8 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS	27
7.9 ESTADÍSTICA	27
8. RESULTADOS	28
9. DISCUSIÓN	47
10. CONCLUSIONES	57
11. APÉNDICE	59
12. BIBLIOGRAFÍA	64

1. ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
AR	Artritis Reumatoide
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ARNc	Ácido Ribonucleico Complementario
CD	Cluster Differentiation
Células NK	Células Natural Killer
Células Th	Células T "helper" o cooperadoras
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CMNs	Células Mononucleares
CMNSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
CPH II	Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II
CTRL	Control
CTRL No I	Control No Inflamatorio
CTRL I	Control Inflamatorio
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Dinucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
Fc	Región constante de la inmunoglobulina
fg	femtogramos
GM-CSF	Granulocyte and Monocyte-Colony Stimulating Factor
GPS	Grupos
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Inmunoglobulina de clase E
IgG	Inmunoglobulina de clase G

IgM	Inmunoglobulina de clase M
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1Ra	Antagonista del receptor para la IL-1
IL-1RII	Receptor tipo II para la IL-1
IL-2R	Receptor para la IL-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
Integrinas VLA	Very Late Activation Antigens
M ϕ s	Macrófagos
μ g	microgramos
μ l	microlitro
μ m	micrometro
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase
Mos	Monocitos
NAP-1	Neutrophil Activating Peptide
PAF	Factor Activador de las Plaquetas
PCR-PATY	Polimerase Chain Reaction-PCR Aided Transcript Titration Assay
pg	picogramos
Secuencia RGD	Secuencia de Arginina-Glicina-Aspártico
sTNF- α p75	Receptor soluble p75 para el TNF- α
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TCR	T Cell Receptor
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
TNF- α	Tumour Necrosis Factor- α
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

2. RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia de infiltrados crónicos, el desarrollo de la artropatía destructiva, la degradación ósea y del cartilago articular. Algunas respuestas inmunes anormales se hallan en estos pacientes, por lo que se ha sugerido que, la alteración en la regulación de la producción o de la acción de ciertas citocinas y moléculas de adhesión contribuyen a la patogenia y perpetuación de la enfermedad. Por ello nosotros investigamos la expresión de los ARNm de algunas citocinas con un potencial regulador en el daño sinovial tales como el de la IL-1 β , la IL-4, la IL-6, la IL-8, la IL-10, la IL-13, el TNF- α y el TGF- β 1 en los pacientes con artritis reumatoide de evolución temprana. El perfil de las citocinas se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena en el ADNc, obtenido por transcripción reversa del ARN total de las muestras. Estas incluyen la membrana sinovial y las células mononucleares de la sangre periférica de 5 pacientes con artritis reumatoide, 5 pacientes con enfermedades inflamatorias de tipo no artritis reumatoide (coxoartrosis, osteoartritis o espondilitis anquilosante) y 5 controles no inflamatorios; donde se encontró que el patrón de expresión de los transcritos en ambos compartimientos fue consistentemente diferente. En las membranas sinoviales de pacientes con artritis reumatoide no se hallaron ARNm para la IL-4 y la IL-13, sin embargo sí se encontraron en las células mononucleares de sangre periférica; los de la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α se expresaron en ambos casos en mayor proporción en las células mononucleares, contrario a lo observado para los transcritos de la IL-10 y el TGF- β 1. Al cuantificar las moléculas de los ARNm que codifican para la IL-8 y la IL-10, por una reacción de polimerasa en cadena cuantitativa, se observó que los niveles de los transcritos para la IL-8 en las células mononucleares de los pacientes con artritis reumatoide, fueron mayores a los de controles no inflamatorios ($p=0.06$). En la membrana sinovial, los ARNm para la IL-8 y la IL-10 fueron más altos en los pacientes con AR que en los controles no inflamatorios ($p=0.05$ y $p=0.02$, respectivamente). La proteína de la IL-8 y la IL-10 se identificó específicamente por inmunohistología y mostró que la IL-10 fue secretada por los monocitos/macrófagos y linfocitos, mientras que la IL-8 lo fue por los macrófagos, las células endoteliales, los fibroblastos y los linfocitos de las membranas sinoviales de los pacientes con artritis reumatoide. Asimismo, por densitometría se

semicuantificaron los transcritos para el TGF- β 1 y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio y los compartimientos analizados.

Por otro lado, en la membrana sinovial se investigó la presencia de VCAM-1 e ICAM-1, dos moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas, mediante la técnica de inmunohistología empleando anticuerpos monoclonales específicos. Los resultados obtenidos mostraron que, los niveles de las células endoteliales y los macrófagos inmunoreactivos al anticuerpo VCAM-1 e ICAM-1 fueron significativamente mayores en el grupo de los pacientes con artritis reumatoide que en el grupo control no inflamatorio ($p = 0.026$, $p = 0.007$ y $p = 0.007$, $p = 0.005$ respectivamente).

La información anterior señala como los principales participantes del proceso inflamatorio intrarticular de corta evolución y de la perpetuación hacia la sinovitis crónica, no sólo a los macrófagos y sus factores solubles, sino también a los linfocitos T, las células endoteliales, los fibroblastos y los sinoviocitos. Esto nos lleva a proponer la participación de un Eje "Macrófago - Célula T - Célula Endotelial - Fibroblasto - Sinoviocito" durante el inicio del desarrollo de la sinovitis característica en la artritis, donde la interacción entre las citocinas proinflamatorias y su papel como inductores de la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 juegan un papel trascendental. Además, proponemos que las diferencias en la producción de las citocinas en la artritis reumatoide de evolución corta y la de fase crónica, son básicamente cuantitativas más que cualitativas.

3. INTRODUCCIÓN

La activación de las células que participan en la respuesta inmune y en particular de las células T y los macrófagos (Mφs), desencadena su proliferación e inicia la síntesis de una gran variedad de citocinas que incluyen a los factores estimuladores de colonias (CSF), las quimiocinas o intercrinas, las interleucinas (ILs), los factores de crecimiento (GF) y los interferones (IFN). Así, el perfil de las citocinas secretadas es totalmente dependiente de un tipo particular de células T, lo que en muchas enfermedades es evidente y define así la naturaleza de la respuesta inmune sea ésta de tipo humoral o bien celular, cada una regulada positiva y negativamente a través de dichos factores solubles.

Bajo condiciones fisiológicas en el tejido conjuntivo, las citocinas y los factores de crecimiento forman una red intrincada que mantiene el balance entre el depósito y la degradación de la matriz extracelular. Sin embargo en la artritis reumatoide (AR), una enfermedad autoinmune del tejido conjuntivo que se caracteriza por la presencia de infiltrados crónicos, el desarrollo de artropatía destructiva y la degradación ósea y del cartilago articular; se presentan interacciones muy complejas entre la gran variedad de células que forman la membrana sinovial y los factores solubles que éstas sintetizan y que con toda seguridad constituyen el motor que produce los fenómenos destructivos característicos de la enfermedad establecida. Estas interacciones se basan en dos pilares fundamentales: en los contactos directos célula-célula o célula-matriz extracelular, a través de las diferentes moléculas de superficie y en la sobreproducción de las citocinas proinflamatorias, lo que desplaza el equilibrio hacia una degradación excesiva de los componentes de la sinovia.

Las citocinas son un grupo heterogéneo de moléculas de naturaleza glicoproteica, de bajo peso molecular (7 a 30 kD). Son producidas por una gran variedad de células, actúan de forma autocrina, paracrina o endocrina y a concentraciones picomolares regulan el crecimiento, la morfología, la migración y la función celular, por lo que desempeñan un papel esencial en la inflamación, en la respuesta inmune y consecuentemente en la fisiopatología de la AR (Alvaro-Gracia JM, 1992).

Entre las citocinas sobreexpresadas, de las cuales se conoce su participación en la desregulación que se presenta en esta enfermedad durante la fase crónica, se encuentran la interleucina-1β (IL-1β), la IL-6, la IL-8, la IL-10, el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), el factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Brennan FM,

et al, 1995]. En el caso de la IL-1 existen 2 genes distintos que codifican a dos isoformas, la IL-1 α y la IL-1 β . Ambas tienen un peso molecular de 17 kD en su forma extracelular y derivan de un precursor de 31 kD que carece de actividad biológica. Su similitud es sólo del 26% por lo que a aminoácidos se refiere y del 45% en los nucleótidos, sin embargo las dos tienen las mismas acciones biológicas y se unen al mismo receptor extracelular. Son sintetizadas por los M ϕ s fundamentalmente y en menor grado por las células dendríticas, las de Langerhans, las endoteliales, las mesangiales, las epiteliales, los astrocitos, la microglía, los fibroblastos, los neutrófilos y las líneas de células T y B activadas. La IL-1 es una de las citocinas más pleiotrópicas, que ejerce acciones sobre una gran variedad de células. Además de su efecto activador sobre las células T, es capaz de promover la maduración de las pre-B y de sinergizar con otros factores en la proliferación y la secreción de las inmunoglobulinas por las células B maduras. Empero son sus múltiples efectos proinflamatorios los que han despertado el máximo interés en cuanto a su participación en la AR (*Alvaro-Gracia JM, 1992; Chu CQ, et al, 1992; Farahat N, et al, 1993; Firestein GS, et al, 1990; Holt Y, et al, 1992*).

La IL-6 es una glicoproteína de 23 a 32 kD, producida por las células T y B, los M ϕ s, los fibroblastos, las células endoteliales y las mesangiales. Su síntesis y secreción son inducidas por la IL-1 y el TNF- α . A su vez la IL-6 tiene un notable efecto inductor en la proliferación de las células T y B, sin embargo para que esta acción se produzca, en la mayoría de los casos se requiere de un estímulo adicional como el de otras citocinas (IL-1, IL-2 ó IL-4). Shingu M y cols. demostraron que, la adición de la IL-6 a los cultivos de células endoteliales, sinoviocitos y condrocitos de pacientes con AR, incrementaba la expresión del inhibidor tisular de las metaloproteasas, lo cual resultaba benéfico ya que evitaba la destrucción de la matriz extracelular de la sinovia (TIMP) (*Shingu M, et al, 1993*); por otro lado, se sabe que esta citocina induce la producción del factor reumatoide en la membrana sinovial, por lo que no es claro si ejerce un papel global pro o antiinflamatorio (*Alvaro-Gracia JM, 1992; Chu CQ, et al, 1992; Farahat N, et al, 1993; Firestein GS, et al, 1990; Holt Y, et al, 1992*).

La IL-8 es una citocina poco estudiada, pertenece a la familia de las quimiocinas o intercrinas, su peso molecular es de 8 kD, es sintetizada por los monocitos (M ϕ s)/M ϕ s, los neutrófilos, las células endoteliales, los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos; actúa como un factor quimiotáctico de los leucocitos y como un péptido activador y quimiotáctico de los neutrófilos (NAP-1), con diversos

grados de especificidad. Existen evidencias de que esta citocina participa en una gran variedad de patologías que incluyen a la AR, en la que al parecer, la síntesis local puede constituir un importante mecanismo por el cual los neutrófilos y las células T son reclutados y activados en la sinovia de los pacientes con AR, además de contribuir a la degradación del cartilago articular, a través de la inducción de la desgranulación de los neutrófilos lo que produce la liberación de proteasas (Alvaro-Gracia JM, 1992; Rathanaswami P, et al, 1993; Taub DD, et al, 1994).

La IL-10 es un "factor supresor" de la respuesta inmune, sintetizado por las células Th0, las Th2, los Mo/Mφ, las células B activadas, los queratinocitos y los mastocitos (De Waal Malefyt R, et al, 1992; Yssel H, et al, 1992; Del Petre G, et al, 1993; De Waal Malefyt R, et al, 1991). Su actividad pleiotrópica incluye la proliferación de las células T y B así como la diferenciación de las células T citotóxicas; la inhibición y/o desestabilización de la transcripción de los genes para la IL-1β, -6, -8 y el TNF-α producidos por los Mo/Mφ; los transcritos para la IL-4 y la IL-5 sintetizadas por las células Th2; los de la IL-2 y el IFN-γ de las células Th1; los del IFN-γ y el TNF-α producidos por las células NK (Ho SY, et al, 1994; Wang P, et al, 1994); la remodelación y/o degradación de la matriz extracelular a través de la regulación negativa del transcrito para la colágena tipo I y el incremento en la expresión de los genes para la estromelina y la colagenasa tipo I (Reitamo S, et al, 1994). Debido a sus múltiples efectos, la IL-10 juega un papel importante en la AR, al inhibir la producción de las citocinas de los Mo/Mφs y de las células T (Katsikis PD, et al, 1994).

Una interleucina descubierta más recientemente, la IL-13, presenta propiedades similares a la IL-4, ya que inhibe la citotoxicidad de los Mo/Mφs (McKenzie ANJ, et al, 1993) y la síntesis y secreción de las citocinas proinflamatorias tales como el TNF-α, la IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (Colotta F, et al, 1994; Defrance T, et al, 1994; De Waal Malefyt R, et al, 1993; Zurawski F, et al, 1994). Es producida por las células Th0, Th1 y Th2 CD4⁺ y CD8⁺ activadas (McKenzie ANJ, et al, 1993; Minty A, et al, 1993), su ARNm sólo se encuentra en éstas alrededor de una hora después de la activación y persiste por periodos de hasta 72 horas postactivación (Zurawski G, et al, 1994). No existe evidencia de la acción de esta citocina sobre las células T, sin embargo se conoce que ejerce una actividad pleiotrópica sobre los Mo/Mφs (¹Montaner LJ, et al, 1993), las células B (Defrance T, et al, 1994) y los polimorfonucleares (Minty A, et al, 1993). Si bien la IL-13 regula positivamente varias integrinas,

moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas tales como la VCAM-1 (Bochner BS, et al, 1995), el CD23, el CD13 (Punnonen J, et al, 1993), y los antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II (CPHII) [Defrance T, et al, 1994; McKenzie ANJ, et al, 1993], también regula negativamente otras moléculas como: el receptor para la región constante (Fc) de la IgG (CD64, CD32 y CD16), la expresión del CD54 y del CD58 (De Waal Malefyt R, et al, 1993; Minty A, et al, 1993). Recientemente se ha demostrado que suprime la infección del HIV en los Mos/Mφs *in vivo* (¹Montaner LJ, et al, 1993; ²Montaner LJ, et al, 1993). Esta interleucina induce la proliferación las células T (Aversa G, et al, 1993; Cocks BG, et al, 1993; Punnonen J, et al, 1993) y la síntesis de la IgM, la IgG total y la IgE (Punnonen J, et al, 1993; Defrance T, et al, 1994).

El TNF- α se sintetiza como un precursor intracelular de 26 kD que posteriormente es transformado a la forma extracelular activa de 17 kD. Es secretado fundamentalmente por los Mφs activados aunque los linfocitos, las células NK y los mastocitos también la producen. Más que por su efecto inductor de la necrosis hemorrágica de ciertos tumores y la caquexia en enfermedades parasitarias, es reconocido en la actualidad por sus acciones proinflamatorias. En realidad, comparte casi todas las acciones de la IL-1, salvo las de activación linfocitaria, actúa junto con esta citocina de forma sinérgica y es producido abundantemente por los Mφs de la sinovia de los pacientes con AR (Alvaro-Gracia JM, 1992; Chu CQ, et al, 1992; Farahat N, et al, 1993; Firestein GS, et al, 1990).

Finalmente, el TGF- β 1 pertenece al grupo de los factores moduladores del tejido conjuntivo. Es un dímero de 25 kD, formado por 2 subunidades de 12.5 kD, idénticas o diferentes según el subtipo (TGF- β _{1/2/3}); es secretado por una gran variedad de células, como las T y B, los Mφs, los fibroblastos, las plaquetas, las células del riñón y las tumorales. Se secreta tardíamente durante el proceso de activación de los linfocitos T y es un potente inhibidor de la proliferación de estas células y de la producción de la IL-2 y el IFN- γ , por lo que puede desempeñar un importante papel como regulador negativo. Se ha indentificado como el factor inhibidor de la activación de las células T, en el líquido y la membrana sinovial de pacientes con AR (Alvaro-Gracia JM, 1992; Chu CQ, et al, 1992; Firestein GS, et al, 1990; Holt Y, et al, 1992).

Como habíamos mencionado anteriormente, el otro pilar fundamental de las interacciones en la AR se basa en los mecanismos de interrelación entre los Mφs, los linfocitos y las células endoteliales con

las citocinas y el efecto de esta interacción sobre la cavidad articular, donde la infiltración masiva de la membrana sinovial por las células mononucleares (CMNs), fundamentalmente las células T y los Mos/Mφs, es una de las características histopatológicas constantes en la AR. De tal forma que la adhesión y la migración celular, la generación de la respuesta inmune, la destrucción de las células blanco, la interacción de las células con componentes de la matriz extracelular y la generación de los procesos inflamatorios son manifestaciones de gran importancia biológica en esta enfermedad y dependen de la presencia de los receptores específicos en la superficie de la membrana, que les permitan interactuar.

