



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MEDICINA

EFECTO DEL LIQUIDO SINOVIAL SOBRE LA
PRODUCCION DE SUPEROXIDO Y LA
FAGOCITOSIS POR LOS
POLIMORFONUCLEARES EN DIVERSAS
ENFERMEDADES REUMATICAS. DETECCION
DE UN INHIBIDOR EN LA ARTRITIS GOTOSA.

AUTORA: Rosario Carmen Mata Alcázar-Caballero

1 de Enero de 1991

R. 29.688

T. D.
M/122

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
BIBLIOTECA

Comisión de...
al no 147 ... 179 ...
correspondiente.

villa, ...

Pleca deffite



EFFECTO DEL LIQUIDO SINOVIAL
SOBRE LA PRODUCCION DE
SUPEROXIDO Y LA FAGOCITOSIS
POR LOS POLIMORFONUCLEARES EN
DIVERSAS ENFERMEDADES
REUMATICAS. DETECCION DE UN
INHIBIDOR EN LA ARTRITIS GOTOSA.



INDICE

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
MATERIAL Y METODOS	43
RESULTADOS	62
DISCUSION	82
CONCLUSIONES	95
RESUMEN	97
BIBLIOGRAFIA	103

INTRODUCCION

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son células altamente especializadas cuya función primaria es la fagocitosis y la destrucción de los microorganismos y otros agentes nocivos. Además de su papel en la defensa del huésped, estas células están presentes con frecuencia en los lugares de lesión tisular mediada inmunológicamente. Los PMN participan en muchos de los acontecimientos que tienen lugar en el foco de la inflamación aguda.

Metchnikoff propuso, al final del siglo XIX, que los leucocitos pueden liberar sustancias capaces de dañar los tejidos adyacentes (1). Esta idea se conservó hasta mediados del siglo XX en que se demostró un papel crucial de los PMN en una amplia variedad de reacciones inflamatorias inducidas inmunológicamente, comprobadas de forma experimental. La primera reacción que se demostró dependiente de los neutrófilos fue la reacción de Arthus. La depleción de los PMN por mostaza nitrogenada o los antisueros antineutrófilos heterólogos inhiben la reacción de Arthus en algunas especies (2). A pesar del depósito de antígeno, anticuerpo, y componentes del complemento en los vasos de animales tratados con antisuero, no se han podido encontrar signos microscópicos de lesión vascular. Otros modelos experimentales de lesión inmunológica tienen una dependencia similar del neutrófilo para la lesión tisular. Estos modelos incluyen la arteritis necrotizante de la enfermedad sérica experimental en conejos, la proteinuria asociada con vasculitis nefrotóxica en ratas y conejos, y la arteritis en conejos inducida por una reacción de Arthus pasiva inversa intra-articular. En el último de estos sistemas experimentales, las inyecciones intrarticulares de suspensiones purificadas de PMN reconstituyen las lesiones inmunológicas en los conejos deplecionados de estas células.

Estos estudios muestran que los PMN desempeñan un papel importante en la producción de las lesiones tisulares inducidas inmunológicamente por generación de metabolitos tóxicos y liberación de diversas moléculas inflamato-

rias, especialmente aquellas almacenadas en los gránulos citoplásmicos o lisosomas. Estas sustancias lisosomales causan lesión tisular directamente e interaccionan con componentes del complemento y los sistemas de kinina para generar otros mediadores de la inflamación y la lesión tisular.

DESCRIPCION GENERAL DE LOS POLIMORFONUCLEARES

Los PMN maduros son fácilmente distinguibles de otras células circulantes. Su tamaño oscila entre 8 y 15 μm de diámetro y tienen un núcleo multilobulado. Los frotis sanguíneos teñidos con la tinción de Wright muestran tres tipos de granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

El tipo más frecuente de PMN encontrado en la sangre y otros tejidos es el neutrófilo, que probablemente es el más importante en la mediación de la lesión tisular y en la defensa del huésped. Los núcleos de los neutrófilos poseen de 2 a 5 lóbulos. Tienen un citoplasma amplio y múltiples gránulos que se tiñen de rosa con la tinción de Wright. El estudio por microscopía electrónica muestra la existencia de pocas mitocondrias y un retículo endoplásmico extenso.

Los eosinófilos, que suponen el 1-3% de la población total de leucocitos en la sangre periférica de los individuos normales, tienen gránulos citoplásmicos amplios que se tiñen de rojo. Estas células están implicadas en la respuesta del huésped a los parásitos, aunque su función y el papel concreto que desempeñan en la respuesta del huésped y en la respuesta a la lesión están en la actualidad en estudio.

Los basófilos pueden distinguirse por los grandes gránulos citoplásmicos, oscuros tras la tinción de Wright, que contienen histamina y heparina. Los basófilos constituyen menos del 1% de la población leucocitaria total en la sangre periférica de las personas normales, y median las reacciones de hipersensibilidad inmediata (reacciones tipo I).

PRODUCCION DE LOS NEUTROFILOS

Los PMN neutrófilos tienen un ciclo vital extremadamente rápido, circulando durante periodos muy cortos. La vida media del neutrófilo maduro en la sangre es sólo de 6 a 7 horas. Debido a que son necesarios varios días para que el neutrófilo madure en la médula ósea, es imprescindible la existencia de un gran acúmulo de precursores medulares para el mantenimiento del número de células circulantes. Los factores responsables de los estímulos de la producción de precursores de los neutrófilos, tales como el factor estimulante de los granulocitos y monocitos (GM-CSF) están siendo aislados y clonados para su posible uso terapéutico (3,4).

En la médula ósea, el proceso de maduración de los neutrófilos atraviesa diferentes etapas histológicas características. Los precursores de los neutrófilos (mielocitos y promielocitos) sintetizan lisosomas en el aparato de Golgi. Morfológicamente se distinguen dos tipos de gránulos. El primero de ellos, que aparece durante la maduración es el llamado "gránulo primario", de carácter azurófilo. Estos gránulos son relativamente grandes y contienen enzimas hidrolíticas y moléculas bactericidas. Los gránulos "secundarios" aparecen con posterioridad, son más pequeños que los gránulos primarios y

contienen un grupo diferente de enzimas. El número de gránulos "secundarios" en el neutrófilo maduro es mayor que el de gránulos "primarios", a pesar de su aparición más tardía en el proceso de maduración.

Además de los cambios morfológicos, el metabolismo celular también sufre una transición durante la maduración. Los precursores de los neutrófilos contienen muchas mitocondrias y parecen utilizar el metabolismo oxidativo para la síntesis protéica. Con la maduración, se produce un cambio hacia la glicólisis anaerobia, presumiblemente en preparación para su actuación en los tejidos hipóxicos (5); la movilidad, la plasticidad, y la capacidad para ingerir partículas también acompañan a la maduración.

Los neutrófilos inmaduros, liberados en la circulación de forma prematura, tienen una actividad bactericida disminuida (6).

FUNCION DE LOS NEUTROFILOS

En la defensa del huésped, los PMN deben abandonar el árbol vascular y emigrar al lugar infectado o inflamado, donde ingieren las partículas agresoras para proceder a su digestión intracelular y a su destrucción, en un proceso que se ha denominado fagocitosis (FIG. 1).

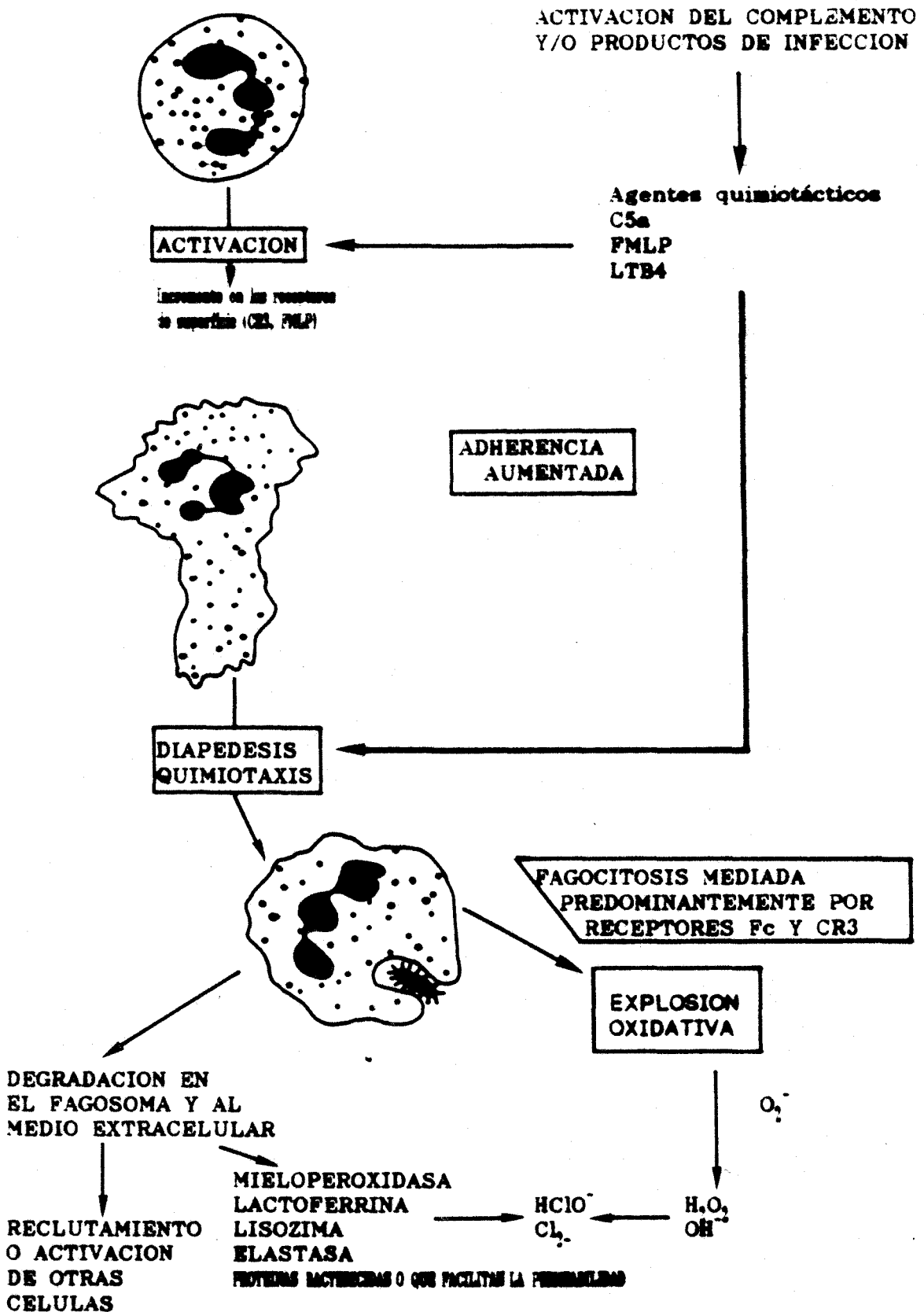


FIGURA 1. RESPUESTA DE LOS NEUTROFILOS A LA INFECCION O A OTRAS CAUSAS DE INFLAMACION

(Tomado de MALSON, M.L., GALLIN, J.I. Neutrophils in human diseases. N Engl J Med 1987; 317:687-692)

Fagocitosis

El término fagocitosis se refiere al acto físico de "engullir", y consiste en el proceso por el cual las partículas reconocidas por el fagocito como extrañas son captadas por la célula y secuestradas en una vacuola intracelular (fagosoma, fagolisosoma, vacuola fagocítica). Este proceso se inicia por la atracción de los PMN al lugar de la lesión (quimiotaxis). La quimiotaxis es la responsable de la puesta en contacto de los PMN con las partículas, siendo por tanto crucial para el proceso de reconocimiento en la fagocitosis. Este reconocimiento se consigue también gracias a la acción de opsoninas cuya formación puede iniciarse por la interacción de anticuerpos específicos.

Una vez que se produce el contacto entre la partícula y el granulocito, una fuerza cohesiva evita su separación a pesar del flujo de líquido extracelular (adherencia). Esto ocurre en gran medida por la actividad de partículas ligadas a opsoninas (IgG, C3b), que se unen a un receptor específico sobre la superficie del granulocito. Como resultado de la expansión y contracción de los microfilamentos, que es dependiente de la energía celular, se forman pseudópodos. La interacción secuencial y circunferencial entre las opsoninas y los receptores con la activación submembranosa asociada de elementos contráctiles da lugar al movimiento de los pseudópodos alrededor de la partícula, hasta que la inclusión de ésta se completa. La vacuola formada se mantiene unida a la superficie de la célula por un tabique membranoso durante un corto periodo de tiempo; las membranas opuestas se fusionan y se rompen y queda así libre en el interior de la célula.

Mecanismos

Los neutrófilos invaginan su membrana superficial en el punto de contacto y envuelven la partícula. La vacuola intracelular resultante, denominada fagosoma o vesícula fagocítica se separa de la superficie celular y llega a internalizarse completamente dentro del citoplasma celular (7). Tras la fagocitosis, la célula se redondea y expone menos membrana superficial. Los neutrófilos restantes, no expuestos a partículas tienen un área superficial mayor, con pseudópodos de superficie y vesículas. A pesar de su superficie relativamente amplia, las limitaciones en la extensión de la membrana superficial pueden, a su vez, limitar el número de partículas que pueden ser ingeridas por una célula única. La fusión de las membranas de los gránulos con las de los fagosomas comienza el proceso de la digestión de las partículas fagocitadas. Los gránulos lisosómicos descargan su contenido dentro del fagosoma en un proceso conocido como degranulación. El fagosoma, ahora llamado fagolisosoma, contiene un amplio abanico de proteínas microbicidas y enzimas degradativas.

Métodos de cuantificación de la fagocitosis

Se han propuesto diversos métodos:

1.- Métodos microscópicos:

En estas técnicas, las partículas son añadidas a una suspensión de células y tras la incubación en las condiciones adecuadas, son preparados los frotis, y la fagocitosis se valora por examen microscópico. Como medida de la fagocitosis puede emplearse o bien el número medio de partículas ingeridas por célula (índice fagocítico) (8, 9), o el porcentaje de células que contienen organismos ingeridos. Sin embargo, existen problemas en la interpretación de

los resultados de las técnicas microscópicas: 1Q) a menudo es difícil distinguir entre un organismo intracelular y uno que está adherido a la superficie de la célula pero no ingerido. Este es un problema común a otros métodos de medición de fagocitosis. La detección de las partículas intracelulares puede facilitarse si se consigue lisar las partículas adheridas sin lesionar el granulocito. El microscopio electrónico puede utilizarse para confirmar la ingestión de las partículas; sin embargo, su empleo para cuantificar la extensión de la fagocitosis no es práctico.

2Q) La medición de la fagocitosis se realiza a menudo en un momento único. Si el momento elegido es después del período de fagocitosis activa, la medición realizada será la de la capacidad fagocítica, más que la de la tasa fagocítica. Podría suceder que células con una tasa de ingestión por debajo de lo normal puedan ingerir un número de partículas comparable al ingerido por células normales si la incubación se prolonga, conduciendo a un error en la interpretación. Algunos investigadores han hecho hincapié en la importancia de estimar la tasa inicial de fagocitosis (10, 11). La medición de la fagocitosis por técnicas microscópicas debería realizarse tan pronto como fuera posible y preferiblemente en varios momentos tras el contacto inicial entre las partículas y las células. Este principio debe aplicarse también a otros métodos para la medición de la fagocitosis.

3Q) Los valores obtenidos en los métodos microscópicos de fagocitosis varían con el tipo, el número y la relación de partículas y células y con las condiciones de la incubación. Puesto que la mayoría de los laboratorios utilizan condiciones diferentes de incubación, relación partículas/células, tipos de partículas, etc., a menudo resulta difícil comparar los datos obtenidos.

A pesar de estas dificultades, el estudio cuidadoso de la fagocitosis por técnicas microscópicas utilizando, bien células en suspensión o en monocapas

(12, 13), puede ser valorable, en particular cuando se mide la fago citosis junto con algún otro aspecto funcional del neutrófilo.

2.- Métodos isotópicos

Estos métodos miden la ingestión de partículas marcadas con un isótopo radiactivo.

* Partículas radiactivas.

Se han empleado partículas marcadas radiactivamente para la medición de la fagocitosis. En general, las partículas son marcadas bien químicamente o por el crecimiento de organismos en medio que contenga metabolitos radiactivos. Para ello, se ha empleado una variedad de partículas (bacterias, hongos, plaquetas, esférulas de poliestireno y diferentes isótopos). Ward y Zvaifler (14), describieron un método para la medición de la fagocitosis en el cual se utilizaban complejos antígeno-anticuerpo marcados.

Estas técnicas ofrecen la ventaja de la objetividad. Sin embargo, al igual que ocurre con las técnicas microscópicas, es necesario tomar precauciones para medir la tasa de fagocitosis y, en algunos casos, para distinguir las partículas adheridas de las ingeridas.

* Medio radiactivo.

Chang (15) empleó la captación de ^{125}I -albúmina sérica humana añadida a una mezcla de PMN de conejo como medida de la fagocitosis. Tras la incubación, la suspensión fue centrifugada y se determinó la radiactividad del sedimento tras los lavados necesarios.

La medición de la fagocitosis por la captación de un soluto marcado se basa en la ingestión de una pequeña cantidad de líquido extracelular con el isótopo durante la fagocitosis (16). Parece ser que la cantidad de líquido captada por la célula no es muy grande, por lo que la cantidad de radioisótopo empleado en el método debe ser alta, comparado con la cantidad requerida cuando se emplean partículas radiactivas. Un problema añadido lo constituye el uso de componentes iodados. Los PMN catalizan la reacción de iodación, de iodación y transiodación durante la fagocitosis, algunas de las cuales se producen en el líquido extracelular. Por lo tanto, parte de la radiactividad detectada en el sedimento puede deberse a las reacciones de transferencia de iodo ocurridas durante la fagocitosis, por lo que se debe ser cauteloso en la interpretación de los resultados.

3.- Métodos de extracción

En estas técnicas las partículas que pueden ser solubilizadas son ingeridas por los PMN y luego extraídas con un solvente adecuado y medidas. Se utilizan dos tipos de partículas: látex y emulsión oleosa.

* Partículas de látex.

La captación de esférulas de látex, poliestireno o poliviniltolueno por las células puede ser determinada por su extracción con dioxan y medición espectrofotométrica (17).

* Gotas de aceite de parafina.

Este método, descrito por Stossel (11, 18), consiste en la medición de la fagocitosis utilizando la captación de gotas de aceite de parafina estabilizadas

por una capa de proteínas alrededor. Las gotas de aceite contienen **aceite rojo O**, que puede ser determinado por métodos espectrofotométricos tras la extracción de las células lavadas libres de las gotas extracelulares. La tasa de ingestión de gotas de aceite de parafina estabilizadas con albúmina no se afecta por el suero, mientras que la fagocitosis del aceite de parafina emulsionado con lipopolisacáridos bacterianos es suero-dependiente. La ingestión de gotas de aceite de parafina conteniendo aceite rojo O y ligado con lipopolisacáridos *E. coli* se ha empleado en combinación con la reducción del **Nitroblue Tetrazol (NBT)** en una técnica de estudio para defectos metabólicos y opsónicos.

4.- Retirada de partículas del líquido extracelular

Maaloe (19) utilizó la caída en el recuento de células bacterianas del líquido extracelular como una medición de la fagocitosis. Se determinó la diferencia entre el número de bacterias añadidas y el número recuperado en el líquido sobrenadante tras la centrifugación a baja velocidad. La captación reducida de metabolitos marcados por los microorganismos puede ser empleada también como una medida de la retirada de los microorganismos del líquido extracelular (20). Debe emplearse un metabolito que no sea captado fácilmente por la célula (o el organismo intracelular) pero sí por organismos extracelulares.

5.- Métodos indirectos

La fagocitosis de los PMN es seguida por una secuencia de acontecimientos intracelulares que pueden ser utilizados para la medición indirecta de la fagocitosis. Así, la actividad microbicida (21), el consumo de oxígeno (22), la

oxidación de la glucosa C-1 (22, 23), la reducción del NBT (24), la quimioluminiscencia (25) y la iodación (26) se ha empleado con este fin.

Los métodos indirectos son útiles para la medición de la fagocitosis, siempre que se tengan en cuenta las siguientes consideraciones:

- Estos métodos miden los sucesos ocurridos tras la fagocitosis así como los que se producen durante la misma y son por lo tanto una medida válida de la fagocitosis sólo cuando los acontecimientos posteriores no están deteriorados. Así por ejemplo, la reacción de iodación es dependiente no sólo de la fagocitosis, sino también de la degranulación, la mieloperoxidasa (MPO) y la explosión respiratoria. Las alteraciones en cualquiera de ellas pueden conducir a la reducción de la iodación sin una disminución asociada de la fagocitosis.

- En ausencia de fagocitosis la perturbación de la membrana plasmática puede iniciar una explosión respiratoria.

6.- Los microorganismos inyectados en el torrente sanguíneo son aclarados rápidamente, en gran medida como resultado de la fagocitosis por los macrófagos fijados. La tasa de aclaramiento puede estar influenciada por la preopsonización del organismo o por la inyección intravenosa de suero opsonizado. El uso de bacterias radiactivas incrementa en gran medida la facilidad y la precisión de la tasa de aclaramiento. Esta técnica sin embargo, no distingue entre el aclaramiento por la fagocitosis del que se produce por otros mecanismos.

Opsoninas y sus receptores

La habilidad y la velocidad con las que los neutrófilos ingieren una partícula determinada depende, al menos en parte, de las características de la superficie de la partícula. La carga superficial y la hidrofobicidad influyen profundamente en la ingestión, aunque las características superficiales óptimas para la fagocitosis no se conocen completamente. Una explicación de la capacidad de algunas bacterias para evitar el ataque fagocítico es la alteración de su superficie que las hace menos "apetecibles" (27).

Los factores humorales del huésped facilitan la fagocitosis. Las partículas expuestas al suero fresco son ingeridas más rápidamente que las partículas no tratadas. Aquellos factores humorales que se unen a las partículas en la preparación para la ingestión son conocidas como opsoninas. Las opsoninas han sido divididas tradicionalmente en factores termoestables y factores termolábiles. Las inmunoglobulinas, en particular la IgG (específicamente las subclases IgG₁ y IgG₃), constituyen el grupo de las opsoninas termoestables.

La molécula de inmunoglobulina debe estar tratada para promover la fagocitosis. Para la digestión proteolítica de las moléculas de inmunoglobulina pueden distinguirse dos porciones funcionales: la porción Fab de la molécula del anticuerpo, que se liga a lugares antigénicos específicos de la partícula; y la porción Fc, que se une a un receptor específico sobre la membrana del neutrófilo. Este receptor ha sido aislado y parcialmente caracterizado como una proteína con un peso molecular de 53.000 a 66.000 daltons. Utilizando bien un anticuerpo monoclonal específico o complejos inmunes marcados puede calcularse que hay 112.000 a 135.000 lugares receptores Fc por célula (28).

El complemento sérico puede también actuar como opsonina, siendo característicamente termolábil. El agente opsónico más activo generado por el sistema del complemento sérico es el C3b, por división proteolítica del C3 resultante de la activación de la vía clásica del complemento o del sistema properdina (vía alternativa). El receptor aislado es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 205.000 daltons. El uso de un anticuerpo antirreceptor específico marcado, ha demostrado que existen aproximadamente 60.000 receptores/célula para el C3b (29).

Estructuras citoesqueléticas

Los microtúbulos y los microfilamentos son los constituyentes más importantes del citoesqueleto del neutrófilo. Estas estructuras no sólo están implicadas en la degranulación, la motilidad celular (30, 31), y el mantenimiento de la organización celular interna, sino que también pueden servir de mediador entre la membrana plasmática y el interior celular.

Los microtúbulos son polímeros de tubulina, una proteína de 55.000 daltons. Los centriolos, localizados entre el aparato de Golgi y el núcleo tienen un centro de organización electrodensado desde el que se origina la mayoría de los microtúbulos asociados con estas estructuras. Posteriormente, los microtúbulos migran de forma radial hacia el exterior, entrando en contacto con los organelos unidos a la membrana (32). El "montaje" y "desmontaje" de los microtúbulos es controlado de diferentes formas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los iones de calcio facilitan la disolución de la tubulina polimerizada, disminuyendo el pH o la osmolaridad del medio. El GMP cíclico y los agentes que elevan sus niveles intracelulares, tales como el forbol miristato acetato y la carbamilcolina, promueven el "montaje" de la tubulina, mientras que el AMPc

y los agentes que elevan sus niveles intracelulares, tales como la PGE₁ y el isoproterenol, facilitan el "desmontaje".

El estado de óxido-reducción de las células puede también regular la organización de los microtúbulos proteínicos (33). Las concentraciones micromolares de alcaloides como la colchicina y la vimblastina inducen la disolución reversible de los microtúbulos. Los estudios realizados con la ayuda de estos agentes, especialmente la colchicina, han hecho posible identificar la función de estas estructuras. Existen lugares de unión separados en los dímeros de tubulina para la colchicina y la vimblastina.

