



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi evolutiu del procés inflamatori i autoanticossos en l'artritis experimental

Margarida Castell i Escuer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

R.441.719

FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

ESTUDI EVOLUTIU DEL PROCÉS INFLAMATORI I
AUTOANTICOSSOS EN L'ARTRITIS EXPERIMENTAL

Memòria presentada per Na
Margarida Castell i Escuer
per optar al Grau de Doctor
en Farmàcia.

Aquest treball ha estat di-
rigit per la Dra. M. Cristina
Castellote i Bargalló i el Dr.
Josep Queralt i Reguè.

Barcelona, agost de 1985.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083988

Si no pots ser un pi al cim de la carena,
sigues un garric a la vall... però sigues
el garric millor vora el torrent;
un arbust, si no pots ser un arbre.
Si no pots ser camí ral, sigues viarany.
Si no pots ser el sol, sigues estrella.
No és pel volum que reeixeràs o no;
sigues al màxim allò que siguis.

Douglas Mallock

Al Josep Anselm i als meus pares...

Vull expressar la meva profunda gratitud envers tots els qui han contribuït a la realització d'aquesta Memòria.

Per damunt de tot he de regraduir als directors, Cristina Castellote i Pep Queralt, per l'amistat que m'han ofert així com per l'encoratjament que m'han transmès en el difícil camp de la investigació.

Agraeixo també el Dr. Antonio Torralba l'acolliment i disposició que m'ha dedicat dins del Departament.

Dec també molt als qui han col.laborat directament en aquest treball, els amics Montserrat Rosich, Juanjo Moreno, M. Prado Gisbert i Joan Carles Oliva, i a la iniciadora del projecte de fa uns anys, la Dra. Guillermina Barberà.

Gràcies també al Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic pel seu lector d'ELISA, el qual ens ha estat essencial per a la realització d'aquest treball, i molt especialment a l'Alberto Nieto i a l'Antoni Gayà pels suggeriments tan útils i positius que han ofert.

Així mateix vull regraduir a l'Antoni Díez, que conjuntament amb la Montserrat Ribot i la Trini Cambras, ha fet possible l'estudi estadístic dels nostres resultats. I, en general, agraeixo a tots els companys del Departament el costat que m'han fet durant les hores de feina.

No vull deixar d'agrair al Josep Anselm Mis, a la Montserrat Castell i al Xavi Giró la seva valuosa assistència en la confecció i correcció del manuscrit.

ÍNDIX

<u>OBJECTE</u>	1
<u>PART TEÒRICA</u>	4
1. INFLAMACIÓ	5
2. CÈL.LULES IMPLICADES EN EL PROCÉS INFLAMATORI	10
2.1. MASTÒCITS	10
2.2. CÈL.LULES FAGOCÍTIQUES	14
2.2.1. Cèl.lules mieloides	15
2.2.2. Sistema fagocític mononuclear	20
2.2.3. Fagocitosi	25
3. MEDIADORS INFLAMATORIS	30
3.1. HISTAMINA	30
3.2. SEROTONINA	33
3.3. SISTEMA DE LES CININES	34
3.4. SISTEMA DEL COMPLEMENT	37
3.5. ENZIMS LISOSOMALS	44
3.6. DERIVATS DE L'ÀCID ARAQUIDÒNIC	48
3.6.1. Prostaglandines i tromboxans	48
3.6.2. Derivats de l'àcid araquidònic via lipoxigenasa	55
3.7. RADICALS LLIURES	59
3.8. LIMFOQUINES	66
3.8.1. Factors quimiotàctics (CF)	68
3.8.2. Factor inhibitori de la migració de macròfags	69
3.8.3. Factor activador dels macròfags (MAF)	70
3.8.4. Factor inhibidor de leucòcits (LIF)	71
4. AUTOANTICOSSOS I INFLAMACIÓ CRÒNICA	73
4.1. FACTORS REUMATOIDES	73
4.2. ANTICOSSOS ANTINUCLEARS	77
4.3. ANTICOSSOS ANTICOL.LAGEN	79
<u>PART EXPERIMENTAL</u>	80
1. INTRODUCCIÓ I DISSENY EXPERIMENTAL	81
2. REACTIU BIOLÒGIC	86
3. INDUCCIÓ DE L'ARTRITIS ADJUVANT	87
3.1. INCIDÈNCIA DE LA PATOLOGIA	88
4. RECOLLIDA DE MOSTRES	90

5.	TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES	91
5.1.	EXPRESSIÓ DELS RESULTATS	91
5.2.	CRITERI DE DIXON	91
5.3.	ANÀLISI DE LA VARIANÇA DE MODELS LINEALS	91
5.3.1.	Descripció dels models inicials	96
5.3.2.	Descripció dels models finals	103
5.3.3.	Hipòtesis	106
5.3.4.	Correlacions	106
5.4.	COEFICIENT DE CORRELACIÓ D'SPEARMAN	106
5.5.	REGRESSIONS	107
6.	DETERMINACIONS SOMATOMÈTRIQUES	108
6.1.	CORBA PONDERAL TOTAL I D'ÒRGANS. ESTUDI DE LA INGESTA	108
6.1.1.	Resultats	109
6.2.	VOLUM DE LES EXTREMITATS	118
6.2.1.	Resultats	118
7.	DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES LOCOMOTORS	131
7.1.	MATERIAL	131
7.2.	REGISTRE DELS MOVIMENTS	132
7.3.	RESULTATS	134
8.	DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES HEMATOLÒGICS	144
8.1.	PROTEÏNOGRAMA I PROTEÏNÈMIA	144
8.1.1.	Material i mètodes	144
8.1.2.	Resultats	146
8.2.	GRUPS SULFHIDRIL SÈRICS	157
8.2.1.	Material i mètodes	161
8.2.2.	Resultats	162
9.	DETERMINACIONS IMMUNOLÒGIQUES	172
9.1.	ACTIVITAT COMPLEMENTÀRIA TOTAL SÈRICA	172
9.1.1.	Material i mètodes	172
9.1.2.	Resultats	173
9.2.	ANTICOSSOS ANTINUCLEARS	177
9.2.1.	Material i mètodes	177
9.2.2.	Resultats	178
9.3.	ANTICOSSOS ANTIIMMUNOGLOBULINES	179
9.3.1.	Metodologia preparativa: fraccionament salí ...	179
9.3.1.1.	Material i mètodes	179

9.3.2. Tècnica d'aglutinació del làtex	180
9.3.2.1. Reactius	181
9.3.2.2. Metodologia general	181
9.3.2.3. Ajust de les condicions experimentals	182
9.3.2.4. Resultats	184
9.3.3. Tècniques d'ELISA	188
9.3.3.1. Material	194
9.3.3.2. Metodologia general	195
9.3.3.3. Ajust de les condicions experimentals	199
9.3.3.3.1. Assaig amb immunoglobulines humanes ...	201
9.3.3.3.2. Assaig amb immunoglobulines de ratolí .	201
9.3.3.3.3. ELISA competitiu	202
9.3.3.3.4. ELISA amplificat	203
9.3.3.4. Optimització de l'assaig amb IgG de ratolí	204
9.3.3.5. Corba estàndard i expressió dels resultats	204
9.3.3.6. Resultats	207
9.3.4. Anticossos antiimmunoglobulines de la classe IgG	210
9.3.4.1. Ajust de les condicions experimentals	212
9.3.4.2. Resultats	212
9.4. DETERMINACIÓ D'IgG	220
9.4.1. Ajust de les condicions experimentals	220
9.4.2. Resultats	222
10. INFLUÈNCIES TERAPÈUTIQUES	225
10.1. TRACTAMENT CURATIU AMB INDOMETACINA	225
10.1.1. Efecte sobre les determinacions somatomètriques	227
10.1.2. Efecte sobre els paràmetres hematològics	228
10.1.3. Efecte sobre les determinacions immunològiques	228
10.2. TRACTAMENT CURATIU AMB BENOXAPROFÈ	230
10.2.1. Efecte sobre les determinacions somatomètriques	232
10.2.2. Efecte sobre els paràmetres hematològics	234
10.2.3. Efecte sobre les determinacions immunològiques	240
10.3. TRACTAMENT CURATIU AMB SUPERÒXID DISMUTASA	244
10.3.1. Efecte sobre les determinacions somatomètriques	245
10.3.2. Efecte sobre els paràmetres hematològics	247
10.3.3. Efecte sobre les determinacions immunològiques	247

<u>DISCUSSIÓ</u>	251
<u>CONCLUSIONS</u>	270
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	274

ÍNDIX DE FIGURES

FIGURA 1:	Esquema de la resposta inflamatòria	6
FIGURA 2:	Cèl.lules i sistemes implicats en la respos- ta inflamatòria	8
FIGURA 3:	Fases de maduració del neutròfil	16
FIGURA 4:	Generació de bradixinina en el plasma	36
FIGURA 5:	Activació del sistema del complement	38
FIGURA 6:	Metabolisme de l'àcid araquidònic via ciclooxigenasa	51
FIGURA 7:	Metabolisme de l'àcid araquidònic via lipoxigenasa	57
FIGURA 8:	Formació de radicals lliures	63
FIGURA 9:	Disseny experimental	83
FIGURA 10:	Representació esquemàtica de les sèries expe- rimentals amb els paràmetres mesurats i els tractaments utilitzats	85
FIGURA 11:	Evolució de l'increment de pes (SÈRIE I)	110
FIGURA 12:	Evolució del pes dels òrgans (SÈRIE III)	113
FIGURA 13:	Evolució de l'increment de volum de l'extre- mitat ipsilateral (SÈRIE I)	119
FIGURA 14:	Evolució de l'increment de volum de l'extre- mitat contralateral (SÈRIE I)	120
FIGURA 15:	Evolució de l'activitat motora (mesurada en unitats arbitràries)	135
FIGURA 16:	Evolució del contingut de potència de l'har- mònic circadiari (% respecte a la potència total de la funció)	136
FIGURA 17:	Evolució de l'acrofase (minuts)	137
FIGURA 18:	Evolució de l'amplitud (mesurada en unitats arbitràries)	138
FIGURA 19:	Actogrames	139
FIGURA 20:	Perfil del proteïnograma d'un animal control i d'un artrític	147
FIGURA 21:	Evolució del proteïnograma (SÈRIE III)	148

FIGURA 22:	Evolució del proteïnograma (SÈRIE VII)	155
FIGURA 23:	Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la <u>deter</u> minació de grups sulfhidril sèrics	163
FIGURA 24:	Evolució dels nivells de grups sulfhidril sèrics (SÈRIE III)	164
FIGURA 25:	Evolució dels nivells de grups sulfhidril sèrics (SÈRIE VII)	168
FIGURA 26:	Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la <u>deter</u> minació de l'activitat complementària total ..	174
FIGURA 27:	Evolució dels nivells d'activitat complemen- tària total	175
FIGURA 28:	Esquema de la tècnica d'aglutinació del làtex	182
FIGURA 29:	Evolució dels títols de làtex (SÈRIE II)	186
FIGURA 30:	Evolució dels títols de làtex (SÈRIE III)	187
FIGURA 31:	ELISA competitiu per a la detecció d' <u>anticos</u> sos i ELISA indirecte	191
FIGURA 32:	ELISA sandvitx de doble anticòs i ELISA amplificat	193
FIGURA 33:	Reacció de l'enzim amb el substrat	198
FIGURA 34:	Disseny general de l'ELISA per a la <u>deter</u> minació d'antiimmunoglobulines	200
FIGURA 35:	Resultats de l'ELISA amplificat	205
FIGURA 36:	Optimització de l'assaig amb IgG de ratolí ...	206
FIGURA 37:	Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la <u>deter</u> minació d'antiIg totals	208
FIGURA 38:	Evolució de la concentració d'antiIg totals (SÈRIE II)	209
FIGURA 39:	Ajust de les condicions experimentals	213
FIGURA 40:	Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la <u>deter</u> minació d'antiIg de la classe IgG	214
FIGURA 41:	Evolució de la concentració d'antiIg IgG (SÈRIE II)	215

FIGURA 42: Determinació de la concentració adient d'antiIgG	221
FIGURA 43: Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la deter minació d'IgG	223
FIGURA 44: Efecte del tractament amb benoxaprofè (BNX) sobre els títols de làtex	241
FIGURA 45: Efecte de la SOD sobre els títols de làtex ...	248

ÍNDIX DE TAULES

TAULA I:	Mediadors associats als grànuls dels mastòcits	13
TAULA II:	Receptors descrits a la superfície dels macròfags	23
TAULA III:	Factors quimitotàctics	26
TAULA IV:	Efectes biològics de la histamina segons el tipus de receptor	32
TAULA V:	Activitats biològiques dels productes resultants de l'activació dels sistema del complement	40
TAULA VI:	Activitats biològiques dels principals metabòlits de l'àcid araquidònic	49
TAULA VII:	Incidència de l'artritis adjuvant	89
TAULA VIII:	Evolució del pes del fetge, de la melsa, del timus i dels ronyons (SÈRIE III)	114
TAULA IX:	Evolució del pes del fetge i de les glàndules suprarenals (SÈRIE IV)	115
TAULA X:	Evolució del pes de la melsa i del timus (SÈRIE VII)	116
TAULA XI:	Quantitat d'aliment ingerida pel grup control i pel grup artrític	117
TAULA XII:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE I)	121
TAULA XIII:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE II)	124
TAULA XIV:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE III)	125
TAULA XV:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE IV)	126

TAULA XVI:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE V)	127
TAULA XVII:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE VI)	128
TAULA XVIII:	Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE VII)	129
TAULA XIX:	Correlacions entre els increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (ml) i els resultats corresponents al pes d'òrgans (%)	130
TAULA XX:	Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE III)	149
TAULA XXI:	Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE II)	152
TAULA XXII:	Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE IV)	153
TAULA XXIII:	Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE VII)	156
TAULA XXIV:	Correlacions entre els resultats corresponents al proteïnograma i diferents paràmetres	158
TAULA XXV:	Evolució de la concentració sèrica de proteïnes (g/dl)	160
TAULA XXVI:	Evolució de la concentració de grups sulfhidril sèrics ($\mu\text{mol/l}$)	165
TAULA XXVII:	Evolució de la concentració de grups sulfhidril sèrics ($\mu\text{mol/l}$) (SÈRIE IV)	166
TAULA XXVIII:	Evolució de la concentració de grups sulfhidril sèrics ($\mu\text{mol/l}$) (SÈRIE VII)	169
TAULA XXIX:	Correlacions entre els nivells de grups sulfhidril sèrics i diferents paràmetres ..	171
TAULA XXX:	Evolució de l'activitat complementària sèrica total (U/ml)	176

TAULA XXXI:	Estudi de diferents preparacions de làtex	183
TAULA XXXII:	Estudi de preparacions de làtex amb protecció i sense	185
TAULA XXXIII:	Correlacions entre els títols de làtex i diferents paràmetres (correlació d'Spearman	189
TAULA XXXIV:	Correlacions entre els nivells d'antiIg totals i diferents paràmetres	211
TAULA XXXV:	Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE II)	216
TAULA XXXVI:	Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE III)	217
TAULA XXXVII:	Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE IV)	218
TAULA XXXVIII:	Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE VII)	219
TAULA XXXIX:	Evolució de la concentració d'IgG sèrica (mg/ml)	224
TAULA XL:	Efecte de la indometacina (IND) sobre l'increment de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral i sobre la concentració sèrica de grups sulfhidril ..	229
TAULA XLI:	Efecte de la indometacina (IND) sobre els nivells d'antiIg totals i d'antiIg IgG	231
TAULA XLII:	Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre l'increment de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE II) ...	233
TAULA XLIII:	Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre l'increment de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral i sobre el pes d'òrgans (SÈRIE III)	235
TAULA XLIV:	Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre el proteïnograma (SÈRIE II)	236
TAULA XLV:	Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre el proteïnograma (SÈRIE III)	239

TAULA XLVI:	Efecte del benoxapofè (BNX) sobre l'acti- vitat complementària sèrica total i sobre els nivells d'antiimmunoglobulines (SÈRIE II)	242
TAULA XLVII:	Efecte del benoxapofè (BNX) sobre la con- centració de grups sulfhidril sèrics i so- bre els nivells d'antiimmunoglobulines (SÈRIE III)	243
TAULA XLVIII:	Efecte de la SOD sobre l'increment de vo- lum de les extremitats ipsilateral i con- tralateral i sobre el pes d'òrgans	247
TAULA XLIX:	Efecte de la SOD sobre el proteïnograma ..	249
TAULA L:	Efecte de la SOD sobre la concentració de grups sulfhidril sèrics i sobre els ni- vells d'antiimmunoglobulines	250

ÍNDIX D'ABREVIATURES

- Ac = anticòs
Ag = antigen
A/G = quocient albúmina/globulines
AM = activitat motora
ANA = anticòssos antinuclears
antiIg = antiimmunoglobulines
antiIg conill-PO = antisèrum antiimmunoglobulines de conill
marcat amb peroxidasa
antiIg IgG = antiimmunoglobulines de la classe IgG
antiIg rata-PO = antisèrum antiimmunoglobulines da rata
marcat amb peroxidasa
antiIg-ratolí-PO = antisèrum antiimmunoglobulines de ratolí
marcat amb peroxidasa
antiIgG rata = antisèrum antiIgG de rata
antiIgG rata-PO = antisèrum antiIgG de rata marcat amb peroxidasa
BCD = "binared codified decimal"
BSA = albúmina bovina sèrica
BNX = benoxaprofè
CPHC = contingut de potència de l'harmònic circadiari
DMAB = àcid dimetilbenzoic
DTNB = àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)
ECF-A = factor quimiotàctic d'anafilaxi per a eosinòfils
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
FH = factor Hageman
FITC = isotiocianat de fluoresceïna
FR = factor reumatoide
FR IgA = factor reumatoide de la classe IgA
FR IgE = factor reumatoide de la classe IgE
FR IgG = factor reumatoide de la classe IgG
FR IgM = factor reumatoide de la classe IgM
GBS = solució salina amortidora de glicina
HMP = hexosa monofosfat
Ig-ratolí = immunoglobulines de ratolí
IgA = immunoglobulina A
IgE = immunoglobulina E

IgG = immunoglobulina G
 IgM = immunoglobulina M
 IL-1 = interleuquina 1
 IND = indometacina
 LIF = factor inhibitori dels leucòcits
 LTA = leucotriè A
 LTB = leucotriè B
 LTC = leucotriè C
 LTD = leucotriè D
 LTE = leucotriè E
 MAF = factor activador dels macròfags
 MBTH = 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona
 MCF = factor quimiotàctic per a monòcits-macròfags
 MIF = factor inhibidor de la migració de macròfags
 PBS = solució salina amortidora de fosfats
 PBS-T = PBS amb el 0.5 % V/V de Tween-20
 PBS-T-BSA = PBS-T amb un 1 % de BSA
 PG = prostaglandines
 PGA = prostaglandina A
 PGB = prostaglandina B
 PGC = prostaglandina C
 PGD = prostaglandina D
 PGE = prostaglandina E
 PGF = prostaglandina F
 PGG = prostaglandina G
 PGH = prostaglandina H
 PGI = prostaglandina I
 PMN = polimorfonuclears
 SFM = sistema fagocític mononuclear
 SOD = superòxid dismutasa
 SRS-A = "slow reacting substance of anaphylaxis"
 TNB = àcid 5-tio-2-nitrobenzoic
 TTL = "total transistor logic"
 TxA = tromboxà A
 TxB = tromboxà B

O B J E C T E

Hi ha tota una sèrie de models animals en els quals es pot induir una patologia semblant a l'artritis reumatoide. Aquests models experimentals constitueixen un dels millors mètodes per a investigar la fisiopatologia del procés inflamatori i per a determinar l'activitat de medicaments antiinflamatòris en la fase preclínica. Un d'aquests models experimentals és l'anomenada artritis adjuvant induïda en rates mitjançant l'administració d'adjuvant complet de Freund (Mycobacterium tuberculosis suspès en oli mineral).

L'artritis adjuvant és una patologia que cursa amb poliartritis i amb tota una sèrie d'alteracions sistèmiques que afecten altres teixits i que indueixen nombrosos canvis en els components cel·lulars i humorals sanguinis.

En aquest treball s'ha intentat aprofundir en diferents aspectes d'aquesta patologia. Així doncs, s'ha seguit l'evolució de la inflamació articular i d'altres determinacions somatomètriques durant dos mesos. També s'ha analitzat la influència de la malaltia sobre una sèrie de paràmetres locomotors, com són, entre altres, l'activitat motora total i el ritme circadiari dels animals.

D'altra banda s'han estudiat paràmetres sèrics fent un especial èmfasi en la determinació de l'activitat reductora sèrica com a possible paràmetre d'aplicació en el diagnòstic i evolució de la malaltia i com a mesura de l'eficàcia del tractament.

També s'han analitzat algunes característiques immunològiques de la patologia, amb la finalitat d'esbrinar si, en aquest aspecte, hi ha similituds entre l'artritis adjuvant i l'artritis reumatoide. Està ben establert que l'artritis adjuvant és una malaltia immunològica, però la naturalesa de l'antigen i de la resposta immune enfront aquest no es coneixen. En aquest treball ens hem centrat en un aspecte concret de la resposta immune de tipus humoral, com és la detecció i quantificació d'autoanticossos, els quals juguen un important paper en l'artritis reumatoide. També s'han estudiat els nivells sèrics d'activitat complementària total, per tal d'observar les seves variacions paral·leles a la patologia i a la presència d'autoanticossos.

PART TEÒRICA

1. INFLAMACIÓ

La inflamació és la resposta dels teixits enfront de qualsevol agressió. Aquesta resposta comprèn una sèrie de reaccions i canvis en la circulació local, que tendeixen a la neutralització i eliminació de l'agent nociu i a la reparació del mal tissular causat (Peña, 1982).

La inflamació ha ocupat des de sempre un lloc important en el pensament mèdic. Ja en el segle I, Cels va definir els quatre caràcters anatomoclínic que acompanyen la inflamació: el rubor, la calor, la inflor i el dolor. Més tard, Galè va afegir a aquestes quatre característiques la pèrdua de la funcionalitat. Però no va ser fins el segle XVI que es va associar la inflamació a l'existència d'un trastorn vascular i aleshores es van començar d'una manera empírica els estudis sobre la inflamació (Brune, 1984).

Avui dia se sap que com a resultat d'una lesió cel·lular s'activa tot un intricat sistema, causant l'alliberament de nombrosos mediadors inflamatoris tal com la histamina, la serotonina, enzims lisosomals, prostaglandines i leucotriens. Aquestes substàncies inicien un procés en tres fases: vasodilatació, augment de la permeabilitat capil·lar i exsudació leucocítica. Aquestes tres fases tenen lloc simultàniament en un procés amb múltiples interaccions que componen els signes cardinals esmentats de la inflamació (Robins i col., 1979). A la figura 1 es pot observar d'una manera esquemàtica un resum del mecanisme de resposta de l'organisme.

La primera fase de la inflamació és una vasodilatació localitzada, fet que té per objecte l'augment de flux de sang a la zona afectada i que assegura l'aport suficient de cèl·lules amb capacitat defensiva, així com dels elements

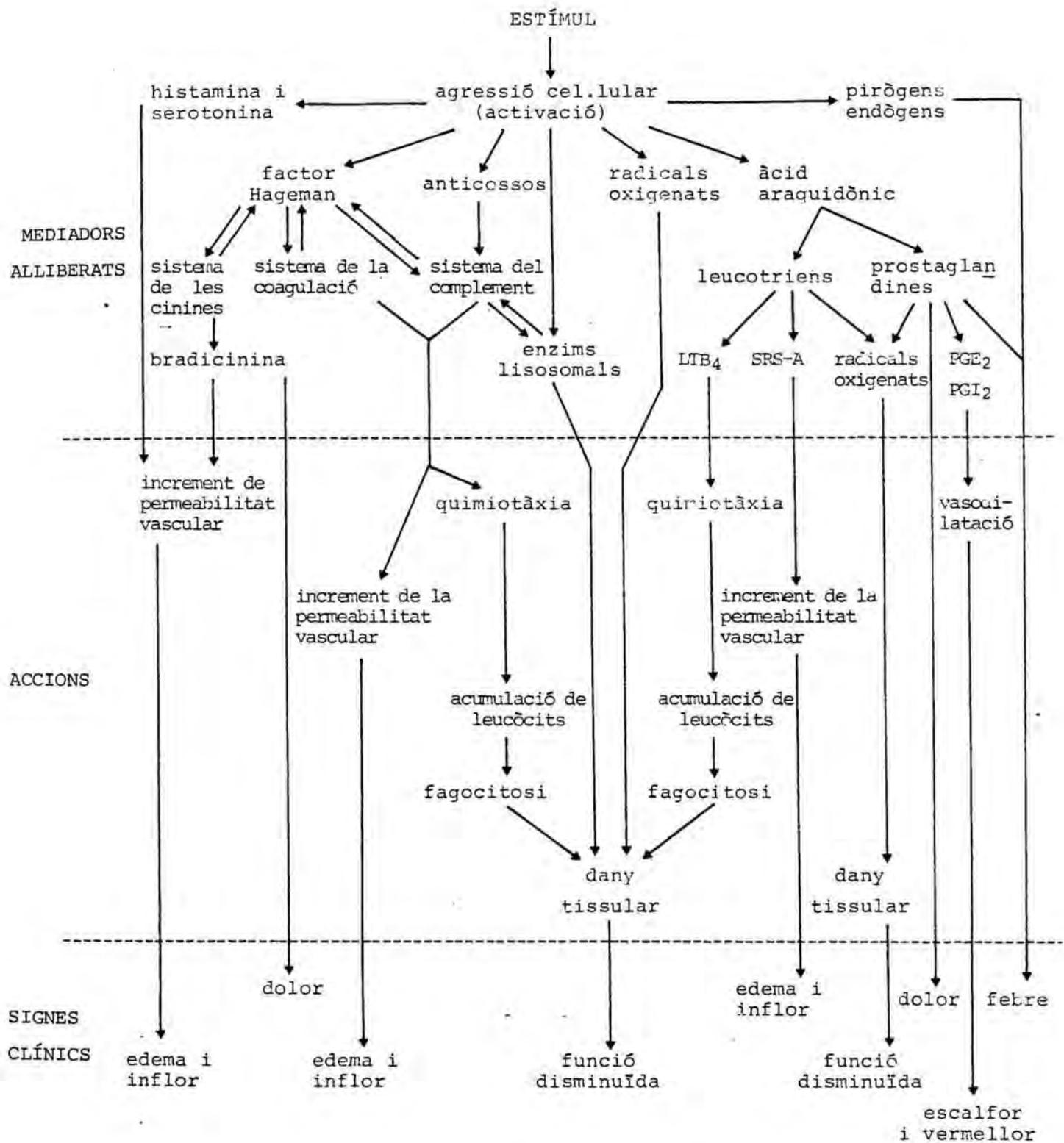


FIGURA 1: Esquema de la resposta inflamatòria (Ford i col., 1984)

sèrics col.laboradors en la defensa local. La vasodilatació ocasiona els primers signes de la inflamació: escalfor i eritema o vermellor (Robins i col., 1979; Van de Stadt, 1982).