Los principales receptores de adhesión que se detectan en las células del sistema inmune, se agrupan en tres grandes familias, que se describen brevemente a continuación:

1) La familia de las Integrinas: comprenden a un grupo de glicoproteínas heterodiméricas transmembranales, aparentemente heterogéneas, que fueron denominadas así debido a su función integradora de las células con la matriz extracelular en el tejido conjuntivo no especializado. Las integrinas están constituidas por una cadena β y una α asociadas de manera no covalente; se conocen 7 cadenas β ($\beta 1$ a $\beta 7$) y al menos 12 cadenas α ($\alpha 1$ a $\alpha 8$, αL , αM , αX y αV). Existe una asociación preferencial de algunas cadenas α con ciertas cadenas β , lo que da lugar a la formación de 3 subfamilias: cuando la cadena $\beta 1$ (CD29) se asocia a las cadenas $\alpha 1$ a $\alpha 8$ se genera la **subfamilia de las integrinas $\beta 1$ o VLA** (Very Late Activation Antigens); cuando la cadena $\beta 2$ (CD18) se asocia con las cadenas αL , αM y αX se constituye la **subfamilia de las integrinas $\beta 2$ o leucocitarias**; y por último, la $\beta 3$ se asocia preferencialmente con αV (CD41/CD51) que se denomina **subfamilia $\beta 3$ o de las citoadhesinas**. Las integrinas $\beta 1$ se expresan casi en todas las células del organismo a excepción de los neutrófilos. Entre sus funciones se incluyen el reconocimiento de los componentes de la matriz extracelular, al unirse a más de un ligando; por ejemplo, la adhesión de la VLA4 participa en la unión de las células T CD8⁺, los Mos y los eosinófilos a la fibronectina por un lado y por el otro las células endoteliales activadas, a través de la molécula VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), una glicoproteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas; y finalmente la activación celular como en el caso de la interacción de VCAM-1/VLA4, que induce señales de coestimulación en la activación de las células T mediada por su receptor (TCR). Las

integrinas $\beta 2$ se expresan únicamente en los leucocitos, por lo que se les ha denominado integrinas leucocitarias. Sus funciones incluyen: la actividad citotóxica mediada por las células NK y la dependiente de anticuerpos, la función cooperadora de las células T, la unión de los leucocitos al endotelio, la presentación antigénica, la agregación, la migración y la quimiotaxis leucocitaria, la opsonización y fagocitosis y la interacción leucocitaria con superficies recubiertas de proteínas séricas. La subfamilia $\beta 3$ se expresa en las plaquetas principalmente. Posee funciones de reconocimiento de ligandos de la matriz extracelular con la secuencia RGD tales como la fibronectina, el fibrinógeno, el factor de Von Willebrand, la vitronectina y la trombospondina, la osteopontina y la colágena (*Albelda SM, et al, 1990; Bevilacqua MP, 1993; Cronstein BN, et al, 1993; Laffón A, 1992*).

II) La familia de las Selectinas: son glicoproteínas transmembranales con una estructura peculiar (un dominio tipo lectina, otro tipo factor de crecimiento epidérmico y de 2 a 9 dominios tipo factor de complemento) que se expresan en la membrana de los leucocitos, las plaquetas y las células endoteliales. Se han descrito 3 tipos de selectinas, la L-selectina (LAM-1, gp90MEL, Mel-14, Leu 8, LECAM-1), la E-selectina (ELAM-1, LECAM-2) y la P-selectina (CD62, PADGEM, GMP-140, LECAM-3); la primera se expresa constitutivamente en la mayor parte de los leucocitos, los Mos, las células T, los polimorfonucleares y otras células mieloides, la segunda lo hace en el endotelio activado y la tercera se detecta en las plaquetas y en las células endoteliales. Los ligandos que se unen a las selectinas son principalmente oligosacáridos que se encuentran en la membrana de diversas células. La E-selectina y la L-selectina inducen la adhesión de los linfocitos y los granulocitos a las células endoteliales mediante el fenómeno de rodamiento (rolling) a lo largo de las paredes de la microvasculatura, este es el paso inicial en la migración de los leucocitos a través de los endotelios. La P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en las plaquetas se localiza en las membranas de los gránulos densos, por lo que es capaz de mediar las interacciones entre éstas y los leucocitos y posiblemente también entre las células endoteliales y los leucocitos (*Bevilacqua MP, 1993; Cronstein BN, et al, 1993; García de Vicuña R, et al, 1992; Laffón A, 1992*).

III) Las moléculas de la superfamilia de las Inmunoglobulinas: son glicoproteínas que comprenden a un grupo importante de moléculas que poseen regiones que semejan a las de los dominios de las inmunoglobulinas. Se expresan en los linfocitos así como en otras células, e incluyen

al CD2 (LFA-2), el LFA-3, la ICAM-1 o CD54, la ICAM-2, el CD4, el CD8, el complejo TCR/CD3, la VCAM-1 y las moléculas del CPH I y II, que a continuación se describen: la molécula CD2 se expresa en todos los linfocitos T y en la mayor parte de las células NK; cuando se une a sus ligandos principales (LFA-3, CD59 o CD58) cambia su conformación generándose el CD2R y envía señales de activación celular. La molécula LFA-3 presenta diversas isoformas, que parecen tener afinidad similar por el CD2; se expresa en los linfocitos activados. Las moléculas ICAM-1 o CD54 e ICAM-2 están relacionadas en estructura y función, participan en las interacciones célula-célula y se asocian a una o más integrinas $\beta 2$ (LFA-1 o CD11a/CD18 y Mac 1). Las moléculas CD4 y CD8 se expresan principalmente en los linfocitos T y están funcionalmente relacionadas con el complejo TCR/CD3. No fungen propiamente como moléculas de adhesión, ya que al parecer su función principal es la de generar señales de coestimulación que favorezcan la activación de las células T, mediada por los antígenos a través del complejo TCR/CD3. Este complejo se encuentra constituido por el TCR propiamente dicho, formado por las cadenas α y β , o las γ y δ que pertenecen también a la superfamilia de las inmunoglobulinas y forman heterodímeros que poseen la capacidad de reconocer los péptidos unidos a las moléculas del CPH y el complejo molecular CD3 que se encuentra formado por las subunidades γ , δ , ϵ y ζ . Es en este sentido que el complejo TCR/CD3 funciona como una molécula de adhesión altamente específica (Bevilacqua MP, 1993; Cronstein BN, et al, 1993; García de Vicuña R, et al, 1992; Laffon A, 1992).

Así, la presencia de los polimorfonucleares neutrófilos y las CMNs en el espacio subsinovial, detectada en los primeros días o semanas tras el comienzo de los síntomas articulares, tiene su origen en la migración de éstas desde la sangre periférica a través de la membrana sinovial. Donde el primer paso (reversible), para que un leucocito activado circulante abandone el torrente sanguíneo y sea reclutado al interior de un tejido, es su adhesión al endotelio por el cual literalmente rueda sobre los segmentos afectados en una sucesión de adhesiones y desuniones consecutivas con las células endoteliales, a través de las selectinas vasculares E y P que reconocen hidratos de carbono (como SLe^x) y del extremo flexible de la L-selectina localizado selectivamente en las microvellosidades de la superficie celular de los leucocitos que inician el contacto. Particularmente, la unión de las células linfoides a la E-selectina está mediada por la molécula denominada CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen), por el CD31 y el CD44 con su correspondiente ligando: el hialuronato. La interacción de la

E-selectina con los leucocitos permite la exposición de éstos a los agentes quimiotácticos, a las citocinas o los activadores producidos en el microambiente, lo que incrementa la expresión y la avidéz de la integrina leucocitaria Mac 1 o LFA-1 por su ligando ICAM-1; de tal manera que, la especificidad en el reclutamiento de uno u otro tipo de leucocito esta dada por los factores activadores que son producidos localmente, a los que no todos responden o lo hacen de forma diferente (*Chapman PT, et al, 1995*). De lo anterior se presupone que, la interacción inicial de las células T y los Mos con el endotelio, mediada por E-selectina/CD44, favorece el subsiguiente mecanismo de adhesión a través de las integrinas $\beta 1$ (VLA4) presentes en la superficie de estas células activadas, lo que determina una adhesión preferencial por su ligando inducible, VCAM-1. Lo anterior es consecuencia tanto de un incremento en la expresión de VLA4 como de un cambio conformacional de esta glicoproteína (el cual incrementa la afinidad por su ligando). Cuando las células T son estimuladas, la unión al endotelio activado por IL-1 y/o TNF- α , IL-4 ó IL6 (*lademarco MF, et al, 1995; Lindsley HB, et al, 1993*) utiliza las dos vías VLA4/VCAM-1 y LFA-1/ICAM-1, mientras que la adhesión al endotelio en reposo utiliza fundamentalmente LFA-1/ICAM-2 (*Szekanecz Z, 1994*). Una vez que los leucocitos y las células T activadas atraviesan el endotelio, penetran en la membrana sinovial e interactúan con los componentes de la matriz extracelular tales como la fibronectina, la laminina y la colágena a través de las integrinas VLA4 y 5 cuya expresión aumenta y además genera un cambio conformacional que incrementa la avidéz. Esta interacción produce señales de activación, que estimulan a su vez a las células T, a través del receptor de antígeno (TCR/CD3). Lo anterior resulta de interés, ya que se ha encontrado que la colágena tipo II induce la proliferación de las células T de la membrana sinovial reumatoide (*Trentham DE, et al, 1993*). El reconocimiento simultáneo de colágena, como antígeno a través del complejo TCR/CD3 y como ligando a través de integrinas VLA, genera un estímulo mitogénico efectivo para los linfocitos de la membrana sinovial reumatoide. Un fenómeno similar al anterior se encuentra, cuando los linfocitos se unen simultáneamente al antígeno y a las integrinas (VCAM-1, ICAM-1). La interacción de las integrinas con sus ligandos produce la liberación de citocinas y metaloproteasas tales como colagenasas y estromelisin. La interacción de las células T con los sinoviocitos, mediada por VCAM-1/VLA4 e ICAM-1/LFA-1, produce la migración de los linfocitos hacia la cavidad articular (*García de Vicuña R, et al, 1992; Laffón A, 1992*).

Sin embargo en la actualidad, pese a todo el acervo de información que se posee acerca de la red de citocinas y de su relación con la expresión de ciertas moléculas de adhesión, aún se desconoce el mecanismo que lleva a la cronicidad de la sinovitis característica de la AR. No obstante se reconoce a los Mφs y sus productos solubles (factores de crecimiento y citocinas) y en menor grado a los linfocitos T, las células endoteliales, los fibroblastos y los sinoviocitos como los posibles responsables del daño tisular y de la perpetuación del proceso inflamatorio (Keyszer GM, 1994). Por otra parte, no ha sido posible correlacionar los niveles elevados de una citocina en particular con la destrucción articular, además de que se debe considerar la abundancia y diversidad de las citocinas liberadas *in situ* en la membrana sinovial, así como la información del papel individual que desempeñan cada una de éstas en el desarrollo y perpetuación del proceso inflamatorio; la cual proviene de los estudios *in vitro* que no siempre reflejan la complejidad de las interacciones de las citocinas dentro de la cavidad articular.

Por ello decidimos realizar la investigación de algunas de las citocinas y moléculas de adhesión que tienen un potencial regulador en el daño sinovial.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar en los pacientes con artritis reumatoide de evolución corta, la participación de diferentes citocinas y moléculas de adhesión en el inicio del proceso inflamatorio que, potencialmente contribuyen a su perpetuación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Examinar la presencia de los ARNm para la IL-1 β , la IL-4, la IL-6, la IL-8, la IL-10, la IL-13, el TNF- α y el TGF- β 1, en la membrana sinovial y las CMNSP de los controles no inflamatorios e inflamatorios y de los pacientes con AR a través de la técnica de transcriptasa reversa-reacción de la polimerasa en cadena (PCR).
- ◆ Cuantificar el número de los transcritos que codifican para la IL-8 y la IL-10 en las CMNSP y la membrana sinovial de los tres grupos de estudio, empleando la técnica de PCR cuantitativa.
- ◆ Analizar la presencia de las proteínas de IL-8 e IL-10 en cortes de la sinovia sometidos a la técnica de inmunohistología.
- ◆ Semicuantificar los ARNm que codifican para el TGF- β 1 en la membrana sinovial.
- ◆ Estudiar la relación entre la expresión de la IL-10 y los parámetros de la actividad clínica de la enfermedad, en el suero de sangre periférica mediante un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA.
- ◆ Conocer la interacción de estas citocinas con la expresión tisular en el endotelio vascular de dos moléculas de adhesión pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas: ICAM-1 y VCAM-1, a través de la técnica de inmunohistología.

5. JUSTIFICACIÓN

La AR es una enfermedad de incidencia considerable en la población mexicana (1 al 3%). En la actualidad aún se desconoce(n) el(los) mecanismo(s) que inicia(n) el proceso inflamatorio y lo perpetúa(n) produciendo la sinovitis característica de la AR. Previamente se ha señalado que los M ϕ s y sus productos solubles y en menor grado los linfocitos T localizados en la membrana sinovial, son las principales estirpes celulares que participan en el daño tisular en fase crónica, de ahí que se requieran esclarecer los mecanismos inmunológicos específicos que se involucran durante el inicio de la sinovitis.

6. HIPÓTESIS

En el inicio del proceso inflamatorio intrarticular, una población policlonal de células T presenta un fenómeno de activación inducido por un agente aún no identificado, lo que genera la liberación de factores solubles como la IL-8, la IL-1 β , la IL-6, el TGF- β 1 y el TNF- α que a su vez activan a las células endoteliales, las cuales incrementan la síntesis y expresión de las moléculas de adhesión que permiten la interacción con los M ϕ s, las células T y los eosinófilos por un lado y por otro de los factores solubles que contribuyen a la quimiotaxis de los leucocitos. Ambos mecanismos facultan la activación, la unión y la trans migración de las células inflamatorias a la sinovia a través de una serie de pasos relacionados entre sí, lo que conlleva a la producción y liberación de las citocinas, los factores solubles y las enzimas degradativas, que producen la inflamación en la cavidad articular. Dichos factores solubles y citocinas estimulan a las células estromales y de los infiltrados inflamatorios, así como al endotelio perpetuando la sinovitis.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS BIOLÓGICAS. Se obtuvieron muestras de la sangre periférica y la membrana sinovial de 5 pacientes con AR sometidos a cirugía ortopédica de la cadera o la rodilla, que reunían los criterios del Colegio Americano de Reumatología para esta patología (Arnett FC, et al, 1988), 5 pacientes con alguna enfermedad inflamatoria de tipo No-AR (coxoartrosis, espondilitis anquilosante u osteoartritis) y 5 individuos sanos ingresados al servicio de traumatología (ver Tabla 1).

TABLA 1

Características clínicas de los pacientes*

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO	PATOLOGIA	EVOLUCION (AÑOS)	TRATAMIENTO
CTRL No 1 1	35	F	Fractura	---	AB Y AG
CTRL No 1 2	30	M	Fractura	---	REL MUS
CTRL No 1 3	38	M	Fractura	---	
CTRL No 1 4	23	M	Fractura	---	
CTRL No 1 5	20	F	Polifractura	---	
CTRL I 1	50	F	OA	2	AI
CTRL I 2	69	F	OA	10	Ninguno
CTRL I 3	35	M	CA	3.5	AI Y AG
CTRL I 4	21	M	EA	10	
CTRL I 5	66	F	OA	10	AG
AR 1	19	M	ARJ	8	AG
AR 2	43	F	AR	15	AG
AR 3	53	F	AR	13	Ninguno
AR 4	28	F	AR	2	MTX
AR 5	26	F	AR	1	Ninguno

*CTRL No I: Individuo control no inflamatorio, CTRL I: Individuo control inflamatorio, AR: Paciente con artritis reumatoide, OA: Osteoartritis, CA: Coxoartrosis, EA: Espondilitis Anquilosante, ARJ: Artritis Reumatoide Juvenil, AB: Antibióticos, AG: Analgésicos, REL MUS: Relajantes Musculares, AI: Antiinflamatorios, MTX: Metotrexate.