Los microtúbulos son de particular importancia en la función de los neutrófilos. La degranulación durante la fagocitosis se ve afectada por agentes que influyen en el estado de "montaje" de los microtúbulos (34, 35). Los incrementos y las reducciones de los nucleótidos cíclicos en la degranulación se correlacionan con los aumentos y las reducciones en el número de los microtúbulos (36). El GMPc puede inducir el "montaje" de los microtúbulos en ausencia de un estímulo, pero es incapaz por sí mismo de estimular la degranulación.

Datos recientes parecen indicar que la translocación de los fagosomas más que su fusión es modulada por los microtúbulos. La correlación entre la organización y desorganización tubulares y el grado de degranulación son reflejo probablemente de acontecimientos tempranos en la secuencia de la degranulación. El "montaje" puede aumentar, o el "desmontaje" reducir, la posibilidad de contacto entre los gránulos neutrófilos y las áreas estimuladas de la membrana plasmática. Otras estructuras, quizás las proreínas contráctiles, pueden desempeñar un papel más directo en la fusión entre los gránulos y el fagosoma.

Los microfilamentos tienen un diámetro de 6 nm y constituyen el sistema contráctil de las células. Han sido identificados como polímeros de actina y son predominantes en las áreas de la célula implicadas en la adhesión y la ingestión de partículas (31). El sistema contráctil de los neutrófilos tiene una semejanza con el del músculo esquelético. Actina, miosina, la proteína ligada a la actina, y un cofactor que permite a la actina activar la ATPasa Mg^{2+} han sido aisladas de la célula fagocítica (37). Durante la fagocitosis normal, las contracciones se producen en dos direcciones. La contracción se produce bajo la patricula para formar la invaginación que es dirigida a lo largo del microtúbulo hacia el citocentro. El segundo tipo de movimientos afecta a una red de filamentos de la superficie celular, conteniendo actina y miosina. La contracción de esta red, que interactúa con las proteínas ligadas a la actina, da lugar a un movimiento lateral de la membrana plasmática que sirve para cerrar la vacuola fagocítica. El sistema de microfilamentos puede ser inhibido por interferencia con la producción de energía metabólica o por quelación del calcio, aportando una posible explicación al mecanismo de degranulación por este ión. Una disrupción más específica del sistema contráctil puede lograrse utilizando el metabolito de la citocalasina B, que interfiere con la función de la proteína ligada a la actina (38). La citocalasina B inhibe la contracción del "anillo" bien por la prevención de la formación de los geles ligados a la actina o por la solubilización de los mismos, evitando así la transformación de sol a gel con los extractos citoplásmicos (38,39). La citocalasina B es un poderoso inhibidor de la migración de los neutrófilos y de la fagocitosis.

Junto con los datos estructurales, los expuestos parecen indicar un papel vital de los microfilamentos en estos procesos activos (30).

Relación estímulo-respuesta en los PMN

En respuesta a un estímulo apropiado, tal como una bacteria, péptidos extraños, o ciertos agentes solubles, los neutrófilos se agregan, migran hacia la fuente del estímulo, ingieren las partículas, se degranulan, y generan metabolitos tóxicos del oxígeno. La naturaleza de esta interacción entre el estímulo y los neutrófilos está aclarándose ahora y puede servir como un paradigma de la activación celular.

El proceso de activación

Una vez que el neutrófilo ha captado una partícula opsonizada tiene lugar una serie de respuestas celulares. Después de la estimulación de un receptor apropiado existe un periodo de latencia antes de que se produzca una respuesta fisiológica medible, como la liberación de gránulos o la agregación (40, 41). Este periodo de latencia es específico del estímulo y representa el tiempo requerido para la transmisión de una señal excitadora y el paso a una respuesta celular adecuada.

Una familia de Guanina trifosfato (GTP) ligada a proteínas parece actuar como transmisores para la activación por los agentes que actúan en la superficie celular.

Estas proteínas han sido denominadas G_i ó G_s , dependiendo de si inhiben o estimulan respectivamente, la adenil-ciclasa. La proteína G_i también tiene la propiedad característica de ser inactivada por la toxina pertussi, mientras que la G_s es irreversiblemente activada por la toxina cólera. La

ocupación de receptores quimioattractantes en los neutrófilos conduce a la activación (GTP ligada) de una proteína semejante a G_i que genera otros mensajeros intracelulares, por ejemplo, activa los fosfolípidos intermediarios (como el acilglicerol y el inositol trifosfato) y los movimientos del Ca^{2+} (42).

Una de las alteraciones celulares que se encuentran clásicamente como un primer paso en el acoplamiento estímulo-respuesta es un cambio en el potencial transmembrana. Tras una estimulación apropiada se ha podido observar la hiperpolarización rápida seguida por despolarización (43).

Además de los cambios en el potencial de membrana, el calcio se ha propuesto como un segundo mensajero para la activación del neutrófilo. Se han encontrado cuatro criterios para esta consideración: a) la translocación del calcio extracelular por el ionóforo A 23187 activa los neutrófilos, mientras que la retirada del calcio del medio extracelular reduce de forma notable la respuesta celular a una variedad de estímulos (44, 45). Los neutrófilos activados captan el calcio extracelular marcado y tras un periodo variable lo eliminan de forma activa. Los niveles de calcio libre en el citoplasma se incrementan rápidamente tras la estimulación; esto probablemente representa la movilización de los depósitos intracelulares (46). El calcio ha sido localizado en diversas áreas dentro de los neutrófilos por técnicas citoquímicas y ultraestructurales. Existen depósitos discretos a lo largo del plasmalema en las células en reposo, en la región metacromática del núcleo, en los gránulos azurófilos y asociado con el glucógeno. El calcio asociado a la membrana es liberado muy pronto tras la estimulación del neutrófilo y puede ser la fuente de la elevación del calcio libre en el citosol (47, 48).

Los nucleótidos cíclicos son segundos mensajeros clásicos en muchas células secretoras. La elevación transitoria rápida en el AMPc se produce tras

la estimulación de los neutrófilos con algunos pero no con todos los estímulos (I-010-440, 480). No son necesarias concentraciones elevadas de AMPc para que se produzca una respuesta de los neutrófilos, ya que la inhibición de su formación no tiene efecto sobre la respuesta a aquellos estímulos que incrementan los niveles de AMPc (49). Los agentes que elevan los niveles de AMPc intracelular, tales como el isoproterenol o la teofilina, tienden a disminuir la respuesta de los neutrófilos (35), lo que parece indicar que los nucleótidos cíclicos desempeñan un papel como modulador, pero no como desencadenantes para la función celular.

Respuesta metabólica a la actuación

Tras el contacto con las partículas adecuadamente opsonizadas, se producen cambios metabólicos. Estos incluyen un aumento del consumo de oxígeno (la explosión respiratoria) (50, 51) y un incremento en la actividad de las vías de las hexosas-monofosfato (52), en la generación de anión superóxido (53) y peróxido de hidrógeno (54), en el intercambio fosfolipídico (55), y en la fosforilación de las proteínas (56).

La fosforilación de las proteínas está implicada en la regulación de las actividades intracelulares de muchos tipos de células. Tanto la actividad protein-kinasa sensible al AMPc, como la sensible a fosfolípidos se han encontrado en los neutrófilos activados (57, 58). Los ésteres forbol, potentes activadores de los neutrófilos se ligan directamente a una proteína kinasa C, evitando al parecer de este modo la habitual secuencia de activación (59).

La estimulación de los neutrófilos también aumenta el metabolismo del ciclo fosfatidil inositol/ácido fosfatídico, que puede desempeñar un papel en la

regulación de los niveles de calcio libre intracelular (60). Además, el desdoblamiento del fosfatidil inositol y sus derivados difosforilados o trifosforilados por la fosfolipasa C podía conducir a la generación de diacilglicerol, un conocido activador de la protein-quinasa C. El metabolismo fosfolipídico puede aportar también ácido araquidónico, conduciendo a la generación de productos de las vías ciclooxigenasa y lipooxigenasa. El consumo rápido de oxígeno por los neutrófilos estimulados conduce a la producción de radicales de anión superóxido, peróxido de hidrógeno, "oxígeno singlet", y radicales hidroxilo. Un primer paso crítico en estos acontecimientos parece ser la reducción del oxígeno molecular a anión superóxido por una oxidasa NADPH-dependiente unida a la membrana plasmática. El consumo de NADPH por esta oxidasa conduce a una estimulación del metabolismo de la glucosa por la vía de la hexosa-monofosfato. El anión superóxido es convertido en peróxido de hidrógeno bien enzimáticamente (por la superóxido dismutasa, o espontáneamente. Este peróxido de hidrógeno puede reaccionar con el anión superóxido adicional para formar radicales hidroxilo. Todas estas especies de oxígeno son muy reactivas y poseen actividad bactericida y citolítica (61, 62).

El hallazgo de partículas subcelulares sin gránulos y sin núcleo, derivadas de los neutrófilos humanos parece indicar que el anión superóxido es generado por enzimas en la membrana plasmática (63). Esta localización del sistema generador de ión superóxido conduce a una concentración de agentes microbicidas tóxicos alrededor de los organismos ingeridos una vez que se forma el fagosoma por la membrana celular, reduciendo al mínimo la liberación de especies tóxicas del oxígeno en el citoplasma celular o el espacio extracelular.

Liberación de prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos

Los neutrófilos liberan productos activados de araquidonato cuando son expuestos a un estímulo fagocítico. Estos productos incluyen los de la vía ciclooxigenasa, las prostaglandinas, los tromboxanos, y los leucotrienos. El papel exacto de la interacción de estos compuestos con los otros mediadores de la inflamación no es comprendido completamente. Además, estos compuestos parecen tener efectos tanto anti, como pro-inflamatorios. La revisión de este tema supera los objetivos de nuestro trabajo.

Degranulación

La degranulación de los neutrófilos acompaña normalmente a la fagocitosis, lo que parece indicar un mecanismo desencadenante común o similar (64, 65). Tras la unión de una partícula, se produce una contracción localizada justo por debajo del punto de contacto y en ángulo recto con la membrana plasmática, dando lugar a una depresión en copa en la cual se encajan las partículas. Los márgenes de la depresión se mueven para englobar a la partícula en una vacuola fagocítica o fagosoma; este movimiento es inhibido por la citocalasina B, que interfiere con los microfilamentos, haciendo así posible la medición de la degranulación. Los gránulos azurófilos y específicos (lisosomas) unen estas vacuolas de nueva formación a su borde interno, y descargan sus contenidos en un proceso llamado degranulación. La fusión de los gránulos y la membrana plasmática es inhibida por los corticosteroides. Generalmente las vacuolas son cerradas, previniendo la pérdida extracelular de enzimas. Sin embargo, si hay demasiado para digerir, la vacuola puede permanecer abierta y algunas enzimas ser eliminadas extracelularmente y atacar los tejidos del huésped.

La degranulación tiene lugar durante la fagocitosis, pero también ocurre cuando los neutrófilos son expuestos a cantidades suficientes de secretagogos, quimioattractantes, lectinas, promotores de tumores e ionóforos del calcio. La liberación extracelular del contenido de los gránulos puede ser inducida in vitro por los neutrófilos exponiéndolos a secretagogos en presencia de citocalasina B. Esta técnica ha permitido los estudios cinéticos de la respuesta de acoplamiento estímulo-secreción. La monitorización continua de la secreción de las células tratadas con citocalasina B reveló un periodo de latencia distinto entre la exposición a los estímulos y la liberación de enzimas lisosómicas. Este periodo es dependiente del estímulo y varía entre 15 segundos para el péptido quimiotáctico FMPL (formil-metionil-leucil-fenilalanina) (66) y 60 segundos para el ionóforo del calcio A23187 (67). Estos tiempos son comparables a los observados para la generación de superóxido utilizando el mismo estímulo. En general, los periodos de latencia para la descarga de los gránulos específicos son ligeramente menores que para los gránulos azurófilos (66, 68).

La explicación posible para los periodos de latencia incluye el tiempo requerido para "montar" o "desmontar" las estructuras citoesqueléticas, para organizar un sistema oxidasa multicomponente o para transportar gránulos secretores a través del citoplasma. La teoría que ha recibido más atención es la de que el periodo de latencia refleja el tiempo necesario para acumular un segundo mensajero crucial.

Liberación de enzimas. Mecanismos FIG. 2

Un mecanismo es la muerte celular simple. Cuando los neutrófilos son expuestos a las toxinas, la lesión de la membrana plasmática es una consecuencia temprana, siendo liberados todos los materiales intracelulares de la célula

lesionada, incluyendo aquellos secuestrados dentro de los lisosomas. Los detergentes biológicos actúan de esta manera para causar lisis primaria de la membrana celular y, sólo posteriormente, disrupción de los lisosomas (69). Bajo estas circunstancias, los enzimas citoplásmicos, el potasio, y otros constituyentes celulares, además de las hidrolasas lisosómicas son liberados directamente en los tejidos circundantes.

Otro mecanismo apoya la hipótesis de deDuve del "saco suicida". Bajo algunas circunstancias, los materiales tienen acceso al interior de los sistemas de vacuolas de las células, donde provocan la ruptura de las membranas lisosómicas desde dentro. El daño a las organelas da lugar a la liberación de enzimas lisosómicas simultáneamente con la liberación de enzimas citoplásmicas y otros constituyentes celulares, de tal modo que la célula muere por perforación de un sistema vacuolar desde el interior. Las sustancias cristalina, tales como el urato monosódico, actúan sobre las células fagocíticas en este aspecto (31). Esta forma de liberación de enzimas lisosómicas es la determinante primaria de la inflamación en la gota.

Utilizando neutroplastos (fragmentos de neutrófilos carentes de gránulos pero que conservan la capacidad de fagocitar cristales) se ha demostrado que la fagocitosis sola no es suficiente. La lisis desde dentro requiere la liberación del contenido de los gránulos del fagolisosoma.

Junto con estos dos primeros mecanismos de liberación de enzimas lisosómicas, existen otros dos en los que participan los neutrófilos viables, intactos. Ambos son importantes para la patogénesis de las lesiones tisulares inmunes y a menudo se han demostrado susceptibles de modificación por agentes farmacológicos, particularmente aquellos que afectan el estado de

"montaje" de los microtúbulos citoplásmicos o el nivel de nucleótidos cíclicos dentro de las células.

Un mecanismo de liberación de enzimas lisosómicas de los PMN intactos, ha sido denominado regurgitación durante la ingestión. Bajo algunas circunstancias, por ejemplo, tras la ingestión por estas células de complejos inmunes insolubles, como ocurre en el líquido sinovial en la artritis reumatoide, o de otras partículas, se forma un fagosoma que se fusiona a sus bordes internos con los lisosomas primarios.

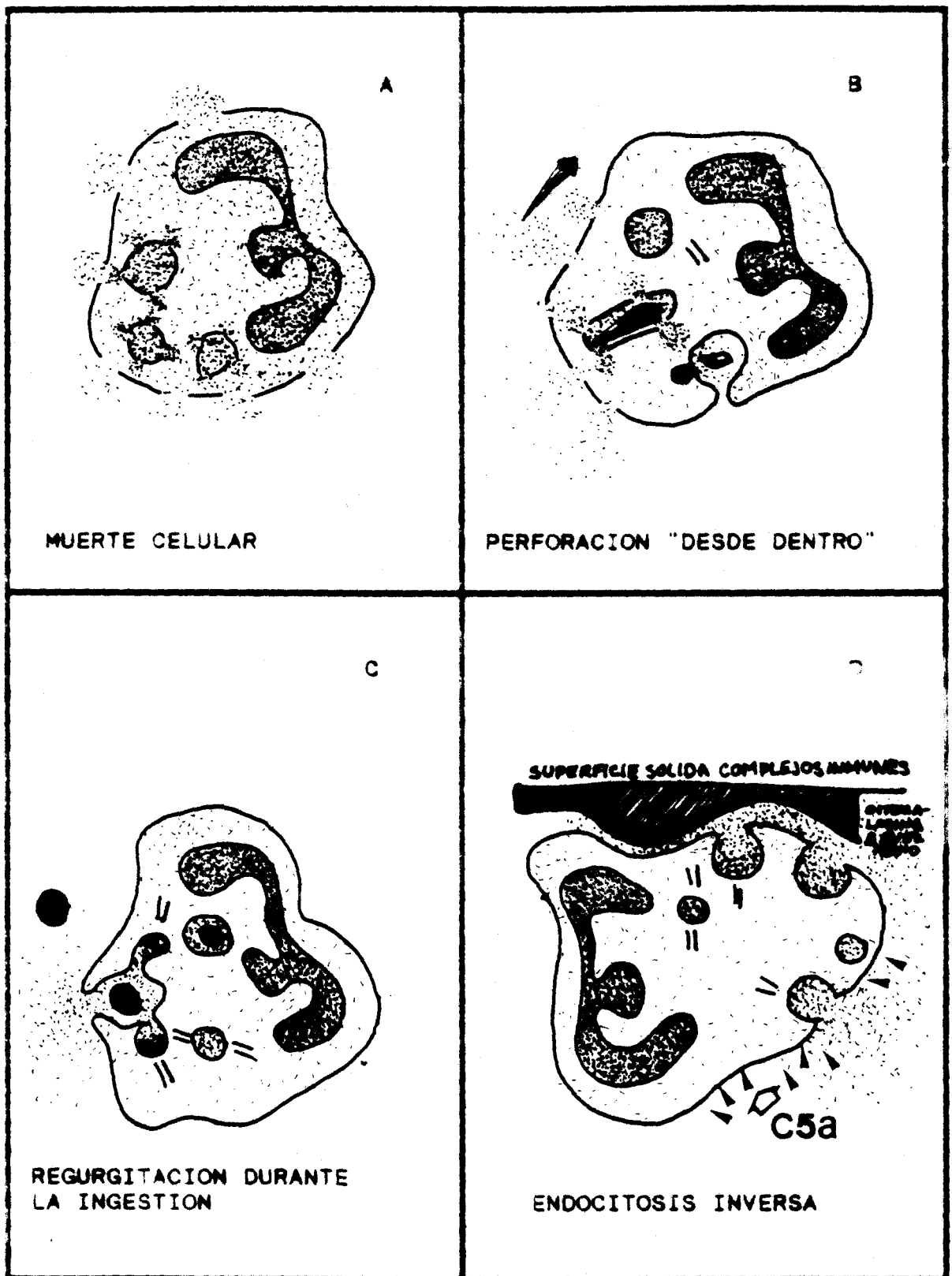


FIGURA 2. MECANISMOS DE LIBERACION DE ENZIMAS
 (Tomado de cita 27)

Debido, bien a la fusión completa de la membrana vacuolar o a la persistencia de los canales endocíticos, se produce la regurgitación de las hidrolasas lisosómicas, y los materiales lisosómicos son liberados en los tejidos circundantes sin muerte celular fagocítica asociada o liberación de enzimas citoplásmicas (70). Los signos bioquímicos y morfológicos para este mecanismo, llamado regurgitación durante la ingestión, se han presentado para una variedad de sistemas implicados en la ingestión de partículas por las células fagocíticas. Las células permanecen viables pero liberan sus contenidos lisosómicos, que quedan libres para actuar más allá de los tejidos circundantes. Este es un mecanismo frecuente de lesión tisular en una variedad de estados de enfermedad. Ohlsson ha mostrado que las proteasas neutras, elastasa y colagenasa, son regurgitadas por este mecanismo (71).

Harlan et al (72), utilizando neutrófilos humanos activados con suero tratado con zimosán, han demostrado la destrucción de la célula endotelial causada por la digestión de las proteínas de superficie de estas células por las proteasa neutras, incluyendo la fibronectina.



Endocitosis inversa

Otro mecanismo de extrusión de enzimas lisosómicas selectivo de los neutrófilos ha sido denominado endocitosis inversa o "fagocitosis frustrada". En este proceso, el material almacenado previamente dentro de los lisosomas es exportado al medio externo. Por ejemplo, las células que encuentren complejos inmunes (tanto solubles como insolubles), o agregados de inmunoglobulinas depositados sobre superficies sólidas, tales como filtros microporosos o membranas de colágeno, se adhieren a esta superficie y liberan selectivamente

sus contenidos lisosómicos (67). La liberación de enzimas se produce entonces por endocitosis inversa. La fusión de los gránulos con la membrana plasmática da lugar a la descarga de las enzimas lisosómicas directamente al exterior de la célula, como si fuera al interior de una vacuola fagocítica. La fagocitosis *per se* no tiene lugar, y la viabilidad de las células adherentes no está alterada. Este mecanismo de liberación de enzimas parece pertinente para la patogénesis del daño tisular cuando los complejos inmunes se depositan sobre la superficie de la célula o las estructuras celulares, tales como la membrana basal vascular. Por ejemplo, la nefritis del lupus eritematoso sistémico puede ser generada por esta forma de liberación de enzimas granulares, estimulada por el depósito superficial de complejos inmunes (ADN, antiADN IgG, y componentes del complemento).

Los metabolitos del oxígeno se han implicado también en la citólisis extracelular de las células del huésped. Puesto que la generación de metabolitos del oxígeno se produce simultáneamente con la captación fagocítica, estos metabolitos se ponen en contacto con los tejidos circundantes por uno de los cuatro métodos descritos. Parece ser que estos metabolitos del oxígeno causan el mismo grado de lesión tisular en las enfermedades autoinmunes (73).

RADICALES LIBRES Y ESPECIES ACTIVADAS DEL OXIGENO Y SUS IMPLICACIONES MEDICAS

La medicina científica, en la búsqueda de la interpretación del fenómeno morboso ha ido pasando por diversas etapas, desde la interpretación anatomopatológica de la enfermedad hasta la búsqueda de los mecanismos fisiopatológicos o la interpretación molecular de la misma. En esa búsqueda, no es de extrañar que se llegaran a tratar de encontrar los mecanismos químicos

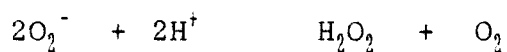
o fisicoquímicos, energéticos o electrónicos que subyacen en toda experiencia vital, bien en el estado de salud, bien en el de enfermedad.

En esta línea se halla la investigación existente acerca del papel de los llamados *radicales libres* del oxígeno o *especies activadas* del oxígeno.

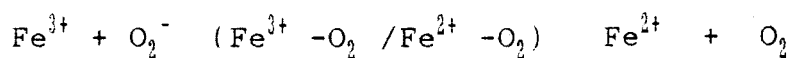
Las moléculas alcanzan su estabilidad en virtud del emparejamiento de los electrones y la subsiguiente formación de enlaces covalentes. Un radical libre puede ser definido como un átomo o molécula con uno o más electrones desapareados, capaz de una existencia independiente. Estos radicales libres pueden tener una carga positiva, negativa, o neutra. Entre ellos se encuentran la molécula de oxígeno, el átomo de hidrógeno, y la mayoría de los metales de transición. El o los electrones desapareados que caracterizan a un radical libre derivado del oxígeno, confieren un nivel alto de inestabilidad y por consiguiente de reactividad química sobre la molécula. Como consecuencia, los radicales libres del oxígeno son capaces con frecuencia de producir lesión tisular, y generalmente sólo existen a concentraciones bajas in vivo (74).

El oxígeno molecular, O_2 , es en sí mismo un biradical, ya que posee dos electrones desapareados y desempeña un papel importante como aceptor de electrones. La adición de un electrón único al O_2 da lugar al radical superóxido, un anión, O_2^- . El superóxido es capaz de participar en una serie de reacciones para producir otras especies de oxígeno reactivas, por ejemplo el radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta secuencia de reacciones, y la implicación de los metales de transición catalizadores se muestran en el TABLA 1.

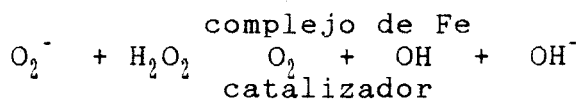
[1] DISMUTACION



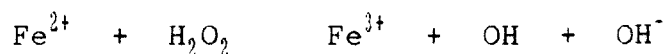
[2] REDUCCION DE HIERRO (III) A HIERRO (II)



[3] REACCION DE HABER-WEISS CATALIZADA POR HIERRO



[4] REACCION DE FENTON



CUADRO I. Reacciones de producción de radicales libres de oxígeno y participación de catalizadores metálicos.

Papel de los radicales libres

Cuando los PMN fagocitan a los microbios, consumen oxígeno de forma rápida. Este fenómeno es conocido como explosión respiratoria, un proceso que no utiliza el oxígeno para producir energía por la fosforilación oxidativa mitocondrial, responsable de la mayor parte de la utilización de nuestro oxígeno inhalado, sino para producir radicales libres, capaces de originar la muerte de los patógenos microbianos. Al menos dos sistemas enzimáticos son responsables de la generación de oxidantes microbicidas: a) un sistema oxidasa NADH ligado a la membrana plasmática incorporando citocromo b-245 (75), y b) El sistema mieloperoxidasa, una hemoproteína localizada dentro de los gránulos azurófilos, que junto con un halógeno amplifica las reacciones dependientes del H_2O_2 .

Parece ser que existen otros sistemas centrados en el radical óxido nítrico (NO).