Junt amb la vasodilatació, es produeix un augment de la permeabilitat capil.lar que permetrà la sortida de proteïnes, líquids i cèl.lules del torrent circulatori, i així comportarà la formació d'un edema (Robins i col., 1979). Aquest augment de permeabilitat és una conseqüència de l'alliberament de prostaglandines i histamina dels teixits lesionats.

El mecanisme que produeix el dolor associat al procés inflamatori no és gaire conegut, però se sap que està ocasionat per l'alliberament de certs mediadors químics a les àrees locals de la lesió (Simon i col., 1980; Van de Stadt, 1982).

La pèrdua de la funcionalitat és l'últim signe clínic i és un resultat directe del mal tissular (Van de Stadt, 1982).

El flux de cèl.lules originat per la vasodilatació, per l'augment de la permeabilitat vascular i per estímuls quimiotàctics alliberats pels mastòcits o que provenen de l'activació del complement, comporta la concentració de neutròfils i macròfags al lloc de la lesió. Aquestes cèl.lules amb capacitat fagocítica alliberen enzims proteolítics i hidrolítics dels lisosomes, fet que crea i manté el procés inflamatori (figura 2).

En determinades condicions, l'estímul inflamatori cessarà o bé serà fagocitat per neutròfils i macròfags. Aleshores el teixit lesionat serà regenerat pels fibroblasts i el procés inflamatori finalitzarà. Però hi ha vegades en què els estímuls són persistents com per exemple, en infeccions bacterianes cròniques o en casos d'existència d'autoanticossos, de manera que les substàncies tòxiques alliberades pels teixits

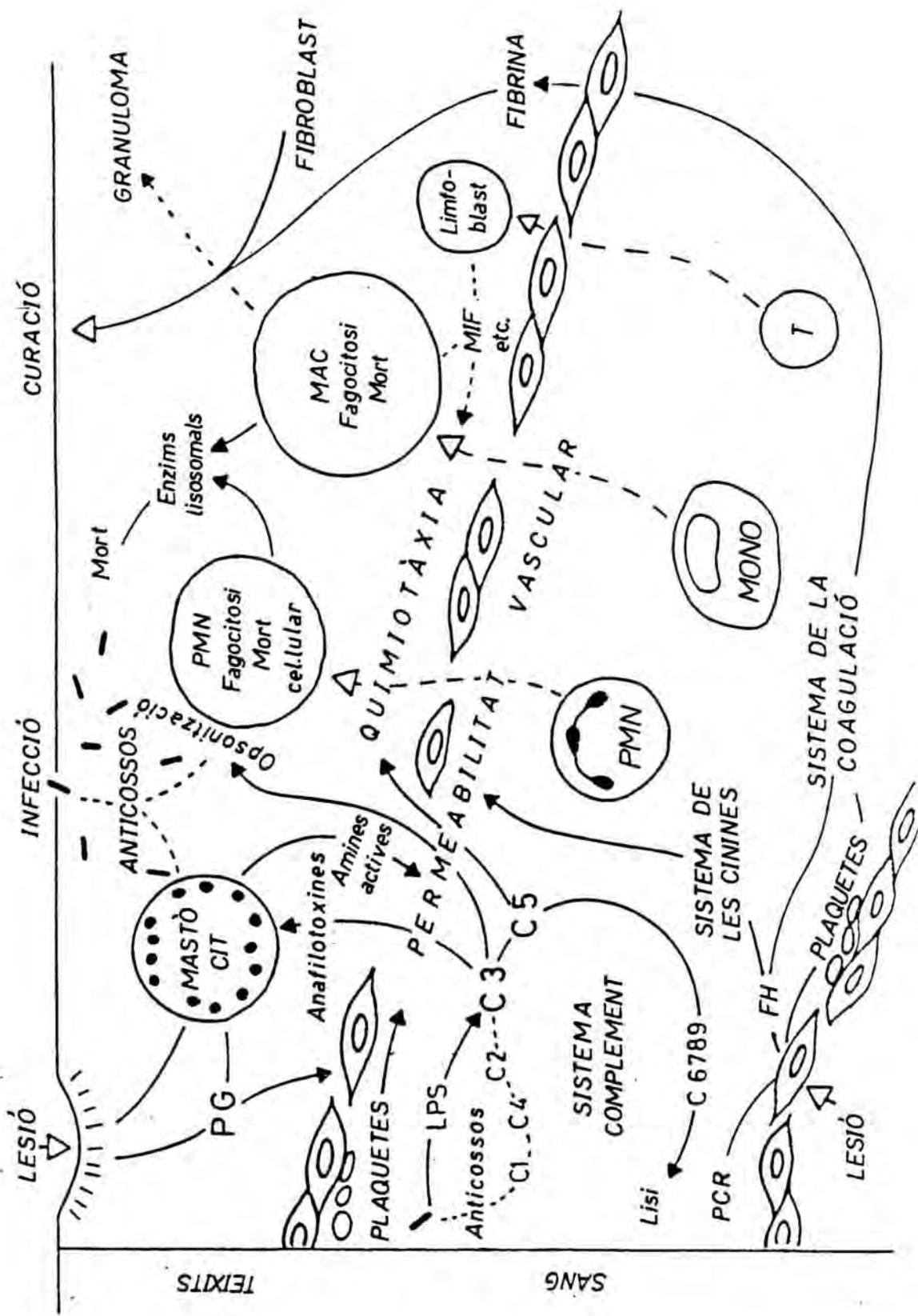


FIGURA 2: Cèl·lules i sistemes implicats en la resposta inflamatòria

i les cèl.lules, contribuiran a fer crònic el procés inflamatori. Aquest és el cas de l'artritis reumatoide, malaltia inflamatòria crònica que cursa amb hiperplàsia o "pannus" sinovial. En aquesta patologia tenen lloc dues reaccions simultàniament. Una és una reacció exsudativa induïda per immunocomplexos amb activació del sistema del complement i generació de factors quimiotàctics i de proteases, responsables de l'erosió del cartílag. La segona reacció és cel.lular i comporta la secreció de limfoquines i autoanticòssos (factor reumatoide, la qual cosa dóna un caràcter cíclic a l'evolució (Ziff, 1980).

Des del punt de vista fisiològic es pot dir que la inflamació és el resultat de l'acció d'unes substàncies que actuen com a mediadors i de la participació d'unes cèl.lules que han sigut atretes i activades per un estímul determinat. En aquesta introducció teòrica s'ha intentat fer un petit recull sobre aquestes cèl.lules i aquests mediadors. S'ha de tenir en compte la dificultat inherent a la separació i a la classificació de les cèl.lules i mediadors inflamatoris, ja que l'organisme respon d'una manera unitària i existeixen moltes interrelacions entre els mediadors inflamatoris i entre aquests i les cèl.lules, com s'ha fet palès a la figura 1.

En l'última part d'aquesta introducció es fa referència especial al factor reumatoide, mediador inflamatori que participa activament en la patogènia de l'artritis reumatoide. El fet d'afegir aquest apèndix es deu a que en la part experimental del treball, on s'ha estudiat un model animal d'inflamació crònica, es fa èmfasi sobre la detecció i quantificació d'aquest.

2. CÈL.LULES IMPLICADES EN EL PROCÉS INFLAMATORI

La reacció tissular desenvolupada a la inflamació comporta un flux de leucòcits a través dels estomes endotelials. Les cèl.lules implicades en més o menys extensió són basòfils, eosinòfils, neutròfils, monòcits, macròfags, mastòcits i limfòcits.

Els neutròfils i els macròfags són els tipus cel.lulars més importants tant en nombre com per la seva funcionalitat. Són cèl.lules que participen activament mitjançant el procés de fagocitosi i també són primordials com a font de mediadors inflamatoris.

Seguidament es tractaran les cèl.lules més rellevants en el procés inflamatori: d'una banda les cèl.lules fagocítiques i d'altra els mastòcits, ja que aquestes darreres cèl.lules participen d'una manera precoç i intensa, constituint així la font dels primers mediadors alliberats en el decurs de la reacció inflamatòria.

2.1. MASTÒCITS

Els mastòcits són les principals cèl.lules que intervenen en les reaccions d'hipersensibilitat immediata, on inicien la resposta al·lèrgica mitjançant la secreció d'una sèrie de mediadors continguts als seus grànuls i alliberats després de la interacció de l'antigen amb la immunoglobulina E lligada als receptors de la seva membrana. Però els mastòcits també participen en les reaccions d'hipersensibilitat retardada, com per exemple en moltes formes d'inflamació crònica i neoplàsies. Són cèl.lules que possiblement provoquen la primera resposta inflamatòria en una lesió i, mitjançant l'alliberament dels seus mediadors, estimulen la migració secundària d'altres cèl.lules efectores a l'àrea inflamada

(Holgate, 1983).

Els mastòcits són cèl.lules altament diferenciades, probablement d'origen medul.lar (Clark, 1983) i que es troben en els llocs d'entrada potencials d'agents nocius, com el teixit perivascular i les superfícies seroses i cutànies. Concretament, a l'home, s'han considerat concentracions considerables de mastòcits a la pell, teixit limfàtic, úter, bufeta de l'orina, llengua, sinòvia, mesenter, capes subserosa i submucosa del tracte digestiu i al voltant dels vasos sanguinis (Selye, 1965). La característica principal dels mastòcits és la presència de grànuls citoplasmàtics densos, que ocupen el citoplasma de manera que emmascaren el nucli i es coloren intensament amb colorants metacromàtics (Metcalf i col., 1981a).

Els mastòcits poden intervenir en les reaccions inflamatòries a través de vies mediatitzades per IgE o per mediadors derivats dels limfòcits i del sistema del complement. El seu paper a la inflamació depèn de la secreció dels grànuls citoplasmàtics que contenen substàncies responsables d'una sèrie d'efectes biològics específics que varien segons el teixit on té lloc la reacció (Metcalf i col., 1981a).

L'activació dels mastòcits indueix una complicada sèrie d'esdeveniments químics com són l'estimulació del metabolisme de fosfolípids, l'activació d'enzims de membrana, la participació de segons missatgers cel.lulars, el consum d'energia i la intervenció d'elements citoesquelètics contràctils i no contràctils que comporten el moviment dels grànuls. Paral·lelament a la degranulació, l'activació dels mastòcits també estimula la síntesi "de novo" d'altres substàncies (Holgate, 1983).

En les reaccions d'hipersensibilitat immediata l'antigen reacciona amb la corresponent IgE específica fixada a

la superfície dels mastòcits i produeix la descàrrega dels grànuls. Aquesta reacció té lloc pocs segons després de l'exposició a l'antigen (Ishizaka, 1981).

Però la degranulació del mastòcit es pot provocar també per una àmplia varietat d'agents farmacològics. Concretament en els mastòcits de rata s'ha pogut induir la secreció per enzims com la fosfolipasa A i C, per compostos catiònics com el compost 48/80, la polimixina B, la polilisina, la poliarginina, també per ionòfors, lectines i polímers de carbonhidrats i per altres agents immunològics com IgG i les anafilotoxines derivades del complement, C3a, C4a i C5a (Holgate, 1983).

La secreció dels grànuls del mastòcit comporta l'alliberament d'una sèrie de mediadors, que es troben resumits a la taula I. D'aquestes substàncies la histamina i la serotonina seran tractades més endavant (apartats 3.1. i 3.2.), dels altres mediadors esmentarem seguidament els més importants:

- Factors quimiotàctics per a neutròfils:

Són glico-proteïnes d'un pes molecular de 75,000 i un punt isoelèctric neutre. Tenen especificitat per a neutròfils i en menys extensió per a eosinòfils però no per a monòcits (Metcalf i col., 1981a; Holgate, 1983). Produeixen el fenomen de desactivació, és a dir, després de la incubació de neutròfils amb aquests factors, aquestes cèl.lules ja no responen a altres factors quimiotàctics (Wasserman, 1983).

- Factor inflamatori d'anafilaxi:

S'ha descrit un agent quimiotàctic derivat dels grànuls dels mastòcits que atreu neutròfils i cèl.lules mononuclears en la fase tardana de la reacció al·lèrgica (Tannen-

TAULA I: Mediadors associats als grànuls dels mastòcits

MEDIADOR	EFFECTE FISIOLÒGIC
- Preformats, alliberats ràpidament en condicions fisiològiques:	
Histamina	Contracció del múscul llis Increment de la permeabilitat vascular Estimulació de limfòcits T supressors Augment o inhibició de la quimiotàxia Estimulació de la secreció de mucus
Serotonina*	Contracció del múscul llis Increment de la permeabilitat vascular
Factors quimiotàctics per a eosinòfils	Quimiotàxia i desactivació d'eosinòfils
Factors quimiotàctics per a neutròfils	Quimiotàxia i desactivació de neutròfils
Arilsulfatasa A	Sulfhidrolasa
- Preformats, associats estretament al grànul en condicions fisiològiques:	
Heparina	Anticoagulant Inhibició de l'activació del complement Inhibició de la quimotripsina
Quimotripsina/Tripsina	Proteòlisi
Peroxidasa*	Peroxidació lipídica
Superòxid dismutasa*	Dismutació del superòxid
Arilsulfatasa B	Sulfhidrolasa
- Generats com a conseqüència de l'activació-secreció del mastòcit:	
Factor activador plaquetari	Agregació plaquetària
Leucotriens	
Prostaglandines	Veure taula VI

* = demostrats en espècies diferents de l'home

baum i col., 1980). Aquest factor inflamatori d'anafilaxi sembla estar format per tretze aminoàcids i té un pes molecular de 1,350.

- Factors quimiotàctics per eosinòfils d'anafilaxi (ECF-A):

S'han descrit dos tetrapèptids, Ala-Gly-Ser-Glu i Val-Gly-Ser-Glu, diferents només en el seu aminoàcid N-terminal, com a substàncies amb activitat ECF-A (Goetzl i col., 1975). Són factors selectius pel que fa als eosinòfils i són capaços de desactivar-los. També s'han descrit factors quimiotàctics per als eosinòfils de pes molecular intermig associats als mastòcits, però encara no s'han caracteritzat bé.

- Enzims lisosomals:

El mastòcit conté un nombre d'enzims, associats específicament amb els grànuls, com arilsulfatasa, β -hexosaminidasa, β -glucuronidasa, β -D-galactosidasa, quimotripsina, tripsina, fosfatasa àcida, superòxid dismutasa i peroxidasa (Metcalf i col., 1981a).

A més d'aquests mediadors que ja es troben preformats als grànuls, els mastòcits alliberen una sèrie de substàncies com a conseqüència de la seva activació. Entre aquestes substàncies es troben prostaglandines (PGD_2) i els leucotriens C_4 , D_4 i E_4 , que constitueixen la SRS-A (apartat 3.6) (Holgate, 1984).

2.2. CÈL.LULES FAGOCÍTIQUES

Al 1893, Metchnikoff va estudiar la funció de les cèl.lules fagocítiques en una àmplia varietat d'espècies animals, des dels més senzills organismes multicel.lulars fins als mamífers. Va demostrar que en totes aquestes espècies es

produïa una resposta a una lesió o infecció que consistia en la migració de cèl.lules fagocítiques al lloc lesionat i la posterior ingestió i digestió del material agressor.

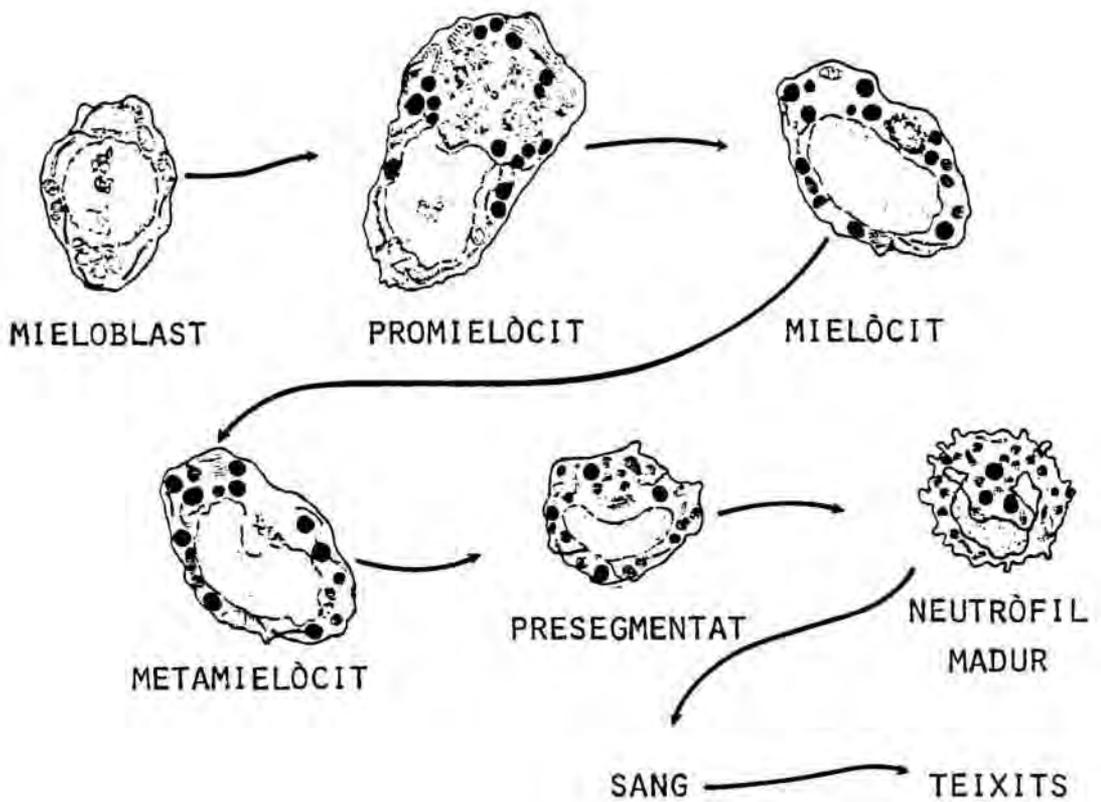
Les cèl.lules fagocítiques comprenen dos grups especialitzats de cèl.lules. D'una banda les cèl.lules mieloides (granulòcits), que poden ésser mobilitzades ràpidament i arriben als llocs inflamats de seguida i en gran nombre, són molt eficients en molts tipus d'infeccions, però no tenen capacitat de diferenciació i viuen només poc temps. D'altra part el sistema fagocític mononuclear que comprèn cèl.lules mòbils que inicialment responen més lentament que les cèl.lules mieloides, però que poden diferenciar-se als llocs d'inflamació donant lloc a cèl.lules més eficients que les originals. Moltes cèl.lules fagocítiques mononuclears són cèl.lules fixes localitzades als teixits on actuen com a trampes o filtres del material que circula a través del teixit (Wilkinson, 1983).

2.2.1. Cèl.lules mieloides

Les cèl.lules madures del sistema mioide que circulen per la sang es coneixen com a granulòcits o leucòcits polimorfonuclears (PMN). Segons l'afinitat dels seus grànuls citoplasmàtics per la tinció de Romanowsky, els granulòcits es classifiquen en leucòcits neutròfils, eosinòfils i basòfils. D'aquestes cèl.lules els neutròfils són els més abundants i els més estudiats.

Els granulòcits es produeixen a la medul.la òssia a partir d'una cèl.lula mare que és antecessora comuna de leucòcits, eritròcits i plaquetes (Dunn, 1971; Rickard i col., 1971). A partir d'aquesta cèl.lula pluripotencial, el precursor del granulòcit comença una fase proliferativa i de maduració, i passa a través de diferents estadis (figura 3). En condicions normals, el teixit hematopoètic conté un nombre consi

FIGURA 3: Fases de maduració del neutròfil
(Davis i col., 1981)



derable de granulòcits madurs, els quals constitueixen una reserva que pot ésser mobilitzada en cas necessari (Wilkinson, 1983).

A la sang, aproximadament la meitat del nombre total de granulòcits són circulants, mentre que l'altra meitat està marginada als llits capil.lars, especialment dels pulmons (Dancey i col., 1976). Aquestes cèl.lules poden ésser alliberades ràpidament en determinades condicions, i causar un immediat increment del nombre de granulòcits circulants. De manera recíproca, aquests leucòcits poden tornar-se marginals mitjançant agents que incrementen la seva adhesivitat. No es coneix el mecanisme exacte pel qual es mantenen constants els nivells de granulòcits en la sang. S'ha suggerit que el mateix nivell de granulòcits en la sang pot actuar com a regulador de l'alliberament des de la medul.la mitjançant algun mecanisme de retroalimentació negativa (Wilkinson, 1983). Sigui com sigui hi ha un equilibri entre el nombre de cèl.lules medul.lars, el nombre de les circulants i el nombre de les marginals. En el cas dels neutròfils s'ha estimat que la quantitat de neutròfils de reserva a la medul.la és del 92.6 % dels totals, la proporció a la circulació és del 3.2 % i el nombre de neutròfils marginals representa el 4.2 % (Boggs, 1975).

Els neutròfils circulen per la sang durant un breu període, només algunes hores, després del qual poden migrar als teixits, particularment als llocs inflamats, o senzillament poden desaparèixer.

Els neutròfils són cèl.lules finals que tenen un nucli format per una massa informe de cromatina sense nucléols i capaces només d'una síntesi limitada de proteïnes. La seva vida està fonamentalment dedicada a la tasca de migrar al lloc d'una lesió inflamatòria, i allí realitzar les seves funcions fagocítiques i digestives i, probablement, fent això, exhaurir les seves reserves metabòliques (Wilkinson, 1983).

El neutròfil madur està envoltat d'una membrana plasmàtica trilaminar, que és capaç d'extendre pseudòpodes dirigits cap a un gradient quimiotàctic (Berlin i col., 1975). Per sota d'aquesta membrana hi ha microfilaments constituïts per actina i miosina, que generen les forces contràctils necessàries per a moure's (Stossel, 1974). A més té un sistema de microtúbuls que és important en l'estabilització de la cèl·lula durant la locomoció i en l'organització dels grànuls intracel·lulars durant la degranulació (Malech i col., 1977; Hoffstein, 1980). Cal assenyalar la presència a la membrana del neutròfil de receptors per a la porció Fc de la IgG i per al component C3b del complement, receptors essencials per a exercir les seves funcions fagocítiques (Lay i col., 1968).

Els neutròfils contenen dos tipus principals de grànuls citoplasmàtics: els grànuls primaris o atzuròfils (es teñeixen de blau amb la coloració de Wright-Giemsa) i els grànuls secundaris o específics; el nombre de grànuls secundaris és unes tres vegades més gran que el nombre de primaris. Mitjançant estudis histoquímics, ultraestructurals i bioquímics s'ha demostrat l'existència de subclasses addicionals de grànuls (Baggiolini, 1980). Els grànuls atzurófils apareixen durant la diferenciació cel·lular en la fase de promonòcit; són grànuls lisosomals amb un alt contingut d'hidrolases àcides, i també amb lisozim, proteases neutres (elastasa), proteïnes catiòniques, mieloperoxidasa, mucopolisacàrid àcid i β -glucuronidasa. Els grànuls específics es formen durant la fase de diferenciació de mielòcit, no tenen hidrolases àcides, sinó que contenen lisozim, lactoferrina, proteases neutres (col·lagenasa) i una proteïna d'unió a la vitamina B₁₂ (Rossi, 1980; Davis i col., 1981; Wilkinson, 1983). El citoplasma també conté diferents grànuls de glicogen, que constitueixen una font d'energia per a la cèl·lula.

