

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
CURSO DE POSGRADO EN REUMATOLOGÍA**

**MEDICIÓN DE CITOCINAS EN LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE TEMPRANA Y SU COMPARACIÓN CON OTRAS ARTROPATÍAS**

AUTOR:

**Dra. RUTH MARIA VIANA ALVAREZ
MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA
RESIDENTE DEL POSGRADO EN REUMATOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

TUTOR:

**Dra. MARINA RULL GABAYET
MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA-REUMATOLOGÍA.
ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA.
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN.**

MÉXICO DF- MÉXICO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. José F. Luís Uscanga Domínguez.
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Dr. Jorge Alcocer Varela.
Profesor Titular del Curso de Reumatología del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Marina Rull Gabayet
Médico Especialista en Medicina Interna-Reumatología
Adscrito al Departamento de Inmunología y Reumatología del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Agradecimiento:

A los Drs. Marina Rull Gabayet, Virginia Pascual, Jorge Sánchez y Jorge Alcocer por sus enseñanzas en la formación como Reumatóloga.

Al Dr. Javier Cabiedes por su ayuda en el procesamiento de las muestras.

A la Dra Janitzia Vazquez Mellado por su apoyo en la recolección de muestras.

En memoria del Dr. Donato Alarcón Segovia.

Dedicatoria:

“A mi familia por su apoyo incondicional”

Índice

Resumen.....	Pág. 7
Abstract.....	Pág. 9
Abreviaturas.....	Pág. 10
1. Introducción.....	Pág. 11
2. Justificación.....	Pág. 15
3. Objetivos e hipótesis.....	Pág. 16
3.1. Objetivos.....	Pág. 16
3.2. Hipótesis.....	Pág. 16
4. Definiciones estandarizadas.....	Pág. 17
4.1. Artritis reumatoide.....	Pág. 17
4.2. Artritis reumatoide temprana.....	Pág. 17
4.3. Osteoartritis.....	Pág. 18
4.4. Artropatía por cristales.....	Pág. 19
5. Materiales y métodos.....	Pág. 21
5.1. Diseño del estudio.....	Pág. 21
5.2. Población de estudio.....	Pág. 21
5.3. Muestra.....	Pág. 21
5.4. Criterios de inclusión.....	Pág. 22
5.5. Período de estudio.....	Pág. 22
5.6. Desenlaces.....	Pág. 23
5.7. Recolección de datos.....	Pág. 23
5.8. Sistema de variables.....	Pág. 24
5.9. Instrumento.....	Pág. 25

5.10. Esquema de análisis estadístico.....	Pág. 26
6. Resultados.....	Pág. 27
7. Discusión.....	Pág. 33
8. Bibliografía.....	Pág. 37
9. Anexos.....	Pág. 39

MEDICIÓN DE CITOCINAS EN LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TEMPRANA Y SU COMPARACIÓN CON OTRAS ARTROPATÍAS

Introducción: El daño en la artritis reumatoide se establece en los 2 primeros años. Por esta razón el diagnóstico y el tratamiento temprano es importante en un intento de retrasar la destrucción articular. En la patogénesis de la sinovitis de la artritis reumatoide temprana los procesos de inflamación y angiogénesis son puntos clave. Poco se sabe de los niveles de las moléculas proangiogénicas y citocinas en el líquido sinovial de la artritis reumatoide temprana. **Objetivo:** Conocer las características inflamatorias y los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide temprana comparados con los de artritis reumatoide avanzada, artropatía por cristales y osteoartritis. **Métodos:** Es un estudio transversal, donde incluimos a 20 pacientes con artritis reumatoide temprana, 20 pacientes con artritis reumatoide avanzada, 20 pacientes con artropatía por cristales y 20 pacientes con osteoartritis. En los pacientes con artritis reumatoide se evaluó el grado de actividad mediante VSG, DAS28 y RADAI y su funcionalidad con HAQ. Se realizó artrocentesis de rodilla a todos los pacientes. En el líquido sinovial se analizaron la presencia de cristales, la cuenta celular y los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV. **Análisis estadístico:** Se utilizaron la prueba Anova para variables continuas y Chi-cuadrada para variables dicotómicas. Se utilizó la prueba U-Mann Whitney para la comparación entre dos grupos y la correlación de Spearman para la comparación de cada citocina con la actividad de la artritis reumatoide. Se usó el programa SPSS versión 14. **Resultados:** Los niveles de las citocinas de pacientes con ART estuvieron más altos que los de los pacientes con AR, pero la diferencia no fue significativa. Sin embargo, el grado de actividad por DAS 28 entre los pacientes con ART y AR fue similar, sin diferencia significativa. Entre los pacientes con ART y AC si hubo diferencia significativa entre IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y

FCEV. Al comparar los niveles de las citocinas de pacientes con ART y OA hubo diferencia significativa en todas. **Conclusiones:** Entre los pacientes con ART y AR no hubo diferencia significativa entre las medias de las citocinas, esto podría deberse a que los pacientes tenían actividad similar. El FCEV se encontró más elevado en pacientes con ART que en AR avanzada, sin diferencia significativa. En AR avanzada el FCEV estuvo muy alto. Esto se puede explicar por que los pacientes tenían el mismo grado de actividad.

MEASUREMENT OF CYTOKINES IN SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS AND THE COMPARISON WITH OTHER ARTHROPATHIES

Introduction: It is known that joint damage is established in the first two years of Rheumatoid Arthritis. The diagnosis and treatment of early rheumatoid arthritis could delay the destruction of the joint. In the pathogenesis of synovitis, inflammatory and vascular processes are very important. Little is known about the levels of cytokines and proangiogenic molecules in synovial fluid in early rheumatoid arthritis. **Purpose:** To know the inflammatory characteristics and the levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α and VEGF in synovial fluid in early rheumatoid arthritis.

Methods: Cross sectional study. We identified 20 patients with early rheumatoid arthritis, 20 patients with established rheumatoid arthritis, 20 patients with crystal arthropathy and 20 patients with osteoarthritis using standard criteria. The activity of ERA and RA was evaluated with erythrocyte sedimentation rate, DAS 28 and RADAI and the function with HAQ. Arthrocentesis of the knee was made to every patient. The synovial fluid was analyzed looking for crystals, white blood cell count and levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α and VEGF. **Statistical analysis:** The results of the groups were compared using Anova, Chi-Square, U- Mann Whitney test and Correlation of Spearman. **Results:** The mean values of the cytokines in ERA were more elevated than in the patients with RA, but there was not a significant difference between them. On the contrary when comparing the levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α and VEGF between ERA and CA there was a significant difference. In addition, there was a significant difference in the mean levels of all cytokines in ERA compared to OA. **Conclusion:** The lack of significant difference between the levels of all cytokines in ERA and RA could be explained by the fact that all patients were equally active. The levels of VEGF were more elevated in the patients with ERA than in RA but there was not significant difference, because the levels of VEGF in RA were also high. This could be because both groups were equally active.