Las pruebas de la importancia de la generación de radicales libres por los PMN podemos encontrarlas en: a) la demostración de que las células privadas de oxígeno pueden envolver pero no destruir a ciertos microbios, y b) el síndrome de la enfermedad granulomatosa crónica en el cual la explosión respiratoria falla debido a la ausencia hereditaria de citocromo b-245, dando lugar a infecciones bacterianas persistentes pero selectivas.

Radicales libres y lesión tisular

Una consecuencia de la producción no controlada de radicales libres es el daño a las biomoléculas, dando lugar a alteraciones funcionales. Existen en la actualidad numerosos datos que muestran la implicación tanto directa como

indirecta de los radicales en la patogénesis de las sinovitis inflamatorias. Muchas células presentes en la articulación inflamada tales como macrófagos, neutrófilos, linfocitos, y células endoteliales tienen la capacidad, cuando son estimuladas, de producir radicales libres, originando un daño oxidativo a moléculas tales como lípidos, ADN, proteínas, hidratos de carbono, proteoglicanos y glicosaminoglicanos.

Peroxidación de lípidos

La membrana celular, compuesta primariamente por ácidos grasos poliinsaturados, es un buen lugar de ataque para los radicales libres, y la peroxidación de lípidos resultante de este ataque supone una agresión para la membrana celular. Los lípidos poliinsaturados sometidos al proceso de peroxidación originan un aumento en la formación de productos de degradación lipídicos, que pueden utilizarse como marcadores de la lesión oxidativa sobre los lípidos. Además, se ha observado una correlación entre los niveles de estos productos reactivos en los líquidos sinoviales de los pacientes con Artritis Reumatoide y la gravedad clínica de la enfermedad. El ataque sufrido por los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular por parte de los radicales libres da lugar a la generación de lípidos quimiotácticos que atraen nuevamente a más neutrófilos.

Oxidación de proteínas

La exposición de las proteínas a los radicales libres conduce a la desnaturalización, la pérdida de la función, el enlace cruzado, la agregación, y la fragmentación (76). Existen datos que apoyan la hipótesis de que en las

sinovitis inflamatorias la lesión de las proteínas está mediada por los radicales. Cuando la IgG es expuesta a los radicales libres *in vitro*, desarrolla una fluorescencia característica y forma complejos monoméricos y agregados. En el líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide se ha detectado IgG con estas características. Los residuos metionina de la alfa-1-antitripsina son oxidados por los radicales libres, convirtiendo la molécula, inhibidor primario de la elastasa de los leucocitos en el suero, en inactiva biológicamente. Esta alfa-1 antitripsina dañada también está presente en el líquido sinovial reumatoide (77).

Oxidación de otras biomoléculas

Los radicales libres reaccionan también con los polisacáridos induciendo su fragmentación. La molécula más importante en la composición del líquido sinovial, responsable de su viscosidad, es el hialuronato glicosaminoglicano. La pérdida de la viscosidad del líquido sinovial es debida generalmente a la despolimerización del hialuronato. Experimentos realizados *in vitro* han mostrado que los radicales libres despolimerizan el ácido hialurónico produciendo una disminución de la viscosidad del líquido sinovial (78).

De igual modo, se han encontrado datos que relacionan los radicales tóxicos con la lesión de los cartílagos. Se sabe que el radical OH⁻ puede degradar el cartílago y que el OHCL, derivado del sistema mieloperoxidasa-H₂O₂-Cl, puede atacar los proteoglicanos, mientras que el H₂O₂ inhibe la síntesis de proteoglicanos en los cultivos de cartílago articular bovino.

Hierro y sinovitis inflamatoria

Diversos estudios parecen indicar la existencia de un protagonismo de las reacciones de radicales dependientes de hierro en las enfermedades articulares inflamatorias. Estudios realizados en animales han mostrado que una inyección única de sangre autóloga prolonga hasta la cronicidad una reacción inflamatoria transitoria (79).

En la Artritis Reumatoide activa, la sinovia inflamada está sometida a microhemorragias traumáticas recurrentes y existe un depósito incrementado de hierro en forma de ferritina; y en el líquido sinovial está presente el hierro capaz de catalizar la formación de OH^- a una concentración que guarda una estrecha correlación con los parámetros de actividad de la enfermedad (80). En la Artritis Reumatoide en fases tempranas, los niveles elevados de hierro en el líquido sinovial predicen un pronóstico desfavorable (81), la infusión de complejos de hierro en la Artritis Reumatoide exacerba la sinovitis, siendo este defecto aparentemente debido a la peroxidación de lípidos mediada por el hierro (82). El déficit leve de hierro nutricional en ratas reduce significativamente la inflamación articular sin afectar los demás componentes sistémicos de la enfermedad, y los quelantes del hierro tienen un efecto antiinflamatorio en diversos modelos animales de inflamación.



La paradoja del oxígeno en la sinovitis inflamatoria

Son numerosos los datos que señalan un papel de los radicales libres en la patogénesis de las sinovitis inflamatorias. Sin embargo, existen dudas en las lesiones oxidativas mediadas por radicales que requieren un aporte adecuado de oxígeno. La tensión del oxígeno en el líquido sinovial inflamatorio es baja,

lo que parece indicar que las células dentro de la articulación pueden tener una capacidad reducida en lugar de incrementada para generar radicales libres. En estudios realizados in vitro se llegó a la conclusión de que la producción de radicales por los PMN en el lugar de la inflamación, puede estar limitada por la concentración ambiente de O₂ (83).

Además, en un medio ambiente relativamente hipóxico, como el de una articulación inflamada crónicamente, se podría plantear la cuestión de cómo se generan los radicales libres. En respuesta a esta pregunta cabría especular que los radicales son generados dentro de la articulación inflamada por mecanismos de reperfusión hipóxica.

Lesión hipoxia-reperfusión

La lesión tisular inducida por la isquemia se reconoce como un factor importante en la patogénesis de enfermedades que ponen en peligro la vida, por ejemplo la coronariopatía isquémica. Es en la actualidad cuando se está aclarando que el mecanismo del daño isquémico no es simple. Es cierto que la isquemia prolongada por sí misma, da lugar en última instancia a la muerte celular. Sin embargo, en algunas situaciones clínicas, una parte importante del daño puede ser originado más por la reperfusión que por la isquemia propiamente dicha. Es decir, que gran parte del daño tisular puede producirse no durante el periodo de hipoxia temporal, sino más bien durante el periodo en el que el oxígeno vuelve de nuevo a los tejidos al restaurarse el aporte sanguíneo. Cuando se producen estas circunstancias, los radicales libres pueden ser generados en gran cantidad debido al desacoplamiento de una variedad de sistemas redox intracelulares, y desempeñar un papel importante en la producción de lesiones microvasculares y parenquimatosas.

El daño hipoxia-reperfusión inducido por los radicales fue demostrado por primera vez en el intestino del gato. La isquemia transitoria originada en el intestino delgado del gato dió lugar a un incremento en la permeabilidad capilar intestinal y en el aclaramiento de albúmina, que se incrementó hasta 10 veces durante la reperfusión. Sin embargo, el incremento en la permeabilidad capilar intestinal observado durante la reperfusión fue bloqueado por la administración previa de enzimas que inhiben a los radicales tóxicos, tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, o alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa (84). El daño hipoxia-reperfusión ha sido aplicado a muchos estados de enfermedad, incluyendo la isquemia cerebral o coronaria transitoria, la insuficiencia renal isquémica aguda, y el rechazo temprano de trasplantes renal y óseo.

La bioquímica de la lesión hipoxia-reperfusión

Una fuente de radicales libres, identificada como resultado de múltiples investigaciones en el daño hipoxia-reperfusión, es el sistema enzimático xantina/deshidrogenasa (85).

El mecanismo para la producción de O_2^- en los tejidos postisquémicos parece estar afectado por cambios en el metabolismo de las purinas dentro de las células isquémicas. Durante la isquemia temporal, las concentraciones bajas de oxígeno interfieren la fosforilación oxidativa, y la producción de ATP celular se hace dependiente de la glucólisis anaerobia. Esta es una forma poco eficaz de producir ATP a partir de glucosa y que da lugar también a la producción de lactato. Los niveles incrementados de lactato junto con un cociente elevado de NADH a $NADH^+$, conduce a una eventual inhibición de la glucólisis. Además, los niveles de ATP intracelular y de ADP (adenosin difosfato), ya reducidos, caen nuevamente. Esto da lugar a unos niveles elevados de adenosina y de sus

catabolitos, incluyendo la hipoxantina y la xantina, que son los sustratos para el sistema de enzima xantina oxidasa/deshidrogenasa citosólico.

La xantina oxidasa oxida normalmente la hipoxantina y la xantina a ácido úrico, se distribuye ampliamente entre los tejidos y se localiza predominantemente en el endotelio capilar (86). La enzima es sintetizada como xantina deshidrogenasa, que transfiere electrones al NADH^+ . Sin embargo, en condiciones isquémicas, una proteasa dependiente de Ca_i , altera la enzima de manera crítica, convirtiéndola en una forma oxidasa ('o'), que no transfiere electrones al NAD^+ , sino al O_2 produciendo O_2^- . Tras la reperfusión del tejido temporalmente isquémico, la forma 'O' de la enzima, y los altos niveles de hipoxantina producen un flujo de O_2^- que puede convertirse bien espontáneamente o bien por la enzima SOD a H_2O_2 . Además, la forma 'O' de la xantina oxidasa puede movilizar el hierro de la ferritina, por un mecanismo dependiente en gran medida del superóxido generado. El hierro liberado tiene la capacidad de catalizar la formación de OH^- a partir del O_2^- y el H_2O_2 por la vía representada en las ecuaciones 3 y 4 del CUADRO I. El componente del complemento C5a, así como el factor de necrosis tumoral producido por los monocitos, alfa, también convierten la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa en una reacción rápida irreversible. Los neutrófilos activados que actúan sobre las células endoteliales tienen un efecto similar.

Por consiguiente, durante la isquemia se producen importantes cambios bioquímicos dentro de los tejidos: a) aparece una nueva actividad enzimática, junto con cada uno de estos dos sustratos requeridos; b) el sustrato requerido para la actividad tipo 'O' es el O_2 molecular, que es aportado durante la reperfusión de los tejidos, lo que da lugar a una explosión de O_2^- y a la producción de H_2O_2 , y c) el hierro sale de su compartimento, pudiendo así catalizar la generación de OH^- .

El sistema xantina oxidasa y la articulación

De lo expuesto previamente puede colegirse que la presencia de la xantina-oxidasa en el líquido sinovial humano puede ser fundamental en el daño hipoxia-reperfusión en la articulación. Se ha comprobado que tanto en la sinovial normal como en la reumatoide existe actividad xantina-oxidasa/deshidrogenasa (87), que se localiza en el endotelio capilar y se convierte rápidamente de la forma deshidrogenasa a una oxidasa.

Datos sobre la lesión hipoxia-reperfusión y la sinovitis inflamatoria

Diversas características fisiológicas presentes en la articulación humana inflamada parecen indicar que el movimiento de la misma aporta el medio ambiente potencial para la lesión hipoxia-reperfusión, que se presenta en la FIGURA 3.

La presión intraarticular (PIA) en la articulación de la rodilla normal tanto de animales como de humanos, es igual, o ligeramente inferior, a la presión atmosférica. Jayson y Dixon demostraron que, en la articulación normal, la contracción del cuádriceps produce una presión subatmosférica. Por el contrario, los pacientes con artritis reumatoide tienen una presión de reposo significativamente más elevada que los individuos controles con un derrame simulado de igual volumen. La contracción del cuádriceps en los pacientes con artritis reumatoide puede originar una PIA de hasta 200 mmHg, llegando a superar la presión de perfusión capilar sinovial en 30-60 mmHg. Se ha observado además, la existencia de una relación dinámica inversa entre la tensión de oxígeno y la PIA en las sinovitis inflamatorias (88).

NORMAL

INFLAMADA

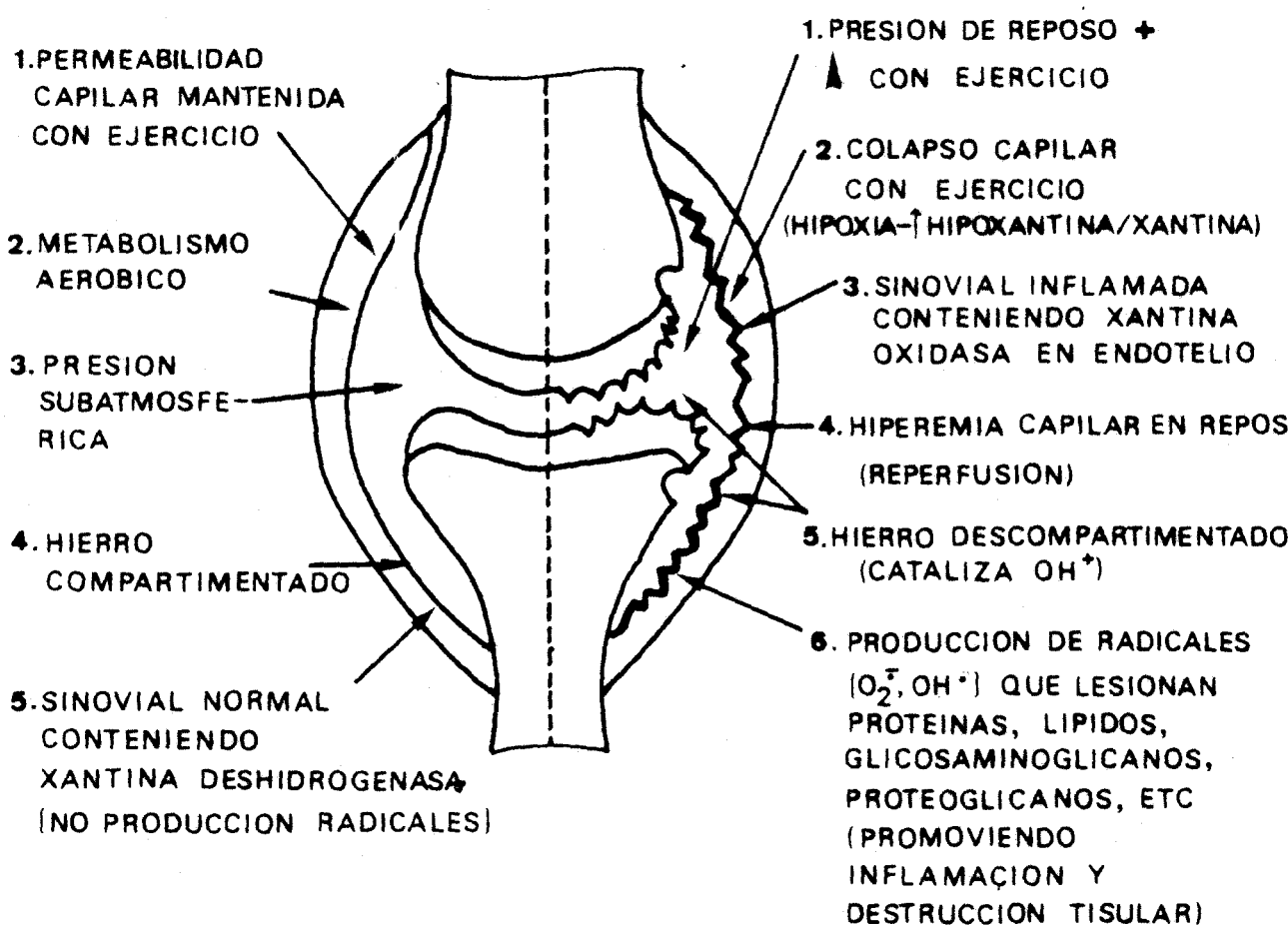


FIGURA 3. ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LA LESION HIPOXIA-REPERFUSION EN LA ARTICULACION

La medición de la pO_2 en las articulaciones inflamadas ha puesto de manifiesto que los derrames inflamatorios tienen una tensión de oxígeno más baja que los no inflamatorios. Un determinante de la tensión de oxígeno en el líquido sinovial es el aporte de oxígeno a la sinovia. Esto podría relacionarse con la PIA, puesto que la membrana sinovial y la cápsula articular forman un medio ambiente cerrado en el cual la PIA es transmitida directamente a los vasos de la membrana sinovial.

Estudios recientes en los que se ha medido la perfusión microvascular dentro del sinovio en las rodillas humanas durante el ejercicio, empleando la flujometría por láser doppler, muestran que, mientras en la rodilla normal hay una reducción imperceptible de la perfusión capilar durante el ejercicio, en las rodillas inflamadas el ejercicio produce la oclusión del lecho capilar sinovial durante el tiempo que dure el mismo, teniendo lugar la reperfusión de la membrana sinovial una vez que el ejercicio ha cesado (89).

La hipótesis de que el ejercicio de la articulación de la rodilla humana inflamada aporta el medio ambiente adecuado desde el punto de vista fisiopatológico para que se produzca la lesión hipoxia-reperfusión, ha sido verificada recientemente por la demostración de la lesión oxidativa inducida por el ejercicio sobre los lípidos y la IgG dentro de la articulación de la rodilla en los pacientes con sinovitis inflamatoria (89).

Parece ser, que la peculiar persistencia de la inflamación sinovial crónica puede deberse en parte a la lesión hipoxia-reperfusión mediada por radicales, inducida por el ejercicio dentro de la articulación. Aunque todavía queda por aclarar cómo se relacionan estos datos con algunas observaciones clínicas bien establecidas en las artropatías inflamatorias.

Observaciones clínicas que apoyan la teoría lesión hipoxia-reperfusión

Todo parece indicar que el ejercicio articular es el centro del mecanismo de la lesión hipoxia-reperfusión, cuyos principios básicos se representan en la FIGURA 2. De ello, se deduce que el reposo de la articulación podría mitigar, como de hecho ocurre, dicha lesión, favoreciendo una disminución de la inflamación.

Otros datos que apoyan la teoría de la lesión hipoxia-reperfusión son las observaciones de las lesiones neurológicas unilaterales que conducen a la parálisis unilateral, y el efecto subsiguiente sobre las condiciones artríticas. Thompson y Bywaters (90) informaron de cuatro casos de artritis reumatoide clásica que se produjeron en pacientes hemipléjicos. Un estudio reciente ha aportado datos convincentes de que los radicales libres derivados del oxígeno estimulan la reabsorción ósea por los osteoclastos (91).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las artritis inflamatorias constituyen un grupo de procesos muy heterogéneos. En algunas de ellas, la destrucción articular es un hecho constante; en otras, sin embargo, sólo aparece un daño estructural después de que la articulación sufra repetidos brotes inflamatorios; y existe un tercer grupo de artritis en las que a pesar de producirse repetidos episodios inflamatorios, no llegan a aparecer daños permanentes.

Clásicamente, estas diferencias se han atribuido a los tipos de mediadores inflamatorios producidos, y a la cantidad de los mismos. Pero es posible, y esta es la justificación fundamental del presente trabajo, que la presencia o no de sustancias inhibitoras de la inflamación sean las que influyan de un modo definitivo en el pronóstico de las artritis.

Por otra parte, los radicales tóxicos del oxígeno constituyen un grupo de agentes inflamatorios que están involucrados en la etiopatogenia de prácticamente todas las artritis inflamatorias, y cuyo estudio *in vitro* puede ser utilizado para valorar la capacidad de función-activación celular.

Lo expuesto, nos da pie para plantear la hipótesis de que las diversas artritis inflamatorias pueden diferenciarse entre si:

10) por la diferente producción de un mediador fundamental de la inflamación, como es el anión superóxido, por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos de sangre periférica y líquido sinovial, representativa de la capacidad de actuación de estas células. Este aspecto ha sido investigado en pacientes con Síndrome de Behçet, Artritis Reumatoide, y un grupo heterogéneo constituido por pacientes con Artropatías Inflamatorias Seronegativas sin etiquetar.

29) por la aparición de un inhibidor de la reacción inflamatoria investigado en el líquido sinovial de pacientes con Gota, Pseudogota y Artritis Reumatoide. Este aspecto se exploró además en una serie de pacientes diagnosticados de Artrosis en los que fue posible la obtención de líquido sinovial, constituyendo esta investigación un elemento más de comparación a la hora de valorar el papel de este posible inhibidor en la etiopatogenia de las artritis inflamatorias.

Para comprobar nuestra hipótesis de trabajo, hemos investigado por una parte la capacidad de producción de anión superóxido por los PMN de sangre periférica y líquido sinovial de las diferentes enfermedades estudiadas, realizando una comparación entre los datos obtenidos. Por otro lado, y para valorar la presencia de un inhibidor de la reacción inflamatoria en el líquido sinovial de pacientes con artritis, se investigó el efecto que la incubación con líquido sinovial extraído de las articulaciones afectadas en las diferentes patologías tenía sobre la producción de superóxido y la fagocitosis por los PMN de sangre periférica de individuos sanos.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

Se estudiaron 85 pacientes que fueron clasificados en 6 grupos:

Grupo I: compuesto por 15 pacientes diagnosticados de GOTA. La edad media de los pacientes fue de $50 \pm 7,6$ años (rango 37-68). Todos ellos eran varones.

Grupo II: formado por 9 pacientes con PSEUDOGOTA, diagnosticada según los criterios de McCarty (Tabla 2). La edad media de los pacientes fue de $61,3 \pm 10,6$ años (rango 45-80), seis de ellos eran varones y tres, mujeres.

Grupo III: constituido por 24 pacientes con ARTRITIS REUMATOIDE (AR), diagnosticada según los criterios de la A.R.A. (1958) (TABLA 3). La edad media de estos pacientes fue de $45,73 \pm 13,06$ años (rango 22-69). De ellos, veintidos eran mujeres y dos, hombres.

Grupo IV: compuesto por 15 pacientes con ENFERMEDAD DE BEHÇET, diagnosticada según los criterios de O'Duffy (TABLA 4). La edad media de los pacientes fue de $37,86 \pm 11,3$ (rango 14-54). Nueve de ellos eran mujeres y seis, hombres.

Grupo V: formado por 7 pacientes con ARTROSIS. La edad media de estos pacientes fue de $55,8 \pm 10,1$ (rango 50-71). Cinco eran mujeres y dos, varones.

Grupo VI: este grupo, al que hemos denominado "miscelánea" estuvo formado por 15 pacientes con ARTROPATIAS INFLAMATORIAS SERONEGATIVAS (AIS), no AR ni Enfermedad de Behçet. En el mismo se incluyeron: cuatro pacientes con Espondilitis Anquilopoyética, dos pacientes con Artritis Reactiva

Brucelósica, dos pacientes con Síndrome de Reiter, así como cinco casos de monoartritis y dos poliartritis sin etiquetar. La edad media de estos pacientes fue de $59,3 \pm 9,8$ años (rango 27-75). Nueve eran hombres y seis, mujeres.

En todos los pacientes sometidos a tratamiento, éste fue suspendido entre 8 y 30 días antes de efectuar las extracciones, dependiendo de su estado clínico y evolutivo.

Grupo control: El grupo control estuvo formado por 45 individuos sanos, de edades comprendidas entre 22 y 37 años (edad media $27,64 \pm 3,57$). Veinte de ellos eran varones y veinticinco, mujeres.

Todos los participantes en el estudio, tanto controles como pacientes, fueron informados de la finalidad del estudio, otorgando todos ellos su consentimiento verbal para las extracciones de las muestras y su utilización con fines de investigación.

TABLA 2

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE LA ENFERMEDAD POR DEPOSITO DE CRISTALES DE PIROFOSFATO CALCICO DIHIDRATADO (PSEUDOGOTA). McCARTY

1. DEMOSTRACION DE CRISTALES DE PIROFOSFATO CALCICO DIHIDRATADO, OBTENIDOS POR BIOPSIA, NECROPSIA O ASPIRADO DE LIQUIDO SINOVIAL.

2. **A.** IDENTIFICACION DE CRISTALES MONOCLINICOS O TRICLINICOS, MOSTRANDO UNA BIRREFRINGENCIA DEBILMENTE POSITIVA O NULA EN EL MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA COMPENSADA.
B. PRESENCIA DE CALCIFICACIONES TIPICAS EN LOS ESTUDIOS RADIOLOGICOS.

3. **A.** ARTRITIS AGUDA, ESPECIALMENTE DE RODILLAS O DE OTRAS ARTICULACIONES GRANDES, CON O SIN HIPERURICEMIA CONCOMITANTE.
B. ARTRITIS CRONICA, ESPECIALMENTE DE RODILLAS, CADERAS, MUÑECAS, MANOS, CODOS, HOMBROS Y ARTICULACIONES METACARPOFALANGICAS, PARTICULARMENTE SI SE ACOMPAÑA DE EXACERBACIONES AGUDAS; LAS ARTRITIS CRONICAS MUESTRAN LOS SIGUIENTES DATOS UTILES PARA SU DIFERENCIACION CON LAS OSTEoarTRITIS.-
 - a) Localizaciones no comunes para las osteoartritis primarias, p.e. muñecas, articulaciones metacarpofalángicas, codo u hombro.
 - b) Aspecto radiológico; p.e. estrechamiento del espacio articular radiocarpal o femoropatelar, especialmente si es aislado; erosión cortical femoral por encima de la patela en la vista lateral de la rodilla.
 - c) Formación de quistes subcondrales.
 - d) Degeneración progresiva grave, con colapso del hueso subcondral, y fragmentación, con formación de cuerpos radiodensos intra-articulares.
 - e) Formación de osteofitos variable e inconstante.
 - f) Calcificaciones de tendones, especialmente del tendón de Aquiles, del tendón del tríceps, y del obturador.
 - g) Afectación del esqueleto axial con quistes subcondrales de articulaciones sacroilíacas y apofisarias, niveles múltiples de calcificación de discos y fenómeno de vacío sacroilíaco.