El pas del neutròfil als teixits s'aconsegueix per migració entre les cèl·lules endotelials adjacents dels vasos,

fenomen anomenat diapedesi. Una vegada als teixits, els leucòcits es dirigeixen al lloc de la lesió o de la infecció tissular, on fagociten i digereixen el material que cal. Aquesta migració es realitza per quimiotàxia, procés descrit per primera vegada per Mac Cutcheon (1946) com la reacció per la qual la direcció de locomoció està determinada per substàncies de l'ambient. Aquestes substàncies són els anomenats agents quimiotàctics.

S'ha demostrat la presència de receptors per a factors quimiotàctics en els neutròfils humans (Aswanikumar i col., 1977; Williams i col., 1977), així com l'existència de receptors específics per al factor quimiotàctic C5a (Chenoweth i col., 1978) i per a un agent quimiotàctic cel·lular (Spilberg i col., 1979).

Els factors quimiotàctics tenen múltiples efectes en la funció dels neutròfils. De més a més d'estimular la locomoció dirigida, indueixen la secreció del contingut dels grànuls, canvis en l'adhesivitat i un fort augment en l'activitat metabòlica, generant productes microbicides. Aquests efectes poden ser dosi-dependents: a baixes concentracions, el principal efecte del C5a és estimular la locomoció, mentre que a concentracions més elevades immobilitza les cèl·lules, afavoreix la degranulació i activa els processos bioquímics necessaris per a la mort del bacteri ingerit (Wilkinson, 1983).

La degranulació del neutròfil juga un important paper modulador en la inflamació (Gallin i col., 1978; Weissman i col., 1980). Els grànuls específics dels neutròfils contenen materials que activen la via alterna del complement, generant C5a. Aquesta activació del complement gràcies a productes del neutròfil pot representar un important sistema d'amplificació de la resposta inflamatòria. Productes procedents dels grànuls azuròfils, que són alliberats més tard en el procés fagocític, poden inactivar el C5a i altres factors quimiotàctics, limi-

tant l'extensió de la inflamació i constituent, aleshores, un sistema modulador de la inflamació (Wright i col., 1977).

2.2.2. Sistema fagocític mononuclear (SFM)

Metchnikoff (1893) va descriure els grans fagòcits de la sang i teixits de mamífers i els va anomenar macròfags per diferenciar-los dels petits fagòcits o "micròfags", nom donat als granulòcits. Més tard, Aschoff va introduir el terme de "Sistema retículo-endotelial" per incloure totes les cèl.lules amb propietats com els macròfags, terme que, al 1969, un comitè reunit a Leyde va substituir pel de Sistema Fagocític Mononuclear (SFM), sistema que comprèn totes les cèl.lules que compleixen les següents condicions:

- a) provenen de la sèrie monocítica de la medul.la òssia,
- b) tenen una capacitat fagocítica i pinocítica molt elevada, i
- c) tenen receptors immunològics (per a les immunoglobulines i el complement) a través dels quals realitzen un reconeixement específic (Langevoort i col., 1970).

Els elements del SFM s'originen a la medul.la òssia, on desenvolupen tot un seguit de canvis que comporten l'adquisició de competències endocítiques i l'expressió a la seva superfície de receptors pel complement i pel fragment Fc de les immunoglobulines. Els fagòcits mononuclears, després de deixar la medul.la, passen a la sang com a monòcits, circulant-hi poc temps (alguns dies) i aleshores abandonen la circulació per desenvolupar-se en els diferents teixits com a macròfags. Els monòcits són cèl.lules fagocítiques menys eficients que els macròfags, però probablement les seves respostes enfront d'agents quimiotàctics són millors (Wilkinson, 1983).

Una característica del SFM és que el macròfag pot canviar una altra vegada segons on es trobi. Aquests canvis es

deuen a certs estímuls i són diferents per a cada teixit (Adams i col., 1983). Els macròfags que acompanyen la inflamació també han canviat: han incrementat el seu volum, el contingut d'hidrolases, la secreció de proteases neutrals i també han guanyat competència per a la quimiotàxia i per a la fagocitosi (Steinman i col., 1974; Cohn, 1978). En general, els macròfags són cèl.lules mòbils, activament fagocítiques, capaces de sintetitzar proteïnes i també de dividir-se.

Una considerable proporció de població cel.lular del SFM està representada per macròfags tissulars "fixos", anomenats així perquè són components constants de l'arquitectura dels òrgans on es troben. La proporció més gran d'aquests es troba al fetge com a cèl.lules de la línia sinusoïdal, de les quals les més grans i més nombroses són les cèl.lules de Kupffer. Aquestes cèl.lules formen un 15 % del pes total del fetge i representen un important filtre en un lloc d'elevat flux sanguini. Altres llocs són la melsa i els nòduls limfàtics, on els macròfags estan estretament relacionats amb els limfòcits, i també es troben en el teixit connectiu (histiòcits) i a llocs especialitzats com l'os (osteoclast) i el sistema nerviós central (micròglia) (Wilkinson, 1983).

Els macròfags contenen tres tipus d'estructures intracel.lulars que són importants per a desenvolupar les seves funcions. Una d'aquestes estructures és el sistema vacuolar, que comprèn fagosomes, pinosomes, endosomes, lisosomes primaris i secundaris, i fagolisosomes (Adams i col., 1984). Els lisosomes primaris i secundaris contenen més de 40 enzims hidrolítics, sent la seva funció la degranulació de partícules i molècules fagocitades. Existeixen senyals, com estímuls fagocítics i limfoquines, que indueixen l'adquisició d'un nombre superior de lisosomes i dels enzims associats (Steinman i col., 1974; Page i col., 1978).

Una altra estructura important és l'aparell citoesque

lètic dels macròfags. Aquest sistema de filaments i túbuls participa en les funcions fagocítiques i secretores i comprèn tota una sèrie de proteïnes com l'actina, la miosina, l'acumentina i la gelsolina (Stossel, 1981).

Per últim també cal considerar com a estructura intracel·lular el sistema mitocondrial, al qual s'associa la cadena respiratòria, els enzims de la via Emden-Meyerhoff i la derivació hexosamonofosfat (HMP). Als llocs inflamats els macròfags contenen un nombre més gran de mitocondris (Steinman i col., 1974). La fagocitosi produeix un fort augment en la respiració cel·lular i activa una oxidasa associada a la membrana que comporta la generació de radicals oxigenats (capítol 3.7.).

La membrana plasmàtica del macròfag conté un gran nombre de proteïnes, glico-proteïnes i glico-lípids diferents que determinen les seves funcions reguladores i efectores. Fins ara s'han descrit més de 30 receptors específics (Adams i col., 1984), que es troben resumits a la taula II.

Dins dels receptors implicats durant la fagocitosi hi ha els receptors per a la porció Fc de la IgG, els quals a la vegada són de dos tipus: FcRI, que reconeix el isotipus $\gamma 2a$ i FcRII, que reconeix els isotipus $\gamma 1$ i $\gamma 2b$ de la IgG (Unkeless i col., 1981). A més hi ha evidències que indiquen l'existència de llocs d'unió específics per a l'isotipus $\gamma 3$ d'IgG i per a la IgE (Melewicz i col., 1980; Diamond i col., 1981). Durant la inflamació, l'activitat fagocítica dels macròfags està augmentada, fet que ve donat per un increment d'unes 6 vegades el nombre de receptors FcRI i d'unes 4 vegades el nombre de receptors FcRII (Unkeless i col., 1981).

Un altre tipus d'estructures implicades a la fagocitosi són els receptors per al complement. Almenys dos tipus de receptors de la superfície cel·lular del macròfag reconeixen

TAULA II: Receptors descrits a la superfície dels macròfags
(Adams i col., 1984)

a) Receptors implicats a la fagocitosis:

1. Receptors per a la porció Fc de la IgG
2. Receptors per al complement
3. Receptors per a glico-proteïnes acabades en manosa, fucosa o N-acetilglucosamina

b) Receptors o proteïnes que mediatitzen funcions no fagocítiques:

1. Antigen Ia
2. Receptor per a la transferrina
3. Llocs d'unió per a cèl.lules tumorals
4. 5' nucleotidasa
5. Altres...

c) Receptors de superfície implicats en la regulació:

1. Receptors per a proteïnes acetilades i lipo-proteïnes
 2. Receptors de α_2 -macroglobulina
 3. Receptors de pèptids formilats
 4. Receptors del factor de creixement de macròfags
 5. Receptors per a altres limfoquines
 6. Receptors per a lactoferrina
-

el tercer component del complement: són els receptors CR1 i CR3 (Rabellino i col., 1978).

Pel que fa als receptors de les glico-proteïnes acabades en manosa, fucosa o N-acetilglucosamina, no se sap la seva funció, però s'ha postulat que poden subministrar un mitjà addicional per a unir i fagocitar certs elements microbians (Sung i col., 1983).

Les cèl.lules del SFM sintetitzen i secreten una gran varietat de productes. Els nivells d'aquests productes alliberats pels monòcits sanguinis o pels macròfags residents són baixos, però poden augmentar a causa dels estímuls inflamatoris i a més, mantenir-se durant llargs períodes de temps. Els fagòcits mononuclears secreten enzims, metabòlits de l'àcid araquidònic, productes oxigenats i altres substàncies. El paper dels enzims, derivats de l'àcid araquidònic i productes oxigenats, és tan important en la inflamació que se'ls considerarà més endavant (apartats 3.5., 3.6. i 3.7.). Entre els altres productes secretats pels macròfags podem destacar els components del complement, com C1q, C2, C4, C3, C5, factor B, factor D, properdina, C3bINA i β 1H (Bentley i col., 1981) i els factors de la coagulació VII, IX, X, V, protrombina i trombina, conjuntament amb altres proteïnes relacionades amb la inflamació, com la α_2 -macroglobulina, encara que el macròfag no és la font principal d'aquesta proteïna. També secreten interleuquina-1 (IL-1 o factor activador dels limfòcits o pirogen endogen), en resposta a una àmplia varietat d'estímuls com endotoxines bacterianes, muramil dipèptid, limfoquines i també agents inflamatoris com sals biliars i el fragment C5a del complement (Rosenwasser, 1984). Per últim també s'ha descrit que els macròfags produeixen interferó de la classe β (Neumann, 1982).

Les substàncies secretades pels macròfags en els llocs inflamats desencadenen mecanismes de retroalimentació positiva

sobre la inflamació. Així, "in vitro" s'ha observat que estimulants de la inflamació crònica, com per exemple immunocomplexos, activen per una part el sistema del complement i per l'altra produeixen una secreció prolongada d'enzims lisosomals pels macròfags (Cardella i col., 1974; Schorlemmer i col., 1977). El propi subproducte del complement C3b, també estimula la secreció d'aquests enzims, amplificant així el senyal inflamatori inicial (Schorlemmer i col., 1976).

Així mateix, els macròfags alliberen components del complement i alguns enzims lisosomals que poden activar certs components del complement (Gordon i col., 1974; Schorlemmer i col., 1977). Com a resultat de l'activació del sistema del complement es formen agents quimiotàctics capaços d'atreure més macròfags, que contribuiran a la lesió inflamatòria (Kay i col., 1973).

Aquest tipus de sistema inflamatori substingut "per se" és una característica dels processos inflamatoris reumatoïdes on existeixen immunocomplexos, productes de l'activació del complement i una elevada activitat enzimàtica lisosomal (Hurst i col., 1981).

2.2.3. Fagocitosi

Els neutròfils i macròfags són les principals cèl.lules fagocítiques o fagòcits de l'organisme. La fagocitosi es defineix com el procés d'ingestió de material particulat per part d'una cèl.lula.

Les cèl.lules fagocítiques mitjançant el fenomen de quimiotàxia es dirigeixen als llocs on han d'exercir la seva funció. S'han descrit moltes substàncies quimiotàctiques, les quals es troben resumides a la taula III. Probablement la substància amb més activitat quimiotàctica és un fragment resultant de l'activació del complement: el C5a. Aquest subpro-

TAULA III: Factors quimiotàctics (Wilkinson, 1983)

Derivats del complement	C5a (possiblement altres)
Derivats cel.lulars	Leucotriè B ₄ Productes alliberats pels neutròfils induïts per: Cristalls d'urat IgG agregada Fagocitosi Productes alliberats pels macròfags Limfoquines
Productes del mal tissular	Proteïnes desnaturalitzades. Molècules amfipàtiques. Productes no definits de les cèl.lules lesionades
Productes de reaccions immunes específiques	Migració de cèl.lules unides a l'anticòs en presència de l'antigen
Caseïnes (α_s - i β -caseïna)	
Pèptids sintètics formil-metionil	
Factors amb especificitat per als monòcits	Sobrenedants de cèl.lules tumorals Lipoproteïnes pulmonars Factors derivats dels limfòcits
Factors amb especificitat per als eosinòfils	ECF-A (productes alliberats pels mastòcits) Limfoquines, a) depenent d'antigen-anticòs b) promotor de l'estimulació d'eosinòfils Productes derivats dels neutròfils Histamina (?)

ducte és un pèptid de 74 residus, derivat de la divisió del component C5. Cal remarcar que la generació de C5a es pot produir no sols per l'activació del complement, sinó que s'han descrit proteases derivades dels macròfags (Gordon i col., 1974) i neutròfils (Snyderman i col., 1972) que poden formar C5a a partir de C5.

Un altre factor quimiotàctic important en les lesions inflamatòries és el leucotriè B₄, producte derivat de l'àcid araquidònic (apartat 3.6.2.). El seu alliberament als llocs d'inflamació pot amplificar considerablement el flux de leucòcits a la lesió (Wilkinson, 1983). També s'ha descrit una limfoquina, d'un pes molecular d'aproximadament 12,000 D, quimiotàctica per a fagòcits mononuclears (Visentín, 1980).

Així mateix s'ha de considerar com a agents quimiotàctics una varietat de productes provinents de cèl.lules intactes o lesionades. Per exemple, s'ha vist que neutròfils que han ingerit cristalls d'urat lliberen factors que atreuen altres neutròfils; així mateix productes de cèl.lules tumorals poden atreure macròfags. De fet, una lesió cel.lular pot comportar l'alliberament de material directament quimiotàctic o bé d'enzims capaços d'activar factors del complement (Wilkinson, 1983). Proteïnes que han patit alguna alteració estructural a conseqüència de l'acció d'un enzim (Hayashi i col., 1974) o a la desnaturalització (Wilkinson i col., 1974) també poden tenir una certa activitat quimiotàctica per a leucòcits.

La interacció de factors quimiotàctics amb els fagòcits inicia una sèrie de processos bioquímics i cel.lulars. Aquests processos comprenen modificacions en els fluxos iònics i en els potencials de membrana, canvis en la forma cel.lular, passant a adquirir una forma triangular (polarització morfològica), secreció d'enzims lisosomals, producció d'anions superòxid i increment en la locomoció (Clark, 1983).

Els factors quimiotàctics, aleshores, no són només responsables de l'acumulació de leucòcits als llocs inflamats, sinó que també poden estimular les cèl.lules perquè secretin mediadors de la inflamació.

La fagocitosi té lloc en dues fases: la unió d'una partícula a la superfície cel.lular i la ingestió d'aquesta quedant inclosa en una vacuola a l'interior del fagòcit. La primera fase implica el reconeixement de la partícula per llocs específics i no específics, i és independent del metabolisme cel.lular, mentre que la ingestió necessita l'acció de microfilaments i requereix un metabolisme actiu.

La unió de la partícula amb el fagòcit pot tenir lloc mitjançant un procés d'opsonització, pel qual una partícula queda fixada al fagòcit a través d'unes macromolècules bifuncionals anomenades opsonines. Les opsonines més importants són la immunoglobulina G i el subcomponent del complement C3b. Si les opsonines s'uneixen a la partícula per una unió antigen-anticòs o per fixació del C3b sobre la partícula, aquesta s'unirà aleshores a la superfície del neutròfil o del macròfag mitjançant els receptors específics (Howe, 1981; Clark, 1983).

En el procés d'ingestió, la cèl.lula fagocítica emet pseudòpodes que envolten la partícula i es forma una vacuola fagocítica o fagosoma (Clark, 1983). El fagosoma migra pel citoplasma a causa de l'acció de proteïnes contràctils, a la regió dels lisosomes, es fusionen les membranes del fagosoma i del lisosoma, i formen l'anomenat fagolisosoma. El contingut lisosomal és aleshores alliberat al fagosoma i és capaç d'atacar el seu contingut sense danyar el citoplasma del fagòcit (Cooper, 1982; Wilkinson, 1983). Els mecanismes d'atac del fagòcit es deuen principalment als enzims lisosomals i als productes oxigenats o radicals lliures resultants de "l'explosió metabòlica" que acompanya al procés fagocític. Aquesta "explo

sió respiratòria" es manifesta per un augment en el consum d'oxigen i un increment en l'activitat de la derivació hexosa monofosfat. Aquests canvis impliquen un augment en la producció d'energia i en la generació de peròxid d'hidrogen i radicals superòxid (Rossi, 1980). El contingut lisosomal i els radicals oxigenats juguen un important paper en el desenvolupament de la resposta inflamatòria, per això s'han considerat amb més detall, dins dels mediadors de la inflamació (apartat 3).

Després de la fagocitosi té lloc l'exocitosi, mecanisme pel qual els grànuls són abocats fora de la cèl.lula. L'exocitosi és un procés actiu que no implica la pèrdua de la integritat de la membrana cel.lular. Aquest fenomen secretor no es registra únicament en la fagocitosi sinó també en moltes altres circumstàncies. Se sap que molts factors provoquen l'exocitosi gràcies a les seves interaccions amb la membrana dels fagòcits. Entre aquests factors es poden citar endotoxines, factors quimiotàctics del complement (Goldstein i col., 1973), immunocomplexos fixats a superfícies no fagocitables (Hawkins, 1972; Henson i col., 1973), ionòfors (Rossi i col., 1975) i algunes lectines (Romeo i col., 1975).

El fet de vessar el contingut dels grànuls citoplasmàtics dels fagòcits al medi extracel.lular pot tenir efectes negatius. Els neutròfils poden alliberar una sèrie de factors que actuen sobre els teixits, lesionant-los i amplificant el procés inflamatori. Entre aquests factors es troben la histamina, les prostaglandines, les catepsines àcides, les proteases neutres, la lipasa, la fosfolipasa, el lisozim, la peroxidasa, la fosfatasa i les proteïnes catiòniques. A més, d'entre aquests factors alliberats n'hi ha que poden activar el complement (Venge i col., 1975; Wright i col., 1975) i el sistema de les cinines (Greenbaun, 1972) amb la formació de factors quimiotàctics i inflamatoris que contribueixen a la perpetuació i amplificació del procés inflamatori.

3. MEDIADORS INFLAMATORIS

Perquè una substància es pugui considerar com a mediador de la inflamació ha de complir unes condicions (Spector i col., 1968):

- a) aquesta substància ha d'induir un augment en la permeabilitat vascular;
- b) la injecció d'un antagonista específic ha de suprimir la fase de la reacció inflamatòria induïda pel mediador;
- c) així mateix, la depleció específica de la substància o del seu precursor ha de comportar la supressió d'aquesta mateixa fase, i
- d) aquest mediador s'ha de trobar en un moment determinat de la resposta inflamatòria.

Avui dia es consideren com a mediadors del procés inflamatori la histamina, la serotonina, les cinines, les prostaglandines, els factors del complement, les limfoquines, els enzims lisosomals i els radicals oxigenats (Houck, 1979). Tots aquests participants del procés inflamatori seran considerats per separat seguidament.

3.1. HISTAMINA

A l'any 1919, Dale i Laidlaw van proposar el paper de la histamina com a mediador inflamatori, i fins a l'any 1959 es va creure que era la principal implicada en aquest procés. La histamina és un potent vasodilatador, capaç d'augmentar la permeabilitat, i d'evocar dolor i pruíja (Rocha e Silva, 1978). Està present en molts teixits i és alliberada en la majoria de respostes inflamatòries, però els clàssics antihistamínics no tenen efecte sobre la inflamació (Youlten, 1978). Avui dia s'accepta que aquesta substància només intervé en la fase vascular de la inflamació (Sanchez Garcia, 1982; Peña, 1982).

La histamina es troba fonamentalment en mastòcits i basòfils. Els mastòcits pulmonars humans contenen de 1.5 a 5 pg d'histamina per cèl.lula, en proporció estequiomètrica al seu contingut d'heparina (Holgate, 1983). Químicament correspon al 4-(2-aminoetil)imidazol. És sintetitzada a l'organisme mitjançant la descarboxilació de la L-histidina, pas que està regulat per la histidina descarboxilasa (Beaven, 1975). La histamina es degradada per desaminació amb diaminoxidasa (histaminasa) o per metilació amb histamin-N-metil-transferasa. Ambdós enzims es troben en els teixits i la diaminoxidasa està també en eosinòfils i neutròfils (Zeiger i col., 1977).

Quan la histamina és alliberada a partir de mastòcits o basòfils exerceix les seves accions a través de dos tipus de receptors, coneguts com a receptors H_1 i H_2 . Els efectes de la histamina segons el receptor sobre el qual actua es troben resumits a la taula IV. La histamina en les reaccions d'hipersensibilitat produeix accions proinflamatòries i antiinflamatòries (Plaut, 1979). La histamina alliberada comporta un increment de la permeabilitat vascular mitjançant una dilatació venular i la creació de porus endotelials (Majno i col., 1967). Aquest fenomen proinflamatori és primàriament un efecte H_1 i facilita l'accés de proteïnes plasmàtiques i leucòcits.

D'altra banda, s'han descrit nombrosos efectes antiinflamatoris de la histamina mediatitzats pels receptors H_2 , entre ells es pot esmentar l'alliberament d'enzims lisosomals, la inhibició de l'alliberament d'histamina de leucòcits perifèrics humans i la supressió de producció de factor inhibitori de la migració per cèl.lules T que posseeixen receptors per a la histamina (Rocklin i col., 1979).

També s'ha observat que la histamina té diferents accions sobre la mobilitat cel.lular. Així s'ha vist que a concentracions micromoleculares és quimiotàctica per a eosinòfils

TAULA IV: Efectes biològics de la histamina segons el tipus de receptor

RECEPTORS H₁

- Contracció del múscul llis
- Augment de la permeabilitat vascular
- Pruija
- Estímul dels receptors irritants
- Increment de GMP cíclic

Aquests efectes són antagonitzats pels antihistamínics clàssics

RECEPTORS H₂

- Increment de la secreció gàstrica
- Secreció mucosa
- Increment d'AMP cíclic
- Inhibició de l'alliberament d'histamina dels basòfils
- Inhibició de l'alliberament de limfoquines
- Inhibició de l'alliberament d'enzims dels PMN
- Inhibició de la migració d'eosinòfils
- Inhibició de la citotoxicitat mediatitzada pels limfòcits T

Aquests efectes són antagonitzats per la cimetidina i la ranitidina

RECEPTORS H₁ i H₂

- Vasodilatació (hipotensió)
 - Vermellor
 - Cefalàlgia
-

i a concentracions més altes inhibeix la migració d'aquestes cèl.lules (Clark i col., 1975). La histamina a concentracions de 1 a 5×10^{-5} M estimula la quimiocinesi de neutròfils (Metcalfe i col., 1981).

Però cal afegir que en inflamacions experimentals, com és l'edema induït per carragenina i l'artritis adjuvant, s'ha observat que el tractament amb cimetidina, antagonista H_2 de la histamina, té un efecte antiinflamatori (Al-Haboubi i col., 1982; Stochla i col., 1982). Aquests fets no aclareixen el paper exacte de la histamina durant la inflamació, però són evidències de la seva participació en aquest procés.

3.2. SEROTONINA

És la 5-hidroxitriptamina, prové de la descarboxilació i hidroxilació del triptòfan. Està localitzada a les cèl.lules somàtiques del tracte gastrointestinal, al cervell, on serveix de neurotransmissor, i en grànuls dins de les plaquetes. Als rosegadors, la serotonina també es troba als mastòcits a concentracions de $0.2-6$ pg/cèl.lula i és alliberada en resposta a l'activació de la IgE (Holgate, 1983).

Les activitats biològiques de la 5-hidroxitriptamina inclouen la contracció del múscul llis, l'augment de la permeabilitat vascular i la separació de les cèl.lules endotelials venulars, comportant edema tissular (Holgate, 1983).

El paper fisiològic de la serotonina s'exerceix a nivell del sistema nerviós i del tracte gastrointestinal. El paper específic d'aquest mediador a la inflamació encara no està clar. És alliberat, com la histamina, en els primers moments de la reacció inflamatòria i es creu que té un paper complementari i reforçador en la primera fase de la reacció inflamatòria (Sanchez Garcia, 1982). En les reaccions d'hipersensibili-

tat immediata s'ha observat que els mastòcits activats alliberen factors activadors de les plaquetes (PAF) que tenen la capacitat d'estimular les plaquetes i alliberar serotonina (Demopoulos i col., 1979).