Abreviaturas:

ART: Artritis reumatoide temprana

AR: Artritis reumatoide

AC: Artropatía por cristales

OA: Osteoartritis

FR: Factor Reumatoide

Anti PCC: Antipéptido cíclicos citrulinados

FARME: Fármacos modificadores de la enfermedad

AINES: Antinflamatorios no esteroideos

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

VSG: Velocidad de sedimentación globular

PTEN: Homólogo de fosfatasa de tensina suprimido del cromosoma TEN ; MIM # 6011728)

HIF: Factor Inducible por Hipoxia

1. Introducción

El concepto de artritis temprana surgió en 1973 de la cohorte clínica de Jacoby et al ¹ y a partir de 1976 se reportan otras clínicas de artritis temprana como las de Fleming et.al ² y Masi et.al.³ Sin embargo, el diagnóstico de artritis reumatoide de reciente inicio es muy difícil. Los parámetros considerados útiles para el diagnóstico de artritis reumatoide son: afección simétrica de MCF y MTF, rigidez matutina de más de treinta minutos, buena respuesta a AINES e historia familiar de artritis reumatoide. En la artritis reumatoide temprana el FR, la PCR y las radiografías son normales hasta en el 35, 70 y 80% de los casos respectivamente. Los nódulos reumatoides y las erosiones ocurren en etapas avanzadas de la enfermedad.

El diagnóstico temprano de la artritis reumatoide es importante ya que la afección articular irreversible ocurre en los primeros 2 años. Se pueden ver erosiones en 10 a 26% de los casos en los primeros 6 meses y en 75% a los 2 años. Los criterios del ACR no son muy sensibles ya que un 15% de los pacientes con artritis persistente no cumplen con ellos a los 2 años de evolución. El tener artritis de más de 6 semanas de evolución tiene una sensibilidad del 88% y una especificidad del 42%. La rigidez matutina tiene una sensibilidad del 58% y una especificidad del 76% ⁴. Los reactantes de fase aguda como VSG y PCR no distinguen entre AR y no AR, ni tampoco predicen la persistencia de la enfermedad. El factor reumatoide por el contrario distingue entre AR y no AR. Los anticuerpos anti - PCC tienen una sensibilidad del 68% y una especificidad del 97%.

En la artritis reumatoide se altera el fenotipo de la membrana sinovial, ésta se hace más gruesa, invadiendo y destruyendo los tejidos adyacentes. En la artritis reumatoide temprana se observa engrosamiento de la membrana sinovial, alteración de la morfología de los sinoviocitos, infiltrados perivasculares y aumento en la

vascularidad (Pando et al)⁵. El engrosamiento sinovial, es de más de 8 células, lo que se llama hiperplasia sinovial. Hay infiltración de monocitos y macrófagos. Por inmunohistoquímica se ha revelado que el 80% de las células son macrófagos. Los macrófagos estimulan la neovascularización de la sinovia, que produce varias citocinas inflamatorias, en particular IL-1 β , IL-6 y TNF- α ⁶. Hueber et.al⁷ encontraron elevación sérica significativa de IL-1 α , IL-8/CXCL8, IL-12p40, IL-13 y TNF- α comparado con controles sanos. También encontraron que los pacientes con artritis reumatoide temprana con niveles más elevados de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL13, IL-15 y GM-CSF tenían más anticuerpos en contra de epitopes citrulinados y la proteína gp39 de cartílago humano y mayor riesgo de un comportamiento agresivo. Se ha encontrado que un tercio de los pacientes con artritis reumatoide temprana tienen elevación de citocinas clásicas Th1 (INF γ , IL-12) y Th2 (IL-10, IL-13). Los fibroblastos también producen más AP-1 y NK- κ B, las cuales estimulan las moléculas de adhesión, citocinas y enzimas de la matriz y disminuyen la producción del gen supresor PTEN. La membrana sinovial inflamada también es infiltrada por linfocitos T, B, células plasmáticas, NK, células dendríticas y mastocitos. Los neutrófilos se acumulan en el líquido sinovial más que en el tejido sinovial. Estos neutrófilos participan en la destrucción del cartílago al liberar enzimas proteolíticas y productos oxidativos tóxicos.

En contraste, el líquido sinovial en artritis temprana ha sido poco estudiado. Se ha encontrado que el aumento de IL-1 β , IL-6 y TNF- α tiene correlación con la actividad de la enfermedad. Varias citocinas, como TNF- α y IL-1 β , son las mediadoras y/o moduladoras de la inflamación y de la destrucción articular. También, se ha visto que la IL-17 contribuye al daño articular al tener un efecto aditivo con la IL-1 β y el TNF- α . Mientras las prostaglandinas actúan como moduladores locales de los osteoblastos y son mediadores de la inflamación. La IL-6 estimula la resorción del hueso e induce la formación de osteoclastos. La IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17 y el TNF- α , estimulan la

osteoclastogénesis al aumentar la expresión de RANKL con disminución de la expresión de osteoprotegerina. La interacción de RANKL-RANK es esencial en la diferenciación de los osteoclastos. En la AR hay osteopenia al aumentar la resorción ósea por osteoclastos⁸. Raza et.al. estudiaron líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide temprana y lo compararon con el de pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis, artropatía por cristales y artritis indiferenciada; encuentran una elevación significativa de IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL1, IL15, bFGF y EGF en artritis reumatoide temprana y sin diferencia significativa de IL-1B, TNF- α , IL-6, INF- γ , IL-10 e IL-12.⁹