PSEUDOGOTA DEFINIDA: debe cumplir los criterios 1 ó 2 (A y B)

PSEUDOGOTA PROBABLE: debe cumplir los criterios 2A ó 2B

PSEUDOGOTA POSIBLE: los criterios 3A o 3B deben alertar al médico ante la posibilidad de un depósito subyacente de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado.

Tomado de: LAWRENCE, M., McCARTY, D.J. Calcium pyrophosphate crystal deposition disease; pseudogout; articular chondrocalcinosis. En: McCarty, D.J. ed. Arthritis and allied conditions. Philadelphia: Lea & Febiger 1989:1711-1736.

TABLA 3

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE (AR) DE LA ASOCIACION AMERICANA DE REUMATISMOS (A.R.A.) (1958)

1. RIGIDEZ MATUTINA.
2. DOLOR A LA PRESION O MOVILIZACION DE, AL MENOS, UNA ARTICULACION.
3. TUMEFACCION DE, AL MENOS, UNA ARTICULACION.
4. TUMEFACCION DE, AL MENOS, OTRA ARTICULACION DENTRO DE LOS 3 MESES ANTERIORES.
5. TUMEFACCION ARTICULAR SIMETRICA.
6. NODULOS SUBCUTANEOS.
7. CAMBIOS RADIOLOGICOS TIPICOS DE ARTRITIS REUMATOIDE.
8. PRUEBA DE AGLUTINACION PARA FACTOR REUMATOIDE, POSITIVA.
9. PRECIPITADO DE MUCINA POBRE EN LIQUIDO SINOVIAL.
10. CAMBIOS CARACTERISTICOS EN LA MEMBRANA SINOVIAL: vellosidades hipertróficas; proliferación celular de la capa superficial; disposición en empalizada, linfocitos y células plasmáticas, focos de necrosis celular.
11. CAMBIOS HISTOLOGICOS CARACTERISTICOS EN NODULOS: focos granulomatosos con zonas centrales de necrosis celular rodeados por células proliferativas; fibrosis periférica, infiltración predominantemente perivascular.

AR CLASICA: Siete criterios. Duración mínima de los síntomas articulares, 6 semanas.

AR DEFINIDA: Cinco criterios. Duración mínima de los síntomas articulares, 6 semanas.

AR PROBABLE: Tres criterios. Duración mínima de los síntomas articulares superior a 4 semanas.

AR POSIBLE: Dos criterios. Duración mínima de los síntomas superior a 3 semanas.

Tomado de: BLUMBERG, B., BUNIM, J.J., CALKINS, E., et al. ARA nomenclature and classification of arthritis and rheumatism. Arthritis Rheum 1964; 7:93-97.

TABLA 4

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DEL SINDROME DE BEHÇET SEGUN O'DUFFY (1974)

1. ESTOMATITIS AFTOSA RECIDIVANTE.
2. ULCERAS GENITALES AFTOSAS.
3. UVEITIS, TANTO ANTERIOR COMO POSTERIOR.
4. VASCULITIS CUTANEA O DE LOS GRANDES VASOS.
5. ARTRITIS-SINOVITIS.
6. MENINGOENCEFALITIS.
7. HIPERREACTIVIDAD CUTANEA AL MENOR TRAUMA.

Son necesarios 3 ó más de estos criterios para realizar un diagnóstico de SINDROME DE BEHÇET COMPLETO.

Tomada de: O'DUFFY, J.D. Critères proposes pour le diagnostic de la maladie de Behçet et notes therapeutiques. La Rev de Med 1974; 36:2371-2384.

TOMA DE MUESTRAS

Muestras sanguíneas

De cada uno de los participantes en el estudio se extrajeron 20 ml de sangre por venopunción.

Muestras de líquido sinovial

En aquellos pacientes en los que se estudió la producción de superóxido de sus PMN de líquido sinovial, éste fue obtenido por artrocentesis tras realizar un cuidadoso examen físico, extrayéndose diferentes cantidades del mismo según la patología y el estado clínico. La extracción fue realizada previa desinfección de la zona con solución yodada o alcohol. Para las extracciones, realizadas en la articulación de la rodilla, se emplearon agujas de 21 G y 1½ pulgadas.

SEPARACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA Y RECUENTO

La separación de los PMN de sangre periférica se llevó a cabo siguiendo el método de Boyum modificado (92).

La sangre fue extraída en material previamente heparinizado, depositada en un tubo de polipropileno cónico y centrifugada a 600 rpm durante 10 minutos.



El sobrenadante obtenido fue despreciado y el sedimento diluido en solución de Hanks más EDTA, hasta completar un volumen de 40 ml. Este volumen se colocó sobre la mezcla de separación (Ficoll-Hipaque), con una pipeta Pasteur estéril, evitando que se mezclara, y se centrifugó a 1350 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación se distinguieron 4 capas:

- Un sobrenadante amarillento.
- Una interfase conteniendo mononucleares.
- La mezcla de separación.
- Una última capa conteniendo eritrocitos y células polimorfonucleares.

Esta última capa, conteniendo polimorfonucleares y eritrocitos fue conservada y diluida en un volumen de PBS igual al inicial de sangre, añadiendosele Dextrán (al 6%) en un volumen igual a 1/3 del inicial de sangre, para conseguir la sedimentación y agregación de los hematíes.

Estos componentes fueron mezclados sin agitar y la mezcla incubada en una estufa con ambiente de CO₂ durante 45 minutos, a 37° C.

Tras la incubación, el sobrenadante obtenido fue separado y depositado en un tubo Falcon, completándose el volumen con PBS hasta 40 ml; y centrifugado a temperatura ambiente durante 15 minutos, a 1500 rpm.

El sedimento así obtenido, conteniendo PMN y algunos eritrocitos contaminantes, fue sometido a un choque hemolítico con agua destilada para eliminar estos últimos. Para ello, se añadieron 3-4 ml de agua, pipeteando enérgicamente durante unos segundos y reconstituyendo el volumen con PBS.

Después de una nueva centrifugación, el sobrenadante fue eliminado, y el sedimento obtenido diluido en 1 ml de medio de Hanks con BSA (0,5 mg/ml), para preparar las células para su recuento.

A lo largo de todo el proceso de separación celular, el pH de los reactivos empleados se situó entre 7,35 y 7,42.

Recuento de células

Se preparó una dilución de la suspensión de células obtenida en líquido de Türk al 1/10. De esta solución se depositó 0,1 μ l con una micropipeta en una cámara de recuento celular de Thoma. Tras su observación en el microscopio óptico y la realización de los cálculos necesarios, obtuvimos la concentración deseada de PMN.

Una vez realizado el recuento, la suspensión de células fue diluida hasta conseguir la concentración de células deseada, que en nuestro caso fue de $0,8 \times 10^5/100$ para los ensayos de superóxido.

ENSAYOS DE PRODUCCION DE SUPEROXIDO

Para los ensayos de producción de superóxido utilizamos el método descrito por Simchowitz y cols. (93).

El citocromo C fue preparado en medio de Hanks con BSA (1 mg/ml), a una concentración de 4 mg/ml.

Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4° C.

En tubos de microfuga de polipropileno se colocaron:

- 100 µl de citocromo C a una concentración de 4 mg/ml.
- 200 µl de la suspensión de células, conteniendo 1.6×10^6 .
- 100 µl del estímulo utilizado, o del medio en el que estaban suspendidas las células en el caso de los tubos controles. Los estímulos empleados fueron: FMLP a una concentración de 4×10^{-7} ; PEPSTATINA, a una concentración de 4×10^{-5} ; y MSU, a una concentración de 8 mg/ml.

Una vez preparados los tubos de microfuga, estos fueron incubados en un baño a 37° C, durante 10 minutos, con agitación continua.

Inmediatamente después fueron centrifugados a 8.000 rpm para detener la reacción.

De cada uno de los tubos se extrajeron 200 µl de sobrenadante, que fueron depositados en otros tantos tubos conteniendo 2,8 ml de buffer fosfato, y leídos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, midiéndose absorbancia.

La producción de O_2^- fue valorada por los nanomoles de citocromo C reducido.

Denominamos producción espontánea de superóxido a los nanomoles de citocromo C reducido obtenidos tras ser incubados los polimorfonucleares con medio. Producción estimulada es la que se genera tras incubar los neutrófilos

con un estímulo. Por razones de índole práctica, el valor de la producción estimulada que se utiliza para efectuar los cálculos es el que se obtiene tras sustraer al valor total de producción de superóxido por los PMN estimulados, el de la producción espontánea.

Los cálculos fueron realizados según la siguiente fórmula:

$$\text{Diferencia de densidad óptica} / \text{Millones de PMN} \times \text{ml}^{-1} = \text{nmol Citocromo reducido}$$

Para comprobar que el radical medido era el anión superóxido, se añadió al estímulo superóxido dismutasa (SOD) en algunos de los experimentos de cada serie, a una concentración de 10 µg/ml, observándose una abolición total de la respuesta obtenida, es decir, de la reducción del citocromo C.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo consta de dos apartados perfectamente diferenciables desde el punto de vista de su diseño experimental.

En una primera parte, estudiamos la capacidad que los PMN de pacientes con ENFERMEDAD DE BEHÇET, ARTRITIS REUMATOIDE, Y ARTROPATIAS INFLAMATORIAS SERONEGATIVAS, tienen para generar ión superóxido en respuesta a diferentes estímulos.

En la segunda parte, estudiamos el efecto que el líquido sinovial de pacientes con GOTA, PSEUDOGOTA, ARTRITIS REUMATOIDE Y ARTROSIS, tiene sobre la fagocitosis y la producción de superóxido de los.

FUNCION DE LOS POLIMORFONUCLEARES

En la primera parte del estudio se incluyeron 15 pacientes con ENFERMEDAD DE BEHÇET, 15 pacientes con ARTRITIS REUMATOIDE, y 15 pacientes con ARTROPATIAS INFLAMATORIAS SERONEGATIVAS, denominado grupo MISCELANEA, cuya composición ha sido descrita en el apartado "pacientes" del MATERIAL Y METODOS, así como 45 individuos sanos que constituyeron el grupo control.

Con objeto de averiguar si existían diferencias en la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica y líquido sinovial se extrajeron muestras de ambos fluidos corporales de los pacientes con ARTRITIS REUMATOIDE, y los del grupo MISCELANEA, y de sangre de los pacientes con ENFERMEDAD DE BEHÇET.

En todos los individuos, tanto pacientes como controles se extrajeron 20 ml de sangre venosa. En los pacientes con ARTRITIS REUMATOIDE y con ARTROPATIAS INFLAMATORIAS SERONEGATIVAS se extrajo además líquido sinovial en una cantidad que osciló entre 10 y 50 ml, dependiendo de la articulación afectada y del estado clínico.

Ensayos de producción de superóxido por los PMN de sangre periférica

Los polimorfonucleares de sangre periférica fueron separados según el método de Boyum modificado, descrito previamente, y diluidos en medio de Hanks + BSA a una concentración de $0,8 \times 10^6/100 \text{ ul}$.

La producción de superóxido por estas células fue medida por el método de reducción del citocromo C frente a diversos estímulos: FMLP, PEPSTATINA, y cristales de MSU, tras ser incubados durante 10 minutos con esos estímulos, en las concentraciones indicadas arriba.

Los ensayos fueron realizado por duplicado. De forma simultánea se procesaron las muestras obtenidas de los individuos controles, realizándose los ensayos inmediatamente después de las extracciones.

La generación de superóxido por los PMN de sangre periférica de los distintos pacientes, calculada por los nanomoles de citocromo C reducido fue expresada como tanto por ciento de la obtenida por los PMN de su control respectivo, al que otorgamos el valor de 100.

Ensayos de producción de superóxido por los PMN de Líquido Sinovial

Los PMN de líquido sinovial fueron obtenidos por el método descrito previamente, y diluidos a una concentración de $0,8 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ en Hanks + BSA.

La producción de superóxido por estas células fue medida por el método de reducción del citocromo C frente a diversos estímulos: FMLP, PEPSTATINA, y MSU tras un periodo de incubación de 10 minutos, en las concentraciones arriba indicadas.

Los ensayos fueron realizados por duplicado.

La imposibilidad de contar con controles sanos en los que fuera posible la obtención de líquido sinovial, nos llevó a comparar los resultados obtenidos en la producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial de los pacientes con ARTRITIS REUMATOIDE Y ARTROPATIAS INFLAMATORIAS SERONEGATIVAS con la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica de cada uno de los pacientes respectivamente, a la que se le dió el valor de 100.

ESTUDIO DEL LIQUIDO SINOVIAL

En esta segunda parte del estudio se incluyeron 15 pacientes con GOTA, 9 con PSEUDOGOTA, 9 con ARTRITIS REUMATOIDE, y 7 con ARTROSIS, con el fin de determinar el efecto que la preincubación de los neutrófilos con los líquidos sinoviales obtenidos de las articulaciones afectadas en estos pacientes tienen sobre la producción de superóxido y la fagocitosis por estas células.

Además, en 3 pacientes con GOTA se obtuvo líquido sinovial durante 5 días consecutivos, a partir del comienzo del ataque agudo de gota.

Los experimentos en los que se valoró el efecto del líquido sinovial sobre la generación de superóxido por los PMN se realizaron utilizando líquido sinovial diluido en medio a diferentes concentraciones: 1/5, 1/10, y 1/100, utilizando como control Hanks + BSA.

Aunque la máxima inhibición en la producción de superóxido se obtuvo empleando una dilución 1/5 en prácticamente todas las patologías, en el resto de los experimentos se utilizó la dilución 1/10 porque la inhibición que provocaba esta dilución era significativa, suponía un considerable ahorro de líquido sinovial, y en general, la mayoría de los autores prefieren en experimentos de estimulación-inhibición, concentraciones que se aproximen a la mitad de la concentración que origina la inhibición máxima.

Ensayos de Fagocitosis

Tras ser procesados y diluidos al 1/10, se valoró la capacidad inhibidora de las muestras de líquido sinovial obtenidas de cada uno de los pacientes, sobre la fagocitosis de las partículas de látex fluorescente por parte de los PMN obtenidos de un donante sano.

Para ello, los PMN de sangre periférica separados según el método de Boyum modificado, fueron preincubados con medio de Hanks + BSA o líquido sinovial al 1/10 (según se tratase de muestras control o de estudio) durante 5 minutos, a una temperatura de 37° C.

Transcurrido este tiempo, las partículas de látex fluorescente fueron añadidas, procediéndose a la incubación durante 1 hora a 37° C.

Las muestras fueron preparadas por duplicado, y los resultados fueron valorados por la presencia de partículas de látex intracelulares que fueron contadas por microscopio de fluorescencia, y expresados como inhibición de la fagocitosis de las partículas de látex por los PMN expuestos al líquido sinovial.

En los pacientes con GOTA, las muestras obtenidas secuencialmente durante los días 1 al 5 del ataque agudo fueron procesadas y sometidas a estudios de fagocitosis, que se realizaron inmediatamente después de cada extracción.

Ensayos de producción de superóxido

Alícuotas de líquido sinovial de los mismos pacientes, procesadas de igual modo y diluidos al 1/10, fueron empleados para medir su capacidad inhibidora sobre la generación de superóxido inducida por FMLP por el método de reducción del citocromo C descrito previamente.

Para ello, al igual que en los ensayos de fagocitosis, los PMN obtenidos de un donante sano, y separados por el método de Boyum modificado, fueron preincubados en medio de Hanks o líquido sinovial diluido al 1/10 en el mismo medio, durante 5 minutos, y posteriormente expuestos al FMLP y al citocromo C durante 10 minutos para medir su reducción.

Los ensayos fueron realizados por duplicado, y los resultados medidos por espectrofotometro y expresados como nM de citocromo C reducido/ 10^5 y como tantos por ciento de inhibición de la producción de superóxido, comparando con la generación de superóxido por los PMN expuestos a medio que se igualó con el 0% de inhibición.

En los pacientes con GOTA, las muestras obtenidas secuencialmente durante los días 1 a 5 del ataque agudo, fueron procesados y sometidos a estudios de superóxido inmediatamente después de su obtención.

En ambos tipos de ensayos, de fagocitosis y de producción de superóxido, se realizaron experimentos en los que el líquido sinovial fue previamente tratado con hialuronidasa o calor, no produciéndose modificaciones en los resultados obtenidos.

Análisis del líquido sinovial

Para valorar qué fracción en particular del líquido sinovial era la que daba origen al efecto inhibitor de la fagocitosis y la producción de superóxido por los PMN preincubados con líquido sinovial, que se observó en algunas de las patologías investigadas, se sometió el líquido sinovial de los pacientes con GOTA, PSEUDOGOTA, ARTRITIS REUMATOIDE y ARTROSIS a análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se obtuvieron por este método 4 fracciones de líquido sinovial de diferente peso molecular, que fueron denominadas F₁, F₂, F₃, y F₄.

Este apartado de la investigación fue llevado a cabo en el Laboratorio del Dr. Spilberg, Washington University, St. Louis M.O., por cuya gentileza nos fueron facilitadas las fracciones de líquido sinovial obtenidas.

Investigación del efecto inhibitor de las diferentes fracciones de líquido sinovial sobre la fagocitosis y la producción de superóxido.

Leucocitos PMN obtenidos de donantes sanos fueron incubados con las diferentes fracciones de líquido sinovial obtenidas por HPLC, en las distintas patologías estudiadas, llevándose a cabo ensayos de fagocitosis y producción de superóxido, según protocolos semejantes a los expuestos con anterioridad.

Reactivos

Para el procesamiento de las muestras y la realización de las distintas técnicas fueron necesarios los siguientes productos:

- Heparina sódica al 1%
- Buffer fosfato salino (PBS) 0,15 M (Composición: NaCl 130 mM, KCl 2,65 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM).
- Solución de Hanks con EDTA (Composición: NaCl 130 mM, KCl 5,3 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgSO₄ 0,8 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 4 mM).
- Solución de Dextran (Polímero de la glucosa de peso molecular 510.000) al 6% en buffer PBS.
- Mezcla de separación de células, constituida por Ficoll al 9% e Hipaque sódico. El Ficoll es un polímero de la sacarosa de pm = 400.000. El Hipaque sódico es diatrizoato sódico con acetato cálcico disódico 1:10.000 como estabilizador. La mezcla fue preparada en agua destilada a una densidad de 1077.
- Solución de Hanks enriquecida con seroalbúmina bovina (1 mg/ml).
- Solución de Türk para el recuento de células en la cámara de Thoma (ácido acético glacial, Azul de Metileno o Violeta de Genciana, en agua destilada).
- Resina cubreobjetos.
- Citocromo C de corazón de caballo.
- Buffer fosfato potásico, 0,1 M.
- Superóxido dismutasa.
- FMLP (n-formil-2-metionil-2-leucil-fenilalanina).
- Pepstatina.
- MSU. Cristales de urato monosódico.

Material fungible

Para procesar las muestras se emplearon probetas de teflon y tubos de 50 ml de polipropileno, de fondo cónico, con tapón de rosca, para evitar las adherencias de los granulocitos al cristal.

Procedencia de los reactivos utilizados

El Dextrán, Ficoll, Seroalbúmina bovina, Citocromo C, FMLP, EDTA, Superóxido Dismutasa y Citocalasina B fueron de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO (E.U.A.).

El Hipaque fue de Winthrop Laboratories

RESULTADOS

FUNCION DE LOS POLIMORFONUCLEARES.

La producción espontánea de superóxido por los PMN de sangre periférica de los distintos pacientes tras ser incubados con Hanks, y tras ser estimulados con FMLP, Pepstatina y MSU, calculadas por los nanomoles de citocromo C reducido, fue expresada como tanto por ciento de la obtenida por los polimorfonucleares de su control respectivo, al que otorgamos el valor de 100.

La imposibilidad de contar con controles sanos en los que fuera posible la obtención de líquido sinovial, nos llevó a comparar los resultados obtenidos en la producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide y Artropatías Inflamatorias Seronegativas con la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica de cada uno de los pacientes respectivamente, a la que se le dió el valor de 100.

Producción de superóxido por los PMN de sangre periférica en los pacientes con enfermedad de Behçet (FIGURA 4)

El valor medio de la producción espontánea de anión superóxido por los PMN de sangre periférica de los 15 pacientes con Enfermedad de Behçet fue de $139,02 \pm 23,4$, respecto al valor control.

La producción de superóxido estimulada con FMLP de los PMN de los 15 pacientes con Enfermedad de Behçet presentó un valor medio superior al de la producción espontánea, que fue de $154 \pm 33,13$.

Producción de superóxido por los PMN de sangre periférica de los pacientes con Artritis Reumatoide (FIGURA 4)

En los 15 pacientes con Artritis Reumatoide, el valor medio de la producción espontánea de superóxido por los PMN fue de $92,6 \pm 62,26$.

Tras ser estimulados con FMLP, el valor medio de la producción de superóxido por estos PMN fue de $106,5 \pm 34$, sólo ligeramente superior. Cuando la incubación fue realizada con Pepstatina, el valor medio de la producción de superóxido fue de $107,3 \pm 51,3$, muy similar al obtenido tras FMLP. En el mismo rango se encontró el valor medio de la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica tras ser estimulados con MSU, siendo de $104,33 \pm 56,5$.

Producción de superóxido por los polimorfonucleares de sangre periférica en los pacientes con Artropatías Inflammatorias Seronegativas (FIGURA 4)

La producción espontánea de superóxido por los PMN de sangre periférica de los 15 pacientes con AIS tenía un valor medio de $128,19 \pm 62,26$.

Cuando fueron estimulados, estos PMN mostraron una menor producción de superóxido que la obtenida espontáneamente tras ser expuestos al medio de Hanks. Este valor medio fue de $102,10 \pm 18,8$ cuando fueron incubados con FMLP; de $97,72 \pm 24,2$ tras ser estimulados con Pepstatina; y de $99,59 \pm 19,75$ tras ser estimulados con MSU.

Producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial en los pacientes con Artritis Reumatoide (FIGURA 5)

La producción espontánea de superóxido por los PMN de líquido sinovial en los 15 pacientes con Artritis Reumatoide, comparada con el valor obtenido con los PMN de su sangre periférica igualada a 100, mostró un valor medio de $204,75 \pm 117,17$.

El valor medio de la producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial tras ser estimulados con FMLP, comparado con su equivalente en sangre periférica, fue de $103,18 \pm 50,16$. Tras ser estimulados con pepstatina este valor medio fue de $94,9 \pm 42,65$; y de $60,2 \pm 26$ tras ser estimulados con MSU, comparados con los valores respectivos en sangre periférica.

Producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial de pacientes con Artropatías Inflamatorias Seronegativas (FIGURA 5)

El valor medio de la producción espontánea de superóxido por los PMN de líquido sinovial en los pacientes con AIS, comparándolo con los obtenidos por los PMN de sangre periférica igualado a 100, fue de $120,88 \pm 48,4$.

La producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial tras ser estimulados con FMLP fue superior a la espontánea, con un valor medio de $210,79 \pm 100,23$. Cuando fueron estimulados con Pepstatina, la producción media de superóxido por los PMN de líquido sinovial fue de $226,72 \pm 74,47$. Al ser

estimulados con MSU, el valor medio de la producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial fue de $134,55 \pm 77,27$.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Los valores medios de la producción de superóxido en las distintas poblaciones fueron comparados entre si utilizando el test de la *t de Student* tras ser sometidos los datos a la prueba de las diferencias de las varianzas.

Tras realizar el estudio estadístico se comprobó:

- Que la producción espontánea de superóxido por los PMN de sangre periférica de los pacientes con Enfermedad de Behçet fue significativamente superior que la de los PMN de sangre periférica de los pacientes con Artritis Reumatoide ($p < 0,05$); esta diferencia por el contrario, no alcanzó una significación estadística cuando se compara con la producción espontánea de superóxido de los PMN de pacientes con AIS.
- Igualmente, se observó que la producción de superóxido estimulada con FMLP por los PMN de sangre periférica de los pacientes con Enfermedad de Behçet fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la generada por los PMN de sangre periférica de los pacientes con AIS y AR igualmente estimulados.
- En los pacientes con AIS la producción espontánea por los leucocitos PMN de sangre periférica fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la producción de superóxido por estas células tras ser estimulados con Pepstatina; pero esta diferencia no fue significativa para el resto de los estímulos probados.
- Por otra parte, se detectó una producción espontánea de superóxido por los PMN obtenidos de líquido sinovial de los pacientes con Artritis

Reumatoide que fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la obtenida por los PMN de sangre periférica de estos mismos pacientes. Sin embargo, la producción de superóxido por los PMN de líquido sinovial tras ser estimulados con MSU fue significativamente inferior a la obtenida por los PMN de sangre periférica tras ser expuestos al mismo estímulo. Con los demás estímulos probados los valores fueron semejantes en sangre periférica y en líquido sinovial.