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE LAS MUESTRAS DE LA MEMBRANA SINOVIAL Y LAS CMNSP. Las membranas sinoviales se sumergieron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su procesamiento. De las muestras de la sangre periférica se aislaron las CMNs por la formación de gradientes con Ficoll-Hypaque (SIGMA), se cuantificaron en un hemocitómetro automatizado (Coulter Diluter DDIII C) y se conservaron 1×10^7 CMNs/ml a -70°C . El ARN total de las CMNSP y de los fragmentos de la membrana sinovial ($0.3\text{-}0.5 \text{ cm}^3$) se extrajo por el método de Chomczynski (Chomczynski P, et al, 1987), mediante isotiocianato de guanidina (RNAzol™ B Cinna/Biotech TX) y cloroformo, como se describe brevemente a continuación: sin descongelar se homogenizó el botón de las CMNSP en el vortex o el fragmento de sinovia en un tubo del politrón, con 2 ml de la solución del RNAzol™ para 10 a 100 mg del tejido ó 1×10^7 células. Por cada 2 ml del homogenado se adicionaron 0.2 ml de cloroformo, la mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó por 5 minutos a 4°C , posteriormente se centrifugó a $12\ 000 \times g$ (Microcentrifuga BECKMAN Microfuge 12) durante 15 minutos a 4°C , así se separó en el fondo la fase orgánica que contenía el ADN y algunas proteínas, y en la superficie, la acuosa con el ARN, que tenía el 50% del volumen total el cual se transfirió a un tubo eppendorf al que se agregó isopropanol en una proporción 1:1, se agitó vigorosamente y se incubó durante 15 minutos a 4°C , precipitando así el ARN. La suspensión se centrifugó a $12\ 000 \times g$ por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se eliminó con una pipeta pasteur. El botón (ARN) se lavó con 800 μl de etanol al 75% (ver apéndice) enfriado previamente a -20°C y se centrifugó a $12\ 000 \times g$ durante 10 a 15 minutos a 4°C , el sobrenadante se eliminó con una pipeta pasteur. El ARN obtenido se trató con 10 μl DNAsa tipo I (GIBCO BRL) en 190 μl de solución amortiguadora para DNAsa 1X (10 U/5 μl del amortiguador de DNAsa 1X, ver apéndice) y se incubó durante 15 minutos a 37°C en baño de María. La acción enzimática se detuvo y los productos de degradación se eliminaron con 0.2 ml de una solución de fenol saturado (ver apéndice) y al centrifugar durante 2 minutos a $12\ 000 \times g$ a temperatura ambiente, con lo que se obtuvieron dos fases de las cuales se transfirió la acuosa a un tubo eppendorf al que se adicionaron 0.2 ml de solución de SEVAG (ver apéndice) y se centrifugó durante 2 min a $12\ 000 \times g$. La fase acuosa de transfirió nuevamente a otro tubo al que además se le agregaron 500 μl de etanol absoluto a -20°C y 70 μl de acetato de sodio 3 M, pH 5.3 (ver apéndice), la mezcla se incubó durante toda la noche a -70°C . Después se centrifugó por 15 minutos a $12\ 000 \times g$ a 4°C y el botón se lavó como se mencionó

previamente. Finalmente éste se resuspendió en volúmenes de 20 ó 50 µl de agua-DEPC. La concentración del ARN se determinó con un equipo comercial (FAST CHECK™ Nucleic Acid Quantification System de GIBCO BRL) y se ajustó a 0.5 ó 1.0 ng/µl.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR. En cada muestra se realizó un perfil de citocinas, a partir de 2 a 4 ng (4µl) del ARN total extraído que se empleó para obtener el ADNc por retrotranscripción. Para ello se utilizaron 5 µg/ml del iniciador universal oligo(dT)₁₂₋₁₈ (GIBCO BRL), es decir 1.0 µl del iniciador diluído 1:5 en agua-DEPC; 5 µl de la solución comercial amortiguadora para la transcriptasa reversa 5X (GIBCO BRL); 4 µl dNTPs (mezcla de un volumen de cada dNTP de concentración 10 mM (GIBCO BRL) y un volumen de agua-DEPC); 2.0 µl de ditiotreitolo 0.1 M; 0.5 µl de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia en el ratón MMLV con 200 U/µl de concentración (GIBCO BRL); 1.0 µl del inhibidor placentario de ribonucleasas con 10 U/ml de concentración (GIBCO BRL); 2.5 µl de agua-DEPC y dos gotas de aceite mineral (nujol), para obtener una reacción de 20 µl de volumen final. El programa del termobloque (Perkin-Elmer Cetus) consistió de una incubación de 60 minutos a 42°C y de 5 minutos a 95°C. El ADNc obtenido se diluyó con 80 µl de agua destilada desionizada tratada con DEPC y de esta dilución se tomaron 10 µl para cada una de las 9 reacciones de polimerasa en cadena de 50 µl de volumen final que contenía: 5 µl de la solución amortiguadora de PCR 10X (GIBCO BRL), 5 µl de la solución dNTPs preparada como se mencionó anteriormente, 2 µl de formamida, 20 µl de agua-DEPC, 2 µl de una solución 50 mM de cloruro de magnesio, 3 µl del iniciador sentido y 3 µl del anti sentido de concentración 30 pM (ver Tabla 2) y 0.4 µl de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* a una concentración 5 U/µl (GIBCO BRL).

TABLA 2

Oligonucleótidos empleados en la reacción de polimerasa en cadena

CITOCINA	SECUENCIA SENTIDO		SECUENCIA ANTI-SENTIDO		TAMAÑO DEL AMPLICÓN pb
	5'	3'	5'	3'	
β 2-microglobulina	CCAGCAGAGAATGGAAAGT C		GATGCTGCTTACATGTCTC G		268
IL-1 β	GGATATGGAGCAACAAGTG G		ATGTACCAGTTGGGGAAGT G		263
IL-4	TGCCTCCAAGAACAACA G		AACGTACTCTGGTTGGCTT C		224
IL-6	TCAATGAGGAGACTTGCCT G		GATGAGTTGTCATGTCTCG C		260
IL-8	TTGGCAGCCTTCCTGATT G		AACTTCTCCACAACCCTCTG C		247
IL-10	AAATTTGGTTCTAGGCCGG G		GAGTACAGGGGCATGATAT C		264
IL-13 o NC30	GAGTGTGTTTGTCAACCGT G		TACTCGTTGGCTGAGAGCT G		253
TNF- α	ACAAGCCTGTAGCCCATGT T		AAAGTAGACCTGCCAGAC T		427
TGF- β 1	TTTCGCCTTAGCGCCCCAC TG		TCCAGCCGAGGTCTTTCG G		No determinado

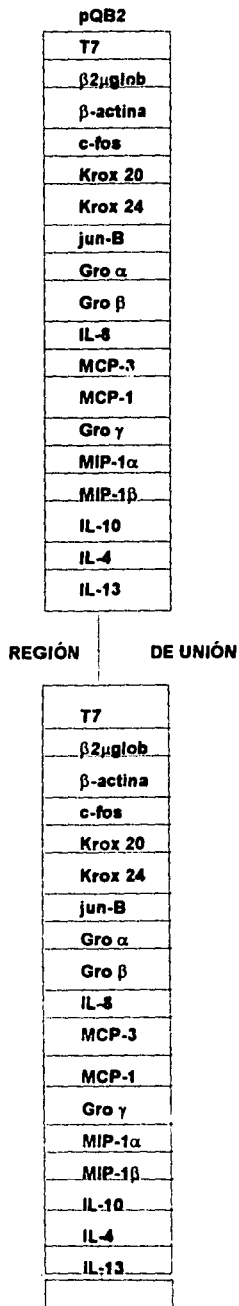
El programa del termociclador (Perkin-Elmer Cetus) utilizado, consistió de un ciclo de 94°C por 5 minutos, 57°C por un minuto, 72°C por un minuto; 28 ciclos de 94°C por un minuto, 57°C por un minuto, 72°C por un minuto y un ciclo de 94°C por un minuto, 57°C por un minuto, 72°C por 5 minutos. Los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% (SIGMA) en TBE 0.5X con bromuro de etidio (ver *apéndice*) a 80 V durante 1 hora, se observaron en un transiluminador (Bio/CAN Scientific) y se fotografiaron.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA (Becker-André M, et al, 1989; Bouaboula M, et al, 1992; Chelly J, et al, 1990; Deutsch ML, et al, 1990; Gilliland G, et al, 1990; Raeymaekers L., 1994; Wang AM, et al, 1989). Para determinar el número de los ARNm que codificaban para la IL-8 y la IL-10 en las muestras de los individuos controles no inflamatorios, controles inflamatorios y pacientes

con AR, el ARN total aislado de cada muestra se coretrotranscribió junto con la ribosonda de ARNc del plásmido pQB2 (*Figura 1*).

FIGURA 1. El plásmido pQB2 es un ARN con arreglo lineal de múltiples genes blanco en cuya secuencia se encuentra el promotor T7, una región con secuencias sentido para las citocinas seguida de una secuencia de unión (linker) de 21 pb, una región antisentido para la citocinas y una zona de poliadenilación. El tamaño del amplicón obtenido de este plásmido es de 388 pb.

FIGURA 1



Para la coretrotranscripción se mezclaron en la misma reacción el ARN de la muestra (0.5 a 1.0 ng/ μ l) con una cantidad específica de ARNc del plásmido (1.0 μ l) cuya concentración variaba de 0.1 pg hasta 0.015 fg, se empleó como iniciador universal el Oligo(dT₁₂₋₁₈) y las condiciones de la reacción se llevaron a cabo bajo las mismas especificaciones mencionadas previamente. Una vez obtenido el ADNc, éste se amplificó por PCR con los iniciadores específicos (descritos arriba) para la IL-8 o la IL-10, además se utilizó como control estructural y del grado de inflamación el gen para la β 2-microglobulina, de expresión constitutiva. El programa del termociclador (Perkin-Elmer Cetus) empleado, consistió de un ciclo de 5 minutos a 94°C, un minuto a 57°C, un minuto 30 segundos a 72°C; 33 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 57°C, un minuto 30 segundos a 72°C y 1 ciclo de un minuto a 94°C, un minuto a 57°C y 7 minutos a 72°C.

Con el amplificado se corrió un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X con bromuro de etidio (*ver apéndice*) a 100 V durante 60 minutos, donde cada carril contenía de 7 a 15 μ l del producto de la PCR y de 5 a 10 μ l del amortiguador de carga. El gel visto en un transiluminador debía presentar dos bandas por carril (una superior que correspondía al ADNc del plásmido y otra inferior que correspondía al ADNc de la citocina a investigar en la muestra), si solo se observaba la banda superior, indicaba que el gen que codifica para la citocina no se encontraba expresado. Finalmente se tomó una fotografía del gel, se usó un rollo Polaroid 667 (tiempo de exposición de 10 seg) y se reveló el negativo, al que se le realizó una densitometría, del análisis de ésta se obtuvo un histograma bimodal en cada carril de dos bandas, del cual se generó la relación plásmido/muestra al medir la altura de cada pico:

Relación plásmido/muestra = cm altura del pico del plásmido/cm altura del pico de la muestra

de dicha relación se tomaron como válidos los cocientes entre 0.8 a 1.3 cm, si los valores se encontraban por debajo o por arriba de los anteriores se procedió a modificar la concentración del plásmido o del ARN de la muestra, hasta obtener un cociente aproximado de uno. Así, el cálculo del número de moléculas de la β 2-microglobulina, la IL-8 y la IL-10 se realizó de la siguiente manera:

Si:	1 mol	=	Peso molecular (g)
	Peso molecular (g/mol)	=	Número de Avogadro
	Número de Avogadro	=	6.023×10^{23} moléculas/mol
	1 mol	=	Número de Avogadro
Núm. de pb del plásmido		=	388 pb
Peso molecular promedio de una base		=	300 g/mol
Número de bases nucleotídicas		=	2
388 pb X 300 g/mol X 2 bases		=	$232\,800 \text{ g/mol} \times 10^{12} \text{ pg/g} = 2.328 \times 10^{17} \text{ pg/mol}$

Para calcular el número de moléculas del ARNm :

$$2.328 \times 10^{17} \text{ pg} \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{\text{pg del plásmido}} \times$$

$$\text{Factor} = 6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas} / 2.328 \times 10^{17} \text{ pg} = 2\,587\,199.313 \text{ moléculas/pg}$$

$$\text{Factor} = 2\,587\,199.313 \text{ moléculas/pg}$$

Así para obtener el número de moléculas de ARNm:

$$\text{Factor (moléc/pg)} \times \text{pg del plásmido} = \text{Número de transcritos para la citocina ó}$$

$$2\,587\,199.313 \text{ moléc/pg} \times \text{pg del plásmido} = \text{Número de transcritos para la citocina.}$$

DETECCIÓN DE LA IL-10 POR ELISA. Los niveles de la IL-10 en el suero de la sangre periférica del grupo control no inflamatorio e inflamatorio y de los pacientes con AR, se cuantificaron con un equipo obtenido comercialmente para ELISA en sandwich (INNOTEST™, Francia). El procedimiento consistió en incubar 100 µl de suero de cada muestra con el anticuerpo (Ac) anti IL-10 biotinado en los pozos de una placa sensibilizada con un Ac anti IL-10 por 2 horas a 37°C, durante la primera incubación el Ac anti IL-10 adherido a la placa y el anti IL-10 biotinado se unieron a la IL-10 del suero en diferentes sitios, después se eliminó el exceso del Ac biotinado y se agregó el complejo estreptavidina-peroxidasa que se incubó durante 45 minutos a 37°C y finalmente se le adicionó el sustrato o cromógeno que se incubó por 30 minutos en completa oscuridad. La intensidad del color

medida a 450 nm en un lector de ELISA fue directamente proporcional a la concentración de IL-10 presente en la muestra. La sensibilidad de la ELISA era < 5 pg/ml. El equipo no presenta reactividad cruzada con la IL-1 α , la IL-1 β , la IL-2, la IL-6 ó el TNF- α .

INMUNOHISTOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LA IL-8 Y LA IL-10. Se realizó en cortes por congelación de 4 a 6 μ m de espesor de las membranas sinoviales de los grupos control no inflamatorio, inflamatorio y de los pacientes con AR. Las secciones del tejido una vez cortadas y colocadas sobre portaobjetos recubiertos con silano, fueron fijadas en acetona a -20°C durante 3 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena se eliminó al incubar los tejidos con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (*ver apéndice*) durante 15 minutos, después se lavaron con PBS 0.01 M, pH 7.2 para detener la reacción. Los sitios del pegado inespecífico fueron bloqueados con albúmina de huevo al 1% (SIGMA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después, los tejidos se incubaron durante 1 hora con el Ac primario, una inmunoglobulina policlonal anti IL-8 de clase IgG preparada en conejo (PeproTech Inc., NJ) a una concentración de 20 μ g/ml o un Ac monoclonal anti IL-10 de clase IgG preparado en ratón a una concentración de 20 μ g/ml en PBS-albúmina. Posteriormente las laminillas se sometieron a 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS 0.01 M, pH 7.2 y en agitación suave. Como Acs secundarios se emplearon una IgG anti inmunoglobulina de conejo preparada en chivo, conjugada con biotina (SIGMA) diluida 1:20 en PBS-albúmina o una IgG anti inmunoglobulina de ratón biotinada preparada en caballo (VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector Lab, CA), los tejidos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las laminillas se lavaron 3 veces durante 3 min cada uno con PBS y en agitación suave. A continuación se empleó el complejo estreptavidina-peroxidasa diluido 1:20 en PBS-albúmina (SIGMA), con el que se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron nuevamente y la reacción se visualizó incubando los tejidos durante 10 minutos con una solución de diaminobencidina (*ver apéndice*) que produce un precipitado color sepia en las regiones inmunorreactivas. Para detener la reacción, las laminillas se sumergieron en agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 10 minutos, se viraron con una solución de carbonato de litio y finalmente se montaron con bálsamo de Canadá. Durante el ensayo se corrieron un control negativo en el que se sustituyó el primer Ac por uno no relacionado (suero normal de

humano diluido 1:100) y un blanco de reactivos en el que se reemplazó el Ac primario por albúmina de huevo al 1% en PBS 0.01 M, pH 7.2. La evaluación de los tejidos correspondió al promedio de dos a tres cortes seriados de cada una de las sinovias, donde se cuantificó el número de las células inmunorreactivas/campo a 100 aumentos en un microscopio Zeiss.

INMUNOHISTOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN VCAM-1 E ICAM-1. Se realizó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, sólo que para la identificación de las moléculas de adhesión se emplearon los siguientes Acs: una inmunoglobulina monoclonal de tipo IgG/k preparado en ratón anti VCAM-1 o ICAM-1 humanas (GENZYME) a una concentración de 50 µg/ml. Como Ac secundario se utilizó una IgG anti inmunoglobulina de ratón preparada en conejo y conjugada con peroxidasa (DAKO) a una concentración de 1.3 g/l (dilución 1:100). La evaluación de los cortes correspondió al valor promedio de dos a tres cortes seriados de cada tejido, cuantificando el número de los Mφs inmunorreactivos/campo y el de las células endoteliales inmunorreactivas/campo.

EVALUACIÓN MICROSCRÓPICA DEL NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS. De cada paciente se estudió un mínimo de 2 diferentes cortes de la membrana sinovial. La proliferación vascular (neovascularización) se determinó cuantificando el número de vasos sanguíneos en tejidos teñidos con hematoxilina a 400 X. Los resultados se expresaron como promedios.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Las asociaciones entre los grupos de variables cuantificables fueron determinadas por la prueba de Mann-Whitney.

8. RESULTADOS

PERFIL DE CITOCINAS. El análisis del perfil de las citocinas de las CMNSP (Tabla 3) mostró que el 100% de los individuos control no inflamatorio, expresaron todos los ARNm para las citocinas investigadas, a excepción del transcrito para la IL-13 que se encontró en el 80% de la población, mientras que en los pacientes con AR los ARNm para la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la IL-10, el TNF- α y el TGF- β 1 se expresaron únicamente en el 75% de la población; los de la IL-4 en el 25% y los de la IL-13 en el 50% de las muestras.

TABLA 3.

Perfil del citocinas con el ADNc de CMNSP para:

*GPS	β 2 μ glo- bulina	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	TNF- α	TGF- β 1
CTRL No I 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTRL No I 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTRL No I 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTRL No I 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CTRL No I 5	+	+	+	+	+	+	-	+	+
CTRL I 1	+	+	+	+	+	+	-	+	+
CTRL I 2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
CTRL I 3	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
CTRL I 4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
CTRL I 5	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AR 1	+	+	-	+	+	+	-	+	+
AR 2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
AR 3	+	+	-	+	+	+	+	+	+
AR 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AR 5	+	-	-	-	+	-	-	-	-

*GPS: Grupos. β 2- μ globulina: β 2-microglobulina. CTRL No I: Control no inflamatorio. CTRL I: Control inflamatorio. AR: Paciente con artritis reumatoide. nr: no realizado.