La angiogénesis de la membrana sinovial mantiene la inflamación y los mecanismos invasivos. Esta es estimulada por el aumento del estrés en la pared endotelial, la extravasación de proteínas plasmáticas, macrófagos, linfocitos, mastocitos y fibroblastos, IL-1 β , IL-8, TNF- α y FCEV. La molécula proangiogénica más potente es el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV). El FCEV es estimulado por hipoxia y por citocinas. El líquido sinovial en AR es ácido, está en hipoxia, tiene disminución de glucosa y aumento de lactato. Lund-Olesen reportó una pO₂ de 27mmHg en el líquido sinovial de AR y Taylor una pO₂ 13mmHg¹⁰. Los factores que contribuyen a la hipoxia son el aumento de metabolismo de la membrana sinovial inflamada, la hiperplasia sinovial y la presión intraarticular mayor de 300mmHg. En hipoxia los fibroblastos por medio de IL-1 β y TGF- β producen FCEV. También la hipoxia aumenta HIF 1 α lo que permite que se una HIF- 1 β a HIF-2 aumentando la transcripción del gen de FCEV ¹¹. Pero el FCEV también se secreta por neutrófilos, plaquetas y células mononucleares. Ballara et.al.¹² comprobaron que en la artritis reumatoide temprana hay una correlación entre los niveles elevados de FCEV y el daño articular. Ellos también encontraron mayores niveles de FCEV en pacientes con ART comparado con los de AR avanzada, OA, Gota y sanos. El tratamiento con modificadores de la enfermedad como metotrexate y anti TNF- α disminuye

momentáneamente el FCEV pero no lo normaliza^{13,14}. La angiogénesis es importante en el desarrollo y en la perpetuación de la AR.

2. Justificación

El líquido sinovial ha sido poco estudiado en la artritis reumatoide temprana. El análisis de líquido es un estudio sencillo, accesible, económico y que puede dar información acerca de la calidad y cantidad de la inflamación y de la participación de diferentes citocinas en la articulación.

3. Objetivos e hipótesis

3.1. Objetivos

Medir los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV en el líquido sinovial, ver su correlación con el grado de actividad de la artritis reumatoide temprana y compararlos con los de la artritis reumatoide avanzada, OA y artropatías por cristales.

3.1. Hipótesis

Los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV en el líquido sinovial de la artritis reumatoide temprana están más elevados que en la AR avanzada, OA y artropatías por cristales.

4. Definiciones estandarizadas

4.1. Artritis reumatoide:

Pacientes que cumplan con por lo menos 4 de los 7 criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para artritis reumatoide y con 5 años de evolución partiendo del momento del diagnóstico hecho por un reumatólogo.

- Rigidez matutina
- Artritis de 3 o más articulaciones
- Artritis de articulaciones de las manos
- Artritis simétrica
- Nódulos reumatoides
- Factor reumatoide en suero
- Cambios radiográficos

4.2. Artritis reumatoide temprana:

Pacientes con artritis de menos de 1 año de evolución que cumplan con por lo menos 4 de los 7 criterios de la clasificación del Colegio Americano de Reumatología para artritis reumatoide.

- Rigidez matutina
- Artritis de 3 o más articulaciones
- Artritis de articulaciones de las manos
- Artritis simétrica
- Nódulos reumatoides

- Factor reumatoide en suero
- Cambios radiográficos

4.3. Osteoartritis

Pacientes con diagnóstico de OA según su reumatólogo. Que tenga VSG normal y hallazgos radiográficos congruentes a osteoartritis y además que cumplan con los criterios de OA de rodilla (Altman et.al. Arth Rheum 1986). Descartándose la presencia de cualquier otra artropatía inflamatoria.

Clínica y laboratorio:

Dolor en rodilla más 5 de los siguientes criterios

- Edad mayor 50 años
- Rigidez matutina menor 30 min
- Crepitación
- Sensibilidad ósea
- Crecimiento óseo
- VSG < 40mm/hr
- FR < 1:40

Clínica y radiográfica:

Dolor en rodilla más 1 de los siguientes criterios clínicos

- Edad mayor 50 años
- Rigidez matutina menor de 30 min
- Crepitaciones
- Osteofitos

Clínico:

- Dolor en rodilla mas tres de los siguientes criterios
- Edad mayor 50 años
- Rigidez matutina menor 30 minutos
- Crepitación
- Sensibilidad ósea
- Crecimiento óseo
- Sin aumento temperatura

4.4. Artropatía por cristales

Pacientes con monoartritis inflamatoria que se confirma por cuadro clínico y presencia de cristales en análisis de líquido sinovial. Los pacientes con gota deberán de cumplir con los criterios de Wallace et.al. Arth Rheum 1977

- Presencia de cristales de urato monosódico en el líquido sinovial
- Tofos que contengan cristales de urato monosódico
- Presencia de 6 de los siguientes 12 criterios
 - Más de una ataque de artritis aguda
 - Inflamación máxima se desarrolla en una día
 - Ataque de artritis monoarticular
 - Eritema articular
 - Primera metatarsofalángica dolorosa o inflamada
 - Ataque unilateral de la primera metatarsofalángica
 - Ataque unilateral de la articulación del tarso
 - Tofos sospechosos
 - Hiperuricemia

- Inflamación asimétrica de articulación (radiográfica)
- Quistes subcorticales sin erosiones (radiográfica)
- Cultivo negativo de líquido sinovial

5. Materiales y Metodos

5.1. Diseño del estudio:

Estudio transversal.

5.2. Población estudiada:

Pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con artritis reumatoide temprana que cumplieron con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para AR. Se realizó artrocentesis de rodillas en la primera visita a la Clínica de Artritis Reumatoide Temprana. Se obtuvieron como controles pacientes con artritis reumatoide con por lo menos 5 años de evolución, que cumplieron con los criterios de AR de ACR, pacientes con osteoartritis que cumplieron con los criterios de OA de rodilla de Altman y pacientes con artropatía por cristales. Los pacientes con gota cumplieron los criterios de Wallace et.al. A los controles se les realizó artrocentesis de rodilla en el momento de la captación del paciente.

5.3. Muestra:

El tamaño de la muestra se calculó con los niveles de citocinas en líquido sinovial obtenidos por Raza et.al ⁹. Es el único registro por método luminometría en líquido sinovial hasta el momento.

Casos:

20 pacientes con ART

Controles:

20 pacientes con AR

20 pacientes con AC

20 pacientes con OAD

5.4. Criterios de inclusión:

- Pacientes con ART que cumplieron con los criterios del ACR con menos de 1 año de evolución y que tuvieron flogosis de rodilla.
- Pacientes con AR que cumplieron los criterios del ACR con 5 años de evolución y que tuvieron flogosis de rodilla.
- Pacientes con osteoartritis que cumplieron con los criterios de OAD de rodilla de Altman y que tenían flogosis de rodilla.
- Pacientes con artropatía por cristales, con flogosis de rodilla, con demostración de cristales en líquido sinovial. Los pacientes con gota que cumplieran los criterios de Wallace.