- En el líquido sinovial de los pacientes con AIS, la producción de superóxido por los PMN tras ser estimulados con FMLP, Pepstatina, o MSU, fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la de los PMN de sangre periférica tras ser expuestos al mismo estímulo.

- Los PMN del líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide mostraron una producción espontánea de superóxido que fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la que presentaron tras ser estimulados con cualquiera de los tres estímulos probados. Esta diferencia fue especialmente marcada en el caso de la incubación con MSU, que dio lugar a una producción de superóxido significativamente inferior además ($p < 0,05$) a la observada tras la incubación con FMLP o Pepstatina.

- Por el contrario, los PMN de líquido sinovial de los pacientes con AIS presentaron una producción espontánea de superóxido menor que la observada tras ser estimulados con cualquiera de los estímulos empleados, siendo significativa esta diferencia en el caso del FMLP y la Pepstatina ($p < 0,05$), pero no con MSU.

- La producción espontánea de superóxido por los PMN de líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide fue significativamente

superior a la de los PMN de líquido sinovial de los pacientes con AIS ($p < 0,05$); y, a la inversa, la producción estimulada fue significativamente superior ($p < 0,05$) en los pacientes con AIS que en los pacientes con AR para cualquiera de los estímulos valorados comparados respectivamente.

ESTUDIO DEL LIQUIDO SINOVIAL.

Efecto del líquido sinovial sobre la producción de superóxido por los PMN de donantes sanos

Los resultados obtenidos en los estudios en los que se valoró el efecto del líquido sinovial sobre la generación de superóxido por los PMN fueron expresados en nanomoles de citocromo C reducido/ 10^6 PMN. Además, los valores obtenidos fueron expresados como porcentaje de inhibición de la producción de superóxido por los PMN de un donante sano expuestos al líquido sinovial, comparándolos con el valor de la producción de superóxido por los PMN expuestos al medio de Hanks + BSA, al que se le asignó un valor de inhibición del 0%.

En estos experimentos se emplearon líquidos sinoviales de 15 pacientes con Gota, 9 con Pseudogota, 8 con Artritis Reumatoide, y 7 con Artrosis.

Cuando se midió la producción de superóxido por los PMN tras ser incubados con líquido sinovial de las diferentes patologías a una dilución del 1/10, y con medio de Hanks (FIGURA 6), se observó que la producción de superóxido por los PMN incubados con medio de Hanks + BSA fue de $13,1 \pm 0,6$. Por el contrario, los PMN incubados con líquido sinovial de pacientes con Gota tuvieron una producción de superóxido de $10,2 \pm 0,7$, lo que equivale a una inhibición del $22,33 \pm 1,1 \%$ respecto al control ($p < 0,0001$). Cuando los PMN fueron incubados con líquido sinovial de pacientes con Pseudogota, la producción de superóxido alcanzó un valor de $9,7 \pm 1,6$, lo que supone una inhibición del $26,5 \pm 13$ respecto al control. Sin embargo, cuando los PMN fueron incubados con líquido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide o

Artrosis, la producción de superóxido fue muy similar a la del medio de incubación, con valores de $13,00 \pm 0,8$, y $13,2 \pm 0,9$, respectivamente, y por lo tanto, la inhibición no fue valorable.

Para investigar si este efecto era debido a la presencia de un inhibidor o a la falta de un elemento de ayuda, necesario para la adecuada respuesta celular, realizamos experimentos en los que el líquido sinovial de las distintas patologías investigadas se diluyó a diferentes concentraciones : 1/5, 1/10, y 1/100. Como se ve en la FIGURA 7, la dilución progresiva del líquido sinovial llegó a abolir su capacidad inhibidora. Así, la incubación de PMN con líquido sinovial de pacientes con Gota diluido al 1/5 dio lugar a una inhibición del $49,13 \pm 1,2 \%$ ($6,93 \pm 2,3$ nM de citocromo C reducido), frente al control ($13,69 \pm 0,61$ nM de citocromo C reducido); mientras que el líquido sinovial diluido al 1/10 consiguió una inhibición del 32,3% ($9,26 \pm 0,72$ nM de citocromo C reducido); y cuando la dilución se realizó al 1/100 no se logró ningún efecto inhibitorio ($14,86 \pm 1,13$ nM de citocromo C reducido).

La incubación de los PMN con líquido sinovial de pacientes con Pseudogota, diluido al 1/5, produjo una inhibición del $43,27 \pm 1,3 \%$ ($7,76 \pm 0,71$ nM de citocromo C reducido), frente al $26,16 \pm 2,0 \%$ ($10,1 \pm 1,25$) observado con el líquido sinovial diluido al 1/10; y una inhibición nula con el líquido sinovial al 1/100 ($14,43 \pm 0,90$).

Cuando se estudiaron las muestras de líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide y Artrosis, la inhibición observada no fue significativa para ninguna de las diluciones empleadas. Con el líquido sinovial de Artritis Reumatoide, los valores de producción de superóxido obtenidos fueron: $13,22 \pm 0,8$ con líquido sinovial al 1/5; $13,55 \pm 2,03$ al 1/10; y $13,55 \pm 1,8$ al 1/100.

Estos experimentos ponen de manifiesto que los pacientes con artropatías microcristalinas presentan en el líquido sinovial una sustancia capaz de inhibir la producción de superóxido por los PMN.

Fraccionamiento del líquido sinovial y su análisis

Las muestras de líquido sinovial fueron sometidas a fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obteniéndose 4 fracciones diferentes, cuyos pesos moleculares fueron: F1= 25.000 daltons, F2= 13.000 daltons, F3= 9.000 daltons, y F4= 1.500 daltons. Posteriormente se volvieron a realizar ensayos de producción de superóxido con las diferentes fracciones obtenidas, con los resultados que se presentan en la FIGURA 8, en la que se demuestra que la capacidad inhibidora está restringida a la fracción F2, con la que se consiguió un valor de inhibición del $25,9 \pm 5,4$ % en el caso del líquido sinovial de los pacientes con Gota, y del $30,9 \pm 5,1$ en el líquido sinovial de Pseudogota. El resto de las fracciones obtenidas en estas patologías no ejercieron efecto inhibidor sobre la producción de superóxido. En el caso de los líquidos sinoviales de pacientes con Artritis Reumatoide y Artrosis, ninguna fracción mostró un efecto inhibitorio significativo.

En los tres pacientes con Gota en los que fue posible la obtención de líquido sinovial a lo largo de 5 días consecutivos a partir del comienzo del ataque agudo de Gota, se pudo comprobar (FIGURA 9)) que esta capacidad de inhibición aparecía de modo progresivo. En el primero de los pacientes, el porcentaje de inhibición aumentó desde el 10,8% el día primero, al 40,1% el quinto día; en el segundo de los pacientes, el porcentaje de inhibición fue desde un 14,6% al comienzo del ataque agudo hasta un 36,2% el quinto día; y en el tercer paciente, desde un 3,1% hasta un 35,3% al final del estudio.

Efecto del líquido sinovial sobre la Fagocitosis por los PMN de donantes sanos

Los resultados obtenidos cuando se estudió la fagocitosis por los PMN de donantes sanos incubados con líquido sinovial de las distintas patologías, diluidos al 1/10 fueron expresados como porcentaje de partículas de látex ingeridas, y como tanto por ciento de inhibición de dicha fagocitosis comparándola con la obtenida por los PMN de donantes sanos incubados con medio de Hanks, a la que se le asignó un valor de inhibición de 0%.

En estos ensayos se examinó el líquido sinovial de 15 pacientes con Gota, 9 con Pseudogota, 9 con Artritis Reumatoide, y 7 con Artrosis.

Cuando se midió la fagocitosis de las partículas de látex por los PMN incubados con líquido sinovial al 1/10 y con medio de Hanks (FIGURA 10), se observó que los PMN control presentaban una fagocitosis de $75,8 \pm 6,1\%$, mientras que los PMN incubados con líquido sinovial de pacientes con Gota tenían un valor de fagocitosis del $52,1 \pm 3,6 \%$, lo que equivale a una inhibición del $31,3 \pm 3,5 \%$ respecto al control ($p < 0,001$). Los PMN incubados con líquido sinovial de pacientes con Pseudogota tenían un porcentaje de fagocitosis del $51,1 \pm 3,9 \%$, lo que suponía una inhibición del $32,5 \pm 2,0 \%$ respecto al control ($p < 0,01$).

La fagocitosis conseguida por los PMN de pacientes con Artritis Reumatoide y Artrosis fue del $74,7 \pm 1,0 \%$ y $71,8 \pm 2,3 \%$ respectivamente, lo que equivale a unas inhibiciones que no fueron significativas estadísticamente.

Fraccionamiento del líquido sinovial

Cuando se estudió la inhibición de la fagocitosis conseguida al incubar los PMN con las diferentes fracciones de líquido sinovial conseguidas por HPLC, se observó que solamente la fracción F2 producía una inhibición valorable de la fagocitosis, y sólo, en los líquidos sinoviales de pacientes con Gota y Pseudogota, pero no en los de Artritis Reumatoide y Artrosis (FIGURA 11). Esta inhibición fue del $20,8 \pm 2,3$ en los líquidos sinoviales de pacientes con Gota ($p < 0,0005$), y del $24,4 \pm 4$ en los de Pseudogota ($p < 0,0005$). El resto de las fracciones no mostró una inhibición valorable y ninguna de ellas tuvo un efecto inhibitor en el caso del líquido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide y Artrosis.

En los 3 pacientes con Gota en los que fue posible el estudio secuencial durante 5 días (FIGURA 9), se obtuvieron los siguientes resultados: en el primero de ellos, el porcentaje de inhibición de la fagocitosis varió desde un $24,3 \pm 3,1$ % el primer día hasta un $48,9 \pm 1,1$ % el quinto día; en el segundo de los pacientes, el porcentaje de inhibición al comienzo del ataque agudo fue del $20,8 \pm 2,9$ % y al quinto día del $48,9 \pm 4,3$ % y, en el tercero de los pacientes, la inhibición de la fagocitosis fue desde el $14,0 \pm 1,7$ % el primer día hasta el $31,3 \pm 7,3$ % el último día del estudio.

PRODUCCION DE O₂⁻ POR LOS PMN DE SANGRE PERIFERICA

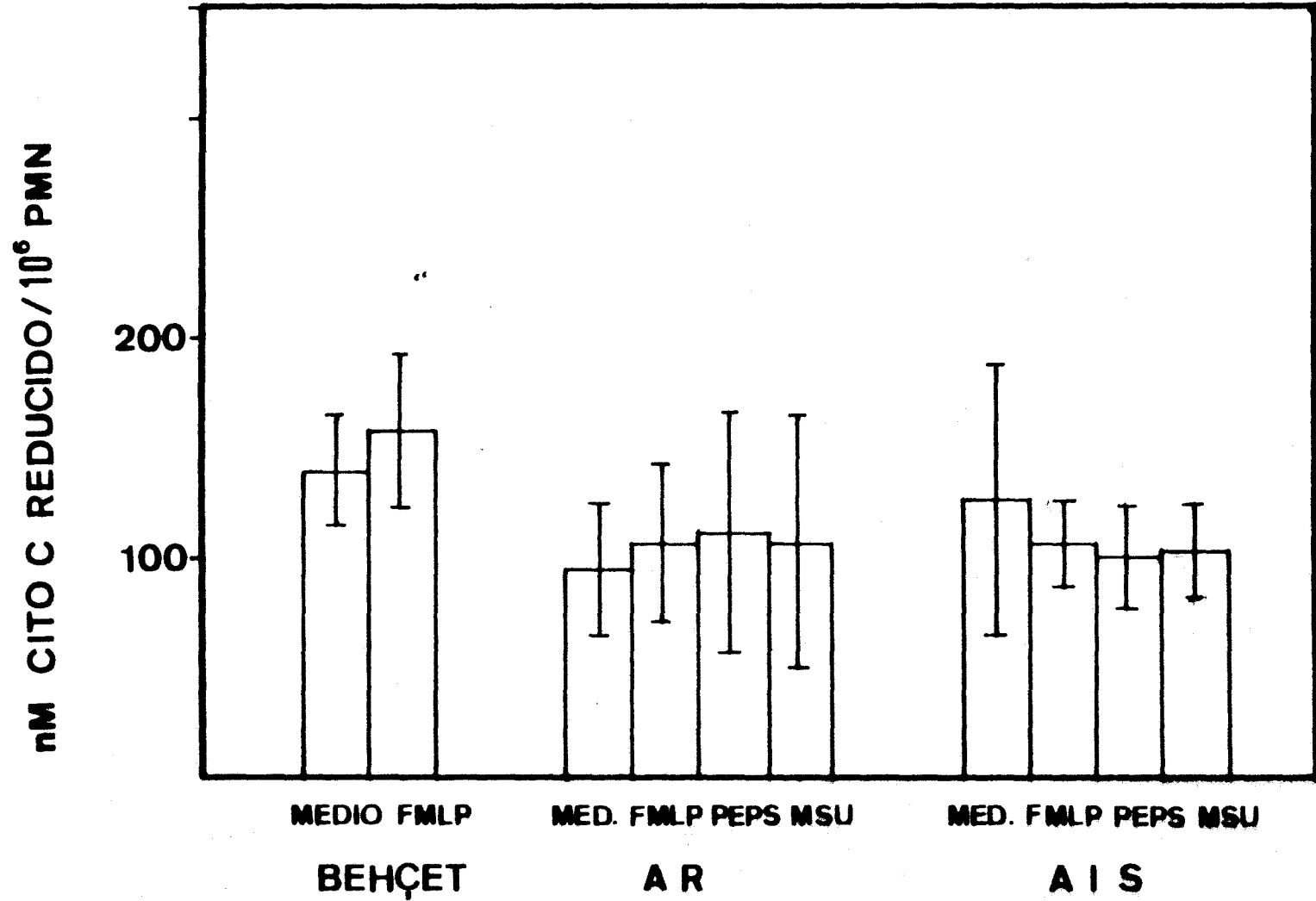


fig. 4

PRODUCCION DE O₂ POR LOS PMN DE LIQUIDO SINOVIAL

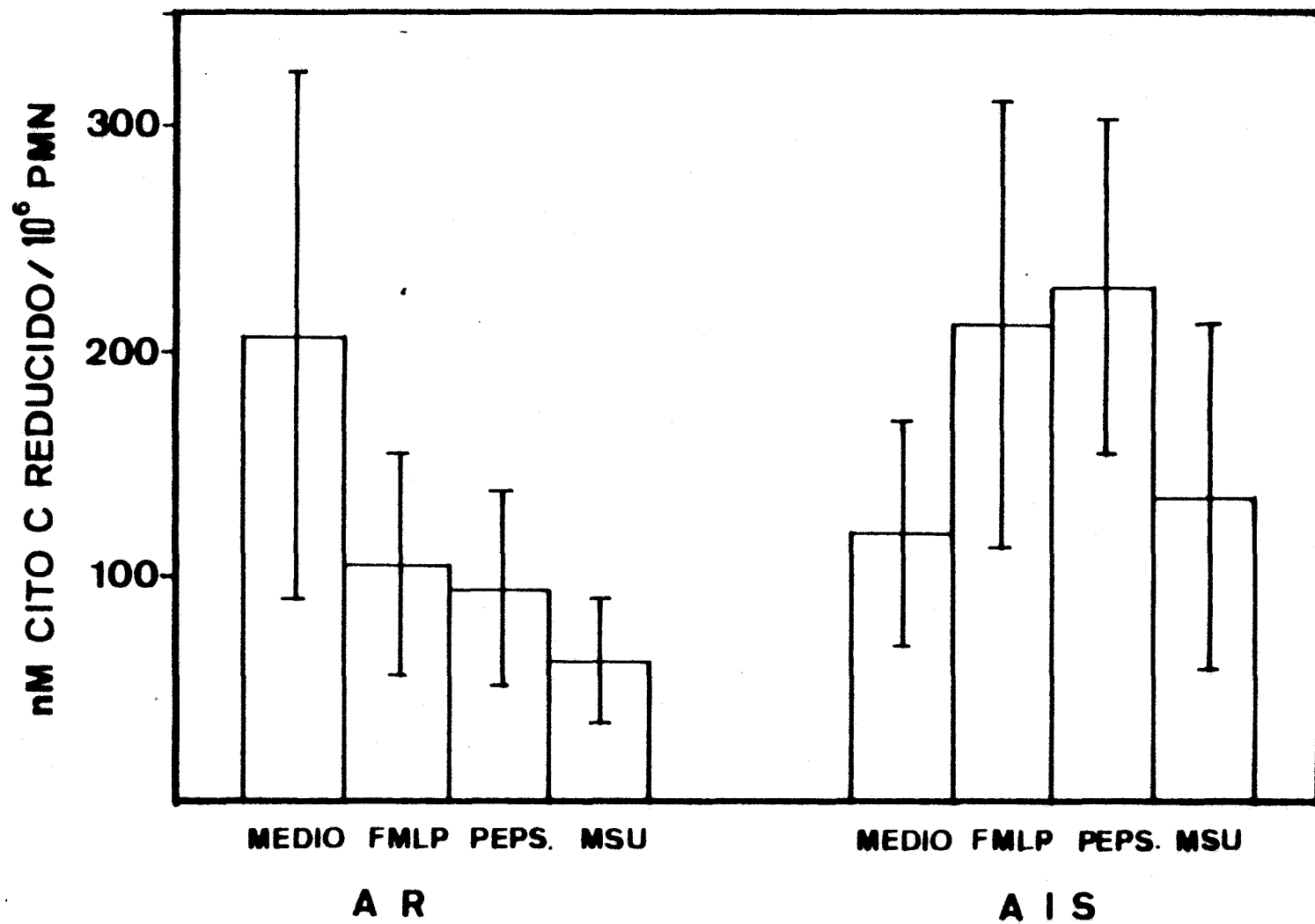
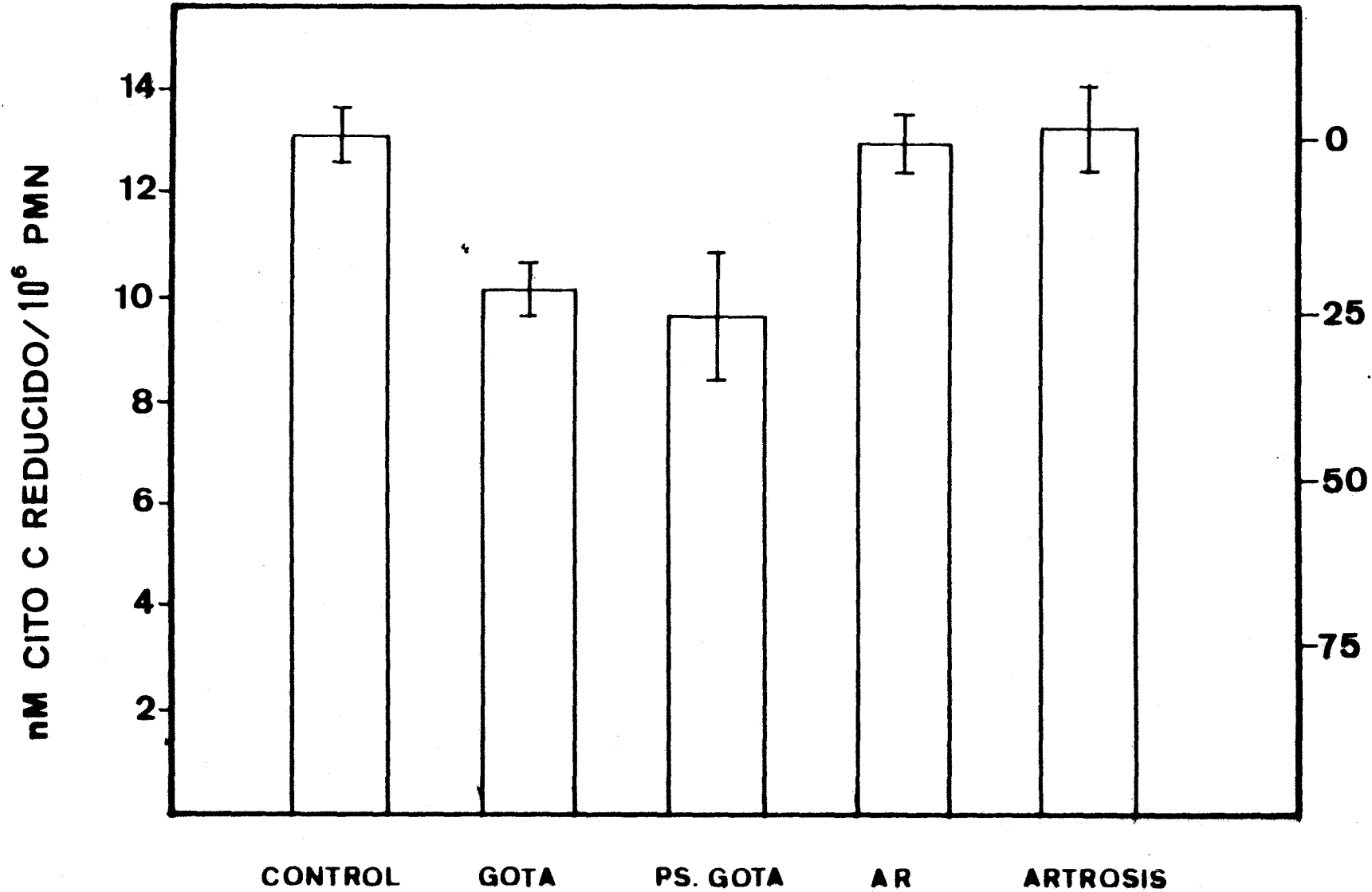