Por otro lado, en la membrana sinovial se halló un patrón de frecuencia de la expresión de los ARNm, distinto al encontrado en las CMNSP (Tabla 4). Así, los resultados observados en el grupo control no inflamatorio mostraron que los transcritos para la IL-6, la IL-10 y el TGF- β 1, se expresaron en el 80% de las muestras, mientras que los de la IL-1 β sólo en el 40%, los del TNF- α en el 20% y los de la IL-4, la IL-8 y la IL-13 no se expresaron en ninguna de las muestras. En los controles inflamatorios se determinó que el 100% de la población presentaban el ARNm para el TGF- β 1; el 80% para la IL-6 y la IL-10; el 20% para la IL-1 β , el TNF- α y la IL-8 y los transcritos para la IL-4 y la IL-13 no se expresaron en ninguna de las muestras. Cabe señalar que tanto para el grupo control no inflamatorio como en el inflamatorio, no se expresaron los ARNm para la IL-4 y la IL-13, mientras que los transcritos para la IL-8, el TNF- α y la IL-1 β se encontraron con baja frecuencia en esta población de estudio. En los pacientes con AR se observó que el 100% expresaron los ARNm para la IL-10 y el TGF- β 1, mientras que el 60% para la IL-8 y el TNF- α ; el 40% para la IL-1 β y la IL-6, sin embargo tampoco se observaron los ARNm para la IL-4 y la IL-13.

TABLA 4

Perfil de citocinas con el ADNc de membrana sinovial para:

*GPS	β 2 μ glo- bulina	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	TNF- α	TGF- β 1
CTRL No I 1	+	+	-	+	-	+	-	+	+
CTRL No I 2	+	-	-	+	-	+	-	-	+
CTRL No I 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CTRL No I 4	+	+	-	+	-	+	-	-	+
CTRL No I 5	+	-	-	+	-	+	-	-	+
CTRL I 1	+	-	-	+	-	+	-	-	+
CTRL I 2	+	-	-	-	-	-	-	-	+
CTRL I 3	+	+	-	+	+	+	-	+	+
CTRL I 4	+	-	-	+	-	+	-	-	+
CTRL I 5	+	-	-	+	-	+	-	-	+
AR 1	+	+	-	+	+	+	-	+	+
AR 2	+	-	-	-	+	+	-	+	+
AR 3	+	-	-	-	-	+	-	-	+
AR 4	+	+	-	+	+	+	-	+	+
AR 5	+	-	-	-	-	+	-	-	+

*GPS: Grupos. β 2- μ globulina: β 2-microglobulina. CTRL No I: Control no inflamatorio. CTRL I: Control inflamatorio. AR: Paciente con artritis reumatoide.

CUANTIFICACIÓN DE LOS ARNm PARA LA IL-8 Y LA IL-10. Los ARNm se cuantificaron con la técnica de PCR cuantitativa o competitiva, que consistió en coretrotranscribir el ARN extraído de las muestras y el del plásmido pQB2 que contiene las secuencias sentido (5' - 3') y antisentido (3' - 5') de las citocinas a investigar y que funciona como un estándar interno a una concentración conocida. Con el ADNc se realizó una reacción de polimerasa en cadena; el amplificado se corrió en un gel de agarosa y se fotografió. Por la densitometría del negativo de la fotografía y a través del uso de factores de conversión se obtuvo la concentración de los ARNm para la citocina en la muestra (*Tabla 5*). Los resultados obtenidos mostraron que, el nivel de los transcritos para la IL-8 de las CMNSP en el grupo de los controles no inflamatorios era mayor que en el grupo de los pacientes con AR, lo cual fue estadísticamente significativo ($p=0.06$). Sin embargo cuando se compararon los niveles del ARNm para la IL-10 de las CMNSP entre el grupo control no inflamatorio y el de pacientes con AR no se encontró una diferencia estadísticamente significativa (*Figura 2*). Por otro lado, en la membrana sinovial del grupo de individuos control no inflamatorio no se encontraron transcritos para la IL-8, mientras que en el de los pacientes con AR los niveles fueron muy elevados ($p=0.05$), asimismo el número de transcritos para la IL-10 en el grupo de pacientes con AR fueron mayores que los del grupo control no inflamatorio ($p=0.028$ *Figura 3*). Al comparar los niveles de ARNm para la IL-8 y la IL-10 en las CMNSP y la membrana sinovial del grupo control no inflamatorio y del inflamatorio, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Cabe señalar que el número de transcritos para la IL-8 en las CMNSP de los pacientes con AR, fue del orden de 0 a 1400, mientras que los de IL-10 fueron de 0 a 170 000 ARNm y que los transcritos para la IL-8 en membrana sinovial fueron de 0 a 2 500 mientras que los de la IL-10 fueron hasta de 6 500 000, lo que mostró que los niveles de ARNm para la IL-8 y la IL-10 en las CMNSP y la membrana sinovial en el grupo de pacientes con AR, fueron siempre mayores que los del grupo control no inflamatorio, guardando una proporción de 100 a 1000 veces mayor respectivamente.

TABLA 5.

Cuantificación de transcritos para IL-8 e IL-10

GPOS	CMNSP			MEMBRANA SINOVIAL		
	82- μglobulina*	ARNm para IL-8*	ARNm para IL-10*	82- μglobulina*	ARNm para IL-8*	ARNm para IL-10*
CTRL No I	42205±1778	1159±104	131008±25563	3460±972	0±0	129520±52350
CTRL I	7071±2018	1001±779	126126±42042	4800±1881	1±1	1.49e6±1.25e6
AR	26939±7788	412±294	93693±43708	6012±1732	507±504	2.00e6±1.20e6

*Promedio grupal de los valores numéricos de los niveles de ARNm cuantificados ± error estándar.

CTRL No I: grupo control no inflamatorio. CTRL I: grupo control inflamatorio. AR: grupo de pacientes con artritis reumatoide. e = 10⁶.

CUANTIFICACION DE ARNm CMNSP

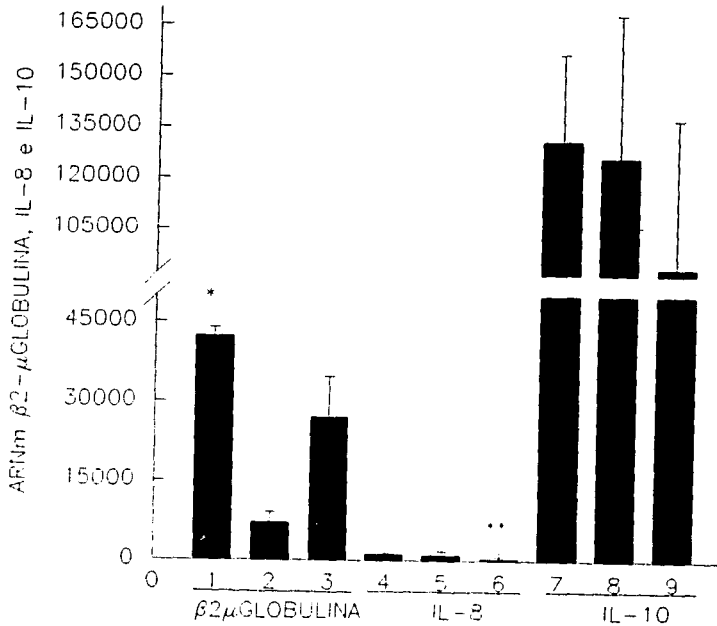


FIGURA 2. Cuantificación de los transcritos en CMNSP. Las columnas 1, 4 y 7 representan el promedio del valor numérico \pm error estándar del **grupo control no inflamatorio**. Las columnas 2, 5 y 8 corresponden a los valores promedio del **grupo control inflamatorio**. Las columnas 3, 6 y 9 se refieren al **grupo de pacientes con AR**. $\beta 2\mu\text{GLOBULINA}$: transcritos para $\beta 2$ -microglobulina. * $p = 0.08$ comparando el grupo de controles no inflamatorios vs el de pacientes con AR. ** $p = 0.06$ comparando el grupo de pacientes con AR vs el grupo de controles no inflamatorios.

CUANTIFICACION DE ARNm EN MS

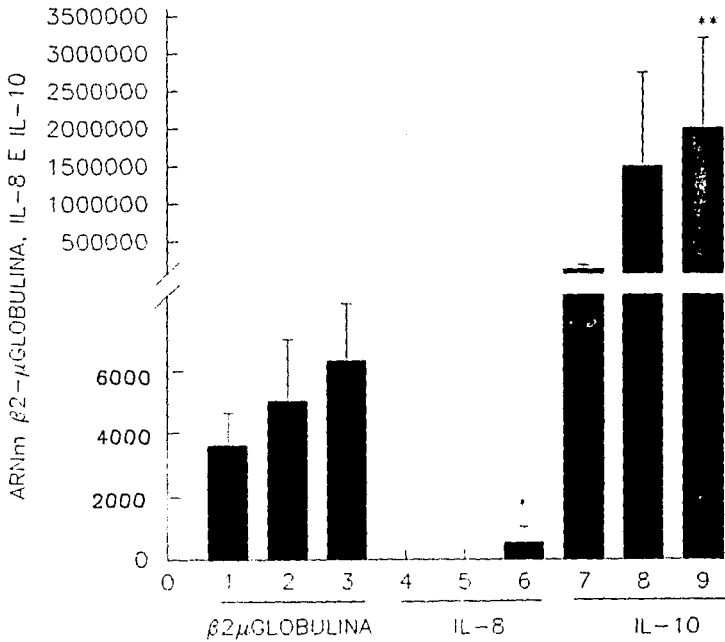


FIGURA 3. Cuantificación de los transcritos en membrana sinovial. Las columnas **1, 4 y 7** representan el promedio del valor numérico \pm error estándar del **grupo control no inflamatorio**. Las columnas **2, 5 y 8** corresponden a los valores promedio del **grupo control inflamatorio**. Las columnas **3, 6 y 9** se refieren al **grupo de pacientes con AR**. $\beta 2\mu$ GLOBULINA: transcritos para $\beta 2$ -microglobulina. * $p = 0.05$ y ** $p = 0.028$ comparando el grupo control no inflamatorio vs el de pacientes con AR.

INMUNOHISTOLOGÍA PARA LA IL-8 Y LA IL-10. En ambos ensayos se utilizó la técnica de biotina-avidina-peroxidasa, que amplifica de 5 a 10 veces la inmunorreacción, lo cual permitió identificar claramente las células positivas o inmunorreactivas de las que no lo eran. Para obtener los resultados se procedió a cuantificar el número total de células inmunorreactivas al Ac primario (policlonal anti IL-8 o monoclonal anti IL-10), en dos o tres cortes de cada uno de los tejidos; el valor obtenido se dividió entre el número de campos totales observados a 100X y los resultados se expresaron como promedios (Tabla 6). Histológicamente se observó que la IL-8 fue producida principalmente por los Mφs de los infiltrados inflamatorios, por las células endoteliales en forma muy abundante, por los fibroblastos y en menor grado por los linfocitos (Figura 4), lo que manifiesta la participación de otras células además de los Mφs en el desarrollo de la sinovitis. Esta citocina se presentó casi exclusivamente en los pacientes con AR, ya que en el grupo control no inflamatorio, solamente se encontró un individuo que presentaba inmunorreactividad al Ac. Los niveles de proteína fueron significativamente más altos en el grupo de los pacientes con AR que en el del control no inflamatorio ($p=0.05$). Por otra parte, la IL-10 fue producida por los Mφs y los linfocitos de los infiltrados inflamatorios (Figura 5), encontrándose que en los pacientes con AR la cantidad de células inmunorreactivas fue mayor que en los grupos control inflamatorio y no inflamatorio (Figura 6).

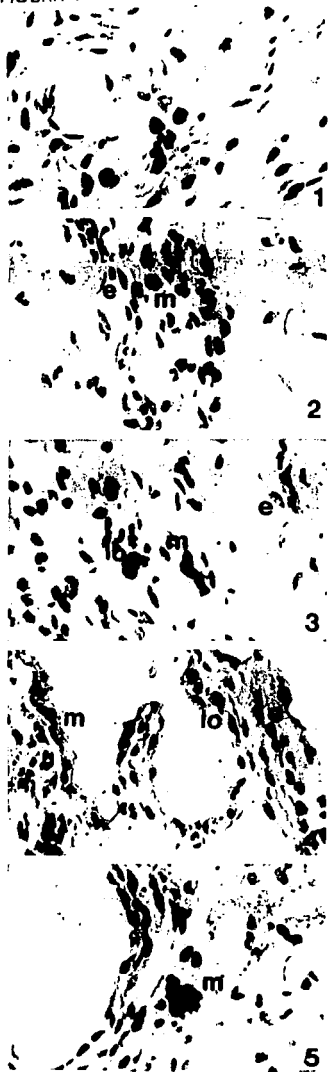
TABLA 6

Inmunohistología para la IL-8 y la IL-10

GRUPOS	IL-8*	IL-10*
CONTROL NO INFLAMATORIO	00.00 ± 0.00	01.016 ± 0.464
CONTROL INFLAMATORIO	04.48 ± 4.48	02.048 ± 1.158
PACIENTES CON AR	10.35 ± 5.42	10.210 ± 8.149

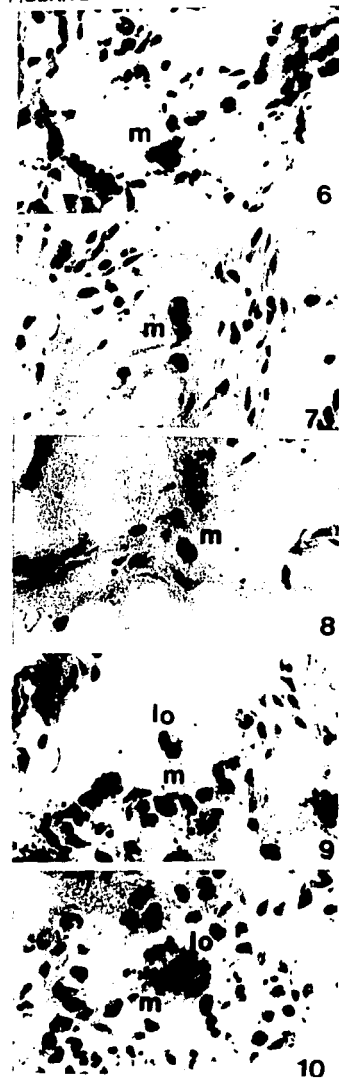
*Promedio grupal de las células inmunorreactivas por campo ($n = 2 \text{ ó } 3$) ± error estándar.

FIGURA 4



Cortes por congelación de la membrana sinovial con la técnica de inmunoperoxidasa (sistema avidina-biotina-peroxidasa), empleando como Ac primario una IgG anti IL-8. 1: Blanco de reactivos (640X). 2: Corte del control no inflamatorio 2; Mφs (m) y células endoteliales (e) no inmunorreactivas al Ac. 3: Mφs (m), célula endotelial (e), fibroblasto (f) y linfocito (lo) en un corte del control inflamatorio 3 (500X). 4: Mφs (m) y células endoteliales (e) del paciente AR 2 inmunorreactivas (500X). 5: Mφs (m) en un corte del paciente AR4 que presentan inmunorreactividad al Ac (500X).

FIGURA 5



Cortes por congelación de la membrana sinovial con la técnica de inmunoperoxidasa (sistema avidina-biotina-peroxidasa), empleando como Ac primario una IgG anti IL-10. 6: Mφs (m) en un corte de membrana del control no inflamatorio 4 que presenta inmunorreactividad al Ac (500X). 7: Mφs (m) en un corte del control inflamatorio 3 que presenta inmunorreactividad (640X). 8: Mφs (m) en un corte de membrana del control inflamatorio 5 (640X). 9: Mφs (m) y linfocitos (lo) en un corte del paciente AR 2 (640X). 10: Mφs (m) y linfocitos (lo) en un corte del paciente AR 4 (640X).

INMUNOHISTOLOGIA PARA IL-8 E IL-10

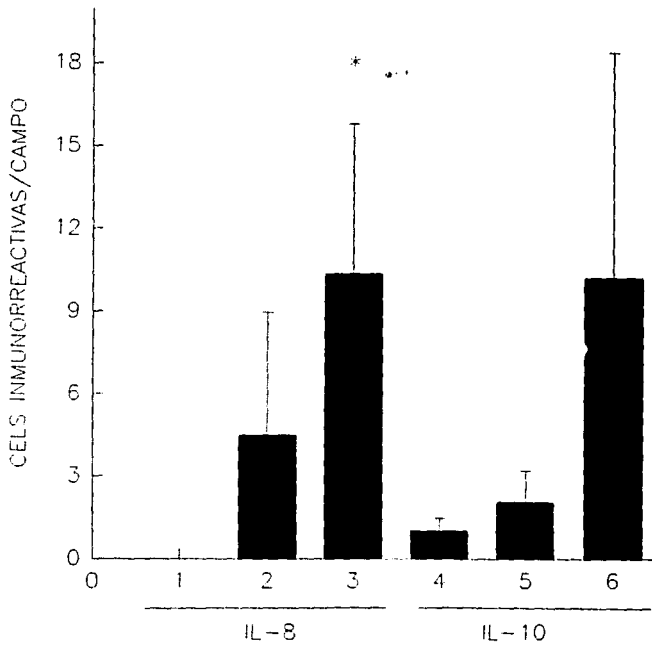


FIGURA 6. Inmunohistología con el sistema de biotina avidina-peroxidasa en cortes de membrana sinovial. Las columnas 1 y 4 representan el promedio del valor numérico \pm error estándar del **grupo control no inflamatorio**. Las columnas 2 y 5 corresponden a los valores promedio del **grupo control inflamatorio**. Las columnas 3 y 6 refieren al grupo de **pacientes con AR**. * $p = 0.05$ comparando el grupo control no inflamatorio vs el de pacientes con AR.