5.5. Período de estudio:

Se evaluaron todos los pacientes con ART de la clínica de artritis reumatoide temprana, con flogosis de rodilla en la primera visita a la consulta externa. Los controles de AR y OA que acudieron al INCMNSZ de enero del 2006 a septiembre del 2006, que cumplieron los criterios antes mencionados. Los pacientes con AC que acudieron a consulta de INCMNSZ y del Hospital General de México que cumplían con los criterios de Wallace.

5.6. Desenlaces:

Se midieron niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV en el líquido sinovial de pacientes con ART.

5.7. Recolección de datos:

A los pacientes seleccionados se realizó punción de la rodilla para obtener líquido sinovial. Se hizo análisis de líquido sinovial (color, claridad, viscosidad, cristales, rojo alizarina, cuenta y diferencial) y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior medición de citocinas.

El estudio de las 11 citocinas se realizó de manera simultánea por luminometría usando equipos de detección múltiplex (LINCOpex, Linco. USA). Brevemente, se bloquearon los filtros de las placas con 200 μL /pozo de amortiguador de ensayo y se incubó por 10 minutos. Se eliminó el amortiguador al vacío. Se centrifugaron las muestras de líquido sinovial a 10,000 rpm por 2 minutos y 50 μL de líquido sinovial centrifugado y estándares se preincubarán con 50 μL de amortiguador de bloqueo durante 30 minutos. Posteriormente se tomaron 50 μL de la mezcla anterior y se depositaron en pozos de placas con fondo de filtro, se adicionaron además 25 μL /pozo de microesferas multiplex y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación se eliminó el líquido al vacío y se lavaron las esferas 2 veces con 200 μL de amortiguador de lavado, se eliminó la solución de lavado como se mencionó anteriormente, se agregaron 25 μL /pozo de la mezcla anticuerpos anticitocinas y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Terminando el tiempo de incubación se agregaron 25 μL /pozo del conjugado estreptavidina-PE y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente las esferas con 200 μL de solución de lavado y se eliminó la solución al vacío. Finalmente se agregaron 100 μL /pozo de amortiguador de análisis,

se incubó durante 5 minutos con agitación y se midieron las citocinas en el equipo de luminometría Luminex¹⁰⁰ LabMAPTM system; Luminex Corporation, Austin Texas, USA. La concentración de las citocinas se calculó en función de curvas estándar.

Se midió la velocidad de sedimentación globular por método Westergreen y la PCR por Nefelometría. El factor reumatoide se midió por ELISA.

Los pacientes contestaron cuestionarios para valorar actividad de la enfermedad (DAS 28 y RADAI) y capacidad funcional con HAQ, ver anexo.

Se revisaron los expedientes de los pacientes que cumplían los criterios con la hoja de recolección de datos, ver anexo.

5.8. Sistema de variables:

- Edad
- Genero
- Tabaquismo
- FARME
- IL-1 β
- IL-2
- IL-4
- IL-6
- IL-8
- IL-13
- IL-15
- IL-17
- INF- γ

- TNF- α
- FCEV
- DAS
- HAQ
- RADAI
- VSG
- PCR
- FR
- Anti PCC

5.9. Instrumento:

El estudio de las 11 citocinas se hizo de manera simultánea usando equipos de detección múltiple (LINCOpex, Linco. USA).

Se midieron reactantes de fase aguda (VSG (Westerngreen) y PCR (Nefelometría) y factor reumatoide por ELISA.

Los pacientes contestaron cuestionarios para valorar actividad de la enfermedad (DAS 28 y RADAI) y capacidad funcional con HAQ, ver anexo.

Se revisaron los expedientes de los pacientes que cumplían los criterios con la hoja de recolección de datos, ver anexo.

5.10. Esquema de análisis estadístico:

Se obtuvo la media, moda y desviación estándar de cada variable. La comparación entre las medias de todos los grupos se hizo con Anova de una vía para variables continuas y la comparación de variables dicotómicas se hizo con la prueba de chi-cuadrada. La comparación entre las medias de los dos grupos se hizo con la prueba de U-Mann Whitney. La correlación entre los niveles de cada citocina con la actividad de la artritis se hizo con el Coeficiente de Spearman, utilizando el programa SPSS versión 14. Se consideró $p < 0.05$ significativa de dos colas.

6. Resultados

La población estudiada estuvo compuesta por 20 pacientes con artritis reumatoide temprana, 18 mujeres y 2 hombres. Los controles incluyeron a 20 pacientes con AR, 19 mujeres y un hombre, con una $p=0.548$, 20 pacientes con artropatía por cristales 3 mujeres y 17 hombres, con una $p < 0.0002$ y 20 pacientes con osteoartritis, 17 mujeres y 3 hombres, con una $p=0.63$. La media de edad de los pacientes con ART fue de 36.2 ± 10.3 (limites entre 20 y 54 años), la de los pacientes con AR fue de 49.4 ± 15.03 (limites entre 21 y 73 años), la de los pacientes con AC fue de 57.5 ± 15.04 (limites entre 38 y 82 años) y la de los pacientes con OA fue de 63.25 ± 12.07 (limites entre 38 y 84 años), con diferencia significativa ($p < 0.0001$). (Tabla 1)

El tiempo de evolución de la ART fue de 5.33 ± 3.51 (rango de 0.47 a 12.5) meses, AR fue de 233.03 ± 158.02 (rango de 36.5 a 511.0) meses, AC fue de 158.06 ± 116.71 (rango de 10.0 a 413.66) meses y OA fue de 116.09 ± 103.79 (rango de 8.3 a 340.66) meses, con diferencia significativa entre casos y controles ($p < 0.0001$). (Tabla 1)

Tres de los pacientes con ART tuvieron tabaquismo positivo, 2 con AR, 5 con AC y 3 con OAD, con $p=0.63$. (Tabla 1)