fig.5

INHIBICION DE LA PRODUCCION DE O_2^- POR EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON GOTA Y PSEUDOGOTA



INHIBICION %

fig. 6

INFLUENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LIQUIDO SINOVIAL SOBRE LA PRODUCCION DE O₂ POR LOS PMN

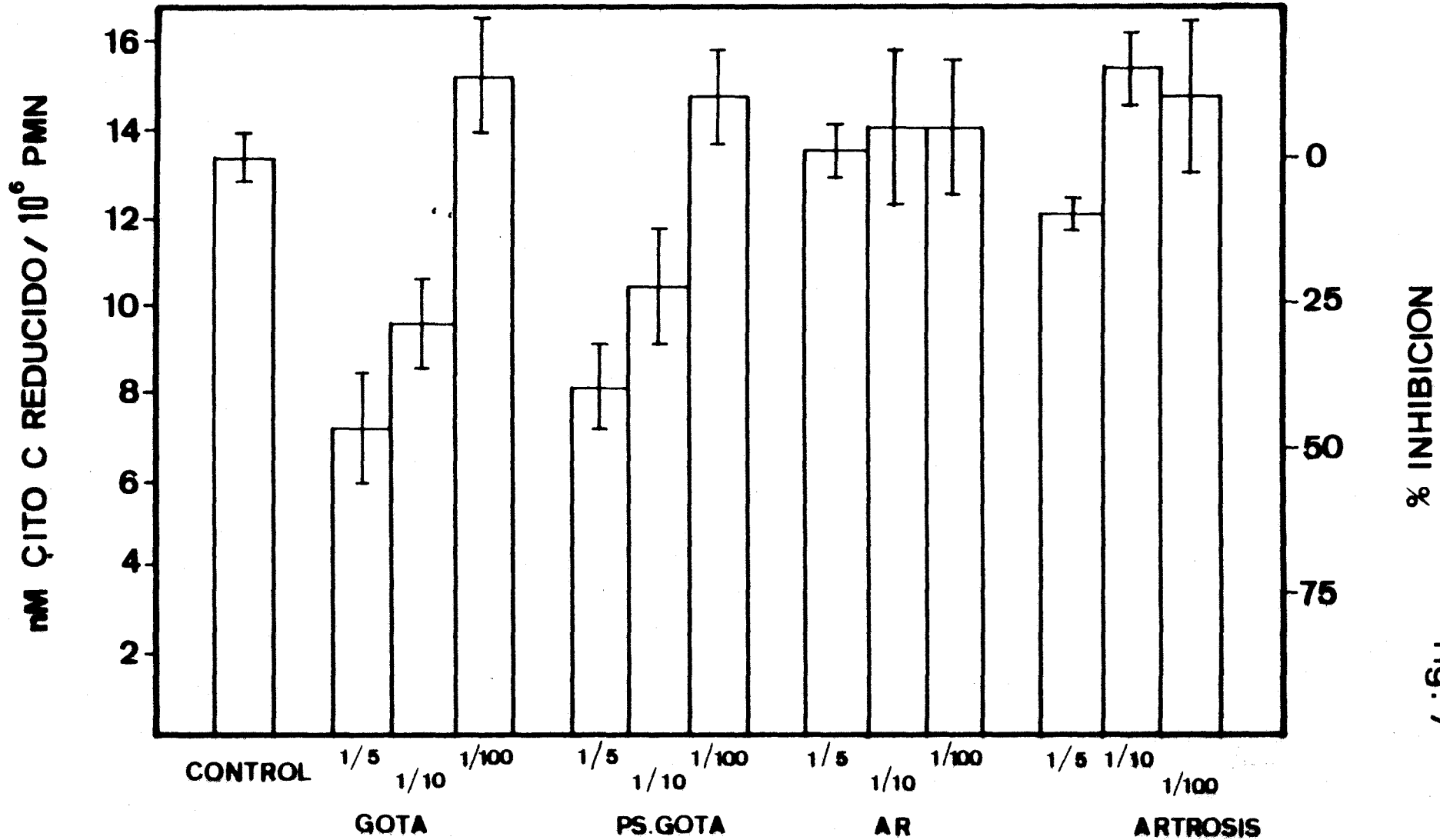


fig. 7

EFFECTO DE LAS FRACCIONES DE LIQUIDO SINOVIAL
SOBRE LA PRODUCCION DE O₂ POR LOS PMN

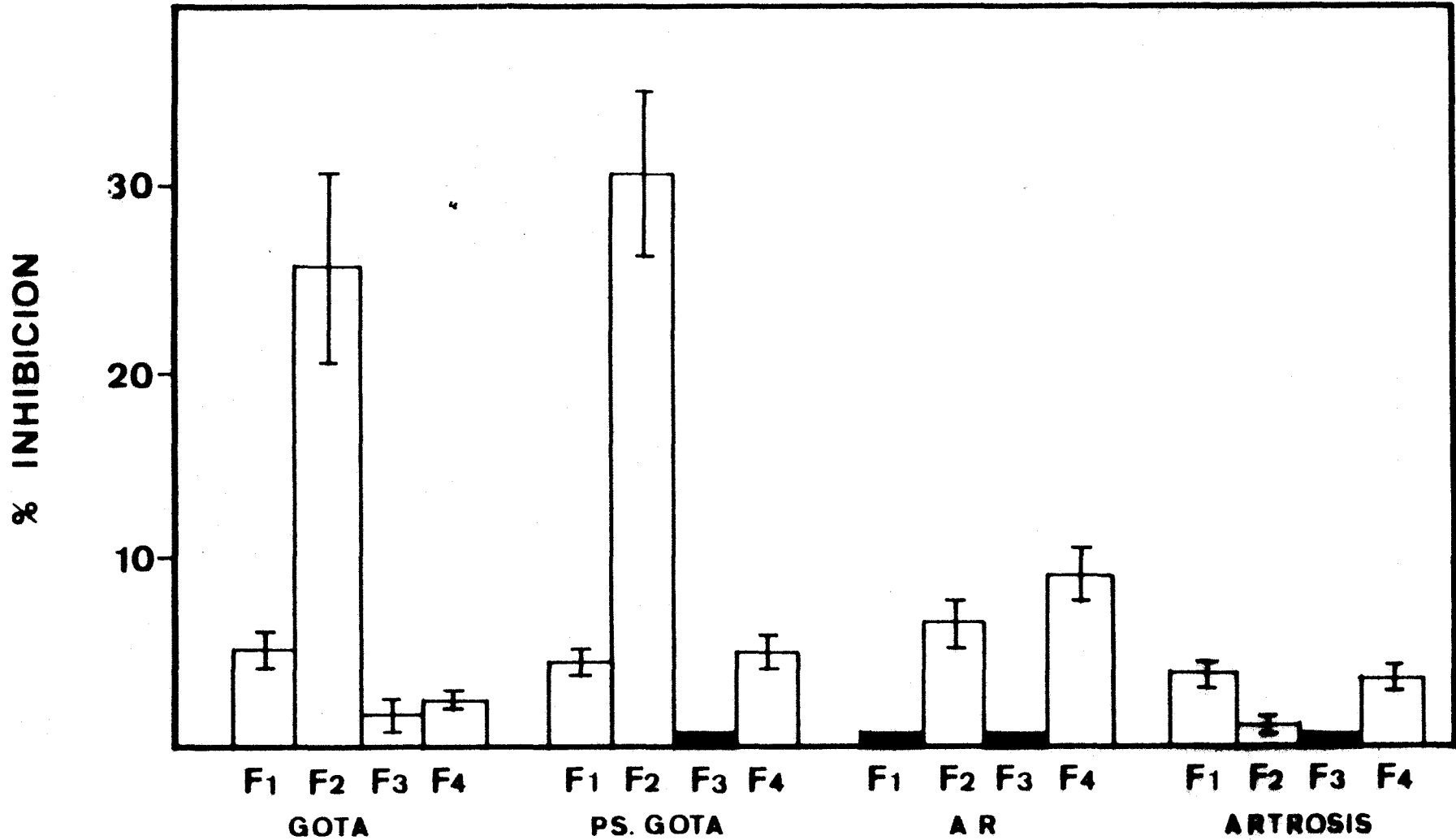


fig. 8

INHIBICION DE LA PRODUCCION DE O_2 Y DE LA FAGOCITOSIS POR MUESTRAS SECUENCIALES DE LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON GOTA AGUDA

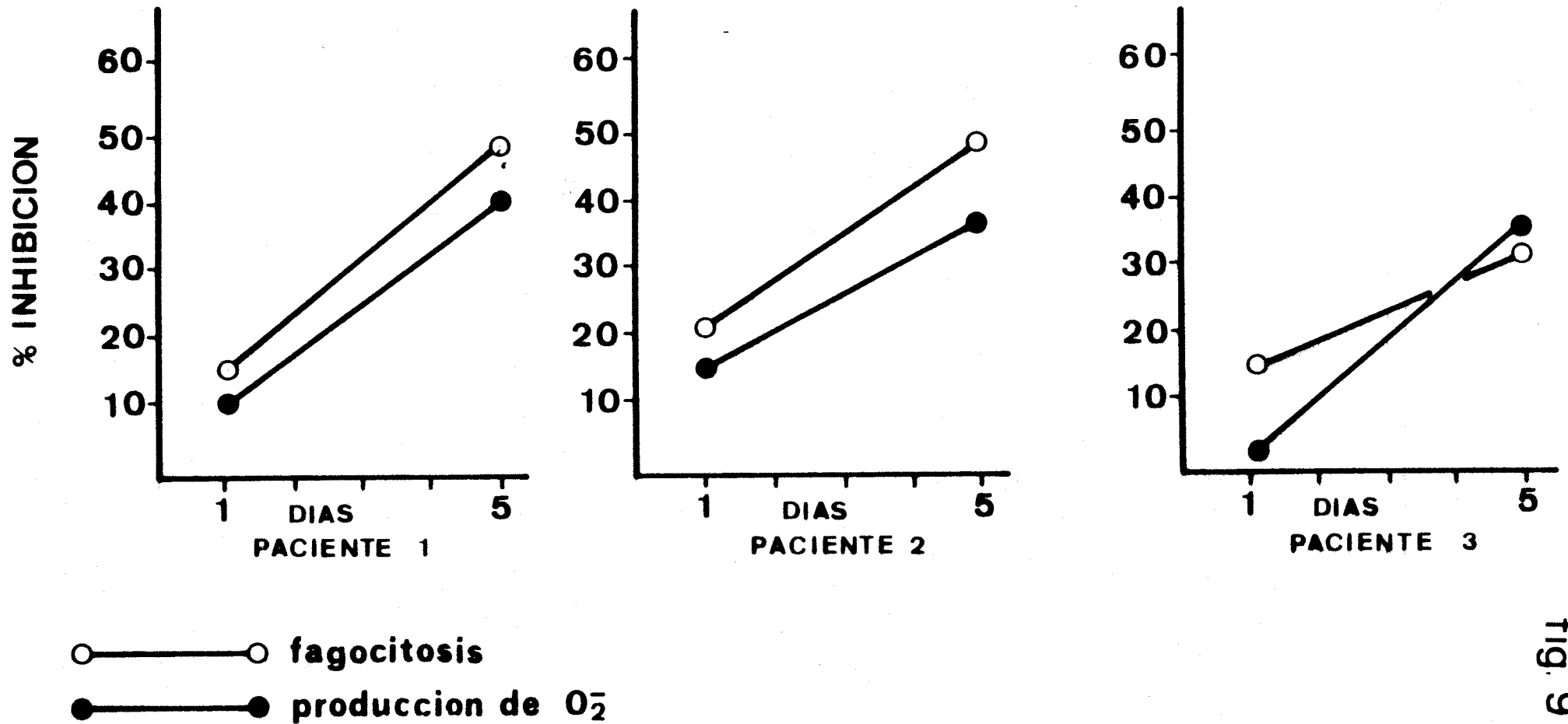
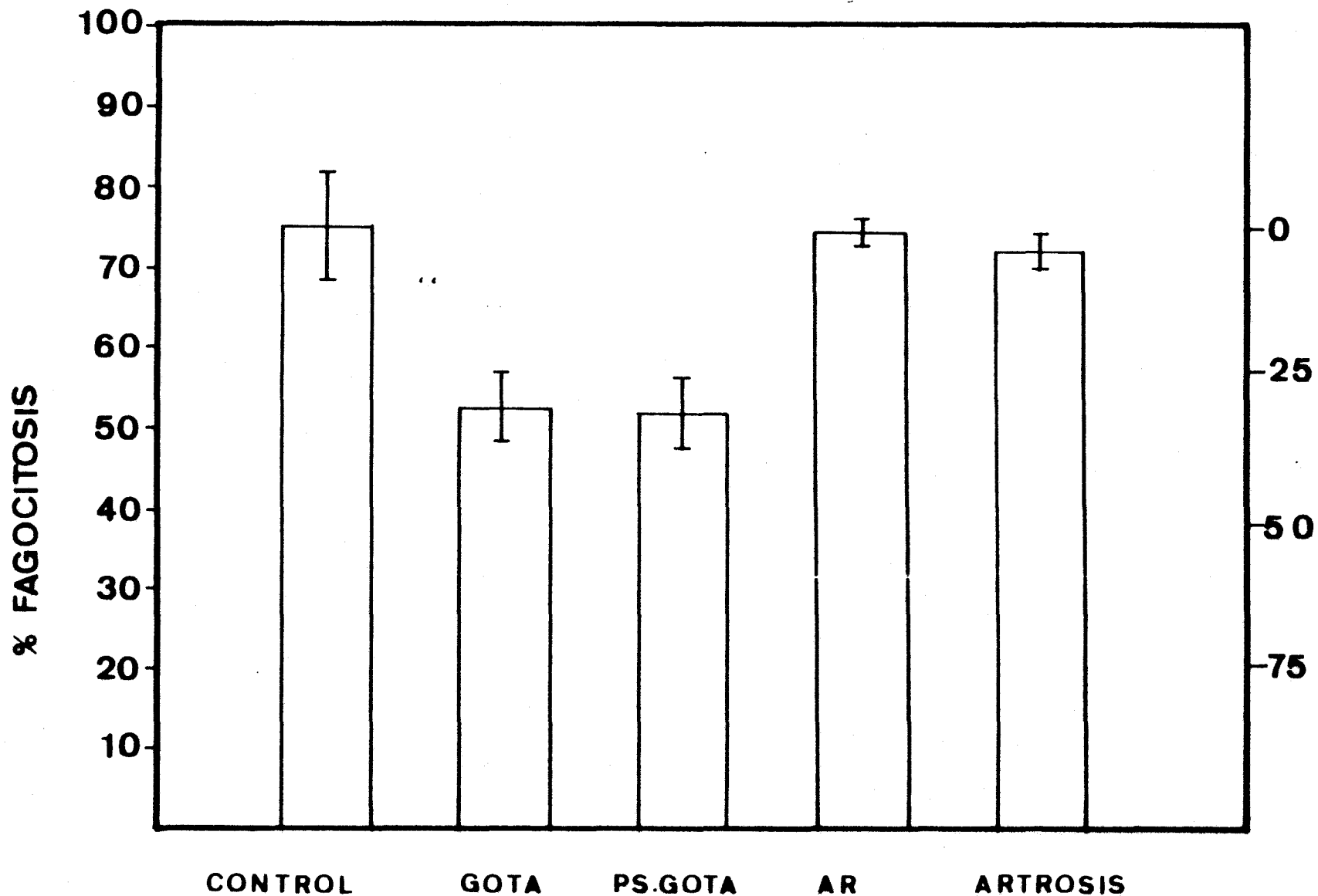


fig. 9

INHIBICION DE LA FAGOCITOSIS DE LOS PMN POR EL LIQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES CON GOTA Y PSEUDOGOTA



INHIBICION %

fig.10

EFFECTO DE LAS FRACCIONES DE LIQUIDO SINOVIAL SOBRE LA FAGOCITOSIS DE LOS PMN

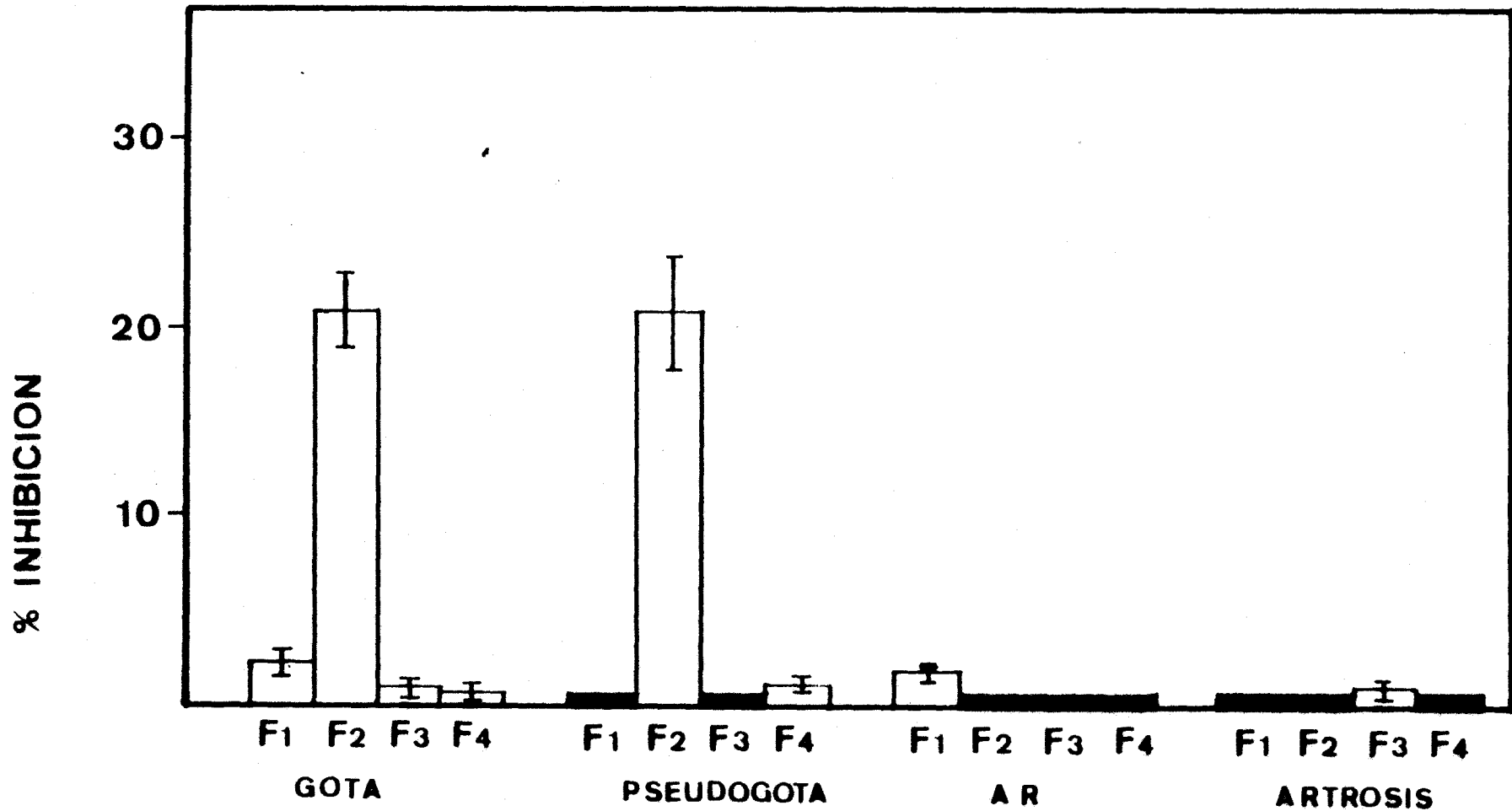


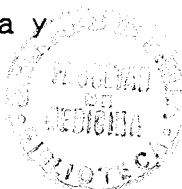
fig. 11

DISCUSSION

En el presente trabajo hemos estudiado diferentes tipos de artropatías. Una artritis, como es la Artritis Reumatoide, en la que el daño articular es precoz e importante; otros procesos, como la Gota y la Pseudogota, en los que el daño articular sólo aparece tras muchos brotes repetidos de la enfermedad, y por último, pacientes con Artrosis, enfermedad en la que el daño articular es de evolución muy lenta. Además, hemos estudiado pacientes con Enfermedad de Behçet, y un grupo de Artropatías Inflamatorias Seronegativas no filiadas. En estos dos grupos últimos de pacientes no nos ha sido posible llevar a cabo todos o algunos de los experimentos planteados con líquido sinovial, ya que la cantidad disponible no era suficiente para los estudios que nos habíamos propuesto.

Si bien los datos obtenidos en los estudios de producción de superóxido por los PMN revelan algunas diferencias que analizaremos posteriormente, creemos que el hallazgo más interesante es la demostración de la presencia de un inhibidor del proceso inflamatorio en las artropatías por cristales, Gota y Pseudogota.

En la Enfermedad de Behçet hemos encontrado que la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica es significativamente superior a la de los controles sanos. Igualmente, fue significativamente superior a la encontrada en los pacientes con Artritis Reumatoide, mientras que fue superior, pero no de forma significativa, a la observada en las Artropatías Inflamatorias Seronegativas. Por otra parte, la producción de superóxido por los PMN de pacientes con Enfermedad de Behçet estimulados con FMLP, también fue significativamente superior a la observada en los pacientes con AR y AIS. Resultados concordantes con los encontrados por nosotros en este sentido han sido publicados previamente por otros autores. Sin embargo, en general los estudios sobre la capacidad funcional de los PMN en estos pacientes muestran



resultados contradictorios (94, 95), y en concreto, en los estudios de liberación de superóxido, algunos autores, como Sobel et al. (96), encontraron una disminución en la reducción del nitroazul de tetrazol; Niwa y Sakane (97) encontraron un incremento en la producción de superóxido; y Friman y Davis (97) no han encontrado diferencias significativas. En general, en las series más amplias, especialmente en las de Japón, se describe una hiperfunción de los PMN (99). Así por ejemplo, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (100) se ha observado un incremento en la liberación espontánea de superóxido en los pacientes con Enfermedad de Behçet en actividad respecto a los controles sanos, pero no en la producción de superóxido por los PMN estimulados con FMLP.

Se han postulado varias hipótesis para explicar este incremento en la producción de superóxido, entre ellas la estimulación de los PMN por inmunocomplejos. Es bien sabido que estos pacientes, especialmente durante los brotes de la enfermedad, presentan un incremento de inmunocomplejos circulantes. Estos, al ser fagocitados por los PMN pueden originar una liberación espontánea de superóxido. Sin embargo, en nuestro trabajo previo la producción espontánea de superóxido en los pacientes con Enfermedad de Behçet en remisión, y la producción estimulada, tanto durante la fase activa como en remisión fueron normales. Estos resultados discrepan de los observados en la presente serie, en la que la producción de superóxido por los PMN estimulados con FMLP fue significativamente superior a la de los controles sanos, aunque la diferencia no fue significativa con respecto a su propia producción espontánea. Este hecho, junto con la presencia en la Enfermedad de Behçet de fenómeno patérgico o de hipersensibilidad cutánea (100), dato que no ha sido tenido en cuenta en el estudio actual, creemos que justifica la hipótesis de que la hiperfunción de los PMN juega un papel importante en la etiopatogenia de esta enfermedad. De hecho, son varios los fármacos con

capacidad para inhibir la función de los PMN que se muestran eficaces en el tratamiento de algunas de las manifestaciones de esta enfermedad, p.e. la colchicina, algunos antiinflamatorios y los corticosteroides (101). En nuestra serie no hemos determinado la presencia o no de fenómeno patérgico en estos pacientes, por lo que no podemos discutir la posible relación entre su positividad y la existencia o no de hiperfunción celular. Sin embargo, en un trabajo previo (100) hemos observado coincidencias en el nivel de actividad celular, valorado por la medida de la quimiotaxis, entre miembros de una misma familia, lo que nos hace pensar en la existencia de un factor genético en la patogénesis de la enfermedad. En este sentido se ha descrito un aumento de la quimiotaxis en pacientes con espondilitis anquilosante, pero sólo en los que presentaban un HLA-B27 positivo (102). Esta teoría también se ve apoyada por la variabilidad del fenómeno patérgico, cuya importancia como criterio diagnóstico en la enfermedad de Behçet es muy discutida, ya que su presencia es muy variable, con una incidencia completamente distinta entre diferentes estudios.

Por último, queremos hacer constar que en los pacientes seleccionados en el presente estudio, el diagnóstico de enfermedad de Behçet se realizó según los criterios de O'Duffy (TABLA 4), que estaban vigentes cuando se comenzaron a estudiar los primeros pacientes incluidos en nuestra población de estudio. Sin embargo, a partir de entonces, se han venido utilizando diferentes criterios diagnósticos (103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111). Recientemente, se ha formado un grupo de estudio internacional con el fin de establecer unos criterios diagnósticos para la enfermedad de Behçet aceptados internacionalmente (112). Los nuevos criterios requieren la presencia de ulceración oral más 2 de los siguientes hallazgos: úlceras genitales, lesiones oculares definidas típicas, lesiones cutáneas definidas típicas, o una prueba de hiperactividad cutánea (fenómeno patérgico) positivo.

La Artritis Reumatoide es el paradigma de las artritis inflamatorias, en la que la destrucción articular es en muchos casos progresiva e invalidante. En nuestro estudio, la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica no se ha diferenciado básicamente de la del control sano, ni en el caso de la producción espontánea ni cuando los PMN fueron enfrentados a un estímulo. Por el contrario, al estudiar la producción de superóxido por los PMN obtenidos de líquido sinovial de estos pacientes se observó un incremento en la producción espontánea de superóxido, mientras que la producción estimulada se encontraba disminuida, comparándolas con los valores de PMN de sangre periférica. Es decir, los PMN del líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide están continuamente activados, y de algún modo mal regulados, ya que no son capaces de responder adecuadamente a estímulos específicos. Estas diferencias encontradas entre los PMN de líquido sinovial y sangre periférica, no pueden deberse solamente a la diferente procedencia de los PMN, ya que los PMN de líquido sinovial de las Artropatías Inflamatorias no se comportan igual, sino que son diferencias que pueden deberse al proceso inflamatorio en sí mismo.

La revisión de la literatura sobre este tema, pone de manifiesto la disparidad de resultados obtenidos, aunque la mayoría de los autores han encontrado incrementos de la producción espontánea de superóxido (113, 114, 115, 116). No obstante, Davis y colaboradores (117) en un reciente trabajo han publicado que la producción basal y la estimulada son normales cuando los PMN están recién aislados; pero a las 24 horas de cultivo, la producción basal disminuye y la espontánea aumenta.

Varias críticas pueden hacerse a este trabajo. En primer lugar, la producción basal que ellos encuentran la consideran normal. Verdaderamente está aumentada, pero por la gran dispersión de datos no encuentran

diferencias sig-nificativas. Lo mismo puede decirse de la producción estimulada. De hecho, estos mismos autores, al estudiar los niveles de mieloperoxidasa encuentran que los PMN de los pacientes con Artritis Reumatoide presentan una mayor actividad extracelular, y menor actividad intracelular, es decir, los PMN están activados *in vivo*. Por otro lado, el método que emplean (la quimioluminiscencia) determina no sólo la producción de superóxido, sino también la de otros radicales tóxicos del oxígeno. El método empleado por nosotros, la reducción del citocromo C, es más específico para determinar los niveles de superóxido.

Este hallazgo creemos que puede tener importancia, ya que nos permite suponer que los PMN de estos pacientes están activados *in vivo* en el líquido sinovial, pero no en sangre periférica. Esta constante activación puede justificar la cronicidad y la agresividad de la enfermedad.

Existen diversas explicaciones que justificarían estas observaciones:

1.- Es bien sabido que los pacientes con Artritis Reumatoide forman inmunocomplejos en el líquido sinovial. La reacción de los antígenos con los anticuerpos en los tejidos articulares compromete la secuencia del complemento dando lugar a unos niveles reducidos de complemento en el líquido sinovial, a una permeabilidad vascular incrementada, y a un acúmulo de elementos celulares sanguíneos. Los leucocitos PMN atraídos por los factores quimiotácticos derivados del complemento, ingieren los complejos dando lugar a la liberación de grandes cantidades de enzimas hidrolíticas, radicales derivados del oxígeno, y metabolitos del ácido araquidónico que son en gran medida responsables de la inflamación, y en parte del daño articular. Es posible por lo tanto, que los PMN de estos pacientes fagociten continuamente estos complejos que una vez en el interior de la célula van a actuar como un estímulo permanente para

la inflamación (117). Esta hipótesis ha sido apuntada por otros autores (118).