SEMICUANTIFICACIÓN DE LOS TRANSCRITOS PARA EL TGF- β 1. La PCR semicuantitativa para determinar los ARNm consistió en realizar una densitometría de los negativos obtenidos del perfil de las citocinas empleando como control interno a la β 2-microglobulina. Con los valores de las lecturas se obtuvo el cociente que correspondía a la lectura de la banda del TGF- β 1 entre la de la β 2-microglobulina. Los resultados encontrados no mostraron diferencias significativas en los niveles de los transcritos entre los tres grupos de estudio tanto en las CMNSP (Tabla 7) como en la membrana sinovial (Tabla 8).

TABLA 7

Semicuantificación de transcritos para el TGF- β 1 en las CMNSP

GRUPOS	PROMEDIO*	ERROR ESTÁNDAR
CTRL NO INFLAMATORIO	0.7846	0.0682
PACIENTES CON AR	0.6325	0.1374

CTRL NO INFLAMATORIO: grupo control no inflamatorio. *Promedio de los cocientes (TGF- β 1 / β 2-microglobulina).

TABLA 8

Semicuantificación de transcritos para el TGF- β 1 en la membrana sinovial

GRUPOS	PROMEDIO*	ERROR ESTÁNDAR
CTRL NO INFLAMATORIO	0.4218	0.1285
CTRL INFLAMATORIO	0.2782	0.0931
PACIENTES CON AR	0.4748	0.2039

CTRL NO INFLAMATORIO: control no inflamatorio. CTRL INFLAMATORIO: control inflamatorio. *Promedio de los cocientes (TGF- β 1/ β 2-microglobulina).

SEMICUANTIFICACION DE TGF- β 1

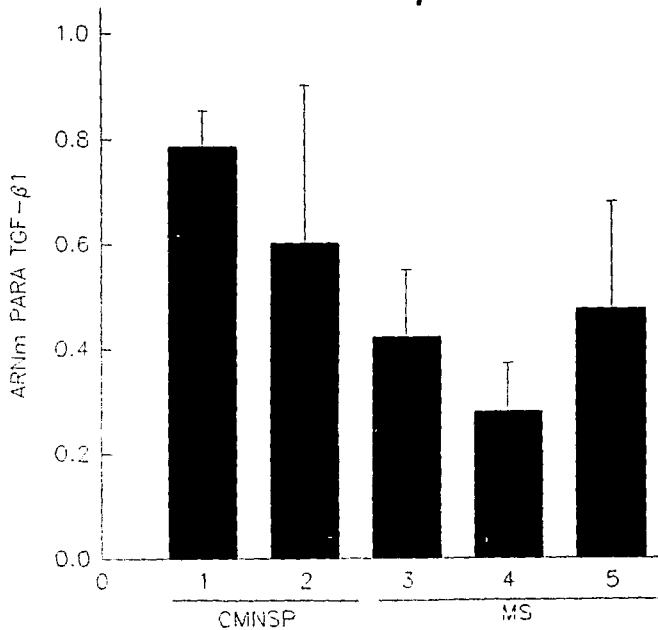


FIGURA 7. Semicuantificación de los transcritos para el TGF- β 1. Las columnas 1 y 3 representan el promedio del valor numérico \pm el error estándar del **grupo control no inflamatorio**. La columna 4 corresponde al valor promedio \pm error estándar del **grupo control inflamatorio**. Las columnas 2 y 5 se refieren al **grupo de pacientes con artritis reumatoide**.

INMUNOHISTOLOGÍA PARA LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN VCAM-1 E ICAM-1. Se realizó un análisis histológico del grado (escaso, ligero o leve, moderado y abundante) y tipo del infiltrado inflamatorio [perivascular o intersticial; agudo (predominantemente de células polimorfonucleares) o crónico (predominantemente de células mononucleares)] en los cortes que se emplearon para la inmunohistología (Tabla 9) y se encontró que los infiltrados en las sinovias de los individuos control no inflamatorio en general eran escasos, de tipo perivascular y/o intersticial y en su mayoría constituidos por CMNs y polimorfonucleares, mientras que los de los controles inflamatorios y de los pacientes con AR variaban desde leves hasta abundantes y estaban constituidos principalmente por CMNs.

TABLA 9

GRUPOS	CARACTERÍSTICAS DEL INFILTRADO
CONTROL NO INFLAMATORIO 1	Escasos infiltrados inflamatorios de tipo intersticial diseminado, predominantes en CMNs con algunos neutrófilos.
CONTROL NO INFLAMATORIO 2	Escasos infiltrados inflamatorios de tipo perivascular, constituidos por polimorfonucleares, Mφs y Mφs.
CONTROL NO INFLAMATORIO 3	Leves infiltrados inflamatorios de CMNs de tipo perivascular.
CONTROL NO INFLAMATORIO 4	Ligeros infiltrados inflamatorios de tipo perivascular, compuestos de CMNs, básicamente por Mφs y monocitos.
CONTROL NO INFLAMATORIO 5	Moderados infiltrados intersticiales difusos constituidos por CMNs y polimorfonucleares.
CONTROL INFLAMATORIO 1	Infiltrados inflamatorios leves, de tipo intersticial, constituidos básicamente de CMNs.
CONTROL INFLAMATORIO 2	Infiltrados inflamatorios perivasculares moderados, compuestos principalmente de CMNs.
CONTROL INFLAMATORIO 3	Abundantes infiltrados inflamatorios de tipo intersticial, predominantes en CMNs, principalmente de Mφs y linfocitos.
CONTROL INFLAMATORIO 4	Ligeros infiltrados inflamatorios de tipo perivascular, compuestos de CMNs, básicamente Mφs y linfocitos.
CONTROL INFLAMATORIO 5	Infiltrados inflamatorios moderados de CMNs de tipo Mφs y linfocitos. Se observaron células gigantes alrededor de los vasos sanguíneos de pequeño calibre además se encontraron algunos neutrófilos.
AR 1	Ligeros infiltrados inflamatorios de tipo intersticial constituidos de CMNs.
AR 2	Abundantes infiltrados inflamatorios de tipo perivascular e intersticial, constituidos de CMNs. Además se observaron cantidades abundantes de Mφs, Mφs y linfocitos activados.
AR 3	Escasos infiltrados inflamatorios de tipo perivascular, compuestos de CMNs, predominantes en Mφs.
AR 4	Abundantes infiltrados de Mφs y linfocitos, localizados intersticial y perivascularmente. Se observaron pocos neutrófilos y Mφs activados. Se encontraron células gigantes abundantes.
AR 5	No se observaron infiltrados inflamatorios. El tejido es de tipo fibroso, por lo que la densidad de la población celular es baja.

Por lo que respecta a las moléculas de adhesión, se encontró que ICAM-1 fue significativamente más abundante en las células endoteliales de los pacientes con AR que en los grupos control no inflamatorio e inflamatorio ($p = 0.007$ y $p = 0.009$, respectivamente. *Tabla 11*), también se observó que la comparación del grupo control no inflamatorio con el inflamatorio reflejaba una cantidad significativamente mayor de células inmunorreactivas en éste último ($p = 0.058$. *Tabla 11*). Por otra parte en el grupo de pacientes con AR, se evidenció una profusa cantidad de Mφs inmunorreactivos con respecto a los grupos control no inflamatorio e inflamatorio ($p = 0.005$ y $p = 0.009$, respectivamente), no hallándose diferencias significativas entre el grupo control no inflamatorio e inflamatorio (*Tabla 10*).

Asimismo, el análisis de las células endoteliales inmunorreactivas al anticuerpo anti VCAM-1, mostró que esta molécula era más abundante en los grupos control inflamatorio y de los pacientes con AR comparados contra el de individuos control no inflamatorio ($p = 0.05$ y $p = 0.026$, respectivamente. *Tabla 11*). Un patrón de respuesta similar se encontró al analizar el número de los Mφs positivos al Ac, ya que éstos fueron significativamente más abundantes en el grupo de pacientes con AR y control inflamatorio con respecto al grupo control no inflamatorio ($p = 0.007$ y $p = 0.008$, respectivamente. *Tabla 10*). No se observaron diferencias significativas en la expresión de VCAM-1 en los Mφs y en las células endoteliales de los grupos control inflamatorio y de pacientes con AR.

TABLA 10

Valores promedio de los Mφs inmunorreactivos/ campo

GRUPO	ICAM-1		p	VCAM-1		p
	PROMEDIO	*ES		PROMEDIO	*ES	
CONTROL NO INFLAMATORIO	0.000	0.000	No inf vs AR $p=0.0053$	0.080	0.080	No inf vs AR $p=0.0071$
CONTROL INFLAMATORIO	0.092	0.057	Inf vs AR $p=0.0090$	0.184	0.0642	Inf vs AR $p=0.0082$
PACIENTES CON AR	5.794	4.356		6.770	5.463	

*ES: error estándar. No inf: grupo control no inflamatorio, Inf: grupo control inflamatorio, AR: grupo de pacientes con artritis reumatoide.

TABLA 11

Valores promedio de las células endoteliales inmunorreactivas/campo.

	ICAM-1			VCAM-1		
GRUPO	PROMEDIO	*ES	p	PROMEDIO	*ES	p
CONTROL NO INFLAMATORIO	0.034	0.034	No inf vs Inf p=0.0582	0.040	0.025	No inf vs inf p=0.0524
CONTROL INFLAMATORIO	0.254	0.090	Inf vs AR p=0.0090	0.348	0.160	
PACIENTES CON AR	2.844	1.062	No inf vs AR p=0.0071	2.242	1.395	No inf vs AR p=0.0264

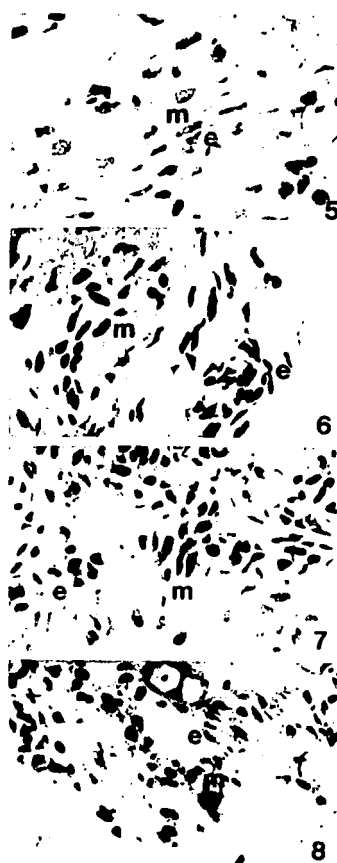
*ES: error estándar. No inf: grupo control no inflamatorio, Inf: grupo control inflamatorio, AR: grupo de pacientes con artritis reumatoide.

FIGURA 8



Técnica de inmunoperoxidasa para detectar la molécula de adhesión ICAM-1. 1: Mφs (m) y células endoteliales (e) no inmunorreactivas al Ac, en un corte de membrana del control no inflamatorio 2 (800X). 2: células endoteliales (e) y Mφs (m) no inmunorreactivos al Ac, en un corte del control inflamatorio 3 (800X). 3: Mφs (m) y células endoteliales (e) inmunorreactivas, en un corte de membrana del paciente AR 4 (600X). 4: Mφs (m) y células endoteliales (e) inmunorreactivas, en un corte de membrana del paciente AR 2 (640X).

FIGURA 9



Técnica de inmunoperoxidasa para detectar la molécula de adhesión VCAM-1. 5: Mφs (m) y células endoteliales (e) no inmunorreactivas al Ac, en un corte de tejido del control no inflamatorio 2 (800X). 6: Mφs (m) y células endoteliales (e) no inmunorreactivas al Ac, en un corte de membrana del control inflamatorio 3 (800X). 7: Mφs (m) y células endoteliales (e) inmunorreactivas, en un corte de membrana del paciente AR 4 (640X). 8: Mφs (m) y células endoteliales (e) inmunorreactivas, en un corte de membrana del paciente AR 2 (500X).

INMUNOHISTOLOGIA PARA ICAM-1 Y VCAM-1

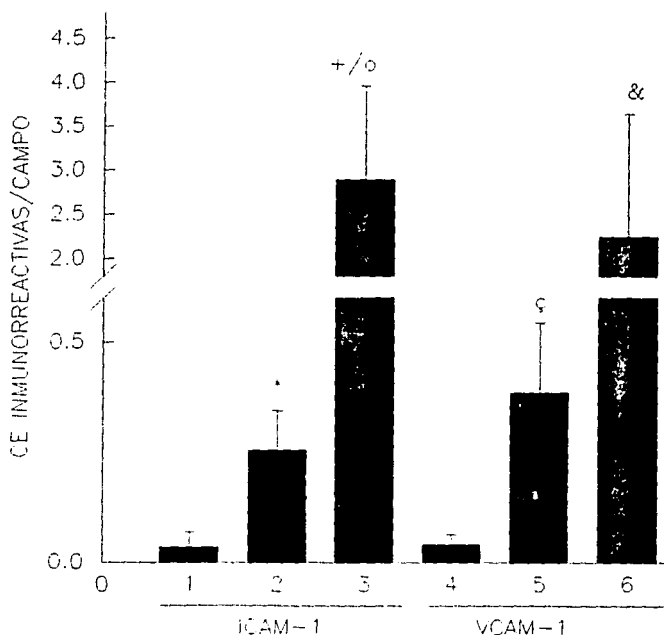


FIGURA 10. Inmunohistología con el sistema de peroxidasa en cortes de membrana sinovial. Las columnas 1 y 4 representan el promedio del valor numérico \pm error estándar del grupo control no inflamatorio. Las columnas 2 y 5 corresponden a los valores promedio del grupo control inflamatorio. Las columnas 3 y 6 se refieren al grupo de pacientes con AR. *p = 0.05 comparando el grupo control no inflamatorio vs el inflamatorio. *p = 0.007 cuando se comparó el grupo control no inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide. *p = 0.009 comparando el grupo control inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide. *p = 0.05 cuando se comparó el grupo control no inflamatorio vs el inflamatorio. *p = 0.026 comparando el grupo control no inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide.

INMUNOHISTOLOGIA PARA ICAM-1 Y VCAM-1

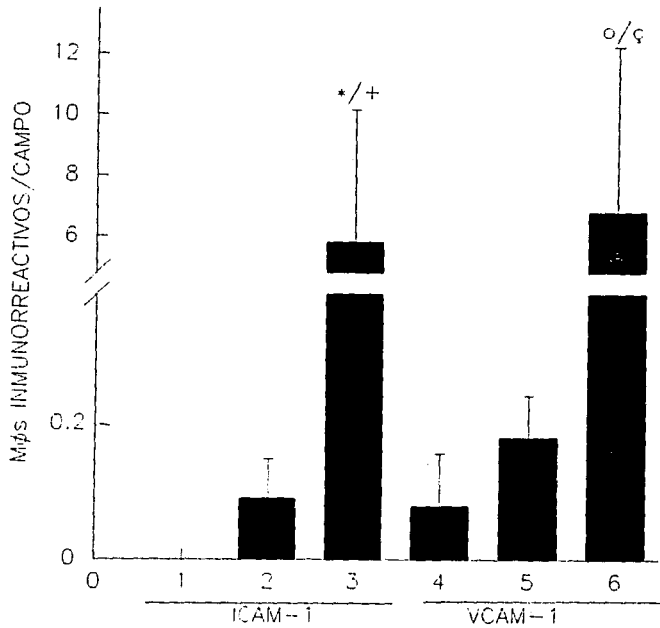


FIGURA 11. Inmunohistología con el sistema de peroxidasa en cortes de membrana sinovial. Las columnas 1 y 4 representan el promedio del valor numérico \pm error estándar del **grupo control no inflamatorio**. Las columnas 2 y 5 corresponden a los valores promedio del **grupo control inflamatorio**. Las columnas 3 y 6 se refieren al **grupo de pacientes con AR**. * $p = 0.005$ comparando el grupo control no inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide. + $p = 0.009$ cuando se comparó el grupo control inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide. ° $p = 0.007$ comparando el grupo control no inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide. ç $p = 0.008$ cuando se comparó el grupo control inflamatorio vs el de pacientes con artritis reumatoide.

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS. Por lo que respecta a la cuantificación de los vasos sanguíneos que se realizó en 2 ó 3 cortes de la membrana sinovial a 400X, se encontraron diferencias en la proliferación vascular o neovascularización ya que la comparación de la evaluación del número de vasos sanguíneos entre los grupos de estudio presentó una tendencia significativa ($p = 0.07$) entre los valores del grupo control no inflamatorio y el de pacientes con AR.