3.3. SISTEMA DE LES CININES

La bradixinina és un polipèptid de nou aminoàcids amb un pes molecular de 900, capaç de causar vasodilatació, increment de la permeabilitat vascular i dolor (Kaplan, 1981).

El paper de la bradixinina en la inflamació aguda sembla posterior a l'efecte de la histamina, però anterior al de les prostaglandines. En processos que cursen amb inflamació crònica, com l'artritis reumatoide, es considera la bradixinina com a mediador, ja que s'han observat concentracions elevades d'aquest polipèptid en el fluid sinovial

La bradixinina es forma com a conseqüència d'un mal tissular, contribuint a la resposta inflamatòria que en resulta. La vasodilatació i l'increment de la permeabilitat vascular induïts per aquesta cinina facilitaran per una part el dipòsit local d'immunocomplexos i d'altra banda, l'afluència de cèl.lules estimulades per la formació de factors quimiotàctics. També s'ha vist que la bradixinina és capaç d'estimular l'alliberament de prostaglandines (Nasjletti i col., 1979).

La bradixinina és generada a partir de les proteïnes plasmàtiques conegudes com a cininògens, que són α_2 -globulines i dels quals hi ha dues formes: el 85 % correspon a un cininogen de baix pes molecular (LMW) i la resta és un cininogen d'alt pes molecular (HMW). El pas de cininogen a bradixinina depèn de la presència d'alguna kallicreïna, sent les kallicreïnes un grup d'enzims molt similars presents a molts teixits del cos (Kaplan, 1981).

No existeix kal.licreïna activa al plasma, sinó que circula un precursor anomenat prekal.licreïna. L'activació d'aquest precursor es pot realitzar pel factor Hageman o factor XII activat, que es forma durant l'activació de la via intrínseca de la coagulació. Així, el factor XII activat convergeix a la prekal.licreïna en kal.licreïna i la kal.licreïna plasmàtica digereix el cininogen per generar bradicinina. Aquesta seqüència d'aconteixements es mostra a la figura 4. Altres activadors de la prekal.licreïna són fibrinopèptids, plasminopèptids i enzims lisosomals derivats dels neutròfils (Sánchez García, 1982).

El factor XII normalment es troba en forma de proenzim i perquè passi a la forma activa necessita el contacte amb superfícies carregades negativament. S'assumeix que el teixit lesionat exposa macromolècules que poden actuar com a superfícies iniciadores. Així s'ha observat que preparacions de col.lagen o altres elements del teixit connectiu poden activar el factor Hageman i la cascada de la coagulació per la via intrínseca (Moskowitz i col., 1970; Kaplan, 1981). La kal.licreïna i el cininogen són capaços d'activar el factor XII "in vitro", podent existir així un mecanisme de retroalimentació positiva (Marceau i col., 1983).

Les funcions del sistema de les cinines a la inflamació no estan clares. La bradicinina és un probable mediador gràcies a les seves accions sobre els petits vasos sanguinis i la kal.licreïna plasmàtica sembla tenir activitat quimiotàctica per als neutròfils (Kaplan i col., 1971). D'aquesta manera, la formació local de kal.licreïna podria dirigir les cèl.lules a la proximitat d'una reacció inflamatòria, mentre la bradicinina facilitaria la migració cap als teixits (Kaplan, 1978).

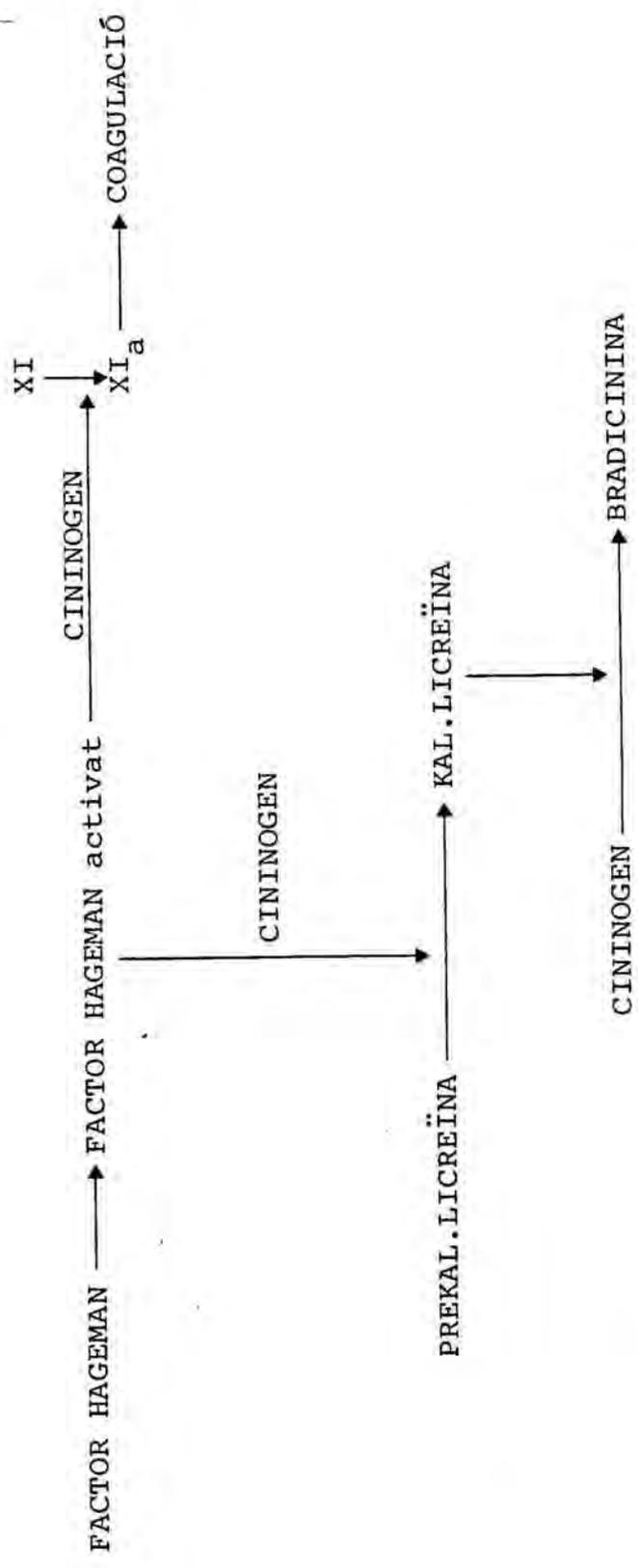


FIGURA 4: Generació de bradiceïna en el plasma (Kaplan, 1981)

3.4. SISTEMA DEL COMPLEMENT

El complement s'ha definit com un sistema de proteïnes d'elevat pes molecular del plasma o fluids tissulars, que pot ésser activat per anticossos combinats amb el seu antigen específic o, en circumstàncies especials, per altres agents i un cop activat desencadena tota una sèrie de fets biològics. Els components d'aquest sistema existeixen com a precursors inactius que s'activen d'una manera successiva (Thompson, 1983).

La seqüència d'activació del sistema del complement es troba resumida a la figura 5. Existeixen dues vies d'activació: la via clàssica i la via alterna. La primera té lloc quan immunocomplexos que contenen anticossos de la classe IgM o de les subclasses IgG 1 o IgG 3 (o en menys extensió IgG 2) interaccionen amb el component C1. La via clàssica comprèn l'activació successiva dels components C1, C4 i C2. La via alterna requereix la participació del component C3b, que és el principal producte de divisió del C3, del factor B, del factor D i de la properdina. L'activació del complement per aquesta via es deguda a una gran varietat de substàncies com endotoxines, lipopolisacàrids de parets cel·lulars bacterianes i de llevats, algunes cèl·lules de mamífers activades per virus i algunes superfícies d'eritròcits; també pot ser activat per agregats d'immunoglobulines. Enzims com la plasmina, la tripsina i les catepsines lisosomals poden activar directament el component C3. S'ha observat també que la tripsina pot actuar en presència de C6, sobre el C5, activant-lo (Thompson, 1983).

La via clàssica i la via alterna convergeixen en l'activació del component C3. Després d'això el procés és comú i comporta l'activació dels darrers components: C5, C6, C7, C8 i C9 (Sandberg, 1981; Whaley i col., 1981; Schur, 1983; Thompson, 1983; Porter, 1984).

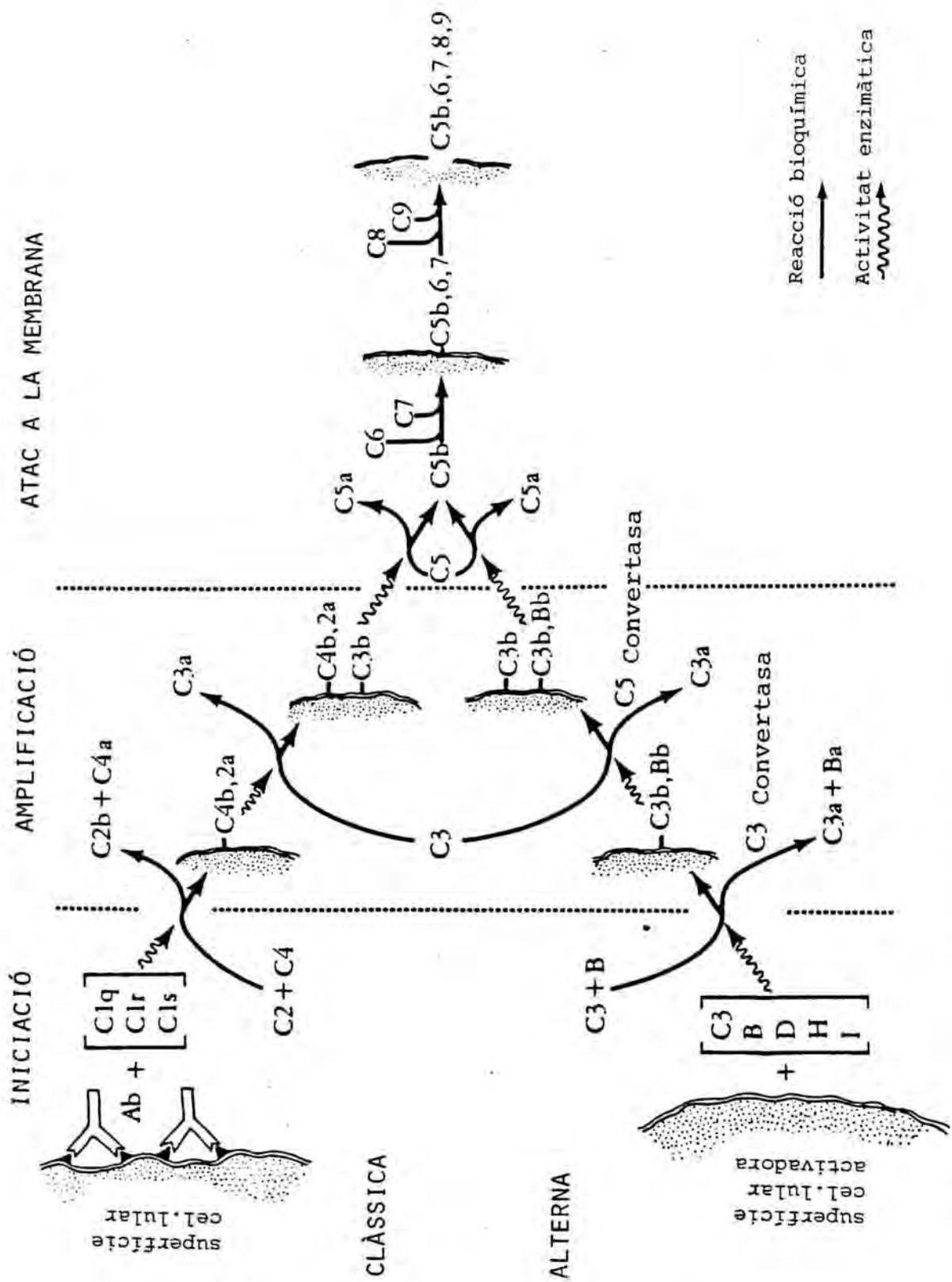


FIGURA 5: Activació del sistema del complement

L'activació del complement allibera tota una sèrie de factors amb funcions biològiques, les quals es troben resumides a la taula V. A continuació s'esmentaran algunes d'aquestes accions.

Citolisi

El sistema del complement pot lisar cèl·lules de molts tipus, com hematies, cèl·lules nucleades, bacteris i partícules subcel·lulars com plaquetes, micoplasmes i virus (Barkas, 1978).

La lisi cel·lular es deguda a la inserció del complex $C5b-9$ a la membrana, tot formant un canal hidrofílic que permet el pas d'aigua i electròlits i això comporta l'eventual lisi osmòtica (Mayer, 1972). La formació d'aquest canal hidrofílic encara no està clara. Alguns autors creuen que dins del complex $C5b-9$ hi ha un canal proteic, com si fos un "bunyol foradat" que penetrés la bicapa lipídica i permetés així el pas de ions i aigua (Mayer, 1978). Altres autors han proposat un canal hidrofílic format per grups de caps de molècules fosfolipídiques reorientades al voltant de la perifèria de les proteïnes del complement inserides (Podack i col., 1979). També s'ha pensat en un model similar a una petita extensió foradada formada per un anell integrat per uns quants complexos $C5b-9$, el centre del qual estaria foradat i formaria el passadís hidrofílic (Biesecker i col., 1979).

Anafilaxi

La divisió dels components C3 i C5 comporta la formació de C3a i C5a, respectivament. Aquests subproductes posseeixen activitat anafilotòxica, però el C5a és unes 10 vegades més potent que el C3a.

TAULA V: Activitats biològiques dels productes resultants de l'activació del sistema del complement (Sandberg, 1981)

VIA CLÀSSICA

<u>Components</u>	<u>Efectes</u>
C14b	Neutralització vírica
C14b2a3b	Neutralització vírica Adherència a limfòcits i cèl.lules fagocítiques Increment de la fagocitosi Generació de limfoquines
C14b2a3d	Adherència a limfòcits i cèl.lules fagocítiques
C1-9	Lisi de cèl.lules, bacteris i virus
C3a	Anafilaxi Quimiotàxia (?)
C3b	Generació de limfoquines
C3e	Mobilització de leucòcits
C4a	Anafilaxi
C5a	Anafilaxi Quimiotàxia
C5b-9	Quimiotàxia (?)

VIA ALTERNA

- Citòlisi
 - Neutralització vírica
 - Augment de la fagocitosi
 - Activació del macròfag
 - Generació de limfoquines (C3a, C5a)
 - Quimiotàxia (C5a, Ba)
-

Com a anafilotoxines provoquen la contracció del múscul llis i la degranulació de cèl.lules encepades. El procés contràctil produït per les anafilotoxines té lloc abans de l'acció de la histamina, alliberada per les mateixes substàncies (Sandberg, 1981; Whaley i col., 1981). S'ha vist que el pèptid derivat de l'escisió del C4, el C4a, també és espasmogènic (Gorski i col., 1979).

De més a més de l'acció directa sobre el múscul llis, les anafilotoxines indueixen l'alliberament d'histamina a partir de mastòcits i basòfils (Glovsky i col., 1979). Aquesta inducció es realitza a través dels receptors de superfície per a C3a i C5a que posseeixen aquestes cèl.lules. L'alliberament d'histamina comporta la contracció del múscul llis així com un augment de la permeabilitat capil.lar. S'ha vist "in vivo", que el fragment C4a també provoca un increment en la permeabilitat vascular (Sandberg, 1981).

Una altra funció inflamatòria dels fragments C3a i C5a és l'alliberament d'enzims lisosomals a partir de neutròfils (Becker i col., 1974).

La inactivació d'aquestes anafilotoxines té lloc, a l'home, a través d'una carboxipeptidasa sèrica que separa l'arginina carboxi terminal del C3a i del C5a i dóna lloc a fragments sense capacitat anafilotòxica (Bokish i col., 1969).

Quimiotàxia

El component C5a té propietats quimiotàctiques per a macròfags, monòcits, neutròfils i eosinòfils (Fernández i col., 1978). En les inflamacions produïdes per endotoxines o immunocomplexes, l'activació de la via clàssica o alterna comporta la formació del C5a i en conseqüència l'acumulació de neutròfils i macròfags. Proteases alliberades per aquestes

cèl.lules són capaces d'escindir el component C5 i formar més C5a amb propietats quimiotàctiques (Snyderman i col., 1982).

L'acció de la carboxipeptidasa sèrica sobre l'argini-
na terminal del fragment C5a no comporta la desaparició de
l'activitat quimiotàctica. La regulació d'aquest factor qui-
miotàctic s'ha d'atribuir al fet que la migració cel.lular té
lloc només dins d'un estret rang de concentracions de C5a.
D'aquesta manera, la producció continuada d'aquest component
té un efecte inhibitori sobre l'acumulació de cèl.lules
(Sandberg, 1981).

A més de reconèixer l'activitat quimiotàctica produï-
da pel fragment C5a, hi ha autors que creuen que els derivats
del complement C3a i $\overline{C5b67}$ tenen també capacitat quimiotàcti-
ca (Mohino Cruz, 1982; Schur, 1983), però altres autors no es
tan d'acord (Sandberg, 1981; Whaley i col., 1981).

També s'ha vist "in vitro" que el complex de la via
alterna $\overline{C3bBb}$ està associat a la generació d'activitat quimio-
tàctica (Ruddy i col., 1975). Estudis posteriors han demostrat
que la porció Ba, però no la Bb ni el factor B sencer, és qui-
miotàctica per als polimorfonuclears (Hadding i col., 1978).

Opsonització

.. Les cèl.lules fagocítiques posseeixen receptors de su-
perfície per a la porció Fc de la immunoglobulina G i per al
fragment C3b del complement (Lay i col., 1968).

Els immunocomplexos que tinguin IgG seran ingerits
pels fagòcits després d'unir-se a través del receptor Fc. Si
l'immunocomplex ha activat el complement el C3b unit al com-
plex incrementa l'extensió de la fagocitosis. El paper de C3b
en aquesta reacció és el d'augmentar l'adherència de l'immuno-
complex a la cèl.lula fagocítica, mentre que es requereix IgG

per a la ingestió (Sandberg, 1981).

D'altra banda, el component C5b també s'ha relacionat amb un increment de la fagocitosi en alguns microorganismes (Miller i col., 1974).

Així doncs, la fagocitosi pot estar provocada per l'activació del complement ja per la via clàssica, ja per la via alternativa, encara que en l'últim cas el procés fagocític és més lent (Sandberg, 1981).

Adherència immune

A més dels PMN i els macròfags, les hematies humanes i els limfòcits B posseeixen receptors per al fragment C3b a la seva superfície. Aquests receptors són capaços d'unir C3b acoblat a diferents complexos. Aquesta propietat també la té el fragment C4b, però amb menys intensitat (Lay i col., 1968).

La interacció d'immunocomplexos amb el C3b o el C4b i la unió d'aquests fragments amb els receptors cel·lulars és el que s'anomena adherència immune, terme utilitzat per primera vegada a l'any 1953.

Les conseqüències biològiques d'aquest fenomen varien segons el tipus de cèl·lula implicada. Així, per exemple, als fagòcits l'efecte observat és un augment de la capacitat fagocítica tal com s'ha explicat més amunt.

El paper que tenen els receptors per al C3b en els limfòcits B és polèmic. D'una banda se sap que la interacció del fragment C3b amb les cèl·lules B comporta la producció d'almenys una limfoquina, un factor quimiotàctic per a neutròfils i macròfags (Sandberg i col., 1975). D'altra banda s'ha postulat que els receptors per a C3b estan d'alguna manera implicats en la producció d'anticossos, suggerint que el comple

ment amb l'antigen subministra un segon senyal per a la producció d'anticossos (Whaley i col., 1981).

Mobilització de leucòcits

Un fragment derivat del C3, el C3e, és capaç d'afavorir l'alliberament de leucòcits a partir de la medul·la òssia (Ghebrehiwet i col., 1979). Aquest fragment es forma a partir del component C3b, el qual és dividit a C3c i C3d; el C3c és de nou degradat, alliberant C3e (Sandberg, 1981).

Encara que el C3e no és quimiotàctic "in vitro", mobilitza els leucòcits de la medul·la i produeix leucocitosi "in vivo".

3.5. ENZIMS LISOSOMALS

Els lisosomes són petites vesícules intracel·lulars, que contenen una gran quantitat d'enzims amb elevat poder digestiu i lític. S'han identificat fins a cinquanta-dues activitats enzimàtiques diferents, no sent iguals per a totes les cèl·lules (Sánchez García, 1982). El procés de fagocitosi o bé l'acció de determinades substàncies (veure apartat 2.2.3.) comporta l'alliberament del contingut lisosomal al medi extracel·lular. Els enzims lítics alliberats juguen un important paper en la reacció inflamatòria i, en aquest sentit, la participació de macròfags i neutròfils és diferent. Així, els macròfags, en un espai de temps d'alguns dies, arriben a abocar el 80 % del seu contingut en enzims lisosòmics, mentre que els neutròfils alliberen el 10-15 % en pocs minuts (Visentin, 1980).

Però els mediadors inflamatoris d'origen lisosomal també poden ser de tipus no enzimàtic. Entre aquestes substàncies es troben les proteïnes bàsiques o catiòniques, amb

múltiples i complexes activitats. Així s'ha observat que aquestes proteïnes indueixen un augment en la permeabilitat vascular a través de la degranulació de mastòcits i, mitjançant altres mecanismes fins ara desconeguts, produeixen efectes pirògens, modifiquen la coagulació i exerceixen activitats quimiotàctiques sobre els fagòcits mononuclears (Rossi, 1980).

Els enzims hidrolítics alliberats durant la inflamació es poden dividir, com a mínim, en tres tipus: lisozim, hidrolases àcides i proteases neutres.

El lisozim és una proteïna catiònica de baix pes molecular (d'aproximadament 14,000), capaç d'atacar els mucopèptidas de la paret cel·lular d'algunes espècies bacterianes. Es troba a concentracions elevades en els neutròfils i en els macròfags alveolars (Visentin, 1980). Es creu que en les lesions cròniques, el lisozim alliberat dels macròfags modifica els agregats de proteoglicans de la matriu cartilaginosa, fent-los més sensibles a l'acció de les proteases neutres (Howell i col., 1974). A diferència dels altres enzims, la secreció de lisozim és contínua, no requereix l'estimulació prèvia del fagòcits (Gordon i col., 1974; Unanue, 1976).

Les hidrolases àcides són abocades ràpidament i en abundància després de l'estimulació de macròfags i de neutròfils. Dins d'aquests enzims s'inclouen les catepsines B₁, D i E (endopeptidases), les catepsines A i C (exopeptidases), les carboxipeptidases A i B, la hialuronidasa, la β -glucuronidasa i altres glucosidases. Són enzims lisosomals preformats, però no són alliberats al medi extracel·lular fins que els fagòcits són estimulats adequadament. El seu alliberament té lloc abans que el de les proteases neutres i juga un paper important en les malalties inflamatòries cròniques (Rosenstreich, 1981). Les endopeptidases trenquen cadenes polipeptídiques, la catepsina A actua sobre els grups carboxi terminals, men-

tre que la catepsina C ataca els grups amino terminals (Bazin i col., 1971). La catepsina B₁ és capaç de degradar la molècula nativa de col.lagen (Burleigh i col., 1974).

Les proteases neutres inclouen la col.lagenasa, l'elastasa, l'activador del plasminogen i una proteasa citolítica (Adams, 1984). Són enzims que no estan preformats als lisosomes, sinó que són sintetitzats després d'un estímul (Rosenstreich, 1981).

La col.lagenasa és un metalloenzim d'un pes molecular entre 70,000 i 76,000 (Weissman, 1980b). Existeixen diferents tipus de col.lagenases específiques per a cada tipus de col.lagen. Actuen a pH neutre i són secretades per macròfags (Werb i col., 1980), neutròfils (Horwitz i col., 1977), a més de per fibroblasts, condrocits i cèl.lules sinovials reumatoïdes (Borel, 1982).

L'elastasa és un enzim catiònic, que conjuntament amb la col.lagenasa constitueix el 5 % del pes sec dels neutròfils; hidrolitza l'elastina, però també pot actuar sobre la fibronectina, la condronectina i la laminina, proteïnes del teixit connectiu (Mc Donald i col., 1980). L'elastasa purificada pot digerir tant les parets bacterianes com els proteoglicans del cartílag (Janoff i col., 1975).

L'activador del plasminogen catalitza la conversió de plasminogen a l'enzim proteolític plasmina, el qual activa tota una sèrie de vies biològiques, com la generació de cinines, el consum de complement i la coagulació i fibrinolisi (Visentin, 1980; Rosenstreich, 1981).

Dins de les proteases neutres es troba també la catepsina G, enzim amb un pes molecular de 22,000. La seva especificitat de substrat és molt semblant a la de la quimotripsina pancreàtica. És capaç d'hidrolitzar els proteoglicans dels

cartíl·lags i atacar el col.lagen insoluble (Barrett, 1975).