2.- Que en el líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide existan algunas sustancias específicas capaces, una vez que entran en contacto con los PMN, de estimularlos de una manera permanente. En este sentido, es interesante comentar que en el líquido sinovial de estos pacientes se ha detectado la presencia de una sustancia que se ha denominado PLAP (Proteína activadora de la fosfolipasa A2) (119, 120). El PLAP es una sustancia con similitud antigénica con la melitina (veneno de abeja). Está presente en el líquido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide, pero no en el de otros pacientes con artropatías inflamatorias, por lo que se le considera específico de esta enfermedad. Es capaz de producir superóxido, liberar enzimas y es quimioquinética, aunque no quimiotáctica. Además, origina agregación de los neutrófilos (fase inicial de la activación de los PMN). Pero a diferencia de la melitina no origina lisis celular, sino que simplemente activa a los neutrófilos permaneciendo posteriormente viables estas células (121). Es posible por tanto, que los neutrófilos estén activados in vivo como consecuencia del efecto del PLAP.

3.- Es posible, que esta activación in vivo de los PMN no pueda atribuirse únicamente a un factor, sino a un efecto de varios mediadores de la inflamación, tales como la fracción C5a del complemento, interleukinas o factor reumatoide.

Los hallazgos encontrados en los pacientes con A.I.S. cuando se estudió la producción de superóxido por sus neutrófilos de sangre periférica y líquido sinovial son poco concluyentes. Este grupo de pacientes ha resultado ser

excesivamente heterogéneo y aunque han sido incluidos bajo un mismo epígrafe, no constituyen en sí mismo un grupo del que podamos obtener conclusiones.

El dato patogénico inicial, aunque no suficiente de la gota aguda y la pseudogota es la presencia de cristales de urato y de pirofosfato cálcico respectivamente, en el espacio articular (122, 123). Dichos cristales, al ser fagocitados por los PMN, que constituyen el otro elemento imprescindible para la génesis del ataque agudo de gota (124) originan factores quimiotácticos, liberación de superóxido, de enzimas y leucotrienos, poniéndose en marcha la reacción inflamatoria (125). Así como existen numerosos estudios sobre el mecanismo en virtud del cual los cristales de urato pueden desencadenar la crisis aguda de gota, hay muy pocos trabajos publicados sobre los factores que desempeñan un papel en la resolución espontánea del proceso inflamatorio.

La resolución espontánea de la crisis aguda de gota se ha atribuido a varios mecanismos teóricos (126, 127).

El análisis de líquido sinovial durante los últimos estadios de la crisis demuestra que, aunque haya PMN y cristales, estos ya no se hallan dentro de las células, lo que indica que se ha detenido la fagocitosis. Este hecho ha provocado la búsqueda de inhibidores que modifiquen las propiedades "inflamatorias" de dichos cristales, o la capacidad de reacción de los PMN, y que podría generarse en el seno de la articulación o acceder a ella desde los vasos sanguíneos.

En este sentido, nuestros resultados ponen de manifiesto que los pacientes con artropatías cristalinas, GOTA y PSEUDOGOTA, presentan en el líquido sinovial una sustancia capaz de inhibir la producción de superóxido y la fagocitosis por los PMN, como lo demuestra el hecho de que la incubación de

los PMN con LS de pacientes con gota y pseudogota origina una reducción significativa de la producción de superóxido y de la fagocitosis comparándolos con el control. La presencia de un inhibidor queda demostrada además por el hecho de que al diluir el LS a diferentes concentraciones: 1/5, 1/10, y 1/100, y posteriormente incubar las células con las diferentes concentraciones, se observó que el efecto inhibidor se iba reduciendo a medida que disminuía la concentración de líquido sinovial, hasta llegar a desaparecer con una dilución 1/100. Este hecho parece indicar que la resolución del ataque agudo de gota se debe a la presencia de una sustancia con capacidad inhibidora, y no a la falta de una sustancia necesaria para la estimulación celular. Por el contrario, esta inhibición de la producción de superóxido y de la fagocitosis no se observó cuando los PMN fueron preincubados con líquido sinovial de pacientes con AR y Artrosis.

La inhibición de la fagocitosis, que se ha atribuido al factor quimiotáctico (128) tiene como resultado la obtención de la generación de factores quimiotácticos y el cese del aflujo de PMN que contribuye a la finalización de la crisis.

Otras hipótesis han sido planteadas para explicar la forma de evolución observada en las crisis de Gota.

Puesto que en los lisosomas se observa una destrucción considerable de los cristales de MSU ingeridos, la finalización del proceso inflamatorio se ha atribuido al efecto de la mieloperoxidasa de los PMN fagocitantes, que disminuye así la cantidad de cristales liberados por las células rotas que podrían perpetuar el proceso inflamatorio. La observación de la absorción de las enzimas lisosómicas por los cristales de MSU aumenta las posibilidades de que dichas enzimas en el líquido articular de la gota se unan al MSU y puedan influir en el curso de la crisis de gota (129).

El recubrimiento proteico de los cristales de urato monosódico puede desempeñar un papel importante. La unión de IgG parece potenciar la producción de radicales de oxígeno y la degranulación de los PMN y protege la membrana celular del efecto lítico de los cristales (130). Por otro lado, el revestimiento de los cristales de MSU con suero, plasma o albúmina parece suprimir la actividad productora de radicales de oxígeno por los cristales.

La mayoría de las proteínas plasmáticas se hallan presentes en el líquido sinovial, por lo que muchos autores han estudiado los efectos que los componentes plasmáticos tienen sobre la interacción ácido úrico-PMN. Algunos autores han sugerido que la LDL puede inhibir la interacción entre estos dos componentes necesaria para la aparición del ataque agudo de gota. Munian y cols. han estudiado el efecto que la LDL tiene sobre la producción de superóxido por los neutrófilos durante la interacción cristal de ácido úrico-PMN, confirmándose un efecto inhibitorio de la LDL sobre la producción de superóxido que parece ser debido a sus efectos sobre los cristales. Esos autores postulan que en el transcurso de una artritis gotosa aguda, como consecuencia del incremento de la permeabilidad sinovial, se elevan los niveles articulares de LDL, y esta apolipoproteína, a través de un efecto inhibitorio sobre la fagocitosis de los cristales contribuye a que se autolimita el ataque de gota.

Aunque estos factores pueden proporcionar una explicación plausible de la naturaleza autolimitada de la crisis de gota, no se ha definido todavía la secuencia exacta de hechos, ni el papel preciso que cada factor desempeña.

La interacción de los cristales de MSU-PMN se asocia con la producción de radicales libres de oxígeno, que son citotóxicos y tienen una gran capacidad de producir lesión hística, exacerbada por la liberación de enzimas lisosómicas

y la activación de los mediadores químicos de la inflamación. Así pues, los radicales libres del oxígeno pueden añadirse a la lista de mediadores que participan en la inflamación gotosa.

Parece ser que la exposición a los radicales libres del oxígeno determina unas alteraciones en el tamaño de los cristales de MSU, mientras que ejerce poco efecto, si es que ejerce alguno, sobre los cristales de pirofosfato cálcico dihidratado o de hidroxapatita (131). Este hallazgo ha sido confirmado por estudios bioquímicos, ultraestructurales y colorimétricos. Teniendo en cuenta estos datos y la caída progresiva en el número y el tamaño de los cristales, así como la disminución de la inflamación durante la evolución de la artritis gotosa, puede elaborarse una hipótesis mediante la cual, durante la crisis aguda de gota la producción de radicales libres de oxígeno por los PMN estimulados por los cristales de MSU tiene como resultado una reducción en el tamaño y una disolución progresiva de los cristales, de tal forma que los convierte en "inactivos".

Puesto que la dimensión de los cristales puede modificar el grado de producción de los radicales citotóxicos, la disminución progresiva de los efectos producidos por estos factores puede explicar la resolución del proceso inflamatorio. Por otro lado, los radicales libres del oxígeno pueden desnaturar las gammaglobulinas, lo que tienen como resultado una reducción adicional de la producción de superóxido por los PMN estimulados por los cristales recubiertos con la IgG modificada, contribuyendo así a la finalización del ataque agudo de gota.

Un dato que consideramos de interés en nuestro estudio es el hecho de que al incubar líquido sinovial de pacientes con Gota obtenido secuencialmente durante 3 días a partir del comienzo del ataque agudo, se observó que la

capacidad de inhibición sobre ambas funciones celulares aparecía de forma progresiva, lo que podría apoyar la hipótesis del papel de un inhibidor de la función celular que participaría en la naturaleza autolimitada del ataque agudo de gota. Estudios realizados por otros autores (132) muestran datos que coinciden con los encontrados por nosotros.

Respecto a la naturaleza de este inhibidor que se halla presente en el líquido sinovial de pacientes con Gota y Pseudogota, en 1969, Phelps (133) publicó la observación de que los PMN que han fagocitado cristales de urato *in vitro* liberan una sustancia que es quimiotáctica para otros PMN. Desde entonces, la investigación sobre este tema ha sido amplia, centrándose en el papel primario que este factor quimiotáctico inducido por cristales (CCF) desempeña en el desarrollo de las artritis agudas inducidas por cristales.

Cuando los PMN humanos o de conejo fagocitan los cristales de pirofosfato cálcico o de urato, sintetizan una glicoproteína quimiotáctica (CCF) (134, 135). Esta síntesis es inhibida fácilmente por la actinomicina D o la cicloheximida a concentraciones que no tienen efecto sobre la fagocitosis o la viabilidad celular inmediata (134). Los experimentos de fraccionamiento subcelular indican que, aunque un tercio de la actividad está presente en el sobrenadante de la mezcla de incubación de células- cristales, la mayoría se encuentra en la fracción lisosomal. El peso molecular de la banda quimiotáctica correspondiente al CCF por electroforesis en gel de acrilamida SDS es de aproximadamente 11.500 (136). Su actividad quimiotáctica es abolida por calor a 80° C durante 30 min.

De especial interés es el efecto de la colchicina sobre la generación de CCF, dada la relativa especificidad terapéutica de este fármaco en las artritis inducidas por cristales. Cuando los conejos son pretratados con dosis no leucopénicas de colchicina intravenosa, consiguiendo unos niveles séricos

terapéuticos, los PMN de sangre periférica aislados presentan una quimiotaxis normal, pero no son capaces de generar CCF tras la fagocitosis normal de cristales de urato (137). En los experimentos realizados en PMN humanos *in vitro* tratados con colchicina previa a la incubación con cristales de pirofosfato cálcico dihidratado (137, 138), los datos muestran que es necesaria una cantidad considerablemente menor de colchicina para reducir la generación de CCF que para inhibir la liberación de enzimas lisosómicas. Esto parece indicar que la colchicina actúa sobre un paso previo al almacenamiento de CCF en los gránulos lisosomiales. Puesto que la colchicina no tiene un efecto directo sobre la actividad del CCF, parece ser que ejerce un efecto de inhibición selectivo sobre la síntesis de proteína estimulada por la fagocitosis.

El CCF liberado por las células tras la fagocitosis o aislado de los extractos lisosómicos de células incubadas con cristales de pirofosfato cálcico dihidratado o de urato, se une específicamente a los neutrófilos humanos con una cinética de saturación. La unión óptima se produce a un pH de 6, y no se ve influenciada por los factores quimiotácticos derivados del complemento, por los péptidos quimiotácticos formilados, etc. La colchicina no tiene efectos sobre la unión del CCF a los neutrófilos. La citocalasina B reduce sin embargo, la unión del CCF tanto a las células intactas como a las preparaciones de membrana, lo que parece indicar la existencia de un mecanismo de competición independiente de los microfilamentos (139).

Consideramos por tanto, que el presente trabajo presenta evidencias de que en los pacientes con artropatías inducidas por cristales existe una sustancia que aparece progresivamente a lo largo del ataque agudo y que no está presente en los pacientes con Artritis Reumatoide y Artrosis. Que esta sustancia tiene la capacidad de inhibir las dos funciones de los PMN estudiadas: fagocitosis y liberación de superóxido; y que puede por tanto modular

el ataque agudo de gota. Esta sustancia tiene un peso molecular similar al del CCF, el cual, a concentraciones elevadas es capaz de inhibir la reacción inflamatoria que él mismo ha originado.

El fenómeno mediante el cual un factor quimiotáctico es capaz de originar estimulación o inhibición está bien probado. Se considera que para que una sustancia sea quimiotáctica debe originar un gradiente de concentración en las células, de modo que éstas perciban este gradiente de concentración entre el polo proximal y el distal. Cuando la concentración es "excesiva", este gradiente desaparece y la célula no será atraída. Este mecanismo puede ser muy importante para regular múltiples procesos inflamatorios.

CONCLUSIONES

1. Los leucocitos polimorfonucleares obtenidos de sangre periférica en los pacientes con Enfermedad de Behçet presentan una capacidad de producción espontánea de anión superóxido significativamente superior a la encontrada en los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes con Artritis Reumatoide.

2. La producción estimulada de superóxido por los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con Enfermedad de Behçet fue significativamente superior a la obtenida con los polimorfonucleares extraídos de pacientes con Artritis Reumatoide y Artropatías Inflamatorias. Ambas conclusiones permiten afirmar que la hiperfunción de los neutrófilos juega un importante papel en algunas de las peculiaridades clínicas de la Enfermedad de Behçet.

3. En los pacientes con Artritis Reumatoide, la producción espontánea de superóxido de los neutrófilos de líquido sinovial fue significativamente superior a la de los neutrófilos de sangre periférica. Este hallazgo puede ser debido a la constante activación a la que están sometidos los neutrófilos que han fagocitado inmunocomplejos.

4. En los pacientes con Artropatías Inflamatorias Seronegativas no existían diferencias en la producción espontánea de superóxido al comparar los datos obtenidos de polimorfonucleares de sangre periférica y líquido sinovial. En cambio, la producción estimulada era significativamente superior en los neutrófilos de líquido sinovial.

5. El líquido sinovial de pacientes con artropatías microcristalinas (Gota y Pseudogota) inhibe la fagocitosis y la liberación de superóxido por los neutrófilos; y esta inhibición parece ser debida a la presencia de un componente del líquido sinovial de estos pacientes, más que a la falta de una sustancia de ayuda.

6. Dicha sustancia con capacidad inhibidora no aparece en el líquido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide y/o Artrosis.

7. Este inhibidor aparece de forma progresiva en el líquido sinovial desde el comienzo del ataque agudo de Gota.

8. El fraccionamiento del líquido sinovial de los pacientes con artropatías microcristalinas por HPLC pone de manifiesto que el inhibidor de la producción de superóxido y de la fagocitosis de los polimorfonucleares tienen un peso molecular de aproximadamente 13.000 daltons.

9. Consideramos por tanto, que en los pacientes con artropatías microcristalinas va apareciendo progresivamente en el líquido sinovial una sustancia con capacidad inhibidora de la respuesta inflamatoria. Dado que los estímulos quimiotácticos a dosis "excesivas" pueden resultar inhibidores, consideramos que el factor inhibidor detectado en el líquido sinovial de pacientes con artropatías microcristalinas puede ser el CCF (factor quimiotáctico derivado de los cristales).

RESUMEN

Es sabido que las distintas artritis inflamatorias presentan grandes diferencias entre sí, tanto en su evolución clínica y su pronóstico, como en su patogenia. Existen datos suficientes que nos permiten plantear la hipótesis de que las diferencias observadas pueden deberse, bien a la presencia de diferentes mediadores de la inflamación, o a la existencia o no de inhibidores de la misma, que influyan de modo definitivo en el pronóstico de las artritis.

Por otro lado, es conocido que los radicales tóxicos del oxígeno constituyen un grupo de agentes inflamatorios que están involucrados en la etiopatogenia de prácticamente todas las artritis inflamatorias, y su estudio *in vitro* puede ser de utilidad a la hora de valorar la capacidad de función-activación celular.

En el presente estudio, se ha investigado en primer lugar, la capacidad de producción de anión superóxido por los polimorfonucleares de sangre periférica y de líquido sinovial de las diferentes enfermedades estudiadas, como representante de la capacidad de activación celular; en segundo lugar, y para valorar la presencia de un inhibidor de la reacción inflamatoria, se investigó el efecto que la incubación con líquido sinovial extraído de las articulaciones afectadas en las diferentes patologías tenía sobre la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica de individuos sanos.

En la primera parte del estudio se incluyeron pacientes con Enfermedad de Behçet, Artritis Reumatoide y un grupo de pacientes con Artropatías Inflamatorias Seronegativas (con objeto de averiguar si existían diferencias en la producción de superóxido por los polimorfonucleares de sangre periférica y líquido sinovial entre estos pacientes y sus controles sanos). Se extrajeron muestras de sangre periférica y líquido sinovial de los pacientes con Artritis Reumatoide y los del grupo con Artropatías Inflamatorias seronegativas, y de

sangre en los pacientes con enfermedad de Behçet. Los polimorfonucleares fueron separados en las diferentes muestras por el método de Boyum modificado. La producción de superóxido en las diferentes células fue medida por el método de reducción del citocromo C utilizando diversos estímulos.

La producción de superóxido en sangre periférica, calculada por los nanomoles de citocromo C reducido, fue expresada como tanto por ciento de la obtenida por los polimorfonucleares de su control respectivo, al que otorgamos el valor de 100. Los resultados obtenidos en el líquido sinovial fueron comparados con los de sangre periférica en cada uno de los pacientes respectivamente.

En la segunda parte del estudio participaron pacientes con Gota, Pseudogota, Artritis Reumatoide, y Artrosis. Para determinar el efecto que la preincubación de los neutrófilos con los líquidos sinoviales obtenidos de las articulaciones afectadas en estos pacientes tiene sobre la producción de superóxido y la fagocitosis por estas células, los polimorfonucleares de donantes sanos fueron incubados con medio de Hanks o con líquido sinovial diluido al 1/10, y posteriormente se investigó su capacidad para fagocitar partículas de látex fluorescente o su capacidad para reducir al citocromo C, según se tratase de ensayos de fagocitosis o de producción de superóxido, respectivamente. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la generación de superóxido y la fagocitosis de partículas de látex por los polimorfonucleares expuestos al líquido sinovial, respecto a los controles.

En algunos pacientes con Gota se obtuvieron además muestras secuenciales durante 5 días consecutivos a partir del comienzo del ataque agudo, siendo procesadas inmediatamente y sometidas a estudios de fagocitosis y producción de superóxido.

Para valorar qué fracción en particular del líquido sinovial era la que daba origen al efecto del mismo sobre la fagocitosis y la generación de

superóxido por los polimorfonucleares incubados con líquido sinovial, se sometió el líquido sinovial de los pacientes con Gota, Pseudogota, Artritis Reumatoide y Artrosis a análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obteniéndose 4 fracciones diferentes, cuyo efecto sobre la fagocitosis y la generación de superóxido fue investigado por separado.

La producción espontánea de superóxido por los polimorfonucleares de sangre periférica de los pacientes con Enfermedad de Behçet fue significativamente superior a la de los PMN de sangre periférica de los pacientes con Artritis Reumatoide ($p < 0,05$) y a la de los controles ($p < 0,05$) ($139,02 \pm 23,4$, frente a $92,6 \pm 31,7$, y 100 , respectivamente).

La producción de superóxido por los PMN de sangre periférica de los pacientes con Enfermedad de Behçet estimulados por FMLP fue superior a la producción espontánea por estas células, aunque no de forma significativa.

En los pacientes con Artritis Reumatoide no se observaron diferencias valorables en la producción de superóxido por los PMN de sangre periférica de forma espontánea o estimulada, ni respecto a los controles. En el líquido sinovial de estos pacientes por el contrario, la producción espontánea de superóxido fue significativamente superior a la observada por las células de sangre periférica ($p < 0,05$) tanto de forma espontánea como estimulada con FMLP ($204,75 \pm 117,17$ frente a $92,6 \pm 31,7$ y $106,5 \pm 34$, respectivamente); y superior también a la producción de los PMN de líquido sinovial tras ser estimulados con FMLP ($204,75 \pm 117,17$ frente a $103,18 \pm 50,16$, $p < 0,05$).

En el grupo de pacientes con Artropatías Inflammatorias Seronegativas, la amplitud de las desviaciones estandar obtenidas, junto con el carácter excesivamente heterogéneo de las patologías incluidas en este grupo, nos impidió extraer conclusiones de los resultados encontrados.

Cuando se examinó la capacidad de producción de superóxido y la fagocitosis por los polimorfonucleares de donantes sanos incubados previamente

con líquido sinovial de las diferentes patologías, se encontró que las células incubadas con líquido sinovial de pacientes con Gota presentaban un porcentaje de inhibición del $22,33\% \pm 1,1\%$ respecto a las incubadas con medio ($p < 0,05$), y una reducción de la fagocitosis del $31,3 \pm 3,5$ ($p < 0,001$).

Los leucocitos polimorfonucleares incubados con líquido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide y Artrosis no mostraron una inhibición significativa de la generación de superóxido y la fagocitosis.

El estudio por HPLC de las muestras de líquido sinovial puso de manifiesto la existencia de 4 fracciones diferentes con distinto peso molecular. Los análisis posteriores de generación de superóxido y fagocitosis llevados a cabo con las diferentes fracciones obtenidas pusieron de manifiesto que la capacidad inhibidora del líquido sinovial en los pacientes con Gota y Pseudogota radicaba en la fracción 2 (F2), cuyo peso molecular era de aproximadamente 13.000 daltons.

Las muestras de líquido sinovial de pacientes con Gota aguda, que fueron obtenidas y examinadas secuencialmente, mostraron un incremento en la inhibición de la fagocitosis y de la producción de superóxido desde el comienzo del ataque agudo. Esta inhibición llegó a ser del $26,5 \pm 1,3\%$ en la generación de superóxido ($p < 0,0025$), y del $32,5 \pm 2,0$ en la fagocitosis ($p < 0,01$).

Los resultados obtenidos muestran que los pacientes con Enfermedad de Behçet presentan un incremento en la capacidad de producción de anión superóxido tanto de forma espontánea como estimulada respecto a los controles sanos y a los pacientes con AR y AIS. Esto sugiere que los neutrófilos de estos pacientes presentan una activación in vivo que puede ser importante en la patogénesis de muchos de sus signos y síntomas.

Además, se observó que la capacidad de producción espontánea de superóxido de las células obtenidas de líquido sinovial de pacientes con AR fue superior a la que presentaron estas mismas células tras ser estimuladas,

e igualmente superior a la de los polimorfonucleares de sangre periférica de estos pacientes tanto de forma espontánea como estimulada. De estos resultados y otros datos de la literatura es posible concluir que la fagocitosis de Inmunocomplejos por los polimorfonucleares en el espacio articular en estos procesos puede ser un estímulo permanente de su activación crónica y progresiva.

Cuando se valoró el efecto del líquido sinovial sobre la generación de superóxido y la fagocitosis por los PMN de donantes sanos se observó que el líquido sinovial de pacientes con artropatías cristalinas tiene una capacidad de inhibición sobre la generación de superóxido y la fagocitosis de los neutrófilos, y que esta inhibición disminuía hasta desaparecer a medida que el líquido sinovial en estudio era diluido, dato que apoya la hipótesis de que la inhibición observada se debe a la aparición de una sustancia inhibidora más que a la falta o disminución de algún agente cooperador fundamental en el mecanismo inflamatorio. Además, en el líquido sinovial de los pacientes con Gota, ésta sustancia con capacidad inhibidora de la activación celular aparece de forma progresiva a partir del comienzo del ataque agudo, como lo demuestra la progresiva inhibición de la producción de superóxido y de la fagocitosis al ser investigado el líquido sinovial de forma secuencial.

El fraccionamiento del líquido sinovial de los pacientes con Artropatías cristalinas con HPLC puso de manifiesto que dicha sustancia inhibidora presente en el líquido sinovial de estos pacientes tiene un peso molecular de aproximadamente 13.000 daltons, similar al del Factor Quimiotáctico Derivado de Cristales (CCF), ya identificado con anterioridad, lo que nos lleva a concluir que esta partícula inhibidora pudiera ser el mismo CCF. Es decir la misma sustancia, el CCF, que está implicada en el inicio de los ataques en las artritis microcristalinas sería el responsable de la detención del mismo. Este mecanismo, por el que un mediador inflamatorio a dosis elevadas puede llegar a ser

inhibidor en lugar de estimulador, es un hecho bien provado en muchos otros procesos inflamatorios.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- METCHNIKOFF, E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. Ann Inst Pasteur 1887; 1:321.
- 2.- COCHRANE, C.G., WEIGLE, W.O., DIXON, F.J. The role of polymorphonuclear leukocytes in the initiation and cessation of the Arthus vasculitis. J Exp Med 1959; 110:481-494.
- 3.- COHEN, A.M. In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci E.U.A. 1987; 84:2484-2488.
- 4.- KOHSAKI, M. In vivo stimulation of murine granulopoiesis by human urinary extract from patients with aplastic anemia. Proc Natl Acad Sci E.U.A. 1983; 80:3802-3806.
- 5.- BECK, W.S. The control of leukocyte glycosis. J Biol Chem 1958; 232:251-270.
- 6.- MESSNER, R.R. A transient defect in leukocyte bactericidal capacity. Clin Immunol Immunopathol 1973; 1:523-532.
- 7.- KORN, E.D., WEISMAN, R.A. Phagocytosis of latex beads by Acanthamoeba II. Electron microscopic study of the initial events. J Cell Biol 1969; 34:219-227.
- 8.- LEISHMAN, W.B. Note on a method of quantitatively estimating the phagocytic power of the leukocytes of the blood. BMJ 1902; 1:73-75.