Tabla 1: Características Generales

	ART (n 20)	AR (n 20)	AC (n 20)	OA (n 20)	p
Edad años	36.2 ± 10.3	49.3 ± 15.3	57.5 ± 15.04	63.25 ± 12.07	<0.0001
Femenino	90%	95%	15%	85%	$<0.0001^a$
Masculino	10%	5%	85%	15%	
Tiempo evolución meses	5.33 ± 3.51	233.03 ± 158.02	158.06 ± 116.71	116.09 ± 105.79	<0.0001
Tabaquismo	15%	10%	25%	15%	0.63

n= numero de pacientes, promedio \pm Desviación estándar, ^a ART & AC

La velocidad de sedimentación globular en los pacientes con ART fue de 42.5 ± 22.54 y en los pacientes con AR 38.55 ± 21.24 , sin diferencia significativa ($p=0.57$). El 90% de los pacientes con ART, eran FR y anti PCC positivos. Los pacientes con AR el 95% eran FR positivo ($p=1.0$). (Tabla 2)

Solo 2 pacientes con ART en la primera visita recibían 1 FARME, mientras que 18 pacientes con AR recibían FARME, con una diferencia significativa ($p < 0.0001$). El 100% de los pacientes con ART recibían AINES en la primera visita y solo 75% de los pacientes con AR ($p=0.231$). Solo 1 paciente con AR usaba esteroides. (Tabla 2)

Tabla 2: Características de los pacientes con ART vs AR

	ART (n 20)	AR (n 20)	p
Numero criterios	5.75 ± 0.72	4.55 ± 0.76	< 0.0001
VSG mm/hr	42.5 ± 22.54	38.55 ± 21.24	0.57
FR	90%	95%	1.0
Anti PCC	90%	ND	ND
FARME	10%	90%	< 0.0001
AINES	100%	85%	0.231
Esteroides	0%	5%	1.0
DAS 28	6.95 ± 1.18	5.67 ± 1.05	0.0008
RADAI	6.25 ± 2.00	4.98 ± 1.33	0.02
HAQ	1.84 ± 0.85	1.81 ± 0.62	0.89
Cuenta cel/mm3	5055.26 ± 548.51	5279 ± 6504.19	0.78

n= numero de pacientes, *promedio \pm Desviación estándar

Tabla 3: Comparación de la actividad de la enfermedad según DAS 28 en ART y AR

Das 28	ART (n 20)	AR (n 20)	p
Actividad baja*	0%	5%	0.195
Actividad media**	5%	20%	
Actividad alta***	95%	75%	

* 2.6-3.2 ** 3.2-5.1 *** > 5.1

El 95% de los pacientes con ART tuvieron actividad alta y solo 5% tuvieron actividad media. EL 75% de los pacientes con AR tuvieron actividad alta, el 20% tuvieron actividad media y el 5% tuvieron actividad baja. Al comparar el grado de actividad entre los pacientes con ART y AR no hubo diferencia significativa (p=0.195).

La cuenta celular del líquido sinovial en ART fue de 5055 ± 5488.51 y en AR fue de 5279 ± 6504.19 , sin diferencia significativa (p=0.704) (Tabla 2).

Tabla 4: Medias de niveles de citocinas en casos y controles

	ART (n 20)	AR (n 20)	AC (n 20)	OA (n 20)	p
IL-1β pg/ml	126.35 \pm 197.39	54.72 \pm 142.86	2.55 \pm 0.114	0.37 \pm 0.114	0.004^a
IL-2 pg/ml	231.37 \pm 335.02	410.96 \pm 1597.91	0	1.24 \pm 3.48	0.320
IL-4pg/ml	1784.97 \pm 3236.46	1095.94 \pm 2539.80	229.59 \pm 637.57	66.19 \pm 199.09	0.038^b
IL-6 pg/ml	1391.05 \pm 1357.95	1835.32 \pm 3033.76	3264.33 \pm 4457.07	773.42 \pm 2236.94	0.066
IL-8vp/ml	2903.4 \pm 3557.14	2047.3 \pm 3475.07	475.27 \pm 768.12	39.82 \pm 119.90	0.003^c
IL-13 pg/ml	84.56 \pm 237.19	17.35 \pm 39.13	0.22 \pm 0.92	0	0.091
IL-15 pg/ml	268.55 \pm 540.72	529.0 \pm 2229.90	4.15 \pm 8.39	2.41 \pm 4.82	0.414
IL-17 pg/ml	16.47 \pm 29.58	10.55 \pm 26.47	0	0	0.022^d
INF-γ pg/ml	520.22 \pm 1228.92	267.49 \pm 842.98	0.55 \pm 2.47	0.70 \pm 3.12	0.090
TNF-α pg/ml	52.62 \pm 93.10	20.95 \pm 24.36	3.52 \pm 7.56	0.23 \pm 1.03	0.003^e
VEGF pg/ml	257.40 \pm 393.08	113.51 \pm 122.66	129.96 \pm 361.45	91.16 \pm 121.03	0.245

*promedio \pm Desviación estándar, ^a ARTvs AC <0.0001, ART vs OA <0.0001, ^b ART vs AC 0.008, ART vs OA 0.003, ^cART vs AC 0.008, ART vs OA <0.0001, ^d ART vs AC 0.002, ART vs OA 0.002, ^e ART vs AC <0.0001, ART vs OA <0.0001

Las medias de los niveles de IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-13, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV en ART estuvieron más elevadas que en AR pero no hubo diferencia significativa en ninguna de ellas (Fig 1). En los pacientes con AR la media de IL-2, IL-6 y IL-15 se encontraron más elevadas que en ART pero sin diferencia significativa. Mientras que sí hubo una diferencia significativa de los niveles de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV entre ART y AC (Fig 2). No hubo diferencia

significativa en los niveles de IL-6 que estuvieron más elevados en AC que en ART (Fig 2). Al comparar las medias de citocinas de los pacientes con ART y OA hubo diferencia significativa en todas (Fig 3).