El paper patogènic dels enzims hidrolítics alliberats en el focus inflamatori s'ha de considerar en relació al medi extracel.lular. Cal tenir en compte que la màxima capacitat funcional de la majoria d'enzims lisosòmics s'aconsegueix a pH àcid (hidrolases àcides). S'ha de considerar també la presència d'inhibidors o antiproteases plasmàtiques, que també penetren als espais extravasculars, arribant a concentracions elevades al lloc inflammat a causa de l'augment de la permeabilitat vascular. L'activador del plasminogen i l'elastasa són serin-proteases que poden ser inhibides per α_1 -antitripsina, mentre la col.lagensa i les catepsines B₁ i D són inhibides per la α_2 -macroglobulina (Davies i col., 1976). En certes afeccions cròniques, com l'enfisema pulmonar i l'artritis reumatoide s'observa una concentració superior de proteases enfront de les antiproteases, fet que contribueix d'una manera significativa al desenvolupament del mal tissular (Werb i col., 1975a i b).

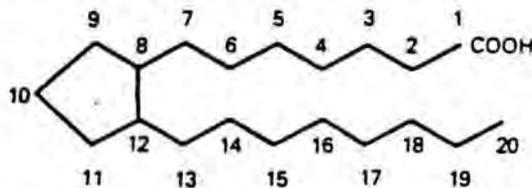
Però s'ha de tenir en compte que de més a més del perill potencial que representen els enzims lisosomals sobre els teixits, aquests mediadors poden interactuar amb altres sistemes amplificant la resposta inflamatòria. Així doncs, els enzims lisosomals estimulen la síntesi de prostaglandines durant la inflamació: una de les hidrolases alliberades pels neutròfils és la fosfolipasa, capaç de formar àcid araquidònic, precursor de les prostaglandines (Visentin, 1980). A més, com ja s'ha descrit (apartat 2.2.3.), existeixen proteases capaces d'actuar sobre el component del complement C5 i formar C5a, factor quimiotàctic molt important (Visentin, 1980; Snyderman i col., 1982).

3.6. DERIVATS DE L'ÀCID ARAQUIDÒNIC

L'àcid araquidònic és un àcid gras poliinsaturat present en grans quantitats en els fosfolípids de les membranes cel·lulars. Per acció directa de l'enzim fosfolipasa A₂ o indirectament a través de l'acció seqüencial de la fosfolipasa C i per la diacilglicerol lipasa, l'àcid araquidònic es pot alliberar de la membrana en resposta a diferents estímuls, com hormones, immunocomplexos, ionòfors de calci, radiació ultraviolada o activació mecànica (Irvine, 1982; Van de Stadt, 1982). Un cop lliure l'àcid araquidònic, és metabolitzat mitjançant dues vies enzimàtiques diferents: via ciclooxigenasa o via lipoxigenasa (figures 6 i 7). El metabolisme via ciclooxigenasa comporta la formació de prostaglandines i tromboxans, mentre que per la via lipoxigenasa es formen leucotriens (Davies i col., 1984). Prostaglandines, tromboxans i leucotriens són mediadors químics de la inflamació. A la taula VI es troben resumides les activitats biològiques d'aquests compostos, si bé a continuació es detallen més ampliament.

3.6.1. Prostaglandines i tromboxans

Les prostaglandines són un grup d'àcids grassos insaturats, de 20 àtoms de carboni que poden considerar-se químicament derivats de l'àcid prostanoic:



L'estudi de les prostaglandines és difícil perquè es produeixen localment, es troben en quantitats molt petites i són metabolitzades ràpidament (Ninnemann, 1984).

Les prostaglandines es sintetitzen a les membranes cel·lulars a partir, almenys, de tres compostos de 20 àtoms

TAULA VI: Activitats biològiques dels principals metabòlits de l'àcid araquidònic (Moncada i col., 1980; Van de Stadt, 1982)

METABÒLIT DE L'ÀCID ARAQUIDÒNIC	LLOC FISIOLÒGIC AFECTAT	EFFECTES
PGE ₂	Sistema vascular	Vasodilatació (majoria dels llocs) Vasoconstricció (alguns llocs)
	Sang	Inhibeix l'agregació plaquetària (elevades concentracions) Promou l'agregació plaquetària (baixes concentracions)
	Múscul bronquial	Dilatació
	Múscul uterí	Constricció
	Múscul glandular	Constricció del múscul longitudinal Relaxació del múscul circular
	Secrecions glandulars	Inhibeix la secreció gàstrica àcida
	Ronyó	Incrementa el flux renal de sang
	SNC	Febre Sedació
	Sistema nerviós	Hiperalgèsia
	Sistema endocrí	Estimula l'alliberament d'hormona del creixement Estimula l'alliberament d'hormona luteïnitzant Estimula l'alliberament de tirotròpina Estimula l'alliberament d'insulina
	PGF _{2α}	Sistema vascular
Múscul bronquial		Constricció
Múscul uterí		Constricció
Múscul glandular		Constricció
Sistema endocrí		Estimula l'alliberament d'ACTH Estimula l'alliberament de prolactina Estimula l'alliberament de gonadotropines Estimula la luteòlisi

TAULA VI: Continuació

METABÒLIT DE L'ÀCID ARAQUIDÒNIC	LLOC FISIOLÒGIC AFECTAT	EFFECTES
PGG ₂ & PGH ₂	Sistema vascular	Vasodilatació (alguns llocs) Vasoconstricció (alguns llocs)
	Sang	Promou l'agregació plaquetària
	Múscul bronquial	Constricció
	Múscul uterí	Constricció lleugera
	Múscul glandular	Constricció lleugera
	Sistema nerviós	Hiperalgèsia
PGI ₂	Sistema vascular	Vasodilatació
	Sang	Inhibeix l'agregació plaquetària
	Múscul bronquial	Dilatació lleugera
	Múscul uterí	Constricció lleugera
	Múscul glandular	Constricció lleugera
	Secrecions glandulars	Inhibeix la secreció gàstrica àcida
	Ronyó	Incrementa el flux sanguini renal Promou la secreció de renina
	Sistema nerviós	Hiperalgèsia
TxA ₂	Sistema vascular	Vasoconstricció
	Sang	Promou l'agregació plaquetària
	Múscul bronquial	Constricció
	Múscul uterí	Constricció lleugera
	Múscul glandular	Constricció lleugera
LTB ₄	Sang	Quimiotàxia
LTC ₄	Sistema vascular	Vasoconstricció
	Múscul bronquial	Constricció
LTD ₄ & LTE ₄	Sistema vascular	Incrementa la permeabilitat
	Múscul bronquial	Constricció

de carboni. L'àcid araquidònic o àcid 5,8,11,14-eicosatetraenoic és el precursor més conegut i comporta la formació de les prostaglandines de la sèrie 2. També es poden formar prostaglandines a partir de l'àcid dihomogamma-linolènic, del qual deriven les prostaglandines amb una insaturació (prostaglandines de la sèrie 1), i de l'àcid 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic que dóna la sèrie amb tres insaturacions (prostaglandines de la sèrie 3) (Metcalfe i col., 1981b).

Totes les prostaglandines posseeixen estructures químiques similars, són àcids grassos insaturats que contenen un anell de ciclopentà amb dues cadenes alifàtiques (Hamor, 1981). Es designen alfabèticament de l'A a l'H. Les prostaglandines PGD, PGE i PGF es consideren prostaglandines primàries, mentre que PGA, PGB i PGC són derivats de la PGE produïts per extracció química i, probablement, no sintetitzats dins del cos (Moncada i col., 1980). Les prostaglandines PGG i PGH són endoperòxids inestables que s'isomeritzen enzimàticament o no enzimàticament a prostaglandines primàries.

Els tromboxans tenen una estructura amb un anell oxà i la PGI té una estructura de doble anell que conté oxigen (Moncada i col., 1980; Hamor, 1981).

A la figura 6 es troba esquematitzat el metabolisme de l'àcid araquidònic per la via cicloxigenasa. El primer pas del metabolisme és la formació de la prostaglandina G_2 (PGG_2) que és un endoperòxid inestable que es transforma enzimàticament en un altre endoperòxid, la prostaglandina H_2 (PGH_2), per reducció d'un peròxid a un grup hidroxil. Ambdós endoperòxids tenen una vida molt curta, i són ràpidament metabolitzats, per reaccions enzimàtiques o no enzimàtiques a 6 productes, dels quals 4 són prostaglandines: PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 i PGI_2 o prostaciclina; un altre producte és l'àcid 12-hidroxid 5,8,10-heptadecatrienoic i també es forma tromboxà A_2 (TxA_2) (Ninnemann, 1984).

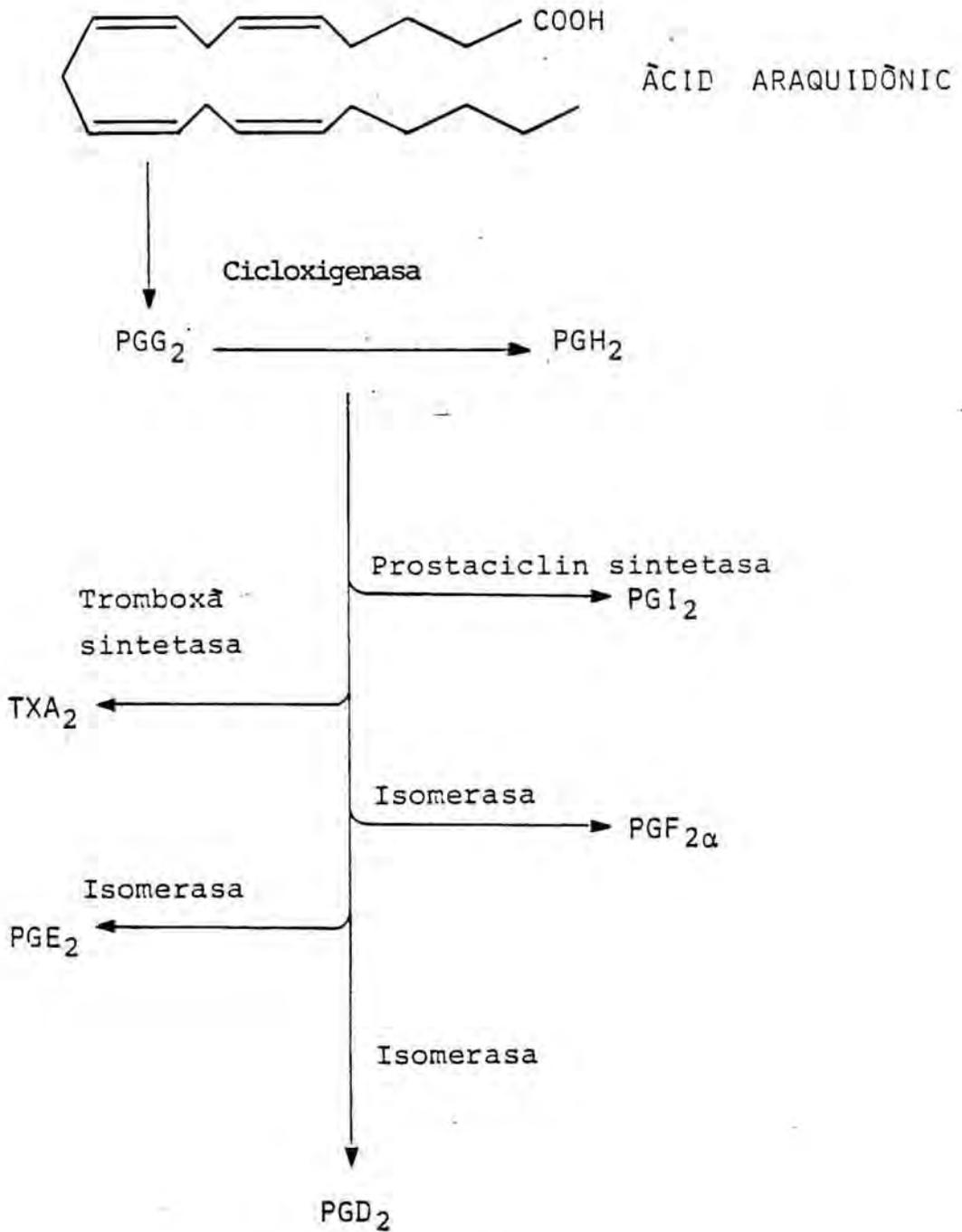


FIGURA 6: Metabolisme de l'acid araquidònic via cicloxigenasa

La prostaciclina i el tromboxà A_2 són productes intermedis inestables, amb importants activitats biològiques. La PGI_2 és vasodilatadora, inhibeix l'agregació plaquetària i la broncoconstricció. La formació de la prostaciclina depèn de l'enzim PGI_2 sintetasa, que s'ha aïllat de l'aorta com una hemoproteïna de pes molecular de 52,000 (Dewitt i col., 1983) i que està present al múscul llis vascular o no vascular, localitzant-se a la perifèria d'alguns tipus de cèl.lules (Smith i col., 1983). El tromboxà A_2 , contràriament a la PGI_2 , és vasoconstrictor, promou l'agregació plaquetària i causa broncoconstricció. El TxA_2 i la PGI_2 es destrueixen ràpidament a través de reaccions no enzimàtiques formant-se respectivament TxB_2 i 6-keto $PGF_{1\alpha}$ (Davies i col., 1984).

No està molt clar el paper de les prostaglandines a la inflamació, però els diferents productes de l'oxidació de l'àcid araquidònic són capaços d'implicar els signes cardinals de la inflamació. L'alliberament de PGI_2 , PGE_1 , PGE_2 , PGD_2 i TxA_2 pot provocar vasodilatació i vermellor. Sembla ser que la prostaciclina i, en menys extensió, la PGE_2 són les principals responsables d'aquesta vasodilatació (Flower i col., 1980; Moncada i col., 1980; Van de Stadt, 1982). Malgrat aquesta acció sobre el vas, les prostaglandines no tenen gairebé influència sobre la permeabilitat. Contràriament, la histamina i la bradiginina tenen una gran capacitat per a augmentar la permeabilitat vascular i una dèbil capacitat per a produir vasodilatació (apartats 3.1. i 3.3.). Si s'administra sols un tipus d'aquests mediadors, només es produeix una petita quantitat d'exsudat plasmàtic, però quan es combinen, les prostaglandines actuen sinèrgicament amb la histamina i la bradiginina per a donar lloc a una gran exsudació plasmàtica (Williams i col., 1977; Lewis, 1979; Weissman, 1980; Basran i col., 1982; Van de Stadt, 1982). L'acció vasodilatadora d'algunes prostaglandines és antagonitzada parcialment per l'activitat vasoconstrictora dels endoperòxids i la $PGF_{2\alpha}$ (Crunkhorn i col., 1971).

El paper de les prostaglandines en la febre no està del tot clar, alguns antiinflamatoris no esteroïdals que interfereixen la síntesi de prostaglandines a nivell central, són antipirètics. A més, en certs models antiinflamatoris el dolor pot ser produït per l'àcid araquidònic i per la PGE_1 i PGE_2 via sinèrgica amb la bradixinina i la histamina (Lewis, 1979; Robins i col., 1979; Weissman, 1980 ; Van de Stadt, 1982; Davies i col., 1984). Es creu que les prostaglandines, a diferència dels altres mediadors inflamatoris que estimulen directament les terminacions nervioses lliures, produeixen una resposta hiperalgèsica, disminuint el llindar d'estimulació d'aquestes terminacions nervioses (Ferreira, 1972; Ferreira i col., 1978).

El TxA_2 està implicat en la inflamació, fet que s'ha deduït gràcies a la presència del seu producte TxB_2 , al fluid sinovial de pacients artrítics. El TxB_2 té un efecte quimiotàctic per a leucòcits i aquestes mateixes cèl.lules sintetitzen TxA_2 durant la fagocitosi (Hornstra, 1982), però com que la principal acció del TxA_2 és la vasoconstricció, la seva relació amb el procés inflamatori no està clara (Ford i col., 1984).

La font de les prostaglandines endògenes es desconeix; l'origen més comú de PGE_2 i PGI_2 és l'endoteli vascular, de manera que qualsevol procés que comporti el trencament d'una membrana, comporta també l'alliberament de prostaglandines (Moncada i col., 1977). Però altres cèl.lules com els macròfags són productores actives de prostaglandines durant la inflamació: tant monòcits com macròfags poden produir PGI_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ i TxB_2 (Till i col., 1979; Davies i col., 1984). També s'ha observat que els neutròfils produeixen prostaglandines i tromboxans en resposta a la fagocitosi (Weissman i col., 1982).

A les articulacions reumatoides, la producció de prostaglandines, sobre tot la de PGE , està augmentada (Robinson i

col., 1975; Dayer i col., 1976), i s'ha observat que la principal font d'aquestes substàncies són els macròfags presents a la sinòvia reumatoide (Pawlotsky i col., 1982; Shiozawa i col., 1982).

Pel que fa al mecanisme d'actuació de les prostaglandines, es creu que aquests agents interaccionen amb receptors de superfície presents en cèl.lules de diferents teixits. Sembla que les prostaglandines exerceixen la seva influència a la cèl.lula a través dels nucleòtids cíclics units a la membrana (Moncada i col., 1980; Nijkamp, 1982). Aquests nucleòtids cíclics poden servir de "segon missatger" alterant processos dins les cèl.lules i així mediatitzar alguns dels efectes induïts per les prostaglandines (Ford i col., 1984; Ninnemann, 1984). A més, es creu que les prostaglandines poden influenciar el comportament cel.lular induint canvis en les característiques de la membrana plasmàtica (permeabilitat, fluïdesa, etc.) i també poden alterar la concentració de nutrients essencials i d'alguns ions, particularment el calci (Stenson i col., 1982).

S'ha postulat també la relació de les prostaglandines amb la síntesi de proteïnes de fase aguda. Concretament s'ha vist que la PGE_1 actua sobre el fetge i augmenta la síntesi de α_2 -macroglobulina i la seva secreció al medi (Anbalagan i col., 1984).

Els productes de l'àcid araquidònic també contribueixen a la inflamació mitjançant la producció de radicals d'oxigen tòxics durant els processos catalitzats per les peroxidases, tant de la via cicloxigenasa com de la lipoxigenasa (Metz, 1981; Van de Stadt, 1982).

El grau d'infiltració leucocítica als teixits inflamats es correlaciona directament amb l'elevada concentració de prostaglandines en aquests teixits. Però les propietats qui-

miotàctiques de les prostaglandines no estan clares (Ninnemann, 1984b). S'ha demostrat que la PGE₁ (Rivkin i col., 1975) i la PGE₂ (Till i col., 1979) tenen activitat quimiotàctica.

En contrast amb els efectes inflamatoris de les prostaglandines endògenes, hi ha treballs que es refereixen a l'activitat antiinflatòria de prostaglandines de la sèrie E, administrades a certs models animals. A la rata, la PGE₁ supprimeix l'augment de permeabilitat vascular causat per histamina, bradicinina, serotonina i C3a (Fantone i col., 1980); també suprimeix l'artritis adjuvant a la rata (Zurier i col., 1971) i la glomerulonefritis en el ratolí (Zurier i col., 1977). De fet, s'ha vist que en rates deficientes en àcids grassos essencials, en les quals es produeix una marcada reducció de la producció de prostaglandines endògenes, el procés inflamatori cursa amb una menor exsudació tant en condicions agudes com cròniques, mentre que la fase proliferativa (crònica) està augmentada. Aquestes dades invaliden el criteri generalitzat segons el qual les prostaglandines són simplement inflamogèniques i permeten pensar en un paper flobogen en la fase aguda de la inflamació, i antiinflamatori i modulador en la fase crònica (Bonta i col., 1978; Bonta i col., 1979).

3.6.2. Derivats de l'àcid araquidònic via lipoxigenasa

L'àcid araquidònic es pot metabolitzar per enzims tipus lipoxigenasa als corresponents àcids hidroperoxieicosatetraenoics o HPETE₁ (figura 7) (Samuelsson, 1983). Aquests compostos poden ser metabolitzats pel sistema glutatió peroxidasa i es formen àcids monohidroxicicosatetraenoics o HETEs.

Els productes resultants de la via de la 5-lipoxigenasa són particularment importants perquè inclouen els leucotriens, substàncies biològicament actives. El 5-HPETE pot convertir-se en un intermig epòxid inestable, el leucotriè A₄ o LTA₄,

el qual es pot metabolitzar enzimàticament a leucotriè B₄ (LTB₄) o es pot conjuguar amb el glutatió per donar lloc al leucotriè C₄ (LTC₄). Aquest últim es pot metabolitzar donant lloc als leucotriens LTD₄, LTE₄ i LTF₄ (Davies i col., 1984). Aquests leucotriens biològicament actius són ràpidament metabolitzats. El LTB₄ s'oxida a un component menys actiu mitjançant una ω-oxidació (Jubiz i col., 1982), i els leucotriens pèptido-lípids es poden oxidar a sulfòxids, donant lloc després a 5,12-diHETE₁ (figura 7) (Lee i col., 1982).

De més a més de la via 5-lipoxigenasa, s'han descrit els enzims 12- i 15-lipoxigenasa com a possibles productors de leucotriens epòxids (11, 12-LTA₄ i 14,15-LTA₄), els quals es poden convertir en una varietat d'àcids dihidroeicosatetraenics (Maas i col., 1983). No s'han descrit funcions biològiques per a aquests leucotriens.

L'activitat més significant dels leucotriens sembla que és la del LTB₄, el qual és un potent agent quimiotàctic i quimiocinètic per a leucòcits (Ford-Hutchison i col., 1980; Goetzl i col., 1980; Smith i col., 1980). Altres productes de la via lipoxigenasa són quimiotàctics però no tan importants. Tota la sèrie de mono-HETEs té activitat quimiotàctica per a granulòcits, essent el més potent d'ells el 5-HETE (Goetzl i col., 1979).

El LTB₄ també té moltes de les propietats associades a la quimiotàxia: estimula l'agregació de leucòcits (Ford-Hutchison i col., 1980; Goetzl i col., 1980; Smith i col., 1980), el flux de ions (Molski i col., 1981) i l'expressió dels receptors per a C3b (Nagy i col., 1982). S'ha postulat que el LTB₄ pot exercir la seva acció actuant com a ionòfor del calci (Serman i col., 1982). També s'ha pensat que el LTB₄ interacciona amb un receptor de membrana específic en els granulòcits, del mateix tipus que el del C5a (Snyderman i col., 1981).

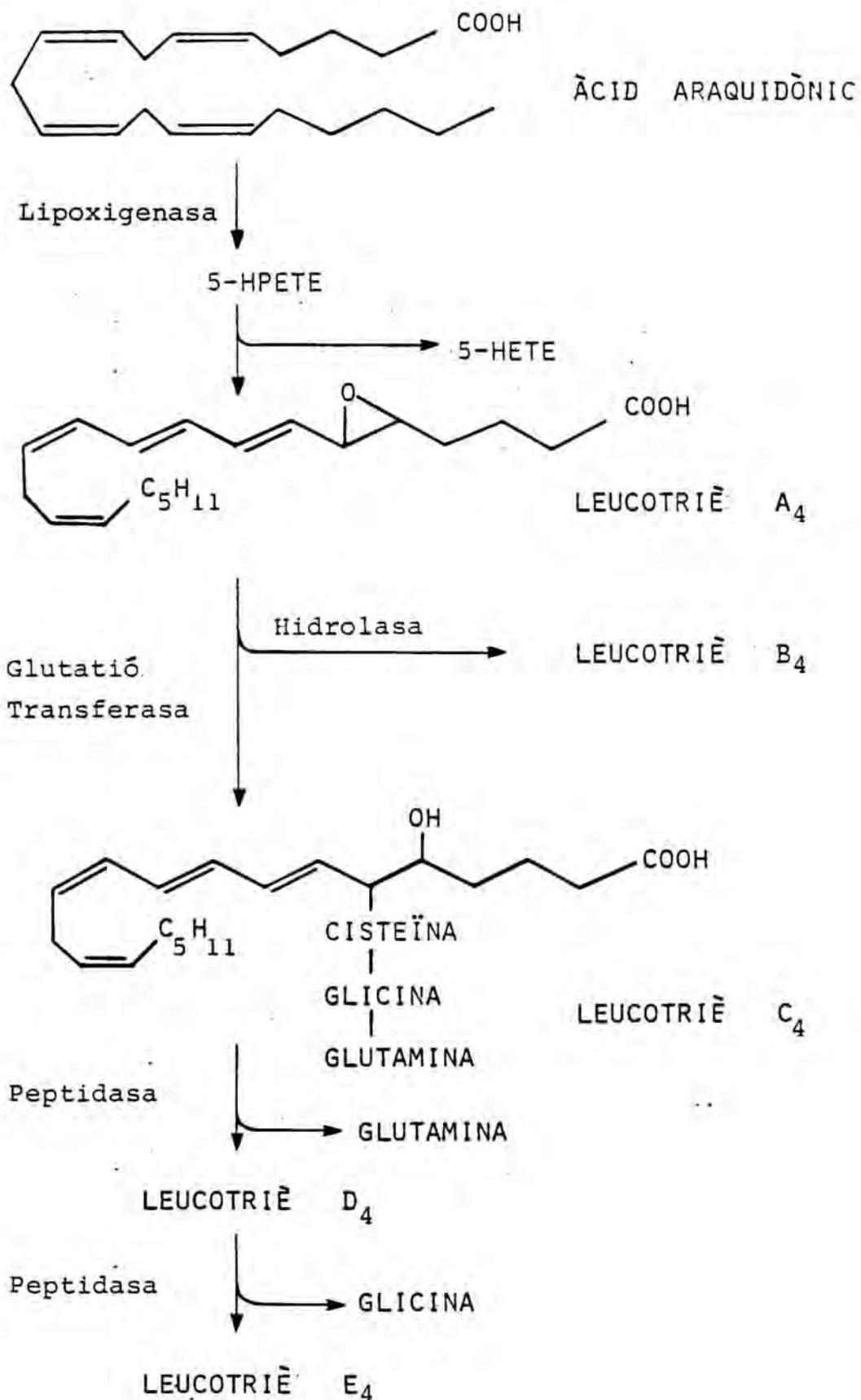


FIGURA 7: Metabolisme de l'acid araquidònic via lipoxigenasa

Els leucotriens LTC₄ i LTD₄ no tenen efecte ni en la quimiostatàxia ni en la degranulació de granulòcits, però augmenten la seva adherència, possiblement a través d'un mecanisme que implica la generació de TxA₂ (Goetzl i col., 1980; Goetzl i col., 1983).