- 9.- WRIGHT, A.E., DOUGLAS, S.R. An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. Proc Roy Soc 1903; 72:357-370.
- 10.- MICHELL, R.H., PANCAKE, S.J., NOSEWORTHY, J., KARNOVSKY, M.L. Measurements of rates of phagocytosis. The use of cellular monolayers. J Cell Biol 1969; 40:1109-1120.
- 11.- STOSSEL, T.P. Evaluation of opsonic and leukocytic function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. Blood 1973a; 42:121-130.
- 12.- NEWSOME, J. Phagocytosis by human neutrophils. Nature 1957; 214:1092-1094.
- 13.- WEHINGER, H., HOFACKER, M., Latex phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. In vitro and in vivo studies with a simple screening test. Europ J Pediat 1976; 123:125-132.
- 14.- WARD, P.A., ZVAIFLER, N.J. Quantitative phagocytosis by neutrophils. I. A new method with immune complexes. J Immunol 1973; 11:1771-1776.
- 15.- CHANG, Y.H. Studies of phagocytosis. I. Uptake of radio-ionated (¹³¹I) human serum albumin as a measure of the degree of phagocytosis in vitro. Exp Cell Res 1969; 54:42-48.
- 16.- BERGER, R.R., KARNOVSKY, M.L. Biochemical basis of phagocytosis. V. Effect of phagocytosis on cellular uptake of extracellular fluid, and

- on the intracellular pool of L- α -glycerol-phosphate. Fed Proc 1966; 25:840-845.
- 17.- WEISSMAN, R.A., KORN, E.D. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical properties. Biochemistry 1967; 485-497.
- 18.- STOSSEL, T.P. Quantitative studies of phagocytosis. Kinetic effects of cations and heat-labile opsonin. J Cell Biol 1973; 58:346-356.
- 19.- MAALOE, O. On the relation between alexin and opsonin. Copenhagen: Einar Mungsgaard, 1946.
- 20.- YAMAMURA, M. BOLER, J. VALDIMARSSON, H. Phagocytosis measured as inhibition of uridine uptake by *Candida Albicans*. J Immunol Methods 1977; 14:19-24.
- 21.- SMITH, J.W., BARNETT, J.A., MAY, R.P., SANFORD, J.P. Comparison of the opsonic activity of gamma G and gammaM anti-proteus globulins. J Immunol 1967; 98:336-343.
- 22.- SBARRA, A.J., KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 1959; 234:1355-1362.
- 23.- SKELL, R.T., YANKEE, R.A., SPIVAK, W.A., NOVIKOV, L. HENDERSON, E.S. Leukocyte preservation. I. Phagocytic stimulation of the hexose monophosphate shunt as a measure of cell viability. J Lab Clin Med 1969; 73:327-337.

- 24.- HANDIN, R.I., STOSSEL, T.P. Phagocytosis of antibody-coated platelets by human granulocytes. *New Engl J Med* 1974; 290:989-993.
- 25.- ALLEN, R.C. Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the initial chemiluminescent response from phagocytizing polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1977; 10:207-218.
- 26.- KLEBANOFF, S.J., CLARK, R.A. Iodination by human polymorphonuclear leukocytes: A re-evaluation. *J Lab Clin Med* 1977; 89:675-686.
- 27.- CRONSTEIN, B.N., WEISSMAN, G. Neutrophil structure and function. En: McCarty, D.J. ed. *Arthritis and allied conditions*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989.
- 28.- FLEIT, H.B., WRIGHT, S.D., UNKELESS, J.C. Human neutrophil Fc receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:3275-3279.
- 29.- FEARON, D.J. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte and monocyte. *J Exp Med* 1980; 152:20-30.
- 30.- ALLISON, A.C., DAVIES, P., DePETRIS, S. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nature (New Biol)* 1971; 235:153-155.
- 31.- REAVEN, E.P., AXLINE, S.G. Subplasmalemmal microfilamenta and microtubules in resting and phagocytizing cultivated macrophages. *J Cell Biol* 1979; 59:12-27.

- 32.- WEISSMANN, G., SMOLEN, J., HOFFSTEIN, S., KORCHACK, H. The secretory code of the neutrophil. En: Dingle, J.T., and Gordon, J.L. eds. Cellulars Interactions. New York: Elsevier North Holland Biomedical Press, 1981.
- 33.- MELLON, M.G., REBHUM, L.I. Sulphydryls and the in vitro polymerization of tubulin. J Cell Biol 1976; 70:226-238.
- 34.- MALAWISTA, S.E. Vinblastine can inhibit lysosomal degranulation without suppressing phagocytosis in human blood leukocytes. En: Forscher, B.K. and Houck, J.C. eds. Immunopathology of Inflammation. Amsterdam: Excerpta Medica, 1971.
- 35.- ZURIER, R.B. Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists and agents which affect microtubule function. J Clin Invest 1974; 53:297-309.
- 36.- GOLDSTEIN, I.M., HOFFSTEIN, S., WEISSMANN, G. Mechanisms of lysosomal enzyme release from human polymorphonuclear leukocytes. J Cell Biol 1975; 66:647-652.
- 37.- BOXER, L.A., STOSSEL, T.P. chronic myelogenous leukemia leukocytes. J Clin Invest 1976; 57:964-976.
- 38.- STOSSEL, T.P., HARTWING, J.H. Interactions of actin, myosin and actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. II. Role in cytoplasmic movement and phagocytosis. J Cell Biol 1976; 68:602-619.

- 39.- WEHRING, R.R. Cytochalasin B inhibits actin-related gelation of HeLa cell extractas. *J Cell Biol* 1976; 71:303-307.
- 40.- KAPLAN, H.B., EDELSON, H.S., FRIEDMAN, R., WEISSMANN, G., The roles of degranulation and superoxide anion generation in neutrophil aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1982; 721:55-63.
- 41.- SKLAR, L.A. A continuous, spectroscopic analysis of the kinetics of elastase secretion by neutrophils. *J Biol Chem* 1982; 257:5471-5475.
- 42.- BECKER, E.L. The inhibition of neutrophil granule enzyme secretion and chemotaxis by pertussis toxin. *J Cell Biol* 1985; 100:1641-1646.
- 43.- KORCHAK, H.M., WEISSMANN, G. Changes in membrane potential of human granulocytes antecede the metabolic responses to surface stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:3818-3822.
- 44.- GOLDSTEIN, I.M., HORN, J.K., KAPLAN, H.B., WEISSMANN, G. Calcium-induced lysozyme secretion from human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 60:807-812.
- 45.- SMOLEN, J.E., WEISSMANN, G. Stimuli wich provoke secretion of azurophil enzymesfrom human neutrophils induced increments in adenosine cyclic 3',5'-monophosphate. *Biochim Biophys Acta* 1981; 672:197-206.
- 46.- SERHAN, C. Changes in phophatidylinositol and phosphatidic acid in stimulated human neutrophils: relationship to calcium mobilization,

aggregation, and superoxide radical generation. *Biochim Biophys Acta* 1983; 762:420-428.

- 47.- HOFFSTEIN, S.T. Ultrastructural demonstration of calcium loss from local regions of the plasma membrane of surface-stimulated human granulocytes. *J Immunol* 1979; 123:1395-1402.
- 48.- SMOLEN, J.E., WEISSMANN, G. The fluorescence response of chlorotetracycline-loaded human polymorphonuclear leukocytes. I. The effect of various stimuli and calcium antagonists. *Biochim Biophys Acta* 1982; 720:172-180.
- 49.- SIMCHOWITZ, L. SPILBERG, I., ATKINSON, J.P. Evidence that the functional responses of human neutrophils occur independently of transient elevations in cAMP levels. *Fed Proc* 1983; 42:1080.
- 50.- BALDRIDGE, C.W., GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 1933; 103:235-236.
- 51.- SBARRA, A.J., KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959; 234:1355-1362.
- 52.- EVANS, W.H., KARNOVSKY, M.L. The biochemical basis of phagocytosis. IV. Some aspects of carbohydrate metabolism during phagocytosis. *Biochemistry* 1962; 1:159-166.

- 53.- BABIOR, B.M., KIPNESS, R.S., CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bacterial agent. *J Clin Invest* 1973; 52:741-744.
- 54.- IYER, G.Y.N., ISLAM, D.F.M., QUASTEL, J.H. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 1971; 192:535-541.
- 55.- KARNOVSKY, M.L., WALLACH, D.F.H. The metabolic basis of phagocytosis. III. Incorporation of inorganic phosphate into various classes of phosphatides during phagocytosis. *J Biol Chem* 1961; 236:1895-1901.
- 56.- ANDREWS, P.C., BABIOR, B.M. Endogenous protein phosphorylation by resting and activated human neutrophils. *Blood* 1983; 61:333-340.
- 57.- HUANG, C-K. Effects of chemotactic factors on the protein phosphorylation of rabbit peritoneal neutrophils. *Fed Proc* 1983; 42:1080.
- 58.- TSUNG, P.K., SAKAMOTO, T., WEISSMANN, G. Protein kinase and phosphatases from human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 1975; 145:437-438.
- 59.- NIEDEL, J.E., KOHN, I.J., VANDENBACK, G.R. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:36-40.
- 60.- SERHAN, C. Phosphatidate and oxidized fatty acids are calcium ionophores. Studies employing arsenazo III in liposomes. *J Biol Chem* 1981; 256:2736-2741.

- 61.- FANTONE, J.C., WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:397-418.
- 62.- BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Eng J Med* 1978; 298:659-668.
- 63.- KORCHACK, H.M. Granulocytes without degranulation: Neutrophil function in granule-depleted cytoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:4968-4972.
- 64.- MANDELL, G.L. Intraphagosomal pH of human polymorphonuclear neutrophils. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 134:447-449.
- 65.- HIRSCH, J.G., COHN, Z.A. Degranulation of polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis of microorganisms. *J Exp Med* 1960; 112:1005-1014.
- 66.- SMOLEN, J.E., KORCHAK, H.M., WEISSMANN, G. Initial kinetics of lysosomal enzyme release and superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1980; 4:145.
- 67.- HERLIN, T., PETERSEN, C.S., ESMANN, V. The role of calcium and cyclic adenosine 3'5' monophosphate in the regulation of glycogen metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1978; 542:63-76.

- 68.- SMOLEN, J.E., KORCHAK, H.M., WEISSMANN, G. Increased levels of cyclic adenosine 3'5' monophosphate in human polymorphonuclear leukocytes after surface stimulation. *J Clin Invest* 1980; 65:1077-1085.
- 69.- MALMSTEIN, C.L. Leukotriene b₁: A highly potent and stereospecific factor stimulating migration of polymorphonuclear leukocytes. *Acta Physiol Scand* 1980; 110:449-451.
- 70.- ZURIER, R.B., HOFFSTEIN, S., WEISSMANN, G. Mechanism of lysosomal enzyme release from human leukocytes. *J Cell Biol* 1973; 52:27-48.
- 71.- OHLSSON, K. Granulocyte collagenase and elastase and their interactions with α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin. In: Reich, D.B. and Shaw, E., eds. *Proteases and biological controls*. New York: Cold Spring Harbor Lab. 1975.
- 72.- HARLAN, J.M. Neutrophils-mediated endothelial injury in vitro. Mechanisms of cell detachment. *J. Clin Invest* 1981; 68:1394-1403.
- 73.- SACKS, T. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *J Clin Invest* 1978; 61:1161-1167.
- 74.- BLAKE, D.R., ALLEN, P., LUNEC, J. Free radicals in biological systems - a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull* 1987; 43:371-365.
- 75.- SEGAL, A.W. Variations on the theme of chronic granulomatous disease. *Lancet* 1985; i:1378-1382.

- 76.- LUNEC, J., BLAKE, D.R., McCLEARY, S.J., BRAILSFORD, S., BACON, P.A. Self perpetuating mechanisms of immunoglobulin G aggregation in rheumatoid inflammation. *J Clin Invest* 1985; 76:2084-2090.
- 77.- WONG, P.S., TRAVIS, J. Isolation and properties of oxidised alpha-1-proteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochem Biophys Res Com* 1980; 96:1449-1454.
- 78.- GREENWALD, R.A., MOY, W.W. Effect of oxygen free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* 1980; 23:455-463.
- 79.- YOSHINO, S., BLAKE, D.R., HEWITT, S., MORRIS, C., BACON, P.A. Effect of blood on the activity and persistence of antigen induced inflammation in the rat air pouch. *Ann Rheum Dis* 1985; 44:485-490.
- 80.- ROWLEY, D.A., GUTTERIDGE, J.M.C., BLAKE, D.R., FARR, M., HALLIWEL, B. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis; thiobarbituric acid reactive material and catalytic iron salts in synovial fluids from rheumatoid patients. *Clin Sci* 1984; 66:691-695.
- 81.- BLAKE, D.R., GALLAGHER, P.J., POTTER, A.R., BELL, M.J., BACON, P.A. The effect of synovial iron on the progression of rheumatoid disease. *Arthritis Rheum* 1984; 27:495-501.
- 82.- WINYARD, P.G., BLAKE, D.R., CHIRICO, S., GUTTERIDGE, J.M.C., LUNEC, J. Mechanism of exacerbation of rheumatoid synovitis by total-dose iron-dextran infusion; in vivo demonstration of iron-promoted oxidative stress. *Lancet* 1987; i:69-72

- 83.- EDWARDS, S.W., HALLET, M.B., CAMPBELL, A.K. Oxygen radical production may be limited by oxygen concentration. *Biochem J* 1984; 217:851-854.
- 84.- GRANGER, D.N., HOLLWARTH, M.E., PARKS, D.A. Ischaemia-reperfusion injury; role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 1986; 548 (suppl):39-46.
- 85.- MCCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in post-ischaemic tissue injury. *New Eng J Med* 1985; 312:159-163.
- 86.- JARASCH, E.D., BRUDER, G., HEID, H.W. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 1986;
- 87.- ALLEN, R.E., OUTHWAITE, J., MORRIS, C.J., BLAKE, D.R. Xantine oxidoreductase is present in human synovium. *Ann Rheum Dis* 1987; 46:843-345.
- 88.- UNSWORTH, J., OUTHWAITE, J., BLAKE, D.R., MORRIS, C.J., FREEMAN, J., LUNEC, J. Dynamic studies of the relation-ship between intra-articular pressure, synovial fluid oxygen tension, and lipid peroxidation in the inflamed knee: and example of reperfusion injury. *Ann Clin Biochem* 1988; 25:8-11.
- 89.- BLAKE, D.R., MERRY, P., UNSWORTH, J. et al. Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. *Lancet* 1989; i:289-293.
- 90.- THOMPSON, M., BYWATERS, E.G.L. Unilateral rheumatoid arthritis following hemiplegia. *Ann Rheum Dis* 1962; 21:370-377.

- 91.- GARRET, I.R., BOYCE, B.F., OREFFO, R.O.C., BONEWALD, L., POSER, J., MUNDY, G.R. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990; 85:632-639.
- 92.- BOYUM, A. Cells separation. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21:27-32.
- 93.- SINCHOWITZ, L., METHA, J., SPILBERG, I. Chemotactic factor induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. *Arth and Rheum* 1979; 22:755-763.
- 94.- JAMES, D.W., WALKER, J.R., SMITH, M.J.H. Abnormal polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in Behçet's syndrome. *Am Rheum Dis* 1979; 38:219-221.
- 95.- TAKEUCHI, A., KOBAYASHI, K., MIZUSHIMA, Y. Mechanism of hyperchemotaxis of neutrophils from patients with Behçet's disease. En: *Studies on etiology, treatment and prevention of Behçet's disease. Behçet's Disease Research Committee of Japan, Ministry of Welfare* 1978.
- 96.- SOBEL, J.D., HAIM, S., OBEDEAN, V.N., MESHULAM, T. Polymorphonuclear leukocyte function in Behçet's disease. *J Clin Pathol* 1977; 30:250-253.
- 97.- NIWA, Y., SAKANE, T. Autooxidative damage in Behçet's disease: endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. En: Inaba, G. ed. *Behçet's*

disease: pathogenic mechanism and clinical future. Japan Medical Research Fundation (publication 18). Proceeding of the International Conference on Behçet disease. Tokio: University of Tokyo Press 1981.

- 98.- FRIMAN, C., DAVIS, P. Polymorphonuclear function in Behçet's syndrome (carta). *Ann Rheum Dis* 1983; 42:477-478.
- 99.- EHRLICH, G.E. Phagocytes and mediators of inflammation in Behçet's syndrome. En: Inaba, G. ed. Behçet's disease: pathogenetic mechanism of clinical future. Japan Medical Research Fundation (publication 18). Proceeding of the International Conference on Behçet disease. Tokio: University of Tokyo Press 1981.
- 100.- MUNIAIN, M.A., RODRIGUEZ, M.D, POZUELO, F., et al. Liberación de superóxido, quimiotaxis, y fenómeno patérgico en pacientes con enfermedad de Behçet. *Rev Esp Reumatol* 1987; 14:9-13.
- 101.- TAKEUCHI, A., KOBAYASHI, M., MORI, M. et al. Neutrophil function in patients with Behçet's disease. En: Inaba G., ed. Behçet disease. Tokio. UNiversity of Tokyo Press 1981; 251-259.
- 102.- PEASE, C., FORDHAM, J., CURREY, F. Increased polymorphonuclear leukocytes motility in B-27 positive controls and patients with ankylosing spondylitis. *The Heberden Society* 1983; 30.
- 103.- MASON, R.M., BARNES, C.G. Behçet's syndrome with arthritis. *Ann Rheum Dis* 1969; 28:95-103.

- 104.- Behçet's Disease Research Committee of Japan, 1972-quoted by Shimizu T (1979). Clinicopathological studies on Behçet's disease. In: Dilsen, N., Konice, M., Ovul, C., eds. Behçet's disease. Int Cong Ser 467:9-43.
- 105.- Behçet's Disease Research Committee of Japan. Behçet's disease: guide to diagnosis of Behçet's disease. Jpn J Ophtalmol 1974; 18:291-294.
- 106.- MIZUSHIMA, Y. Recent research into Behçet's disease in Japan. Int J Tissue React 1988; 10:59-65.
- 107.- O'DUFFY, J.D. Criteres proposes pour le diagnostic de la maladie de Behçet et notes therapeutiques. Rev Med 1974a; 36:2371-2379.
- 108.- O'DUFFY, J.D. Suggested criteria for diagnosis of Behçet's disease. J Rheumatol 1974; 1(suppl 1): 18 (abstr).
- 109.- ZHANG, X.-Q. (in Chinese). Chin J Intern Med 1980; 19:15-20.
- 110.- DILSEN, N., KONICE, M., ARAL, O. Our diagnostic criteria of Behçet's disease-an overview, 1986. In: Lenner, T. Barnes, C.G., eds. Recent advances in Behçet's disease. Int Congr Ser 103:177-180.
- 111.- DILSEN, N., KONICE, M., ARAL, O. Our diagnostic criteria of Behçet's disease. In: Hamza, M., ed. 1988. Behçet's disease: Proceedings of the 3rd Mediterranean Congress of Rheumatology, May, 1986:11-15.
- 112.- International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. Lancet 1990; 335:1078-1080.

- 113.- JAMES, D.W., BETTS, H., CLELAND, L.G. Chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes from rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1983; 10:184-189.
- 114.- GALE, R., BERTOUCHE, J.V., BRADLEY, J., ROBERTS-THOMSON, P.J. Direct activation of neutrophil chemiluminescence by rheumatoid sera and synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1983; 42:158-162.
- 115.- GODDARD, D.H., BROWN, K.A., KIRK, A.P., McCARTY, D., JOHSTON, G.D., HOLBOROW, E.J. Immunoglobulin inclusions in rheumatoid arthritis polymorphonuclear cells: lack of correlation with circulating immune complexes. *Rheumatol Int* 1982; 2:27-30.
- 116.- CORBERAND, J., AMIQUES, J., De LARRARD, B., PRADERE, J. Neutrophil function in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1977; 6:49-52.
- 117.- DAVIES, E.V., WILLIAMS, B.D., CAMPBELL, A.K. Synovial fluid polymorphonuclear leukocytes from patients with rheumatoid arthritis have reduced MPO and NADPH-oxidase activity. *Br J Rheum* 1990; 29:415-421.
- 118.- ZVAIFLER, N.J. Immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 1973; 16:265-336.
- 119.- SAMUELSSON, B., DAHLEN, S.-E., LINDGREN, J.A., ROUZER, C.A., SHERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. *Science* 1987; 237:1171.

- 120.- KRANE, S.M., GOLRNG, S.R., DAYER, J.M. Interactions among lymphocytes, monocytes, and other synovial cells in the rheumatoid synovium. *Lymphokines* 7:75.
- 121.- BOMALASKI, J.S., BAKER, D.G., BROPHY, L., et al. A phospholipase A₂-activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil aggregation and release of lysosomal enzymes, superoxido, and eicosanoids. *J Immunol* 1989; 42:3957-3962.
- 122.- McCARTY, Jr, D.L. On crystal deposition diseases. *D.M.March* 1970.
- 123.- SOKOLOFF, L. The pathology of gout. *Metabolism* 1957; 6:230-243.
- 124.- SPILBERG, I., MEHTA, J. Demostration of a specific neutrophil receptor for a cell-derived chemotactic factor. *J Clin Invest* 1979; 63:85-89.
- 125.- SIMCHOWITZ, L., ATKINSON, J., SPILBERG, I. Stimulation of the respiratory burst in human neutrophils by crystal phagocytosis. *Arthritis Rheum* 1982; 181-188.
- 126.- MARCOLONGO, R. Mecanismo de resolución espontánea del ataque agudo de gota. *Rev Esp Reum* 1989; 16:77-78.
- 127.- BARDIN, T. Inflammations articulaires d'origen microcristalline. *Press Med* 1984; 13:1951-1955.

- 128.- SPILBERG, I., MANDELL, B. Crystal-induced chemotactic factor. En: Weissmann, G. ed. Advances in inflammation research. New York: Raven Press 1983; 57-65.
- 129.- GINSBERG, M.H., KOZIN, F., CHOW, D., MAY, J., SKOSEY, J.L. Adsorption of polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzymes to monosodium urate crystals. Arthritis Rheum 1977; 20:1538-1542.
- 130.- WALLINSFORD, W.R., McCARTY, D.J. Differential membranolytic effects of microcrystalline sodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate. J Exp Med 1971; 133:100-108.
- 131.- MARCOLONGO, R., CALABRIA, A.A., LALUMERA, M., GERLI, R., ALESSANDRINI, C., CAVALLO, G. The-switch-off-mechanism of spontaneous resolution of acute gout attack. J Rheumatol 1988; 15:1.
- 132.- SPILBERG, I., ALVARELLOS, A., MUNIAIN, M., MANDELL, B. Modulation of the acute attack of gout and pseudogout by crystal-induced chemotactic factor (CCF). Arthritis Rheum 1968; 31: n24 suppl.
- 133.- PHEPLS, P. Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro III. Possible release of a chemotactic substance after phagocytosis of urate crystal by polymorphonuclear leukocytes. Arthritis Rheum 1969; 12:197-203.
- 134.- SPILBERG, I., GALLECHER, A., MANDELL, B. Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystal induced chemotactic factor. Subcellular localization, protein synthesis and phagocytosis. J Lab Clin Med 1977; 89:817-822.

- 135.- SPILBERG, I., GALLECHER, A., MANDELL, D. Urate crystal induced chemotactic factor. Isolation and partial characterization. *J Clin Invest* 1976; 58:815-817.
- 136.- SPILBERG, I., MEHTA, J., SIMCHOWITZ, L. Induction of a chemotactic factor from human neutrophils by diverse crystals. *J Lab Clin Med* 1982; 100:399-404.
- 137.- SPILBERG, I., MANDELL, B., MEHTA, J., SIMCHOWITZ, L. ROSENBERG, D. The mechanism of action of colchicine in acute urate crystal-induced arthritis. *J Clin Invest* 1979; 64:775-780.
- 138.- SPILBERG, I., MANDELL, B., WOCHNER, R.D. Studies on crystal induced chemotactic factor. I. Role of protein synthesis and neutral protease activity. *J Lab Clin Med* 1974; 83:56-63.
- 139.- SPILBERG, I., MEHTA, J. Chemotactic factor receptor modulation and cytoskeletal structures. *Infect Immunol* 1981; 32:268-272.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los señores presentes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Rosario Lante Alcaraz-Luque
titulada Estudio del Epitafio suaroid sobre la
educación de las mujeres y la feminidad por las
mujeres en la época republicana y posterior
se acordó otorgarle la calificación de Apto con Lucea por
meritadas

Sevilla, _____ de _____ de _____

L.P.

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,