Fig 1: Comparación de las medias de citocinas de ART y AR

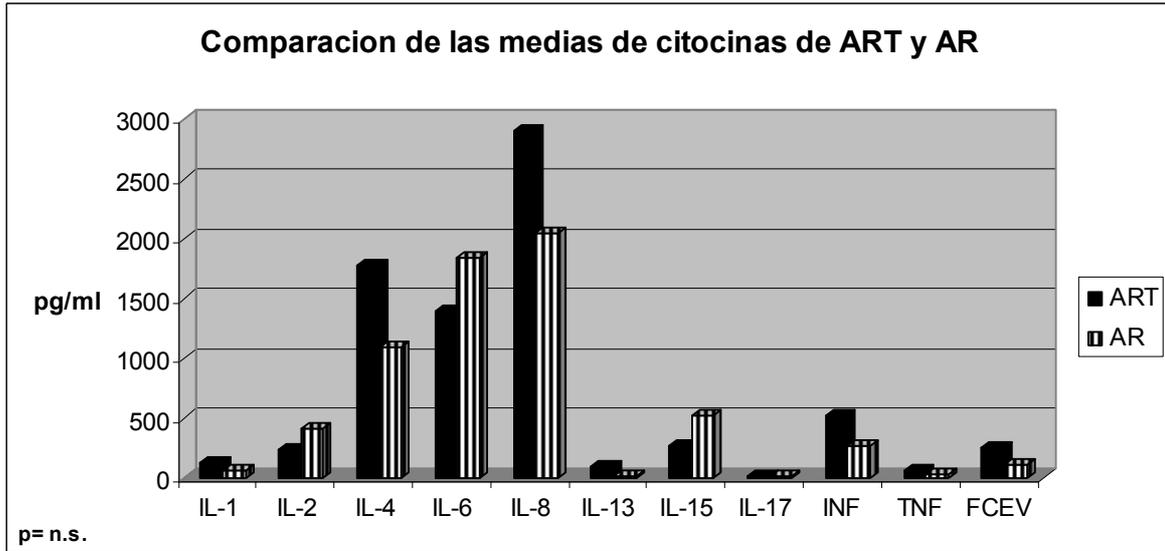


Fig 2: Comparación de las medias de citocinas de ART y AC

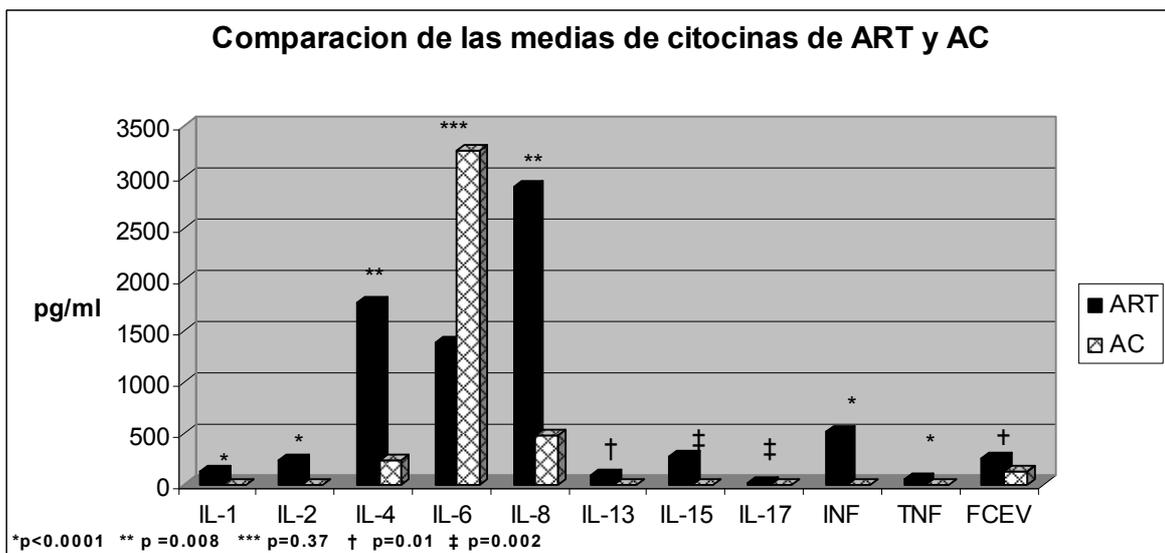


Fig 3: Comparación de las medias de citocinas de ART y OA

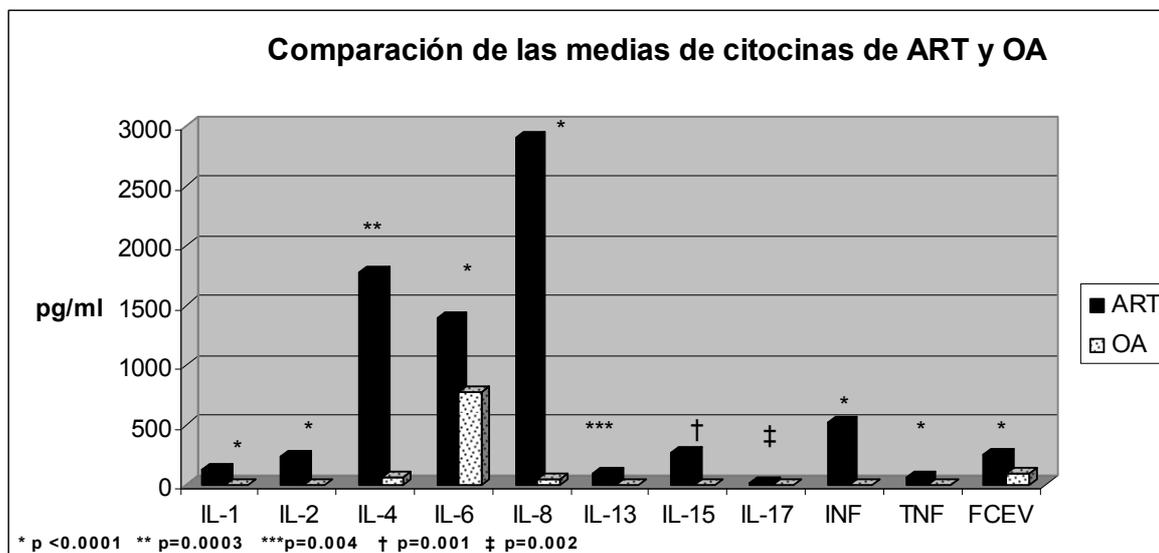


Tabla 5: Comparación de niveles de citocinas contra el grado de actividad según DAS 28

	ART	AR
IL-1 β	r = -0.219, p = 0.353	r = 0.192, p = 0.418
IL-2	r = -0.180, p = 0.448	r = 0.315, p = 0.177
IL-4	r = -0.264, p = 0.260	r = 0.352, p = 0.128
IL-6	r = -0.259, p = 0.271	r = -0.211, p = 0.375
IL-8	r = -0.338, p = 0.145	r = -0.100, p = 0.674
IL-13	r = -0.163, p = 0.491	r = 0.074, p = 0.756
IL-15	r = -0.301, p = 0.198	r = 0.139, p = 0.559
IL-17	r = 0.382, p = 0.097	r = 0.074, p = 0.756
INF- γ	r = -0.264, p = 0.260	r = 0.192, p = 0.417
TNF- α	r = -0.319, p = 0.170	r = -0.072, p = 0.764
VEGF	r = -0.219, p = 0.354	r = -0.172, p = 0.470

Entre los pacientes con ART, FR positivo (18) y FR negativo (2) hubo una diferencia significativa los niveles de IL-8 y TNF- α (p=0.023 y p=0.043

respectivamente), en el resto no fueron significativas. Mientras que entre los pacientes con ART anti PCC positivos (18) y anti PCC negativos (2) hubo una diferencia significativa en los niveles de IL-2 y TNF- α ($p= 0.043$), el resto no fueron significativas

No se observó correlación entre los niveles de citocinas y la actividad de la enfermedad de acuerdo al DAS 28 en pacientes con ART ni AR (tabla 5)

7. Discusión:

El estudio de las diferentes citocinas en el líquido sinovial de pacientes con ART mostró algunas diferencias al compararse con los pacientes con AR, AC y OA.