Pel que fa als símptomes cardinals de la inflamació, s'ha vist que certs productes de la via lipoxigenasa causen dolor quan s'administren intradèrmicament (ferreira, 1972), i el LTB₄ provoca una resposta hiperalgèsica després de l'administració subplantar a la pota de la rata (Rackham i col., 1983).

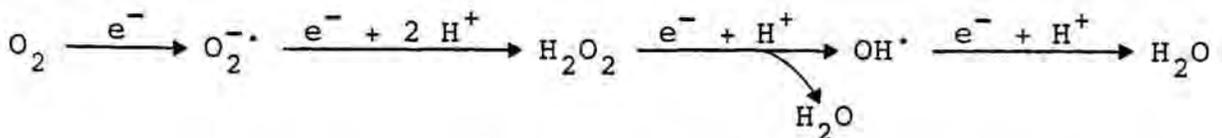
No es coneixen els efectes que els leucotriens puguin tenir en la febre. Sobre el flux sanguini i la permeabilitat vascular, aquests productes tenen uns efectes molt diferents, amb considerables variacions d'espècie a espècie (Davies i col., 1984). El LTB₄ és un potent estimulador de la permeabilitat vascular en rates, conills, conillets d'Índies i ratolins en presència d'un vasodilatador tal com la PGE₂ (Bray i col., 1981; Bray, 1982). Sobre la pell humana, el LTC₄ i el LTB₄ produeixen vasodilatació (Bisgaard i col., 1983).

Els leucotriens LTC₄, LTD₄ i en menor extensió LTE₄, combinats amb glutatió, cisteïnglicina i cisteïna, respectivament, formen l'anomenada "slow-reacting substance of anaphylaxis" (SRS-A), la qual està implicada en la broncoconstricció asmàtica (Fantone i col., 1982; Davies i col., 1984). A més d'aquest efecte, la SRS-A també s'ha vist que augmenta la permeabilitat capil·lar en la resposta inflamatòria i així col·labora en l'edema i la inflor (Pinckard, 1982; Ford-Hutchinson, 1983).

3.7. RADICALS LLIURES

S'accepta que la producció excessiva de radicals lliures podria ser la causa de la inflamació (Bragt i col., 1980; Dyanagui, 1982). Els macròfags i els neutròfils produeixen compostos oxigenats que es poden escapar a l'espai extracel·lular i així estimular una resposta inflamatòria (Bragt i col., 1980).

Els radicals lliures es poden definir com a àtoms o molècules que posseeixen un nombre imparell d'electrons en l'òrbita més externa (Bulkley, 1983; Holmberg, 1984). L'electró no aparellat de l'última òrbita fa a la molècula extremadament reactiva. Als organismes vius, la producció de radicals lliures prové de la reducció monovalent de l'oxigen molecular de les cèl·lules. Aquesta via comporta la formació de l'anió radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$), que pot passar a peròxid d'hidrogen (H_2O_2) mitjançant una reacció de dismutació catalitzada per l'enzim superòxid dismutasa (SOD); el peròxid, en certes condicions, pot transformar-se en radical hidroxil (OH^{\cdot}) (Bulkley, 1983; Hertz i col., 1984).

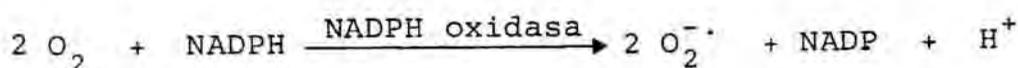


Durant la inflamació, la formació de radicals lliures pot tenir lloc per dues vies: durant la síntesi de prostaglandines i durant la fagocitosis, si bé els dos processos estan estretament lligats (Pérez i col., 1980). En macròfags i neutròfils, el metabolisme de l'àcid araquidònic comporta la producció de radicals lliures durant la formació de prostaglandines, concretament en el pas de PGG_2 a PGH_2 (Marnett i col., 1975; Hertz i col., 1984).

Però el mecanisme més important de producció de radi-

cals lliures és potser la fagocitosi. Com ja s'ha dit (apartat 2.2.3.) el procés fagocític va acompanyat d'un augment en la respiració cel.lular, on es consumeixen grans quantitats d'oxigen molecular, i es secreta O_2^- i H_2O_2 (Drath i col., 1975; Johnston i col., 1978).

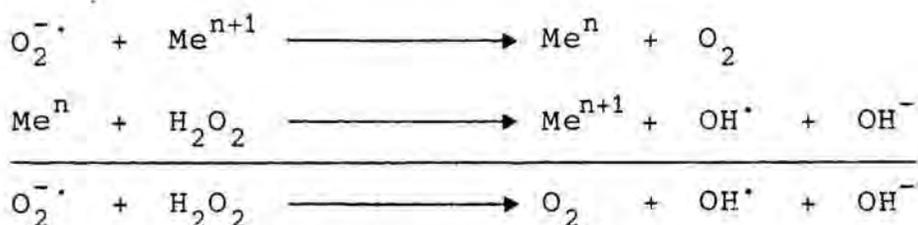
El sistema enzimàtic responsable de l'increment del consum d'oxigen i de la generació de O_2^- es creu que és una NADPH o NADH oxidasa, associada a la membrana (Babior i col., 1981; Nakamura i col., 1981).



L'oxigen molecular té dos electrons desaparellats en els seus últims orbitals i tenen el nivell més baix d'energia quan estan així, ocupant orbitals diferents i tenint spins en la mateixa direcció. Cadascun d'aquests orbitals pot acomodar un electró addicional, de manera que l'adquisició d'un electró condueix a la formació de l'anió radical superòxid (Badwell i col., 1980). Aquest radical pot actuar com a oxidant o com a reductor, segons el substracte amb què reacciona. Dues molècules de O_2^- poden reaccionar oxidant-se l'una i reduint-se l'altra, i formar en una reacció de dismutació, peròxid d'hidrogen (Fantone i col., 1982). Aquesta reacció és espontània només quan el pH és igual al pK_a de inonització (pH = 4.8) (Fee i col., 1977). En un ambient àcid, com el que existeix al fagolisosoma, la dismutació espontània pot ser significant, però a pH neutre, el mecanisme principal de formació de H_2O_2 és la dismutació de O_2^- catalitzada per superòxid dismutasa (SOD) (Fridovich, 1975):



Com ja s'ha dit, també s'han identificat altres metabòlits derivats de l'oxigen existents després de l'activació de cèl.lules fagocítiques. Entre aquests es troben el radical hidroxil (OH^\bullet) (Repine i col., 1979; Rosen i col., 1979), l'oxigen singlet ($^1\text{O}_2$) (Rosen i col., 1977; Piaff i col., 1979) i l'àcid hipoclorós (HClO) (Klebanoff, 1968; Harrison i col., 1976). La producció de OH^\bullet es creu que és deguda a la interacció de $\text{O}_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 en la reacció de Haber-Weiss modificada, també coneguda com a reacció de Fenton (Nilsson i col., 1969; Fee i col., 1977; Mc Cord i col., 1978):

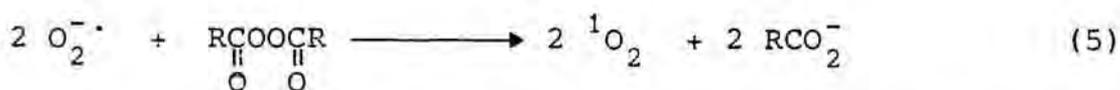
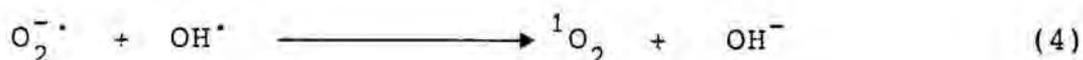
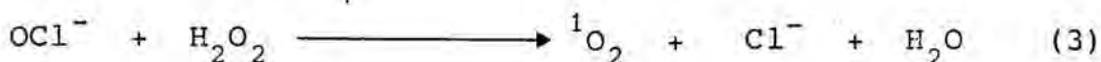
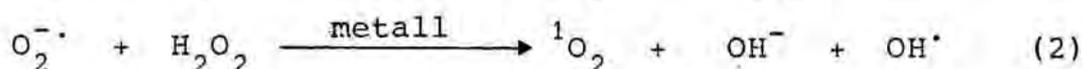
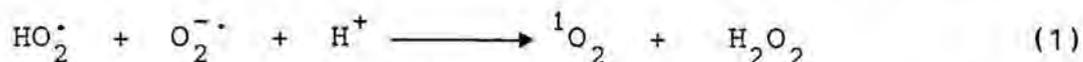


S'ha proposat un segon mecanisme de generació de radical superòxid hidroxil: la reacció de $\text{O}_2^{\bullet-}$ amb hidroperòxids formats per peroxidació lipídica (Babior, 1978), però no se sap quin dels dos mecanismes té més relevància "in vivo".

Un altre radical lliure descrit és l'oxigen singlet ($^1\text{O}_2$). Aquest radical es forma quan l'oxigen molecular absorbeix una quantitat d'energia significativa, causant un canvi d'spin en un dels electrons desaparellats, podent ocupar el mateix o diferent orbital que ocupava (Badwell i col., 1980). Quant l'electró excitat s'aparella amb l'altre electró desaparellat i tenen spin oposat es dona lloc a la forma delta de l'oxigen singlet ($^1\Delta_g \text{O}_2$). Aquesta forma és relativament estable, la seva vida mitjana és de 2 microsegons (Fantone i col., 1982). Hi ha una altra forma, és l'oxigen singlet sigma ($^1\Sigma_g^+ \text{O}_2$), que es produeix quan els dos electrons ocupen els mateixos orbitals que ocupaven, però tenen spin oposat (Badwell i col., 1980; Fantone i col., 1982). La vida mitjana de $^1\Sigma_g^+ \text{O}_2$ és molt més curta (10^{-5} microsegons) (Badwell i col., 1980). La gran inestabilitat de l'oxigen singlet li

confereix una potent reactivitat i un gran potencial per interaccionar indiscriminadament amb altres molècules.

Hi ha una sèrie de reaccions que poden donar lloc a $^1\text{O}_2$ i que són possibles "in vivo" (Klebanoff, 1980):



Aquestes reaccions inclouen la dismutació espontània de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (reacció 1), encara que la producció de $^1\text{O}_2$ per aquesta via, està en discussió (Nillsson i col., 1974; Khan, 1976). La reacció de Haber-Weiss modificada (reacció 2) és responsable de la generació de radical hidroxil i oxigen singlet. La interacció de l'hipoclorit (OCl^-) amb H_2O_2 (reacció 3) té un interès especial ja que l'àcid hipoclorós prové del sistema mieloperoxidasa- H_2O_2 -halur (Rosen i col., 1977; Piaff, 1979). Per últim l'oxigen singlet també es pot produir per la interacció de $\text{O}_2^{\cdot-}$ amb radicals hidroxil (reacció 4) o peròxids de diacil (reacció 5) (Danen i col., 1978). A la figura 8 es troba esquematitzada la formació conjunta de tots els radicals lliures.

Els metabòlits oxigenats alliberats per neutròfils o macròfags activats poden ésser tòxics per a una varietat de cèl.lules eucariotes, com eritròcits, cèl.lules endotelials, fibroblasts, cèl.lules tumorals, leucòcits, plaquetes i espermatozoides (Fantone i col., 1982). Així, els radicals lliures són efectius contra bacteris i alguns virus (Hassan i col., 1981), però també tenen una sèrie d'efectes adversos (Bragt, 1980):

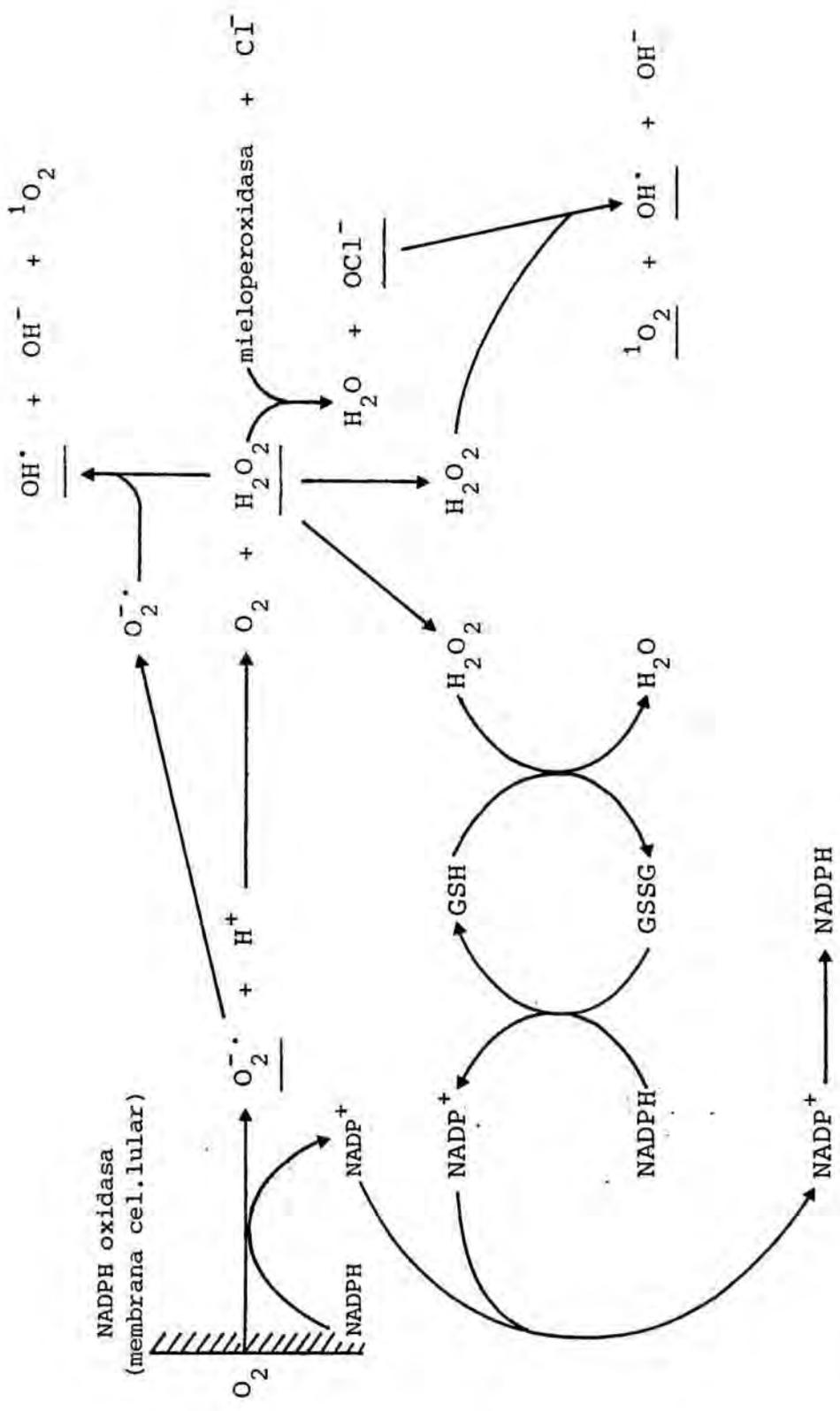
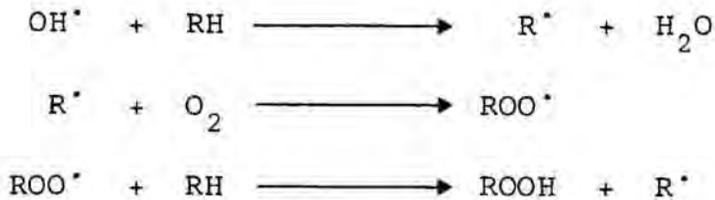


FIGURA 8: Formació de radicals lliures (Hurst i col., 1981)

- a) Els radicals oxigenats despolimeritzen l'àcid hialurònic del fluid sinovial boví (Mc Cord, 1974; Bulkley, 1983).
- b) Fan làbil la membrana cel.lular. Aquest fet es creu que és degut a la peroxidació d'àcids grassos poliinsaturats que formen part de l'estructura fosfolipídica de la membrana. Aquest fenomen té lloc parcialment per l'acció directa de l'anió radical superòxid i de radicals hidroxil, però també és degut a radicals peròxids lipídics, hidroperòxids lipídics i altres productes de la fragmentació lipídica de rivats secundàriament que generen una reacció en cadena, comportant una amplificació de la resposta tòxica (Del Maestro, 1980):



Aquest mecanisme capaç de trencar l'envolupament cel.lular també pot trencar membranes d'importants orgànuls, com lisosomes i mitocòndries. El trencament lisosomal comporta l'alliberament d'enzims lisosomals que potencien el mal cel.lular (Bulkley, 1983).

- c) Incrementen l'alliberament de mediadors anafilàctics en conills d'Índies sensibilitzats.
- d) Indueixen la degradació del col.lagen "in vitro" (Borel, 1982; Bulkley, 1983; Monboisse i col., 1983).
- e) Ataquen els mucopolisacàrids de la substància fonamental del teixit connectiu. S'ha vist que l'anió radical superòxid és capaç de destruir el cartílag, alliberant fragments de col.lagen i proteoglicans (Borel, 1982).

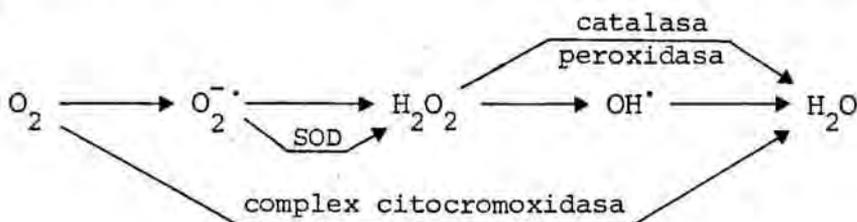
f) Lesionen el DNA: OH^{\cdot} i $^1\text{O}_2$ són capaços de fragmentar la doble hèlix del DNA (Borel, 1983).

La degradació de molècules de col.lagen, d'altres proteïnes i de proteoglicans comporta l'alliberament de pèptids, alguns dels quals tenen propietats quimiotàctiques. Així s'incorporen més neutròfils i macròfags al lloc lesionat, els quals en estimular-se produiran més radicals lliures: el procés es torna cíclic i pot arribar a la cronicitat (Borel, 1982; Fantone, 1982). Alguns fragments generats poden produir nous determinants antigènics i es converteixen en una font d'autoimmunització contra alguns elements del teixit connectiu tals com els proteoglicans (Sandy i col., 1980).

Els radicals lliures i els peròxids lipídics també tenen potents efectes sobre carbohidrats (Cutteridge, 1981; Halliwees i col., 1981) i proteïnes (Roubul i col., 1966, a i b).

Es considera que l'anió radical hidroxil és el principal iniciador de la peroxidació lipídica, jugant un important paper en la fase aguda de la inflamació, considerant-se com el principal radical lliure (Hertz i col., 1984). S'han detectat productes de peroxidació lipídica en sang i fetge així com al mateix lloc on es desenvolupa la inflamació (Bragt i col., 1980).

En condicions normals, l'organisme té una sèrie de mitjans de detoxificació intracel.lular contra l'acció dels radicals lliures. Aquests mitjans inclouen els enzims superòxid dismutasa (SOD), catalasa i peroxidasa (Del Maestro, 1980).



Mc Cord i Fridovich (1969) van ser els primers que van descriure la funció de la SOD, enzim que es troba a la majoria dels teixits, on catalitza la reducció del radical superòxid a peròxid d'hidrogen. De manera anàloga, la catalasa i la peroxidasa detoxifiquen el H_2O_2 i així catalitzen la seva reducció a aigua.

Com a superòxid dismutasa s'inclouen tota una sèrie de metal·loproteïnes, presents en tots els organismes consumidors d'oxigen i que catalitzen la dismutació del radical superòxid.

En les reaccions inflamatòries, els leucòcits presents produeixen O_2^- a partir de la NADPH oxidasa de la membrana, aleshores aquest radical és alliberat al medi extracel·lular. En conseqüència, es troben substancials quantitats de radicals en el fluid extracel·lular. Aquest fluid conté molt poca SOD de manera que els radicals poden exercir els seus efectes tòxics (Badwell i col., 1980).

3.8. LIMFOQUINES

Les limfoquines són proteïnes o glico-proteïnes sintetitzades per cèl·lules limfoides estimulades, capaces d'exercir funcions missatgeres i/o mediadores del sistema immune. Aquesta definició, però, no és del tot correcta ja que s'han descrit limfoquines produïdes per cèl·lules no limfoides i també s'ha vist que algunes d'elles poden tenir efectes fora del sistema immune; és millor utilitzar aleshores el terme de citoquines (Fontana i col., 1982; Schmidt i col., 1982; Besedovsky i col., 1983). A grans trets, les tasques de les limfoquines es poden resumir en funcions reguladores i en funcions efectores.

Les limfoquines poden exercir funcions reguladores so

bre el sistema immune mitjançant la seva influència sobre la diferenciació i la proliferació dels elements cel·lulars que constitueixen aquest sistema i també controlant algunes de les funcions cel·lulars com el metabolisme i la secreció de mediadors. Així s'ha observat que la proliferació dels limfòcits T necessita la presència de interleuquina 1, interleuquina 2 i transferrina, substàncies que actuen durant la fase G1 del cicle cel·lular i la dirigeixen fins a la fase S (Kristensen i col., 1982). Anàlogament existeix un factor de creixement de les cèl·lules B (BCGF) que regula la proliferació d'aquestes cèl·lules (Falkoff i col., 1982).

Hi ha una limfoquina, la interleuquina 3, que a més de fomentar l'aparició de marcadors de maduració a les cèl·lules T precursors, estimula la diferenciació d'algunes cèl·lules immadures de la medul·la òssia, com els basòfils i els mastòcits (Tadokoro i col., 1983).

Les limfoquines també realitzen funcions efectores: són necessàries en determinades funcions cel·lulars, com la secreció d'immunoglobulines (Farrar i col., 1982), la destrucció de cèl·lules diana i la producció d'infiltrats inflamatoris (Boros, 1980). Hi ha limfoquines que, com el factor activador dels macròfags (MAF), el factor necessari per a la expressió de la cèl·lula T citotòxica (Raulet i col., 1982) i l'interferó, activen les cèl·lules per a algunes funcions destructores. Altres tenen capacitats quimiotàctiques o bé efectes inhibitoris sobre la migració cel·lular; també s'han descrit limfoquines capaces d'induir la secreció de peròxid d'hidrogen (Bromberg i col., 1983), la producció de febre (Dinarello, 1982) i de proteïnes de fase aguda (Sipe i col., 1979).

Seguidament farem èmfasi en algunes de les limfoquines implicades en el procés inflamatori, com són els factors quimiotàctics, el factor inhibitori de la migració, el factor activador del macròfag i el factor inhibitori del leucòcit.

3.8.1. Factors quimiotàctics (CF)

S'ha observat "in vitro", que limfòcits activats elaboren una sèrie de factors solubles que són quimiotàctics per a diferents cèl.lules, com macròfags, neutròfils, eosinòfils, basòfils i limfòcits.

- Factor quimiotàctic per a monòcits-macròfags (MCF)

En rates, conillets d'Índies i en l'home s'ha descrit un MCF generat després de l'activació dels limfòcits per antígens específics, mitògens o estimulants del receptor per a C3 (Snyderman i col., 1977; Altman, 1978). El MCF de conillet d'Índies té un pes molecular estimat entre 24,000 i 55,000 (Ward i col., 1969) mentre que el pes molecular del MCF de l'home és de 12,500 (Snyderman i col., 1977). Ambdues substàncies són termoestables i antigènicament diferents dels factors quimiotàctics derivats dels components del complement C3 i C5.