TABLA 12

Evaluación microscópica de los vasos sanguíneos

GRUPO	PROMEDIO/CAMPO	ERROR ESTÁNDAR
CONTROL NO INFLAMATORIO	8.08	1.36
CONTROL INFLAMATORIO	11.88	2.66
PACIENTES CON AR	16.1	4.46

VASCULARIZACION

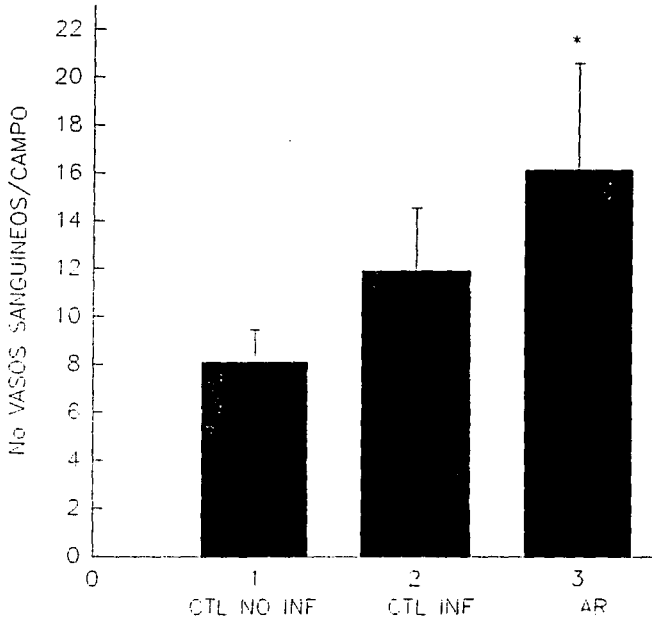


FIGURA 12. CTRL NO INF: Grupo control no inflamatorio. CTRL INF: Grupo control inflamatorio. AR: Grupo de pacientes con artritis reumatoide. * $p = 0.07$ cuando se comparó el grupo de pacientes con AR vs el control no inflamatorio.

9. DISCUSIÓN

Estudiamos la expresión de los ARNm para las diferentes citocinas pro y anti inflamatorias en las CMNSP y la membrana sinovial de los pacientes con AR de evolución temprana. Encontramos que el patrón de expresión en ambos compartimientos fue diferente ya que en la membrana sinovial de nuestros tres grupos de estudio, los ARNm se expresaron con menor frecuencia que en las CMNSP. En la membrana sinovial de los pacientes con AR, la frecuencia de expresión de los transcritos para la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la IL-10, el TNF- α y el TGF- β 1 sugiere que *in situ* existe una intensa activación celular, que la correlaciona con lo hallado en investigaciones previas (*Chen E, et al, 1993; Farahat MN, et al, 1993; Chu CQ, et al, 1992; Holt Y, et al, 1992; Firestein GS, et al, 1990; Keyszer GM, et al, 1994*). Sin embargo, es importante mencionar que: a) el porcentaje de las membranas sinoviales de los pacientes con AR que expresaron los transcritos para la IL-1 β y la IL-6 fueron claramente más bajos que los reportados en la literatura (*Chen E, et al, 1993; Chu CQ, et al, 1992; Holt Y, et al, 1992; Firestein GS, et al, 1990; Sack U, et al, 1993; Manicourt DH, et al, 1993*), empero, dichos resultados han sido obtenidos de las sinovias de pacientes en fase crónica de la enfermedad, mientras que las nuestras pertenecen a pacientes en fase temprana lo que seguramente es el reflejo de lo obtenido; b) los datos encontrados para los ARNm del TNF- α y TGF- β 1 coinciden con los reportados (*Miossec P, et al, 1990; Fava R, et al, 1989*), ya que los transcritos para el TNF- α se expresaron en la mayoría de las muestras analizadas y los del TGF- β 1 se presentaron en todos los individuos; c) no todos los ARNm investigados fueron expresados, por ejemplo el de la IL-4 y la IL-13, siendo éste dato reportado por primera vez ya que su presencia no se había investigado anteriormente en la membrana sinovial de los pacientes con AR. Este último hallazgo concuerda con el hecho de que la IL-13 es una citocina liberada por las células Th2 al igual que la IL-4 y de funciones similares a ésta (*Zurawski G, et al, 1994*), lo que sugiere que la producción de las citocinas por las células se encuentra abatida, por lo que ninguna de estas citocinas participa en el proceso anti inflamatorio en los pacientes de evolución temprana; d) en cuanto a los transcritos para la IL-8, no se detectaron en la membrana sinovial de los controles inflamatorios y no inflamatorios, sin embargo en el caso de los ARNm la para IL-10 sí, pero con una frecuencia menor a la de los pacientes con AR y

e) en la membrana sinovial del grupo control inflamatorio la frecuencia de expresión de los transcritos fue casi idéntica a la del grupo control no inflamatorio, ya que las únicas diferencias radicaron en el ARNm para la IL-1 β que se expresó en el primer grupo en el 20%, y en el segundo en el 40% de los individuos y en los transcritos para el TGF- β 1 que en el primero se presentaron en el 100% mientras que en el segundo en el 80% de los casos.

El análisis de los ARNm para el TGF- β 1 no mostró diferencias semicuantitativas entre los tres grupos de estudio, sin embargo otros investigadores han demostrado que este factor de crecimiento, secretado por los M ϕ s principalmente, se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido y la membrana sinovial de los pacientes con AR en la fase crónica (Fava R, et al, 1989; Moisset P, et al, 1990). Dicha controversia se fundamenta por el hecho de que el factor tiene efectos potentes y contrarios en una gran variedad de células, por un lado participa en la reparación tisular y por el otro en la inflamación, los cuales dependen de su concentración, las condiciones del microambiente y el estado de activación de las células que lo producen, de ahí que quizá las diferencias en la abundancia de los transcritos sean mínimas con respecto al grupo control no inflamatorio ya que en nuestros pacientes el tiempo de evolución de la artritis es corto.

Al cuantificar los transcritos para la IL-8 y la IL-10 una diferencia palpable entre nuestros tres grupos de estudio fue que, únicamente la membrana sinovial de los pacientes con AR expresó niveles abundantes de los ARNm para la IL-8, no así para la IL-10, sin embargo los niveles de esta última, fueron significativamente mayores en comparación con los del control no inflamatorio, sin observar diferencias consistentes entre el grupo control inflamatorio y el no inflamatorio; lo que sugiere que las divergencias entre los pacientes con AR y los controles inflamatorios podrían deberse al cambio cuantitativo y/o cualitativo o bien al número absoluto de células que producen estas citocinas. En las CMNSP esta diferencia no se hizo evidente, lo cual sugiere que lo que sucede en el torrente sanguíneo no es reflejo fiel de lo que acontece dentro de la cavidad articular y que la sinovia es el tejido responsable del total de ARNm para las citocinas sintetizadas en la articulación durante el inicio de la inflamación. Así, la técnica de PCR cuantitativa por demás novedosa, nos permitió (a diferencia de otros estudios publicados previamente en los que se semicuantifican algunos transcritos) (Firestein

GD, et al, 1990; Cush J, et al, 1995] evaluar con certeza las diferencias cuantitativas en la producción de los ARNm entre los pacientes con AR y los controles inflamatorios.

Por otra parte, por la técnica de ELISA se determinaron los niveles de la IL-10 en el suero de los pacientes, los controles inflamatorios y los no inflamatorios, sin embargo a pesar de la alta sensibilidad de la prueba no se logró detectar a la citocina, a excepción de la muestra del control inflamatorio 5 que contenía 65.79 pg/ml (dato no mostrado), lo cual es contrario a lo reportado anteriormente en donde en los sueros de pacientes con AR en fase crónica se le cuantifica por este método (Cush J, et al, 1995). Tales discrepancias pueden ser atribuidas a que la proteína en cuestión podría ser criolábil y nosotros conservamos las muestras durante meses; a que se desconoce su tiempo de vida media en el suero (el cual podría ser muy corto); a que ésta se encontrase inhibida o enmascarada por algún agente contenido en el suero; o a que nuestros pacientes no se encontraban en la fase crónica.

La inmunohistología reveló que la IL-8 se encontraba en los pacientes con AR y únicamente en la membrana sinovial del paciente control inflamatorio 3, lo que sugiere que muy probablemente esta citocina es propia de patologías que implican procesos inflamatorios que tienden a la cronicidad, dentro de los que se incluyen enfermedades reumáticas como la AR. El análisis de las características morfológicas de las células inmunorreactivas mostró que las células productoras de esta citocina eran los Mφs y las endoteliales principalmente y en menor grado los fibroblastos y las células T de la sinovia, lo cual indica que en el inicio de la sinovitis intervienen una gran variedad de células y que la respuesta inflamatoria y su perpetuación no dependen únicamente de los factores liberados por los Mφs, sino de una compleja red de interacciones celulares y de factores solubles.

En lo referente a la IL-10 encontramos que, tanto la membrana sinovial de los controles no inflamatorios, como la de los inflamatorios y de los pacientes con AR tenían células que sintetizaban esta proteína, aunque en los controles no inflamatorios en proporción más baja con respecto a la de los pacientes con AR y enfermedades reumáticas inflamatorias de tipo no AR. Las células que presentaron inmunoreactividad fueron únicamente los Mφs y los linfocitos (Katsikis PD, et al, 1994),

lo que sugiere que participan con ello en la homeostasis de la cavidad articular al inhibir la síntesis de las citocinas proinflamatorias.

Por otra parte, algunas de las citocinas de las cuales demostramos la presencia de su ARNm (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8) y de la proteína como tal en la sinovia (IL-8), hacen de las células endoteliales, entre otras, sus células blanco, por lo que en la actualidad se considera que el endotelio por si mismo es inducido a través de factores solubles como las citocinas; participa de manera activa en una gran variedad de procesos fisiopatológicos que incluyen la inflamación, la angiogénesis, la coagulación, la presentación antigénica, el reclutamiento de los leucocitos, mediador en la producción de citocinas (IL-8 y factor activador de plaquetas o PAF) y diversos procesos inmunes (Bevilacqua MP, 1993); por lo que el estudio de su participación en los procesos inflamatorios crónicos como la AR se hace necesaria. En esta patología, la microvasculatura sufre básicamente dos cambios morfológicos inducidos por la acción de la IL-1 β , el TNF- α y/o la IL-4. El primero, es la diferenciación a vénulas del endotelio alto (HEV) que facilitan el tráfico selectivo de los linfocitos a la sinovia y el segundo, a la proliferación de nuevos vasos sanguíneos a través de un proceso de angiogénesis o neovascularización que contribuye a la destrucción del cartílago articular por medio de dos vías que incluyen: el reclutamiento de las células inflamatorias, que liberan una gran cantidad de sustancias activadoras, factores solubles y fibrina, que al depositarse sobre la membrana sinovial aportan un sustrato físico y bioquímico para la migración y proliferación de las células sinoviales que adquieren características propias de los sinoviocitos tipo A y B; y la proliferación de estas células, que determina un engrosamiento de la capa íntima sinovial conocido como *pannus* (Díaz-Flores L, et al, 1992).

Al analizar nuestras muestras observamos que el proceso de angiogénesis en la membrana sinovial se produce por la formación de yemas vasculares a partir de los capilares y, sobre todo de las vénulas postcapilares preexistentes, donde el mecanismo general se inicia con el estímulo angiogénico (IL-1 β , TNF- α , IL-8 y TGF- β 1) que induce a las células endoteliales a liberar las colagenasas y el factor activador del plasminógeno que producen la degradación local de la membrana basal de las vénulas postcapilares y capilares, lo cual continúa con la migración de las células endoteliales y perivasculares que posteriormente proliferan y se organizan formando una nueva red capilar. La

presencia persistente del tejido de granulación desarrollado en la sinovitis se representa por el *pannus* ricamente vascularizado que permite la migración de los Mφs activados y por lo tanto de sus factores angiogénicos. Al igual que lo reportado en los trabajos realizados previamente (*Díaz-Flores L, et al, 1992; Farahat MN, et al, 1993*), encontramos una diferencia entre el grupo control no inflamatorio y el de los pacientes con AR, sin embargo ésta fue relativamente significativa, empero no debemos olvidar que las muestras analizadas por nosotros son de evolución corta, por lo que la diferencia no es tan marcada como la observada en los trabajos realizados con las sinovias de fase crónica.

Otra de las características que hace relevante el estudio del endotelio activado, es que éste expresa principalmente dos moléculas de adhesión del grupo de la superfamilia de las inmunoglobulinas, ICAM-1 y VCAM-1 ó INCAM-110, las cuales interaccionan con las integrinas presentes en la superficie de los leucocitos y a través de las cuales se lleva a cabo su unión y transmigración hacia la cavidad articular. Estas moléculas y las combinaciones de otras sirven como soporte para la adhesión durante la extravasación en lesiones tisulares o infecciones (*Patarroyo M, 1991*). Así, a lo largo del proceso inflamatorio se observa una vasodilatación local que incrementa el flujo sanguíneo, de los leucocitos, la liberación de PGE₂ y del factor de relajamiento derivado del endotelio (EDRF ó NO₂). Por otra parte el endotelio activado con IL-1β y TNF-α induce la síntesis y liberación de la IL-8, un factor quimiotáctico de neutrófilos (*Seitz M, et al, 1991*), mediadores lipídicos y el PAF, que estimulan las funciones leucocitarias incluyendo la adhesión (*Bevilacqua MP, 1993*). Nosotros encontramos, que la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales y los Mφs fue significativamente mayor en la membrana sinovial de los pacientes con AR que en los controles no inflamatorios e inflamatorios, lo cual concuerda con lo ya reportado (*Gerritsen ME, et al, 1993; Lindstey HB, et al, 1993; Szekanecz A, et al, 1994*). Sin embargo, a diferencia de los estudios previos realizados por Szekanecz Z y col. en pacientes crónicos, nosotros encontramos que la mayor expresión de ICAM-1 fue en los Mφs y no en las células endoteliales de la subíntima. No hubo diferencias significativas cuando se compararon los Mφs inmunorreactivos de controles inflamatorios y no inflamatorios, empero en las células endoteliales sí las hubo.

Por lo que respecta a la molécula VCAM-1, el endotelio y los Mφs de la membrana sinovial del grupo de los pacientes con AR mostraron una expresión significativamente mayor comparada con la del grupo control inflamatorio y no inflamatorio, que se correlaciona con lo reportado (*Bevilacqua MP, 1993; Morales-Ducret J, et al, 1992*). También observamos que la mayor expresión de VCAM-1 fue en los Mφs y no en las células endoteliales de la subíntima. No hubo diferencias significativas cuando se compararon los Mφs o las células endoteliales inmunorreactivas de los controles inflamatorios y no inflamatorios. De lo anterior podemos inferir que, la sobreexpresión tanto de VCAM-1 como de ICAM-1 juegan un papel importante en la adhesión y migración de leucocitos de sangre periférica hacia la cavidad articular de los pacientes con AR (*Cronstein BN, et al, 1993; Morales-Ducret J, et al, 1992*). Cabe mencionar que ICAM-1 se expresa en mayor proporción después de muchas horas de estimulación con la IL-1β y/o el TNF-α, el IFN-γ o la IL-6; sin embargo en condiciones basales esta molécula se encuentra en las células endoteliales no estimuladas ya que su expresión es constitutiva (*Bevilacqua MP, 1993; Gerritsen ME, et al, 1993; Lindsley HB, et al, 1993; Szekanecz.Z, et al, 1994*). Por otra parte, VCAM-1 se expresa en células endoteliales estimuladas con la IL-1β y/o el TNF-α y su actividad máxima se observa entre las 6 y 12 horas después (*Bevilacqua MP, 1993*). Se ha reportado, que la IL-4 actúa en el endotelio incrementando la expresión y tiempo de aparición de VCAM-1 en la superficie celular y estabilizando los ARNm, lo que aumenta su tiempo de vida media, sin embargo esta citocina no fue detectada en las células de la membrana sinovial en ninguno de los tres grupos estudiados. La VCAM-1 participa en la migración selectiva de los Mos, las células T y B, los eosinófilos y los basófilos (*Bevilacqua MP, 1993; Iademarco MF, et al, 1995*) y su expresión se correlaciona con el incremento en el infiltrado de las células mononucleares en función de la naturaleza e intensidad del estímulo. Se encuentra principalmente en las vénulas postcapilares y en las células endoteliales de capilares y arteriolas en el sitio de la inflamación. Con lo mencionado anteriormente, es posible proponer la participación de las moléculas de adhesión, inducidas a través de factores solubles como la IL-1β, la IL-6, la IL-8 y el TNF-α sintetizados localmente en la membrana sinovial de los pacientes con AR, en la perpetuación del proceso inflamatorio, donde los Mφs juegan un papel preponderante sobre las células endoteliales.