Los niveles de citocinas que se encontraron más elevadas en ART comparado con AR fueron IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-13, IL-17, INF- γ y TNF- α . De éstas, las proinflamatorias son IL-1 β , IL-8, INF γ y TNF- α . El TNF- α y el INF- γ son producidos por linfocitos T, mientras que IL-1 β y IL-8 son producidas principalmente por monocitos que infiltran la membrana sinovial (Fig 4). El haber encontrado estas citocinas pro inflamatorias (TH-1) en el líquido sinovial de AR es esperable, solo que los niveles dependen de la actividad de la enfermedad. Los pacientes con AR avanzada estaban en tratamiento con FARMES y esto disminuyó los niveles de citocinas proinflamatorias con respecto a los pacientes con ART que no estaban con tratamiento, pero no lo suficiente para que hubiera una diferencia significativa entre ellas.

La IL-17 es una citocina proinflamatoria, de estudio reciente en enfermedades de base autoinmune (Fig 4). En este trabajo la encontramos elevada tanto en pacientes con ART y AR, sin diferencia significativa.

También se encontró elevación de IL-4 e IL-13 en el líquido sinovial de pacientes con ART comparado con pacientes con AR avanzada. Ambas son producidas por linfocitos que infiltran la membrana sinovial (Fig 4). En la AR las citocinas principalmente son proinflamatorias, TH1 y IL-17, pero las citocinas TH2 es un hallazgo poco común en especial con niveles tan elevados de IL-4. Esto también fue encontrado por el grupo de Raza et.al.⁹

En pacientes con AR avanzada encontramos niveles de IL-2, IL-6 e IL-15 más elevadas que en AR temprana. Todas ellas son citocinas proinflamatorias, IL-2 e IL-15 son producidas por linfocitos T e IL-6 por monocitos (Fig 4). La IL-6 es esperable que esté elevada en pacientes con AR⁶ pero el tratamiento con FARME disminuiría los niveles, por el contrario en nuestro estudio estuvieron más elevados en pacientes con AR avanzada, con tratamiento FARME, que en los de ART, sin diferencia significativa. Mientras que los niveles de IL-2 e IL-15 elevados en AR, no tenemos explicación para ello.

Los grupos con AR y ART estaban igual de activos, sin diferencia significativa, a pesar de que los pacientes con AR avanzada estaban en tratamiento con FARME, lo que explica por que en los niveles de las citocinas no hubo una diferencia significativa entre los dos grupos. No se encontró correlación entre los niveles de citocinas y la actividad de la enfermedad en ART y AR.

En cambio los niveles de citocinas y de FCEV en ART si fueron significativamente mayores comparado con los de AC y OA. En la AC la IL-6 fue la citocina más elevada al compararse con los pacientes con ART, pero no hubo diferencia significativa.

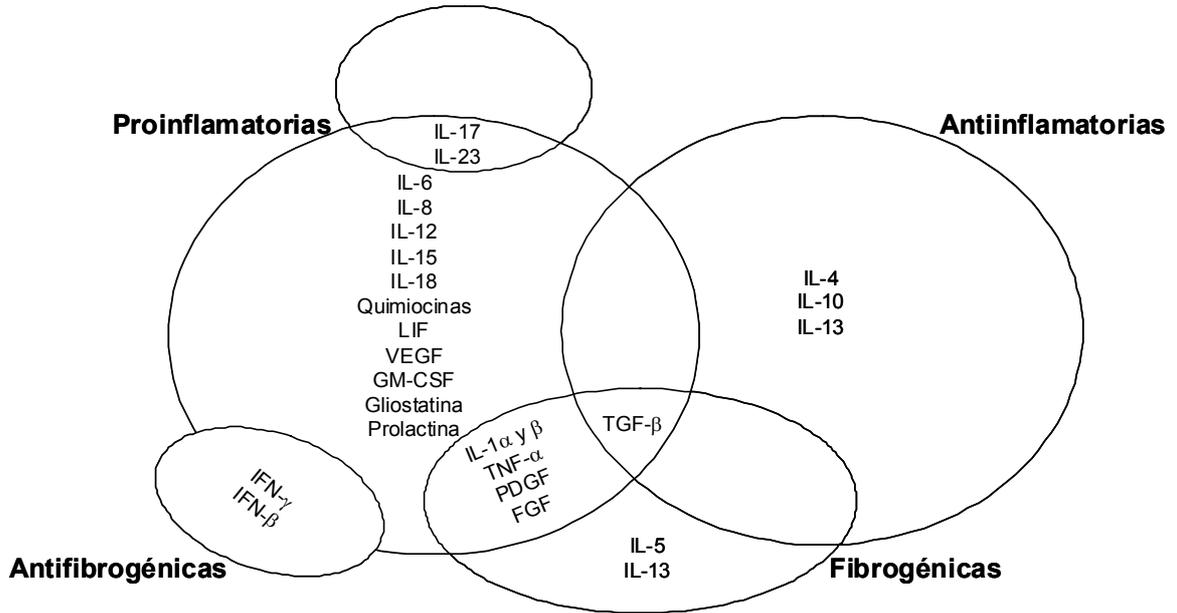
Los pacientes con ART y anti PCC negativos tuvieron niveles bajos de todas las citocinas y de FCEV que los pacientes con anti PCC positivos, en especial IL-2, IL-4, IL-8, IL-13, IL-17, INF- γ y TNF- α , pero solo hubo diferencia significativa en IL-2 y TNF- α . Esto concuerda con lo encontrado por Hueber et.al.⁷ en donde pacientes con artritis agresiva, que tuvieron mas elevado IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-13 y IL-15, hacían más anticuerpos contra epitopes citrulinados. De la misma manera los pacientes con ART FR negativos tenían los niveles disminuidos, en especial IL-4, IL-8, TNF- α y INF-

γ , teniendo diferencia significativa solo en IL-8 y TNF- α . Esto comprueba de una forma objetiva que los pacientes con AR FR positivo y anti PCC positivo tienen un perfil inflamatorio más agresivo y mayor angiogénesis.