L'estimulació dels receptors C3 dels limfòcits B, i no dels limfòcits T, pot generar activitat quimiotàctica per a cèl.lules mononuclears. Aquest fet pot ser bloquejat per l'addició d'anticossos anti-C3, però aquests anticossos no inhibeixen l'activitat MCF un cop s'ha produït. El MCF generat pels limfòcits B amb C3b té les mateixes característiques fisicoquímiques que els MCF derivats de cèl.lules estimulades amb lipopolisacàrids, antígens o fitohemaglutinina (Rocklin, 1984).

- Factor quimiotàctic per a leucòcits PMN

El factor o factors quimiotàctics per a neutròfils, basòfils i eosinòfils aïllats de conillet d'Índies o ratolí, té un pes molecular entre 24,000 i 55,000. La primera activitat quimiotàctica per a eosinòfils va ser descrita per Cohen i col. (1971), investigadors que van observar que els limfòcits

de conillets d'Índies estimulats alliberaven un factor que es combinava amb el complex antígen-anticòs per generar un factor quimiotàctic per a eosinòfils. Aquest factor era específic per a l'antigen i també específic d'espècie, ja que si s'obtenia en ratolí no atreia eosinòfils de conill, per exemple. Aquest factor quimiotàctic també té activitat sobre neutròfils, encara que de 4 a 6 vegades inferior a la observada per eosinòfils.

S'ha descrit un altre factor quimiotàctic per a eosinòfils obtingut en ratolí, anomenat "promotor de l'estimulació d'eosinòfils" (ESP) (Colley, 1973). L'ESP és termoestable i és inactivat per la quimotripsina; té activitat quimiotàctica per a eosinòfils i també per a macròfags (Greene i col., 1974).

Per últim, Ward i col. (1975) observaren que els limfòcits de conillets d'Índies exposats a DNP-BSA "in vitro" elaboraven un factor quimiotàctic per a basòfils.

3.8.2. Factor inhibitori de la migració de macròfags (MIF)

El MIF és generat per limfòcits de la sang, nòduls limfàtics, melsa, exsudat peritoneal i timus, procedents de diferents espècies animals, inclòs l'home, i estimulats per l'antigen o d'una manera inespecífica per lectines (Kotkes i col., 1975). També s'ha demostrat que sobrenedants de cultius de fibroblasts i de cèl.lules tumorals tenien activitat MIF (Tubergen i col., 1972).

Remold i col. (1977) han demostrat l'existència d'un MIF d'alt pes molecular (55,000) amb un punt isoelèctric de 3 - 4.5 i un MIF de baix pes molecular (25,000) amb un punt isoelèctric de 5 - 5.5. De l'estructura molecular d'aquesta limfoquina es coneix molt poc, només se sap que pot contenir enllaços disulfur (Bartfeld i col., 1971).

L'acció del MIF sembla que és a nivell de la superfície cel·lular, i s'han proposat models de receptors per a aquest factor (Remold, 1973). El mecanisme pel qual el senyal inhibitori arriba a l'interior del macròfag és desconegut, encara que sembla que intervenen alteracions en el transport de calci a través de la membrana, així com canvis a la densitat dels microtúbuls dels macròfags (Pick i col., 1977).

3.8.3. Factor activador dels macròfags (MAF)

Les propietats fisicoquímiques del MAF obtingut de conills d'Índies i de l'home no es poden diferenciar de les del MIF. Ambdós factors tenen un pes molecular entre 25,000 i 68,000, són destruïts per neuraminidasa i tenen una densitat lleugerament superior a la de l'albumina (Nathan i col., 1973).

La incubació de macròfags normals amb sobrenedants que contenen limfoquines generades en resposta a antígens o a mitògens, induïx profunds canvis en la morfologia cel·lular. Durant la primera hora, generalment hi ha una inhibició de la difusió dels macròfags; a les 24 hores, les cèl·lules han perdut els seus pseudòpodes i no són mòbils (David, 1966); després de 48 hores els macròfags difonen formant llargs pseudòpodes i formen agregats cel·lulars (Dvorak i col., 1972); a les 72 hores les cèl·lules s'han engrandit, han incrementat la seva adherència a superfícies, presenten moviment ameboide i han augmentat el seu contingut en vacuoles i grànuls lisosomals (Nathan i col., 1971).

El MAF altera considerablement l'activitat metabòlica del macròfag, produint canvis en el metabolisme de carbohidrats, proteïnes i lípids (Nathan i col., 1971 i 1973; Block i col., 1980). Aquesta limfoquina també modifica els nivells d'enzims lisosomals, encara que les dades disponibles són contradictòries: hi ha investigadors que troben un augment en

l'activitat enzimàtica lisosomal (Pantalone i col., 1975; Poulter i col., 1975) i n'hi ha d'altres que observen una disminució del contingut d'enzims lisosomals en macròfags incubats amb MIF (Remold i col., 1975). Aquestes diferències poden ser degudes a l'ús de cèl.lules amb diferents estats de maduració, a diferències en les preparacions de limfoquines o a les condicions experimentals.

S'ha demostrat també que els macròfags tractats amb limfoquines secreten molècules biològicament actives, com per exemple la col.lagenasa (Pantalone i col., 1977) i l'activador del plasminogen (Greineder i col., 1979).

El MAF comporta també un augment de la pinocitosi (Schubert i col., 1980) i un increment o disminució de la fagocitosi segons la naturalesa de la partícula a ingerir (Nathan i col., 1971; Remold i col., 1977). Per últim, cal fer palès també l'augment de l'activitat bacteriostàtica i bactericida induïda per les limfoquines sobre el macròfag (Fowles i col., 1973; Anderson i col., 1974).

3.8.4. Factor inhibidor de leucòcits (LIF)

És una molècula termoestable a 80 °C durant 30 minuts, estable a pH 4 - 10 i inactiva a pH 3 i 11. Té propietats de proteïna i és destruïda pel tractament amb quimotripsina (Rocklin i col., 1980), i se li ha estimat un pes molecular de 58,000 (Meshulam i col., 1982).

Es creu que el LIF pot ser una serin esterasa o una proteasa, o ambdues, ja que es comporta com a tal i és susceptible a inhibidors enzimàtics irreversibles (Bendtzen, 1977; Rocklin i col., 1978).

Les accions de les limfoquines descrites aquí no

s'han de considerar com a elements que actuen independentment en el procés inflamatori. Cada dia es tenen més evidències sobre la interacció de les limfoquines amb altres mediadors endògens implicats en la inflamació, com per exemple, els components dels sistemes del complement, de la coagulació, fibrinolític i formador de cinines; les prostaglandines, tromboxans i leucotriens; i la histamina i altres factors derivats dels mastòcits. Aquestes interaccions poden incrementar de més a més els efectes biològics de les limfoquines (Dumonde i col., 1983).

4. AUTOANTICOSSOS I INFLAMACIÓ CRÒNICA

Els autoanticossos són capaços d'induir una lesió tissular a través de la formació d'immunocomplexos i la consegüent activació del sistema del complement. Si una malaltia té una font constant d'autoanticossos, desenvoluparia una inflamació crònica. Generalment, les malalties que cursen amb la presència d'aquests anticossos són desordres del teixit connectiu, i són conegudes com a malalties autoimmunes.

A l'artritis reumatoide tenen lloc diferents fenòmens autoimmunes, les principals manifestacions dels quals són les d'autoimmunitat contra les immunoglobulines, contra antígens nuclears i contra el col.lagen.

4.1. FACTORS REUMATOIDES

Els factors reumatoides (FR) són autoanticossos que reconeixen determinants antigènics situats sobre el fragment Fc de la immunoglobulina G (Pasquali i col., 1982). Es van descriure per primera vegada al 1940, quan Waaler va descobrir l'aglutinació que tenia lloc enfrontant glòbuls vermells de moltó sensibilitzats amb immunoglobulines anti-glòbuls vermells de moltó i sèrum de malalts amb artritis reumatoide. Uns anys més tard, Rose i col. (1948) van confirmar les troballes de Waaler i des de llavors el test de Waaler-Rose és dels més utilitzats per a detectar la presència de FR. L'artritis reumatoide és la malaltia que presenta un percentatge més elevat d'existència de factor reumatoide.

Els determinants antigènics reconeguts pels FR semblen trobar-se en les regions CH2 o CH3 del fragment Fc de la IgG (Johnson i col., 1976). Els FR són capaços de reaccionar amb IgG de diferents espècies (home, conill, cavall, etc.). Aquesta reacció entre espècies no és una reacció creuada, ja que es

pot absorbir la reactivitat contra la IgG humana i mantenir la reactivitat contra la IgG de conill (Vischer, 1982).

Durant un temps es va creure que els determinants antigènics de la molècula d'IgG només es manifestaven quan tenia lloc alguna alteració estructural, per exemple, durant una termo-desnaturalització o en combinar-se amb l'antigen (Edelman i col., 1958). Però s'ha vist que el factor reumatoide té una afinitat similar per la IgG monomèrica i per la IgG agregada (Eisenberg, 1976) i s'han detectat complexos formats per FR de tipus IgM i IgG monomèrica, fets que demostren que no és necessària la unió IgG-antigen per a combinar-se el FR amb la IgG (Griffiths, 1981). Els malalts amb artritis reumatoide i FR tenen menys bon pronòstic que els malalts sense aquest tipus d'autoanticòs. A més, els malalts amb elevats títols són els que presenten complicacions extraarticulals com vasculitis i pericarditis. En el curs de la malaltia els nivells de factor reumatoide quasi no varien, només es modifiquen les taxes de FR quan hi ha una remissió o una millora duradera (Vischer, 1982).

S'han descrit factors reumatoides en els quatre tipus d'immunoglobulines: IgM, IgG, IgA i IgE (Torrigiani i col., 1967; Panush i col., 1971; Meretey, 1982). La classe d'immunoglobulina predominant amb activitat FR al sèrum sembla que és la IgM. L'estructura decaivalent de la molècula d'aquesta immunoglobulina permet detectar el factor reumatoide de classe IgM (FR IgM) mitjançant reaccions d'aglutinació: reaccions entre el sèrum i partícules, com làtex, bentonita, glòbuls vermells, etc., recobertes de l'antigen. El FR IgM es detecta en un 70 - 90 % dels sèrums de malalts amb artritis reumatoide, són els anomenats pacients seropositius. La resta de pacients es consideren seronegatius i d'aquests un cert nombre es tornarà seropositiu, mentre que el 10 - 20 % romandrà negatiu (Pasquali, 1982).

Els factors reumatoides de la classe IgG (FR IgG) són

abundants en el sèrum i, particularment, en els líquids sinovials de pacients amb formes greus de l'artritis reumatoide (Winchester i col., 1970; Carson i col., 1977; Pope i col., 1979). El FR IgG sembla reconèixer preferentment el domini CH2 del fragment Fc de la IgG (Nardella i col., 1981). Els autoanticossos IgG tenen la propietat de reaccionar amb un epitop que es troba en una molècula idèntica, de manera que la porció Fab d'una molècula es pot combinar amb la Fc d'una altra, llavors es produeix l'autoassociació entre FR i IgG (Pope i col., 1974; Nardella i col., 1981). Encara que s'ha detectat FR IgM en el fluid sinovial de pacients seropositius i d'alguns pacients seronegatius, és probable que el FR IgG del fluid sinovial tingui un paper més important i patogènic en la formació d'immunocomplexos intraarticulars (Winchester i col., 1970).

S'han detectat factors reumatoides de la classe IgA (FR IgA) en el sèrum i fluid sinovial d'una gran proporció de malalts artrítics (Torrighiani i col., 1967; Stankaitiene i col., 1978). El paper d'aquest tipus de FR no està del tot clar. Es presenta només quan ja existeix FR IgM i FR IgG (Pope i col., 1981) i s'ha trobat una correlació significativa entre les concentracions sèriques de FR IgM i FR IgA. Koopman i col. (1982) han postulat que els autoanticossos IgA poden influenciar en la patogeneïtat dels immunocomplexos que continguin IgG, així com els que continguin altres classes de FR.

Els factors reumatoides de tipus IgG s'han descrit recentment i de moment no se'ls ha atribuït una importància particular (Meretey i col., 1982).

Mitjançant tècniques d'immunofluorescència, cultius de teixits i assaigs de cèl.lules formadores de plaques, s'han estudiat els llocs de síntesi de factors reumatoides. Aquests llocs s'han trobat en sang perifèrica, medul.la òssia, sinòvia, fluid sinovial, nòduls limfàtics i nòduls subcutanis. Hi ha cultius de cèl.lules B de la sinòvia reumatoide que tenen una

vida mitjana molt llarga i produeixen FR encara després d'uns anys. Aquestes cèl.lules sintetitzen principalment IgG i s'ha vist que el 74 % d'aquesta té activitat FR IgG (Gilliland i col., 1978).

L'estímul necessari per a desencadenar la producció de factor reumatoide es desconeix. Aquesta producció no està limitada a l'artritis reumatoide, s'ha detectat la presència de FR en diferents estats infecciosos crònics com tuberculosi, sífilis, lepra i endocarditis bacteriana subaguda, així com en altres malalties inflamatòries cròniques del teixit connectiu com la síndrome d'Sjögren, lupus eritematós sistèmic i escleroderma (Griffiths, 1981; Vischer, 1982). En una població normal es detecten títols aïllats de FR, que varien segons els grups ètnics. Amb l'evelliment, el percentatge d'individus amb FR s'eleva conjuntament amb el títol mig de la població (Meltzer i col., 1966).

Hart i col. (1977) han suggerit que la síntesi de FR pot respondre a una inducció viral, ja que l'artritis reumatoide segueix, algunes vegades, a una malaltia vírica. El virus Epstein-Barr, mitogen inespecífic dels limfòcits B, és l'agent inductor més clar implicat en la síntesi de FR "in vitro". En aquestes condicions, el virus Epstein-Barr és capaç d'estimular la síntesi d'IgM en limfòcits de persones sanes i reumàtiques. D'aquesta immunoglobulina, el 10 % de l'obtinguda en cèl.lules normals i el 20 % de la provinent de cèl.lules reumatoides té activitat de factor reumatoide (Slaughter i col., 1978; Steinitz i col., 1982).

Els pacients amb artritis reumatoide també posseeixen altres autoanticossos. S'han detectat anticossos antinuclears en una incidència variable segons el substracte i el mètode utilitzat per a l'estudi, i s'ha observat que aquests anticossos i els factors reumatoides poden tenir reacció creuada (Hannestad i col., 1976). Aitcheson i col. (1980) han trobat que la meitat dels FR aïllats de pacients amb artritis reuma-

toide tenen activitat antinuclear. No se sap si aquesta reacció creuada és el resultat d'un component estructural comú entre la IgG i certs antigens nuclears o és un reflex de la multiespecificitat de certs anticossos, però altres estudis han demostrat que FR IgM aïllats reaccionen amb IgG i DNA, encara que l'afinitat per a la immunoglobulina és lleugerament més gran que per a l'àcid nucleic (Agnello i col., 1980). Aquestes troballes suggereixen que els antigens nuclears poden actuar com a immunògens per al desenvolupament de l'activitat factor reumatoide.

Els FR tenen baixa afinitat per a l'antigen. Les constants d'associació, idèntiques per a FR IgM i FR IgG, són de l'ordre de 1×10^4 a 5×10^5 l/mol (Wagner i col., 1978). Aquests valors són de 10 a 100 vegades inferiors als dels anticossos produïts després d'una immunització exògena. Malgrat això, els FR constitueixen grans immunocomplexos estables que comporten l'origen de les reaccions inflammatòries sinovials en el curs de l'artritis. S'ha trobat una correlació significativa entre la presència de FR, especialment FR IgG i FR IgM, i els immunocomplexos (Roberts-Thomson i col., 1980; Pope i col., 1981). Els complexos són fagocitats i provoquen l'alliberament d'enzims lisosomals, entre altres mediadors de la inflamació, que destrueixen el cartílag i el teixit conjuntiu periarticular, fet que conduirà a la formació de fragments amb capacitat immunògena. Els immunocomplexos també activen el sistema del complement, implicant la generació de noves substàncies inflammatòries i l'increment de la fagocitosi i la citòlisi (Brown i col., 1982; Pasquali, 1982).

4.2. ANTICOSSOS ANTINUCLEARS

La detecció del fenomen cel·lular LE "in vitro", al 1948, va ser el primer indicatiu de factors circulants amb activitat dirigida contra antigens nuclears. La presència d'anti-

cossos antinuclears (ANA) és característica de la malaltia autoimmune lupus eritematós sistèmic, de manera que es creu que aquests autoanticossos poden jugar algun paper en l'etiologia i el tractament de la malaltia. Altres malalties que cursen amb la presència d'ANA són la síndrome d'Sjögren (55 - 65 % d'incidència), l'escleroderma (40 - 60 % d'incidència), l'artritis reumatoide (15 - 25 % d'incidència) i l'artritis reumatoide juvenil (20 % d'incidència).

Avui en dia, la tècnica de les cèl.lules LE per a detectar ANA s'ha reemplaçat per tècniques immunofluorescents semiquantitatives (Friou, 1964). La incidència d'ANA en diferents malalties depèn del substrat utilitzat i del patró de fluorescència observat.

El patró de tinció homogeni es detecta majoritàriament en el lupus eritematós sistèmic. Les tincions membranoses o de la vorera es correlacionen amb els anticossos antiDNA, mentre que el patró de tinció clapejat és degut a un anticòs contra un component antigènic nuclear aïllable, i el patró nucleolar és degut a anticossos antiRNA 7S i s'observa sovint en sèrums provinents de malalts amb escleroderma (Griffiths, 1981).

Alguns antígens nuclears s'han definit bé i la detecció d'anticossos circulants contra ells té valor clínic (per exemple, el DNA). Altres, encara no estan ben definits i no subministren molta informació en el context clínic (per exemple, la histona). Altres encara són extremadament heterogenis (per exemple, l'antigen nuclear aïllable) però tenen cert valor clínic, mentre que altres s'estan començant a conèixer (per exemple, els antígens nuclears RA).

L'existència dels ANA fa pensar que en l'individu malalt hi ha una reacció antigen-anticòs, però la majoria de les tècniques utilitzades per a detectar aquestes reaccions són relativament insensibles i no és possible determinar si aquests

anticossos són detectables a baixes concentracions en sèrums normals, encara que estudis de radioimmuno assaig amb DNA sugereixen que en individus normals poden haver baixos títols d'anticossos i el desenvolupament d'una patologia pot ser degut a un augment quantitatiu més que a una resposta absoluta en autoanticossos (Maini i col., 1979).

4.3. ANTICOSSOS ANTICOL·LAGEN

La presència d'anticossos anticol.lagen a l'artritis reumatoide va ser demostrada al 1963 per Steffen i col. Des d'aleshores, molts estudis confirmen aquests fets (Beard i col., 1980; Steffen, 1980) i a més d'evidenciar l'aparició d'autoanticossos, fan palesa l'existència d'autoimmunitat cellular a diferents tipus de col.lagen.

La demostració d'una artritis experimental induïda per col.lagen fa pensar que l'autoimmunitat al col.lagen té un paper important en la patogènesi de l'artritis reumatoide (Trentham i col., 1977). S'ha demostrat la presència de col.lagenasa, el principal ezmin desintegrador del col.lagen i possiblement inductor de l'autoantigenicitat, en el teixit i fluid sinovial de malalts artrítics i també s'ha desenvolupat una artritis experimental causada per la injecció intraarticular de col.lagenasa procedent d'un pacient artrític. Aquests fets recolzen la hipòtesi anterior (Steffen, 1983).

D'acord amb aquesta hipòtesi, la col.lagenasa alliberaria col.lagen antigènic en el fluid sinovial, que és un teixit immunocompetent, i es formarien autoanticossos anticol.lagen els quals es combinarien amb el col.lagen present. Els immunocomplexos formats induirien una resposta inflamatòria que, en conseqüència, alliberaria contínuament col.lagenasa la qual produiria la formació renovada de col.lagen antigènic (Steffen, 1983).

PART EXPERIMENTAL

1. INTRODUCCIÓ I DISSENY EXPERIMENTAL

L'artritis adjuvant és una patologia experimental induïda per primera vegada al 1954 per Stoerk, mitjançant la injecció intradèrmica d'adjuvant complet de Freund i teixit homòleg. Al 1956, Pearson va demostrar que l'únic agent necessari per a provocar artritis era l'adjuvant complet de Freund.

L'artritis adjuvant està restringida a rates i és induïda per una única injecció de determinades suspensions de parets cel·lulars bacterianes o dels seus components. Aquesta patologia comparteix moltes característiques amb l'artritis reumatoide humana com ho indiquen diferents paràmetres histopatològics i immunopatològics (Rosenthale i col., 1982), de manera que l'artritis adjuvant constitueix probablement un dels models experimentals més àmpliament utilitzats en l'estudi d'agents antiinflamatoris i antireumàtics.

El disseny d'aquest treball comprèn la inducció de l'artritis adjuvant a una sèrie d'animals i l'estudi de les variacions de diferents paràmetres fisiològics al llarg de la patologia. S'han realitzat nou sèries experimentals, que s'han designat amb nombres romans: I, II, ... fins a IX, i que han comprès un total de 660 animals.

Cadascuna d'aquestes sèries ha tingut un protocol diferent que es resumeix a la figura 9, on es representa un esquema que pretèn oferir una visió conjunta de tot l'estudi i que inclou la majoria dels assaigs realitzats. L'obtenció de mostres, realitzada generalment a intervals de 7 dies i paral·lelament a les mesures de pes i volum d'extremitats, s'ha portat a terme mitjançant el sacrifici dels animals, de manera que a l'inici de l'estudi es disposava d'un nombre suficient de grups per a sacrificar un grup control i un grup artrític cada setmana.

La duració de les sèries no ha estat sempre la mateixa: hi ha un experiment que s'ha seguit fins a 60 dies, altres sèries han durat 42 dies i altres 28 o 21 dies. Cal esmentar que l'artritis adjuvant no es manifesta visiblement fins aproximadament el dia 14 de la inducció (artritis establerta), però que s'ha dissenyat una sèrie per a l'obtenció de mostres durant aquesta primera fase, que hem anomenat pre artritis.

A la figura 9 també hi ha esquematitzat un tractament, que s'ha realitzat amb tres agents farmacològics diferents i que sempre era de tipus curatiu, és a dir, s'iniciava un cop establerta la malaltia.

A la figura 10 es pot observar un quadre resum de totes les sèries experimentals realitzades i els paràmetres mesurats, a més del període que ha durat cada experiment i els casos en què hi ha hagut tractament. Com es pot observar hi ha hagut sèries purament descriptives de les modificacions físiques de la malaltia, com la sèrie I i la VI, mentre que altres sèries han comprès l'obtenció de mostres de sèrum per a l'estudi dels nivells de diferents paràmetres, a més de l'estudi de l'efecte d'algun tipus de tractament.

La determinació d'aquests paràmetres ha tingut uns nivells de dificultat molt desiguals. Tècniques com el proteïnograma, la determinació de grups sulfhidril i la determinació dels nivells de complement no han suposat gairebé dificultat. L'estudi de l'activitat motora i del ritme circadiari dels animals artrítics va comportar una tècnica experimental no gaire complicada però complexa en el moment de la interpretació dels resultats. La posta a punt de la tècnica d'aglutinació del làtex i la de les posteriors determinacions d'anticossos antiimmunoglobulines i d'IgG mitjançant tècniques d'ELISA, van representar sens dubte el grau més laboriós del treball.

FIGURA 9: Disseny experimental

El dia 0 s'indueix l'artritis amb *Mycobacterium butyricum* a un grup d'animals. Després de 14 dies es seleccionen els animals que han desenvolupat la patologia i es descarten de l'estudi els que encara no ho han fet. Aquest dia es sacrifiquen un lot d'animals control i un lot d'animals artrítics, i s'inicia un tractament (★). L'estudi es perllonga durant unes quantes setmanes i cada 7 dies se sacrifica un lot de cada tipus.