Así, el presente trabajo sugiere que la identificación de una citocina o, de un par de éstas como agente(s) responsable(s) de una enfermedad en particular o el destacar la participación de los Mφs fundamentalmente y los linfocitos como únicos responsables de la sinovitis temprana, es poco probable. Por lo que proponemos el siguiente modelo (*Figura 13*): Durante el inicio del proceso inflamatorio en la membrana sinovial de los pacientes con AR, se cree que una población policlonal de linfocitos T presenta una activación inducida por un agente aún no identificado. Las células T en su forma activa, por un lado inician la síntesis y liberación de factores solubles y por el otro incrementan la expresión y afinidad de los receptores para las células endoteliales y la matriz extracelular. De tal forma que las CMNs activadas interactúan con el endotelio de la membrana sinovial a través de una serie de pasos relacionados entre sí. Donde, la interacción inicial (reversible) se lleva a cabo a través de las selectinas, lo que induce la participación de un segundo mecanismo de adhesión mediado por VLA4/VCAM-1 y LFA-1/CAM-1,2 que implica la generación de sitios de unión de alta afinidad en VLA4 y LFA-1. Una vez localizados los leucocitos en la membrana sinovial, se induce su proliferación como consecuencia de la unión simultánea del ligando a los receptores específicos de la membrana. Bajo las condiciones anteriores, los leucocitos y las células de la membrana sinovial producen citocinas que a su vez reclutan y activan a otras células. En la membrana sinovial, los Mφs y los sinoviocitos tipo A o semejantes a los Mφs sintetizan y liberan la IL-1β (*Díaz GF, et al, 1992; Dinarello CA, et al, 1993; Mulero MJ, 1991*) que actúa de manera parácrina al incrementar la quimiotaxis de los neutrófilos, los linfocitos y los Mos, la proliferación de fibroblastos que produce hiperplasia y la reabsorción ósea y del cartilago articular (*Downer SK, et al, 1994*), y de forma autocrina acrecentando la síntesis y liberación de PGE₂ y de colagenasas responsables de la destrucción del cartilago (*Mera VA, et al, 1991*) y del TNF-α y la IL-6. El TNF-α a su vez, estimula la proliferación de los sinoviocitos tipo B o semejantes a los fibroblastos y la síntesis de la IL-6, la IL-8 y el TGF-β1 por éstas células, este factor inhibe la formación de los osteoblastos (*Díaz GF, et al, 1992; Mera AV, et al, 1991*) e incrementa la proliferación de las células endoteliales que se traduce en un aumento de la angiogénesis. La combinación de la IL-1β y el TNF-α incrementa la síntesis de metaloproteasas y PGE₂ (*Strieter RM, et al, 1989*) y disminuye la de colágena y proteínas de la matriz extracelular, además induce la diferenciación del endotelio hacia vénulas de endotelio alto que

permiten la transmigración de células inflamatorias participando así en la destrucción articular; por otro lado esta combinación de citocinas colabora en el fenómeno de hiperplasia y formación del *pannus* a través de la estimulación de los sinoviocitos, asimismo inducen la síntesis de sus ARNm detectables a los 30 min post-estimulación (Strieter RM, et al, 1989) y la liberación de la IL-8 (Akahoshi T, et al, 1993; Rathanaswami P, et al, 1993; Seitz M, et al, 1994; Taub DD, et al, 1994). A su vez, esta citocina actúa sobre las células endoteliales incrementando la expresión de las moléculas de adhesión y con ello la migración celular (Grønhøj C, et al, 1989); es un factor quimiotáctico para los neutrófilos, los Mφs y las células T (Bazzoni F, et al, 1991; Grønhøj C, et al, 1989; Seitz M, et al, 1994, Strieter RN, et al, 1989; Taub DD, et al, 1994), adicionalmente se conoce que esta molécula activa las funciones de los neutrófilos tales como la movilización del calcio intracelular, la desgranulación y el disparo de la cadena respiratoria (Rathanaswami P, et al, 1993), por lo que participa en la destrucción de la sinovia en los pacientes con AR; además aumenta la proliferación de las células endoteliales e induce la síntesis de más IL-8 por éstas. La IL-6 liberada por los Mφs y los sinoviocitos tipo A y B estimulados por la combinación de IL-1β y TNF-α (Mulero MJ, 1991), actúa sobre las células plasmáticas al incrementar la producción del factor reumatoide *in situ* (Sack U, et al, 1993; Mera VA, et al, 1991). Sin embargo, dentro de la cavidad articular no solo se liberan factores solubles que participan en el detrimento de ésta, sino también existen mecanismos reguladores, tales como la producción de la IL-10 y el TGF-β1 (Sasaki H, et al, 1991). La primera es un inhibidor de la síntesis de las citocinas proinflamatorias (Wang P, et al, 1994), además de que incrementa la síntesis del receptor soluble p75 para el TNF-α (sTNF-αR p75) [Joyce DA, et al, 1994] y el antagonista del receptor para la IL-1 (IL-1Ra) evitando así la acción del factor (Chomarat P, et al, 1995); esta citocina es producida por los Mφs y los linfocitos, en los primeros disminuye indirectamente la producción de NO y de intermediarios reactivos del oxígeno como el H₂O₂ (Ho AS-Y, et al, 1994). El TGF-β1 producido por los Mφs inhibe la activación de las células T a través de la supresión de la síntesis del receptor para la IL-2 (IL-2R). Empero, a pesar de sus funciones inhibitoras ambos poseen el efecto opuesto, ya que la IL-10 *per se* incrementa la síntesis de metaloproteasas del tipo de las colagenasas y la estromelisin, además disminuye la síntesis del ARNm para la colágena I (Reitamo S, et al, 1994). Por su parte, el TGF-β1 sintetizado localmente incrementa la expresión de los ARNm para la

IL-1, la IL-6 y el TNF- α (Sasaki H, et al, 1992), la angiogénesis, la quimiotaxis de los neutrófilos, los monocitos y los fibroblastos y la adhesión y activación de otros leucocitos; y produce con ello efectos devastadores en la cavidad articular (Wahl SM, 1994; Sasaki H, et al, 1992). La IL-4 y la IL-13 tienen funciones inhibitorias de la síntesis de citocinas y de la actividad de los M ϕ s (Lakkis FG, et al, 1993), sin embargo no participan en la inmunomodulación negativa del proceso inflamatorio de la articulación. Se ha demostrado que la IL-4 inhibe la síntesis de la IL-10, así que la ausencia de la primera en la sinovia de los pacientes con AR puede resultar en un incremento de la producción de la IL-10, lo que al parecer podría ser benéfico, sin embargo no debemos dejar de lado el hecho de que ésta también participa en la destrucción de la matriz extracelular de la sinovia. Las acciones de la IL-13 *in vitro* sugieren que esta citocina derivada de las células T puede regular negativamente la función de los M ϕ s, además de proteger al endotelio y a la superficie de los Mos contra los cambios en los procoagulantes inducidos por los mediadores inflamatorios (Herbert JM, et al, 1994) y de regular la producción del receptor tipo II para la IL-1 (IL-1RII) de los polimorfonucleares circulantes y de la IL-1 (Colotta F, 1994). La ausencia de los transcritos para estas citocinas, sugiere que al parecer la función de las células Th2 se encuentra inhibida.

Con base en los resultados obtenidos, podemos descartar que el inicio de la sinovitis en la AR se debe a una respuesta inmune dirigida únicamente por las células T, o bien a una respuesta de los M ϕ s y las células T (Firestein GS, et al, 1988), por lo que sugerimos que en el desarrollo del proceso inflamatorio participa todo un conjunto celular que aquí denominamos Eje: "M ϕ - Célula T - Célula Endotelial - Fibroblasto - Sinoviocito", que libera factores solubles como la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la IL-10, el TNF- α y el TGF- β 1 e incrementa la expresión endotelial y macrofágica de las moléculas de adhesión inducibles VCAM-1 e ICAM-1 (Iademarco MF, et al, 1995) que participan en la migración de los leucocitos. Además este estudio propone que las diferencias en la producción de citocinas en la AR de evolución corta y la de fase crónica son básicamente cuantitativas más que cualitativas.

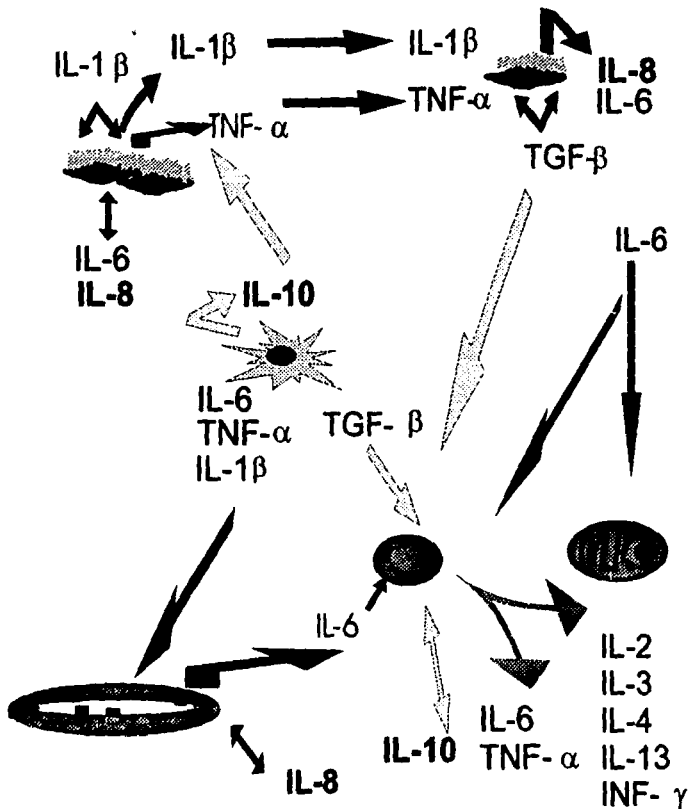


FIGURA 13. Interacciones celulares en la AR mediadas a través de citocinas. **Arriba a la izquierda:** Sinoviocito tipo A o semejante a Mφ. **Arriba a la derecha:** Sinoviocito tipo B o semejante a fibroblasto. **Centro:** Mφ. **Abajo a la izquierda:** células de endotelio alto activadas. **Abajo en el centro:** Célula T. **Abajo a la derecha:** célula plasmática. **Flechas negras:** citocinas proinflamatorias. **Flechas grises:** citocinas para las cuales no se ha encontrado transcritos. **Flechas claras:** citocinas cuya función es inhibidora.

10. CONCLUSIONES

- ◆ A través del análisis del perfil de los transcritos para las citocinas, se evidenció que entre las CMNSP y las células de la membrana sinovial se presenta un patrón de respuesta diferencial, donde la sinovia es la principal productora de citocinas que actúan *in situ* en los pacientes con AR de evolución corta y que ésta patología es un fenómeno autoinmune compartimentalizado y no generalizado; así lo que sucede en la sangre periférica no es el reflejo fiel de lo que se observa intrarticularmente.
- ◆ No se detectaron transcritos para la IL-4 y la IL-13, lo que sugiere que estas citocinas no participan en la intrincada red inmunomoduladora de la AR de evolución corta.
- ◆ No se evidenciaron los ARNm propios de las células Th2 (IL-4 e IL-13), por lo que creemos que se trata de linfocitos altamente diferenciados o bien que la respuesta de estas células se encuentra abatida.
- ◆ En la membrana sinovial los transcritos para la IL-8 sólo se observaron en los pacientes con AR, lo que sugiere que esta citocina es propia de patologías que implican procesos inflamatorios crónicos, mientras que los ARNm para la IL-10 se expresaron en los tres grupos de estudio, sin embargo los niveles fueron significativamente mayores en los pacientes con AR, lo que indica que esta citocina de funciones anti inflamatorias no es específica de una patología en particular.
- ◆ Las proteínas de la IL-8 y la IL-10 se presentaron en niveles elevados en el grupo de los pacientes con AR en comparación con los otros dos grupos de estudio.
- ◆ No se encontraron diferencias significativas en los niveles del TGF- β 1 de las CMNSP o la membrana sinovial entre los grupos.

- ◆ Los niveles de los Mφs y las células endoteliales inmunorreactivas al anticuerpo anti ICAM-1 y VCAM-1 fueron profusamente mayores en el grupo de pacientes con AR vs los del grupo control no inflamatorio e inflamatorio.
- ◆ La expresión diferencial de las moléculas de adhesión inducibles (VCAM-1 e ICAM-1), es un proceso dinámico que ocurre como respuesta a mediadores específicos (IL-1β, TNF-α, IL-6).
- ◆ La información obtenida señala como principales participantes del proceso inflamatorio intrarticular y de la perpetuación hacia la sinovitis crónica a un conjunto celular que denominamos **Eje: "Mφ - célula T - célula endotelial - fibroblasto - sinoviocito"**.
- ◆ Este estudio propone que las diferencias en la producción de citocinas en la AR de evolución corta y la de fase crónica son básicamente cuantitativas más que cualitativas.

11. APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE LAS MUESTRAS DE LA MEMBRANA SINOVIAL Y LAS CMNSP.

◆ Agua-DEPC

DEPC 1.00 ml

Agua destilada desionizada 1.00 l

Dejar en agitación durante toda la noche. Conservar en frascos de vidrio tratados para ARN y a temperatura ambiente.

◆ Etanol al 75%

Alcohol etílico 75.00 ml

Agua-DEPC 25.00 ml

Almacenar a -20°C hasta su uso.

◆ Acetato de sodio 3 M, pH 5.3

Acetato de sodio anhidro 12.05 g

Agua-DEPC 50.00 ml

Ajustar el pH con HCl antes de aforar, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

◆ Solución amortiguadora de DNAsa 5X

Acetato de sodio 0.5 M a partir de la solución 3 M

Sulfato de magnesio 25 mM a partir de una solución 1M

Preparar 10 ml de la solución, antes de aforar ajustar el pH a 5 empleando papel tomasol, esterilizar por filtración y alicuotar. Al momento de su uso diluir al 1X con agua-DEPC.

◆ DNAsa tipo I

DNAsa de 1000 U/ml 10.0 μ l

Solución amortiguadora

de DNAsa 1X 190.0 μ l

Preparar hasta su uso y mantener en hielo.

◆ NaOH 2N

NaOH 8.0 g

Agua-DEPC 100.0 ml

◆ Fenol saturado

Se funden los cristales de fenol en baño de María a 65°C y se hacen alicuotas de 10 ml que se conservarán en tubos falcon de polipropileno de 50 ml a -20°C hasta su preparación. A 10 ml de fenol fundido se le añaden 20 ml de agua-DEPC, se mezclan vigorosamente las fases y se dejan reposar hasta que éstas se separen. Se ajusta el pH a 8 con NaOH 2N preparada con agua-DEPC, posteriormente se adicionan 0.01 g de hidroxiquinoleína, la mezcla se agita fuertemente y se deja reposar. Finalmente se retiran 10 ml de la fase acuosa y el fenol ya saturado se conserva a 4°C protegido de la luz (es estable durante 15 días).

◆ Solución de SEVAG

Cloroformo 24.0 ml

Alcohol isoamílico (isopentanol) 1.0 ml

Se conserva a temperatura ambiente y protegido de la luz.

ELECTROFORESIS DEL ARN.

◆ **Acetato de sodio 50 mM**

Acetato de sodio	3.28 g
Agua destilada desionizada	800.00 ml

Ajustar el pH a 7.0 con una solución de NaOH 2 N. Agregar a esta solución 20.6 g de MOPS.

◆ **EDTA 5mM**

EDTA disódico	9.3 g
Agua-DEPC	30.0 ml

Ajustar el pH a 8.0 y finalmente aforar el volumen a 50 ml con Agua-DEPC

◆ **Solución amortiguadora de corrimiento 5X**

Adicionar a los 800 ml de la solución de acetato de sodio 50 mM con MOPS, 10 ml de la solución de EDTA 5mM, pH 8.0 y aforar el volumen a 1.0 l con agua-DEPC. Almacenar a 4°C en un frasco estéril y protegido de la luz.

◆ **Solución amortiguadora de carga**

Glicerol	5.0 ml
EDTA 1mM, pH 8.0	20.0 µl
Azul de bromofenol	2.5 µg
Xilencianol FF	2.5 µg
Agua-DEPC	5.0 ml

Agitar vigorosamente hasta homogenar el glicerol.

◆ **Bromuro de etidio**

Bromuro de etidio	1.0 mg
Agua-DEPC	1.0 ml

Conservar en un tubo falcon de 15 ml a temperatura ambiente y protegido de la luz.

◆ Agarosa al 1%

Agarosa	0.25 g
Formaldehído al 37%	4.45 ml
Solución amortiguadora de corrimiento 5X	5.00 ml
Agua-DEPC	15.30 ml

La agarosa se funde con el agua-DEPC, posteriormente se agrega la solución amortiguadora de corrimiento 5X y finalmente el formaldehído. Se coloca en el soporte y se deja enfriar en la campana de extracción hasta que solidifique.