Los niveles de FCEV se encontraron más elevados en ART que en AR, OAD y AC. El hecho de no haber encontrado una diferencia significativa entre los pacientes con ART y AR puede deberse que todos los pacientes estaban con actividad media o alta. El FCEV es estimulado por IL-1 β , IL-8, TNF- α , hipoxia y aumento de la presión de la pared endotelial, por tanto un paciente con AR activa presentará aumento de la angiogénesis. Esto explica que los pacientes con AR al estar activos también tuvieran elevado el FCEV sin diferencia significativa entre los pacientes ART. En el estudio de Ballara et.al.¹¹ si hubo una diferencia significativa en los niveles de FCEV en pacientes ART y AR, pero en ellos la medición era sérica y no especifican si los pacientes con AR estaban activos o no. El FCEV disminuye con terapias con FARME pero no se normaliza, lo que se demuestra pues el 90% de los pacientes con AR avanzada estaban con FARME y aún así tenían niveles elevados de FCEV.

En conclusión el líquido sinovial de pacientes con ART y AR tuvieron niveles elevados de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, INF- γ , TNF- α y FCEV sin diferencia significativa entre ambos. No se encontró correlación entre los niveles de citocinas y la actividad de la enfermedad en ART y AR. El hallazgo de citocinas proinflamatorias y de FCEV en el LS de pacientes con AR sugiere que un tratamiento temprano más agresivo es necesario para evitar la destrucción articular que continua al no haberse limitado la respuesta autoinmune. Probablemente una terapia dirigida contra FCEV en etapas tempranas podría disminuir la inflamación, ya que la angiogénesis la perpetúa.

Inflamación autoinmune



Bibliografía

1. Jacoby RK, Jayson MIV & Cosh JA. Onset, early stages and Prognosis of rheumatoid arthritis: clinical study of 100 patients with 11 year follow-up. *British Medical Journal* 1973; 2:96-100
2. Fleming A, Crown JM & Corbett M. Early rheumatoid disease. I. Onset . *Annals of Rheumatic Diseases* 1976;35:357-360
3. Masi At M-CJ, Kaplan SB, Feigenbaum SL & Chandler RW. Prospective study of the early course of rheumatoid arthritis in young adults: comparison of patients with and without rheumatoid factor positivity at entry and identification of variables correlating with outcome. *Arthritis and Rheumatism* 1976;4:299-326
4. Taylor HG, Dawes PT. The utility of the 1987 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis in early synovitis. *Br Rheumatol* 1991, Agosto 30(4): 319
5. Pando JA, Duray P, Yadoro et.al. Synovitis occurs in same clinically normal and asymptomatic joints in patients with early arthritis. *J Rheum* 2000 Agosto;27(8): 1848-54
6. Klimiuk Pa, Sierakowski S, Latosiewicz R et.al. Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with distinct variants of rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis* 2002 Sep; 61(1):804-9
7. Hueber W, Towaska B.H., Zhao X et.al. Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: Anti-citrulline reactivity is associated with upregulation of proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 2006 online
8. Gorozy J., Weynad C.M. Rheumatoid arthritis. *Imnological Reviews* 2005; 204: 55-73
9. Raza K, Falciani F, Curnow S. J. et.al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T ell and stromal cell origin. *Arth Resech & Ther* 2005; 7(4): R784-795
10. Taylor P.C, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumathology* 2005; 17: 293-8
11. Distler K. Hipoxia and angiogenesis in rheumatoid disease. *Z Rheumatol* 2003 62(Suppl 2): II43-5

12. Ballara S, Taylor P.C, Reusch P et.al. Raised Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels Are Associated With Destructive Change in Inflammatory Arthritis. *Arthr & Rheum* 2001 ; 44(9): 2055-64
13. Gonzalez –Juannatey c, Testa A, Garcia-Castelo A et.al. Active but transient improvement of endothelial function in rheumatoid arthritis patients undergoing long term treatment UIT Anti-tumor necrosis factor a antibody. *Arth & Rheum* 2004, 51 (3): 447-450
14. Aggarwal A, Panda S, Misra R. Effect of Ertanecept on matrix metalloproteinases and angiogenic vascular endothelial growth factor: a time kinetic study. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 891-2
15. Bodolay E, Koch A.E, Kim J. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 2002; 6(3): 357-376
16. Paleolog E.M, Miotia J. M. Angiogenesis in arthritis: role in disease pathogenesis and as a potential therapeutic target. *Angiogenesis* 1999;2: 295-307
17. Mcnearney T, Baethge B.A, Cao S et.al. Excitatory aminoacids, TNF a and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies. *Clin Exp Immunol* 2004;134: 621-627
18. Quinn M., Emery P. Potential for Altering Rheumatoid Arthritis Outcome. *Rhuma Dis Clin N Am* 2005; 31: 763-772
19. Young A. Early Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 2005; 31: 659- 679
20. Tak P. P, Smeet T.J.M, Daha M.R. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arth & Rheum* 1997; 40(2): 217-225
21. Gaber T, Dzivila R, Tripmachei R et.al. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology : low O₂. See what HIF can do. *Ann Rheum Dis* 2005;64(7):971-825
22. Taylor HG, Nixon NB, Dawes PT et.al. Interleukin 2 production in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1993;12(2):285-6
23. Taylor PC. Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy. *Rheumatology* 2005;44(6):721-8

Anexos

ANALISIS DE LIQUIDO SINOVIAL EN ARTRITIS REUMATOIDE TEMPRANA

Fecha llenado:

Fecha ingreso:

Registro:

Clave:

Nombre:

Edad:

Sexo:

Diagnóstico:

Fecha de primer síntoma:

Tabaquismo actual

Si= 1, No = 0

Tabaquismo anterior

Si= 1, No = 0

IT

FR

Si= 1, No = 0

PCR

VSG

Tratamiento actual

AINES

Si= 1, No = 0

FARME

Si= 1, No = 0

Esteroides

Si= 1, No = 0

DAS 28

HAQ

RADAI