ELECTROFORESIS DEL ADN

◆ TBE 5X

Tris-Base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20.0 ml
Agua destilada desionizada cbp	1.0 l

◆ Solución amortiguadora de corrimiento de TBE 0.5X

TBE 5X	100.0 ml
Agua destilada desionizada	1000.0 ml
Bromuro de etidio 1 mg/ml	50.0 µl

◆ Agarosa al 1%

Agarosa	1.0 g
TBE 0.5X	100.0 ml

INMUNOHISTOLOGÍA

◆ Solución de peróxido de hidrógeno al 3%

Metanol	9.0 ml
H ₂ O ₂ al 30%	1.0 ml

◆ Solución de diaminobencidina

DAB	6.0 mg
Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6	10.0 ml
H ₂ O ₂ al 30%	10.0 µl

12. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosak S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S & Matsushima K. **Expression on Monocyte Chemotactic and Activating Factor in Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheum*; 1993, 36(6):762-771.
- ◆ Albelda SM & Buck CA. **Integrins and other Cell Adhesion Molecules.** *FASEB J*; 1990, 4:2868-2880.
- ◆ Alvaro-Gracia JM. **Citocinas en la Membrana Sinovial de la Artritis Reumatoide.** *Rev Esp Reumatol*; 1992, 19(9):378-387.
- ◆ Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Nuestadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL & Hunder GG. **The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheum*; 1988, 31(3):315-324.
- ◆ Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F, Zurawski SM, Zurawski G & de Vries JE. **An Interleukin 4 (IL-4) Mutant Protein Inhibits Both IL-4 or IL-13-Induced Human Immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE Synthesis and B Cell Proliferation: Support for a Common Component Shared by IL-4 and IL-13 Receptors.** *J Exp Med*; 1993, 178:2213-2218.
- ◆ Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B & Baggiolini M. **Phagocytosing Neutrophils Produce and Release High Amounts of the Neutrophil-activating Peptide1/Interleukin 8.** *J Exp Med*; 1991, 173:771-774.
- ◆ Becker-André M & Hahlbrock K. **Absolute mRNA Quantification Using the Polymerase Chain Reaction (PCR). A Novel Approach by a PCR Aided Transcript Titration Assay (PATTY).** *Nucleic Acids Res*; 1989, 17(22):9437-9447.
- ◆ Bevilacqua MP. **Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules.** *Annu Rev Immunol*; 1993, 11:767-804.
- ◆ Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL & Schleimer RP. **IL-13 Selectively Induces Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Endothelial Cells.** *J Immunol*; 1995, 154:799-803.

- ◆ Bouaboula M, Legoux P, Pességué B, Delpech B, Dumont X, Piechaczyk M, Casellas P & Shire D. **Standardization of mRNA Titration Using a Polymerase Chain Reaction Method Involving Co-amplification with a Multispecific Internal Control.** *J Biol Chem*; 1992; 267(30):21830-21838.
- ◆ Brennan FM, Maini RN & Feldmann M. **Cytokine Expression in Chronic Inflammatory Disease.** *Br Med Bulletin*; 1995, 51(2):368-384.
- ◆ Chapman PT & Haskard DO. **Leukocyte Adhesion Molecules.** *Br Med Bulletin*; 1995, 51(2):296-311.
- ◆ Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan J-C & Kahn A. **Quantitative Estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase Chain Reaction. Application to Dystrophin mRNA in Cultured Myogenic and Brain Cells.** *Eur J Biochem*; 1990, 187:691-698.
- ◆ Chen E, Keystone EC & Fish EN. **Restricted Cytokine Expression in Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheum* 1993; 36(7):901-910.
- ◆ Chomarat P, Vannier E, Dechanet J, Risoan MC, Banchereau J, Dinarello CA & Miossec P. **Balance of IL-1 Receptor Antagonist/IL-1 β in Rheumatoid Synovium and Its Regulation by IL-4 and IL-10.** *J Immunol*; 1995, 154:1432-1439.
- ◆ Chomczynski P & Sacchi N. **Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction.** *Anal Biochem*; 1987, 162:156-159.
- ◆ Chu CQ, Field M, Allard S, Abney E, Feldmann M & Maini RN. **Detection of Cytokines at the Cartilage/Pannus Junction in Patients with Rheumatoid Arthritis: Implications for the Role of Cytokines in Cartilage Destruction and Repair.** *Br J Rheum* 1992; 31:653-661.
- ◆ Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE & Aversa G. **IL-13 Induces Proliferation and Differentiation of Human B Cells Activated by the CD40 Ligand.** *Int Immunol*; 1993, 5(6):657-663.
- ◆ Colotta F, Re F, Muzio M, Polentarutti N, Minty A, Caput D, Ferrara P & Mantovani A. **Interleukin-13 Induces Expression and Release of Interleukin-1 Decoy Receptor in Human Polymorphonuclear Cells.** *J Biol Chem*; 1994, 269(17):12403-12406.
- ◆ Cronstein BN & Weissmann. **The Adhesion Molecules of Inflammation.** *Arthritis & Rheum*; 1993, 36(2):147-157.

- ◆ Cush J, Splawski JB, Thomass R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, Fujita K & Lipsky PE. **Elevated Interleukin-10 Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheum*; 1995, 38(1):96-104.
- ◆ Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JP, Minty A, Caput D & Ferrara P. **Interleukin 13 Is a B Cell Stimulating Factor.** *J Exp Med*; 1994, 179:135-143.
- ◆ De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G & de Vries J. **Effects of IL-13 on Phenotype, Cytokine Production, and Cytotoxic Function of Human Monocytes.** *J Immunol*; 1993, 151(11):6370-6381.
- ◆ De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M, Te Velde A, Figdor C, Jonhson K, Kastelein R, Yssel H & De Vries J. **Interleukin-10 (IL-10) and Viral IL-10 Strongly Reduce Antigen-Specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen-Presenting Capacity of Monocytes Via Down Regulation of Class II Major Histocompatibility Complex Expression.** *J Exp Med*; 1991, 174:915-924.
- ◆ De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo M, Spits H & De Vries J. **Interleukin-10.** *Curr Op Immunol*; 1992, 4:314-320.
- ◆ Del Petre G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi M, Biagiotti R & Romagnani S. **Human IL-10 is Produced by Both Type 1 Helper (Th1) and Type 2 Helper (Th2) T Cell Clones and Inhibits Their Antigen-Specific Proliferation and Cytokine Production.** *J Immunol*; 1993, 150(2):353-360.
- ◆ Deutsch ML, Herzog CE, Brett RJ, Fojo AT & Bates SE. **Use of the Polymerase Chain Reaction in the Quantitation of *mdr-1* Gene Expression.** *Biochem*; 1990, 29:10351-10356.
- ◆ Díaz-Flores L, González T, Gutiérrez R & Hernández-Berriain JA. **Angiogénesis y Diferenciación Celular en la reparación Sinovial.** *Rev Esp Reumatol*; 1992, 19(9): 421-427.
- ◆ Díaz GF & Álvaro-Gracia JM. **Sinoviocitos: Estructura, Función y Papel Patogénico en la Artritis Reumatoide.** *Rev Esp Reumatol*; 1992, 19(9):412-420.
- ◆ Dinarello CA & Wolff SM. **The Role of Interleukin-1 in Disease.** *New Engl J Med*; 1993, 328(2):106-133.

- ◆ Downer SK, Fanslow W, Jacobs C, Waugh S, Sims JE & Widmer MB. **Interleukin-I Antagonists.** *Therapeutic Immunol*; 1994, 1:113-122.
- ◆ Farahat N, Yanni G, Poston R & Panayi G. **Cytokine Expression in Synovial Membranes of Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 1993; 52:870-875.
- ◆ Fava R, Olsen N, Keski-Oja J, Moses H & Pincus T. **Active and Latent Forms of Transforming Growth Factor β Activity in Synovial Effusions.** *J Exp Med*; 1989, 169:291-296.
- ◆ Firestein GS, Alvaro-García JM & Maki R. **Quantitative Analysis of Cytokine Gene Expression in Rheumatoid Arthritis** *J Immunol*; 1990, 144(9):3347-3353.
- ◆ Firestein GS, Xu W-D, Townsend K, Broide D, Alvaro-Gracia J, Glasebrook A & Zvaifler NJ. **Cytokines in Chronic Inflammatory Arthritis. I. Failure to Detect T Cell Lymphokines (Interleukin 2 and Interleukin 3) and Presence of Macrophage Colony-stimulating Factor (CSF-1) and a Novel Mast Cell Growth Factor in Rheumatoid Synovitis.** *J Exp Med*; 1988, 168:1573-1586.
- ◆ García de Vicuña R., Mendiola AH, Díaz GF y Laffón A. **Adhesión leucocitaria al Endotelio Vascular: bases para la Migración a la Membrana Sinovial Inflamada.** *Rev Esp Reumatol*; 1992, 19(9):388-398.
- ◆ Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G, Perry CA, Shen C-P, Szczepanski A & Carley WW. **Regulation of the Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 in Cultured Human Endothelial Cells Derived from Rheumatoid Synovium.** *Arthritis & Rheum*; 1993, 36(5):593-602.
- ◆ Gilliland G, Perrin S, Blanchard K & Bunn HF. **Analysis of Cytokine mRNA and DNA: Detection and Quantitation by Competitive Polymerase Chain Reaction.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 1990, 87:2725-2729.
- ◆ Grønhøj Larsen C, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ & Matsushima K. **The Neutrophil-Activating Protein (NAP-1) Is Also Chemotactic for T Lymphocytes.** *Science*; 1989, 243:1464-1466.
- ◆ Herbert JM, Savi P, Laplace MCI, Lalé A, Dol F, Dumas A, Labit C & Minty A. **IL-4 and IL-13 Exhibit Comparable Abilities to Reduce Pyrogen-Induced Expression of Procoagulant Activity in Endothelial Cells and Monocytes.** *FEBS Letters*; 1994, 345(187):268-270.

- ◆ Ho AS-Y & Moore KW. **Interleukin-10 and its receptor.** *Therapeutic Immunol*; 1994, 1:173-185.
- ◆ Holt Y, Cooper RG, Meager A & Hopkins J. **Cytokine Inter-Relationships and Their Association with Disease Activity in Arthritis.** *Br J Rheum*; 1992, 31:725-733.
- ◆ Hosaka S, Akahoshi T, Wada C & Kondo H. **Expression of the Chemokine Superfamily in Rheumatoid Arthritis.** *Clin Exp Immunol*; 1994, 97:451-457.
- ◆ Iademarco MF, Barks JL & Dean DC. **Regulation of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression by IL-4 and TNF- α in Cultured Endothelial Cells.** *J Clin Invest*; 1995, 95:264-271.
- ◆ Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M & Brennan FM. **Two Inhibitors of Pro-inflammatory Cytokine Release, Interleukin-10 and Interleukin-4, Have Contrasting Effects on Release of Soluble p75 Tumor Necrosis Factor Receptor by Cultured Monocytes.** *Eur J Immunol*; 1994, 24:2699-2705.
- ◆ Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN & Feldmann M. **Immunoregulatory Role of Interleukin 10 in Rheumatoid Arthritis.** *J Exp Med*; 1994, 179:1517-1527.
- ◆ Keyszer GM, Heer AH & Gay S. **Cytokines and Oncogenes in Cellular Interactions of Rheumatoid Arthritis.** *Stem Cells* 1994; 12:75-86.
- ◆ Laffón A. **Moléculas de Adhesión características estructurales y funcionales.** *Rev Esp Reumatol*; 1992, 19(9):368-377.
- ◆ Lakkis FG & Cruet EN. **Cloning of Rat Interleukin-13 (IL-13) cDNA and Analysis of IL-13 Gene Expression in Experimental Glomerulonephritis.** *Biochem & Biophys Res Commun*; 1993, 197(2):612-618.
- ◆ Lindsley HB, Smith DD, Cohick CB, Koch AE & Davis LS. **Proinflammatory Cytokines Enhance Human Synovocyte Expression of Functional Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1).** *Clin Immunol & Immunopathol*; 1993, 68(3):311-320.
- ◆ Manicourt DH, Triki R, Fukuda K, Devogelaer JP, Nagant de Deuxchaisnes C & Thonar EJMA. **Levels of Circulating Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-6 in Patients with Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheum*; 1993, 36(4):490-499.
- ◆ McKenzie ANJ, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, Brière F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S, de Vries JE, Banchereau J & Zurawski G. **Interleukin 13, a T-Cell-**

- derived Cytokine that Regulates Human Monocyte and B-Cell Function. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993, 90:3735-3739.
- ◆ Mera VA, Insua VS, Caamaño FM & Viñuela RJ. **Acción destructiva de las citocinas en el hueso y articulación.** *Inflamación*; 1991, 93:13-19.
 - ◆ Minty A, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, Minty C, Casellas P, Loison G, Lupker J, Shire D, Ferrara P & Caput D. **Interleukin-13 Is a New Human Lymphokine Regulating Inflammatory and Immune Responses.** *Nature*; 1993, 362:248-250.
 - ◆ Miossec P, Navilliar M, Dupuy D'Angeac A, Sany J & Banchereau J. **Low Levels of Interleukin-4 and High Levels of Transforming Growth Factor β in Rheumatoid Synovitis.** *Arthritis & Rheum*; 1990, 33:305-315.
 - ◆ ¹Montaner LJ, Doyle AG, Collin M, Herbein G, Illei P, James W, Minty A, Caput D, Ferrara P & Gordon S. **Interleukin 13 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Production in Primary Blood-Derived Human Macrophages *in vitro*.** *J Exp Med*; 1993, 178:743-747
 - ◆ ²Montaner LJ, Doyle AG, Herbein G, Collin M & Gordon S. **New Human Cytokine, NC-30, Inhibits HIV-1 Replication in Tissue Culture Differentiated Human Macrophages.** *J Cell Biochem Abstr Suppl* 17B, 1993; 94.
 - ◆ Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ & Firestein GS. **$\alpha\beta_1$ Integrin (VLA-4) Ligands in Arthritis. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Synovium and on Fibroblast-Like Synoviocytes.** *J Immunol*; 1992, 149(4):1424-1431.
 - ◆ Mulero MJ. **Implicaciones de las linfocinas y monocinas en la patogenia de la artritis reumatoide.** *Inflamación*; 1991, 93:21-28.
 - ◆ Pataroyo M. **Leukocyte Adhesion in Host Defense and Tissue Injury.** *Clin Immunol & Immunopathol*; 1991, 60:333-348.
 - ◆ Punnonen J, Aversa G, Cocks B, McKenzie ANJ, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R & de Vries JE. **Interleukin 13 Induces Interleukin 4-Independent IgG4 and IgE Synthesis and CD23 Expression by Human B Cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 1993, 90:3730-3734.
 - ◆ Raeymaekers L. **Comments on Quantitative PCR.** *Eur Cytokine Netw*; 1994, 5(1):57-60.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- ◆ Rathanaswami P, Hachicha M, Wong WL, Schall TJ & McColl SR. **Synergistic Effect of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α on Interleukin-8 Gene Expression in Synovial Fibroblasts. Evidence that Interleukin-8 is the Major Neutrophil-Activation Chemokine Released in Response to Monokine Activation.** *Arthritis & Rheumatism*; 1993, 36(9):1295-1304.
- ◆ Reitamo S, Remitz A, Tamai K & Juoni U. **Interleukin-10 Modulates Type I Collagen and Matrix Metalloprotease Gene Expression in Cultured Human Skin Fibroblasts.** *J Clin Invest*; 1994, 94:2489-2492.
- ◆ Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S & Emmrich F. **Interleukin-6 in Synovial Fluid is Closely Associated with Chronic Synovitis in Rheumatoid Arthritis.** *Rheumatol Int*; 1993, 13:45-51.
- ◆ Sasaki H, Pollard RB, Schmitt D & Suzuki F. **Transforming Growth Factor- β in the Regulation of the Immune Response.** *Clin Immunol & Immunopathol*; 1992, 65(1):1-9.
- ◆ Seitz M, Dewald B, Gerber N & Baggiolini M. **Enhanced Production of Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin-8 in Rheumatoid Arthritis.** *J Clin Invest*; 1991, 87:463-469.
- ◆ Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M & Nagai Y. **The Effects of Cytokines on Metalloproteinase Inhibitors (TIMP) and Collagenase Production by Human Chondrocytes and TIMP production by Synovial Cells and Endothelial Cells.** *Clin Exp Immunol*; 1993, 93:145-149.
- ◆ Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA & Marks RM. **Endothelial Cell Gene Expression of a Neutrophil Chemotactic Factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β .** *Science*; 1989, 243:1467-1469.
- ◆ Strieter RM, Phan SH, Showell HJ, Remick DG, Lynch JP, Genord M, Raiford C, Eskandari M, Marks RM & Kunkel SL. **Monokine-induced Neutrophil Chemotactic Factor Gene Expression in Human Fibroblasts.** *J Biol Chem*; 1989, 264(18):10621-10626.
- ◆ Szekanecz Z, Haines GK, Lin TR, Harlow LA, Goerdts S, Rayan G & Koch AE. **Differential Distribution of Intercellular Adhesion Molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 Antigen in Normal and Diseased Human Synovia. Their Possible Pathogenetic and Clinical Significance in Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Reum*; 1994, 37(2):221-231.

- ◆ Taub DD & Oppenheim JJ. **Chemokines, Inflammation and the Immune System.** *Therapeutic Immunol*; 1994, 1:229-246.
- ◆ Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, Combitchi D, Lorenzo C, Sewell KL, Hafier DA & Weiner HL. **Effects of Oral Administration of Type II Collagen on Rheumatoid Arthritis.** *Science*; 1993, 261:1727-1730.
- ◆ Wahl SM. **Transforming Growth Factor β : The Good, the Bad, and the Ugly.** *J Exp Med*; 1994, 180:1587-1590.
- ◆ Wang AM, Doyle MV & Mark DF. **Quantitation of mRNA by the Polymerase Chain Reaction.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 1989, 86:9717-9721.
- ◆ Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW & Billa M. **IL-10 Inhibits Transcription of Cytokine Genes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.** *J Immunol*; 1994, 153:811-816.
- ◆ Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo M, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, De Vries JE & Figdor CG. **IL-10 Is Produced by Subsets of Human CD4+ T Cell Clones and Peripheral Blood T Cells.** *J Immunol*; 1992, 149(7):2378-2384.
- ◆ Zurawski G & de Vries JE. **Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells.** *Immunol Today*; 1994, 15(1):19-26.