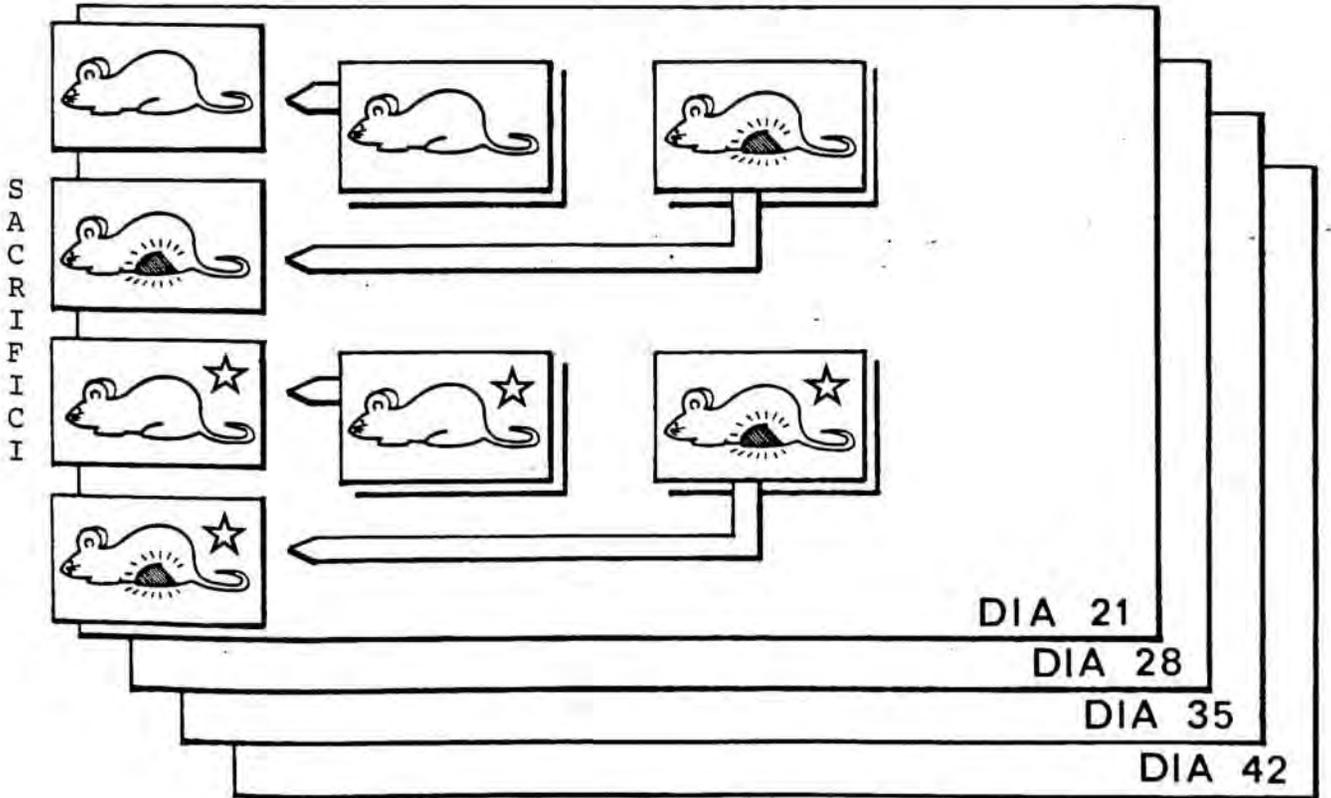
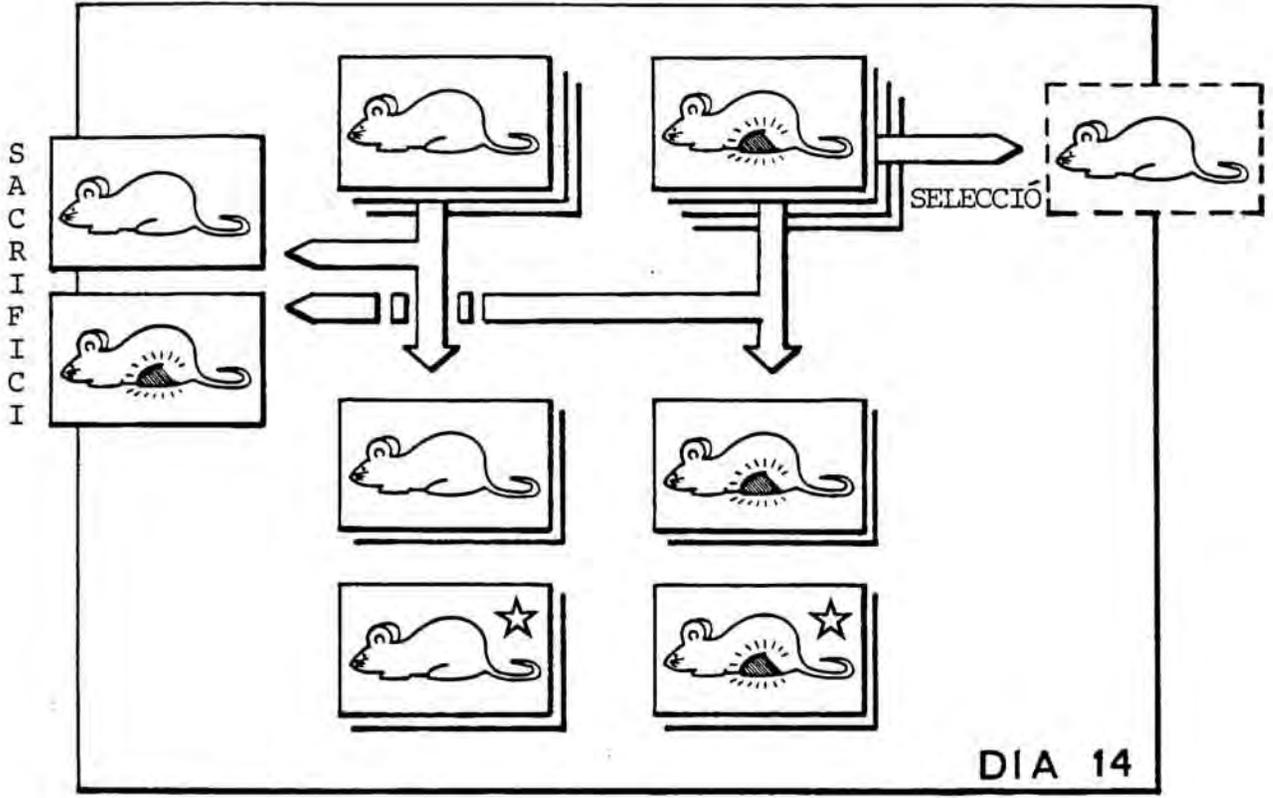
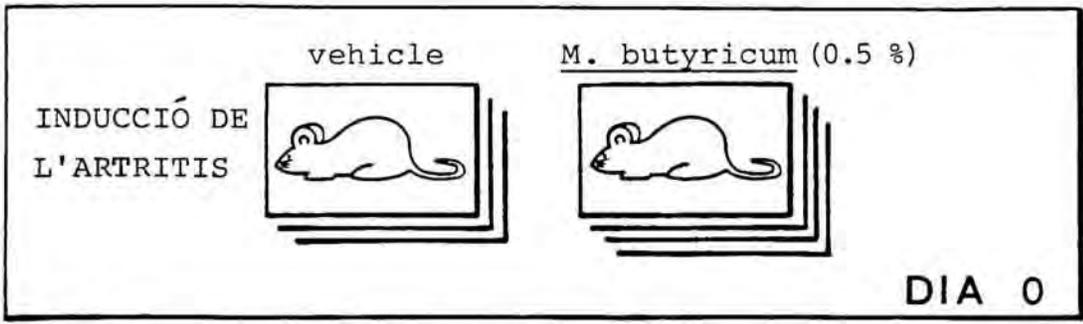
= animals control



= animals artrítics



= animals tractats



SÈRIES EXPERIMENTALS

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
PERÍODE ESTUDIAT (DIES)	60	42	42	28	21	42	14	28	28
SEXE	♀	♀	♀	♀	♂♀	♂	♀	♀	♀

ESTUDIS
REALITZATS

PES I VOLUM D'EXTREMITATS	●	●	●	●	●	●	●	●	●
PES. D'ÒRGANS			●	●			●		
INGESTA					●				
PARÀMETRES LOCOMOTORS								●	●
PROTEÏNOGRAMA		●	●		●		●		
PROTEINÈMIA		●							
GRUPS SULFHI-DRIL SÈRICS			●	●	●		●		
ACTIVITAT COMPLEMENTÀRIA		●							
ANTICOSSOS ANTINUCLEARS		●							
ANTIIMMUNOGLOBULINES		●	●	●			●		
ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG		●	●	●			●		
IgG		●	●						

TRACTAMENTS

PERÍODE		14-42	14-21	14-28					
INDOMETACINA				●					
BENOXAPROFÈ		●	●						
S O D			●						

FIGURA 10: Representació esquemàtica de les sèries experimentals amb els paràmetres mesurats i els tractaments utilitzats

2. REACTIU BIOLÒGIC

L'estudi de l'artritis adjuvant s'ha portat a terme en rates albines de la soca Sprague-Dawley, el pes de les quals oscil.lava entre 160 i 230 g a l'inici de l'estudi. La majoria dels animals estudiats eren femelles si bé es van utilitzar mascles en dues de les sèries.

Els animals es van mantenir amb aigua i menjar "ad libitum" durant tot l'estudi. La dieta subministrada va ser la UAR-A-04 per a rata-ratolí, elaborada d'acord amb les normes del "National Research Council" i del "Bureau National d'Alimentation" i composta de proteïnes (17 %), lípids (3 %), cel.lulosa (5 %), minerals (5 %), glúcids (58 %) i humitat (12 %).

Els animals estaven disposats en gàbies de material plàstic (50 × 25 × 15 cm), en grups de 8 a 10, excepte en el cas de les sèries X i XI on les rates estaven separades entre si per a l'estudi de l'activitat motora i disposades en gàbies individuals (25 × 25 × 15 cm).

L'estabulari es va mantenir a temperatura constant (20 - 24 °C) amb períodes de llum-fosc de 12 hores.

En aquest treball també s'han utilitzat ratolins de la soca CD-1 FFB els quals van ser sacrificats per tal d'obte nir sèrum i a partir d'aquest la fracció globulínica. Ambdós productes van ser necessaris en la detecció d'anticossos anti immunoglobulines.

3. INDUCCIÓ DE L'ARTRITIS ADJUVANT

La inducció s'ha realitzat mitjançant l'administració, via subplantar de 0.1 ml d'una emulsió al 0.5 % de Mycobacterium butyricum (Difco Laboratories, Detroit) a l'extremitat posterior dreta de l'animal.

L'emulsió es preparava el mateix dia de la inducció a partir de 100 mg de M. butyricum, termoinactivat i liofilitzat: s'homogeneitzava primer amb 0.5 ml de sèrum fisiològic (homogeneitzador Anderman & col., L.T.D., Londres) i després s'afegien 19.5 ml de vaselina líquida. Al grup control es van injectar 0.1 ml de vaselina líquida en les mateixes condicions.

A les poques hores de la inducció, l'extremitat injectada presentava ja una marcada inflor que corresponia a la inflamació aguda i local, a causa de l'adjuvant administrat. Després de 10 - 14 dies es podien observar 2, 3 o 4 extremitats inflades i fins i tot la cua. Aleshores consideràvem la patologia establerta.

La valoració de la inflamació sistèmica s'ha portat a terme mitjançant la mesura del volum de l'extremitat contralateral, realitzada amb un pletismòmetre de mercuri Ugo Basile (Milan) amb una cubeta de 3.5 cm de diàmetre. Les dades obtingudes es referien sempre al dia 0 o dia de la inducció, com a increment de volum.

El dia 14 es va establir un criteri per seleccionar els animals que havien desenrotllat artritis dels que encara no ho havien fet. Així es va considerar que un animal era artrític quan complia

$$\Delta V > m(\Delta V)_c + 2s$$

sent ΔV = increment de volum de l'extremitat contralateral del possible animal artrític,
 $m(\Delta V)_c$ = mitjana dels increments de volum de l'extremitat esquerra del grup control,
 s = desviació estàndard de la mitjana $m(\Delta V)_c$.

Els animals que no superaven aquest criteri eren descartats de l'estudi.

3.1. INCIDÈNCIA DE LA PATOLOGIA

La incidència de l'artritis adjuvant el dia 14, en els diferents experiments realitzats amb femelles, ha variat entre un 66 i un 100 %, amb una mitjana del 80 %. A la taula VII es poden observar aquests resultats per a les diferents sèries estudiades.

A la mateixa taula es pot veure la incidència observada en animals mascles ($m = 65.3$ %). Aquest valor és més petit que el trobat en femelles, sobretot tenint en compte que per a la sèrie V es van obtenir al mateix temps un 86.6 % de femelles artrítiques i un 64 % de mascles artrítics.

Com es pot veure a la mateixa taula, el desenvolupament de l'artritis al llarg de l'any no està afavorit en cap època en especial.

TAULA VII: Incidència de l'artritis adjuvant.

	SÈRIE	DATA D'INDUCCIÓ	ANIMALS INDUÏTS	INCIDÈNCIA (%)
FEMELLES	I	gener	10	100.0
	II	abril	94	66.0
	III	febrer	111	71.1
	IV	juny	75	74.6
	V	novembre	15	86.6
			m	79.66
			e	6.112
MASCLES	V	novembre	14	64.0
	VI	juny	18	66.6
			m	65.30
			e	1.300

4. RECOLLIDA DE MOSTRES

A més de les mesures de pes i de volum de les extremitats realitzades cada setmana, un grup d'animals que incloïa controls, artrítics i, si era el cas, tractats, era sacrificat per a obtenir mostres de sang i d'òrgans. Els animals eren anestesiats mitjançant inhalació d'èter, se'ls practicava una toracotomia des de l'apèndix xifoides fins al coll de manera que quedés exposat el cor; aleshores es separava el pericardi i es punxava a l'àpex (agulla 25/11). S'extreien de 4 a 6 ml de sang.

La sang es centrifugava a 1,500 g durant 15 minuts (centrífuga Beckman TJ-6). El sèrum obtingut es distribuïa en dues parts, una per a la determinació immediata de grups sulfhidril i l'altra es congelava en alíquotes a -20°C fins al moment de la seva utilització.

Immediatament després de la presa de mostres de sang, s'exposaven, dissecaven i pesaven el fetge, la melsa, el timus, els ronyons i les glàndules adrenals.

5. TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES

5.1. EXPRESSIÓ DELS RESULTATS

Els resultats dels diferents paràmetres estudiats s'han agrupat en mitjanes, com a índex del grau de dispersió s'ha utilitzat l'error estàndard. Només en el cas de la tècnica d'aglutinació del làtex, les dades obtingudes són no paramètriques i no es pot realitzar el càlcul de les mitjanes ni el dels índex del grau de dispersió.

5.2. CRITERI DE DIXON

Sota certes condicions es pot prescindir de valors extremadament alts o baixos dintre d'una sèrie de valors de variabilitat moderada. Un dels criteris per eliminar aquestes dades és el de Dixon que consisteix en l'ordenament per ordre creixent de totes les dades, sent la dada excepcional un dels dos extrems. A continuació es calcula D:

$$D = \frac{x_e - x_1}{x_e - x_2}$$

on x_e és la dada excepcional, x_1 és la que li és més propera i x_2 la més llunyana. El valor obtingut és compara, tenint present el nombre d'elements de la mostra, en unes taules. Si el valor tabulat és més petit que l'obtingut es rebutja la dada i si no s'accepta com a bona (Neave, 1983). En aquest treball s'ha emprat un nivell de probabilitat del 95 %.

5.3. ANÀLISI DE LA VARIANÇA DE MODELS LINEALS

Les anàlisis estadístiques s'han portat a terme mitjançant l'anàlisi de la varianza d'un model lineal (Guttman, 1982) en el qual per cada paràmetre estudiat es tenen en comp

te tota una sèrie de causes de variació. Els càlculs s'han fet amb un microordinador Sharp MZ - 80 B amb un programa dissenyat pel Dr. Antoni Díez Noguera, membre del nostre Departament.

A continuació es definiran els diferents termes que s'utilitzaran per tractar cada un dels models lineals utilitzats.

1. Es considerarà que el valor de cada determinació experimental és funció d'una sèrie de "factors". Així, el valor de cada paràmetre mesurat en l'evolució de l'artritis depèn de tots els factors que intervenen en la determinació d'aquest paràmetre. Del conjunt d'aquests factors n'hi ha una part que es pot determinar (per exemple el dia de l'estudi, si la rata és o no artrítica,...), però també n'hi ha una part que no es pot determinar i, per tant, aquests factors no són considerats. Es tenen, doncs, dues situacions:

- La situació real, que no es pot conèixer totalment (part determinista i no determinista),

- La situació que es considera i que inclou els factors que d'una manera o altra l'experimentador pot controlar i quantificar (part determinista).

2. A partir dels factors es defineixen les "variants" com les diferents opcions possibles de cada factor. Segons això es tenen dos tipus de factors:

- Quantitatius: són els que poden prendre diferents valors numèrics. És el cas del temps, per exemple. Es consideren com a factors amb una sola variant que pot prendre molts valors diferents.

- Qualitatius: són factors del tipus "tot o res", com per exemple el fet que un animal sigui artrític o control. Són factors que no prenen valors numèrics; tenen un nombre co

negut d'opcions, en general bastant reduït. Els factors qualitius solen generar més d'una variant.

En els models lineals, quant es parli d'aquestes variants, es representaran mitjançant la lletra Z amb un número.

3.- Les variants poden intervenir en el valor de la resposta observada per elles mateixes o bé interactuant amb altres. Així, per exemple, és possible que el tractament amb una determinada substància tingui només efecte després d'un temps determinat i afecti només les rates artrítiques. Aquest és un cas d'interacció. Són "variables" totes les variants i interaccions entre variants que tenen efecte sobre la resposta obtinguda.

Les variables es representen mitjançant la lletra X amb un número.

Un exemple podria ser el següent:

Un factor de variació en cada paràmetre estudiat és la inducció de l'artritis. Aquest factor té dues variants: que l'animal sigui control o sigui artrític (Z(1), Z(2)). La diferència en la resposta obtinguda entre els dos estats ve definida per una variable: $X(1) = Z(2) - Z(1)$.

D'aquesta manera es pot aconseguir una equació lineal que relacioni totes les variables amb efecte sobre la resposta objecte de l'anàlisi. Aquesta equació és del tipus:

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_px_p + \epsilon$$

on "y" és la resposta observada,

$x_1 \dots x_p$ són les variables que influeixen en la resposta,

$b_1 \dots b_p$ són les estimacions dels paràmetres de la re

gressió. Aquestes estimacions indiquen com afecta la variable corresponent a la resposta observada,

ϵ és l'error de la regressió, i inclou tots els factors no determinats en el model.

Per a la totalitat de respostes observades es tindran tantes equacions com nombre d'observacions. En cada equació els valors de les "b" coincidiran amb els de les altres equacions. El sistema es pot reduir a una equació on els termes són matrius:

$$Y = XB + E$$

Y és un vector amb "n" components, sent "n" el nombre de respostes observades,

X és una matriu de "n" files i "p" columnes construïda a partir de les variables independents (les variables del model),

B és un vector de "p" components format per les estimacions dels paràmetres de la regressió,

E és un vector de "n" components que són els errors de la regressió.

L'obtenció dels valors de les "b" es fa pel mètode dels mínims quadrats. La fórmula que s'empra per fer-ho és:

$$B = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad (\text{Jackson, 1984})$$

Amb el superíndex "-1" s'indica la inversa d'una matriu i amb el superíndex "T" s'indica la matriu transposada.

Un cop obtingudes les estimacions "b", el programa inicia una recerca de les variables que influeixen de forma significativa en la definició del model. Per fer això, primerament s'agrupen les variables en conjunts d'una, dues o més,

que s'anomenaran "causes de variació". Normalment cada causa de variació correspon a un factor o a alguna interacció entre ells. A partir d'aquí, i de forma automàtica, s'estudia la contribució de cada causa en el model, eliminant-se aquelles que no siguin significatives en aplicar la prova F d'Snedecor. Realitzant aquesta operació tants cops com calgui s'obté finalment un nombre de causes amb les estimacions dels paràmetres (b) corresponents, que permeten definir el model lineal definitiu. Aquest procediment de selecció correspon al mètode "backward" d'entre els molts que s'han descrit amb aquest fi. S'ha utilitzat aquest mètode ja que és força conservador, és a dir, que respecte als altres és més exigent a l'hora de triar les variables com a significatives.

El coneixement del vector de paràmetres B permet les prediccions de possibles situacions experimentals a partir del model lineal, simplement substituint els valors $X(1) \dots \dots X(p)$ pels corresponents a la situació (real o imaginària) que es vol estimar. De forma una mica més complexa, també s'obtenen els límits fiducials de l'estimació corresponent. En aquest cas, els límits s'han calculat per a una probabilitat del 95 %.

Finalment, el model lineal calculat permet avaluar el grau de certesa de les hipòtesis lineals que interressi estudiar. En aquest treball, sempre s'han plantejat hipòtesis nul·les de la següent manera:

Es tracta de definir un vector de coeficients $H' = h_1, h_2, h_3 \dots$, de manera que en multiplicar-lo pel vector de paràmetres doni zero, únicament si es compleix la hipòtesi que es vol provar. En termes algebraics serà:

$$H_0: H' \cdot B = 0$$

Deseñvolupant aquesta expressió es té:

$$H_0: b_1 h_1 + b_2 h_2 + b_3 h_3 + \dots + b_p h_p = 0 \quad (a)$$

Suposant que b_2 i b_3 fossin els paràmetres corresponents als efectes de dos tractaments diferents, la manera de plantejar H' per tal de veure si els efectes són diferents seria:

$$H' = (0, 1, -1, 0, \dots, 0)$$

D'aquesta manera l'expressió (a) valdrà zero únicament en el cas de que b_2 sigui exactament igual que b_3 . El rebuig o l'acceptació de la hipòtesi es fa aplicant una prova F d'Snedecor, plantejada amb la fórmula:

$$F = \frac{(H^T B)^T (H^T (X^T X)^{-1} H)^{-1} (H^T B)}{S^2}$$

on B és el vector de paràmetres,

H és el vector de la hipòtesi,

X és la matriu de disseny del model,

S^2 és l'estimació de l'error residual, que es cal

$$\text{cula: } S^2 = Y^T Y - B^T X^T Y$$

on Y és el vector de respostes.

La hipòtesi H_0 es rebutja a un nivell de risc $\alpha = 0.05$ si:

$$F > F(1, n-p, 0.05)$$

5.3.1. Descripció dels models inicials

S'han estudiat diferents paràmetres al llarg de la patologia artrítica així com la influència de certs tractaments. Els factors considerats, a més d'incloure la situació de l'a-

nimal (artrític o control, dia de l'estudi,...) engloben tots els paràmetres estudiats excepte un que es considera com a resposta (variant Z = (0)). D'aquesta manera els factors dissenyats i les variants (Z) conseqüents són els que segueixen:

<u>Factors</u>	<u>Definició</u> (corresponent a les sèries I - VII)
Resposta	Pes de l'animal Z(0)
1	Sèrie experimental Z(1)
2	Control/Artritis. Aquest factor genera dues variants: <ul style="list-style-type: none"> - Control Z(2) - Artritis Z(3)
3	Temps que correspon a l'estudi Z(4)
4	Tipus de tractament. Aquest factor genera sis variants: <ul style="list-style-type: none"> - Benoxaprofè Z(5) - SOD de fetge boví Z(6) - SOD d'eritròcits bovins Z(7) - Indometacina a dosi 1 mg/kg/dia Z(8) - Indometacina a dosi 3 mg/kg/dia Z(9) - Ingesta reduïda Z(10)
5	Número de rata a l'experiment Z(11)
6	Increment de pes Z(12)
7	Increment de volum de l'extremitat ipsilateral Z(13)
8	Increment de volum de l'extremitat contralateral Z(14)
9	Albúmina Z(15)
10	Alfa-globulines Z(16)
11	Beta-globulines Z(17)
12	Gamma-globulines Z(18)
13	Quocient albúmina/globulines Z(19)
14	Proteïnes totals Z(20)
15	Grups sulfhidril Z(21)

- 16 Títol de làtex Z(22)
- 17 Pes del fetge Z(23)
- 18 Antiimmunoglobulines Z(24)
- 19 Antiimmunoglobulines IgG Z(25)
- 20 Pes de la melsa Z(26)
- 21 Pes del timus Z(27)
- 22 Pes del ronyó Z(28)
- 23 Pes de les glàndules adrenals Z(29)
- 24 IgG Z(30)
- 25 Activitat complementària total Z(31)
- 26 Sexe de l'animal estudiat. Aquest factor genera dues variants:
- Femelles Z(32)
 - Mascles Z(33)
- 27 Constant. Conté tota la variació residual a causa dels factors que no es consideren i de l'atzar Z(34)

<u>Factors</u>	<u>Definició</u> (corresponent a les sèries VIII i IX)
----------------	--

- | | |
|----------|---|
| Resposta | Amplitud Z(0) |
| 1 | Animal estudiat. Aquest factor genera dotze variants: <ul style="list-style-type: none"> - Z(1), Z(2), Z(3), animals control de la sèrie VIII - Z(4), Z(5), Z(6), animals artrítics de la sèrie IX - Z(7), Z(8), Z(9), animals control de la sèrie VIII - Z(10), Z(11), Z(12), animals artrítics de la sèrie IX |
| 2 | Acrofase Z(13) |
| 3 | Contingut de potència de l'harmònic circadiari Z(14) |
| 4 | Activitat motora per unitat de temps Z(15) |

- 5 Control/Artritis. Aquest factor genera dues variants:
- Control Z(16)
 - Artritis Z(17)
- 6 Temps que correspon a l'estudi Z(18)
- 7 Pes de l'animal Z(19)
- 8 Increment de volum de l'extremitat ipsilateral Z(20)
- 9 Increment de volum de l'extremitat contralateral Z(21)
- 10 Constant. Conté tota la variació residual a causa dels factors que no es consideren i de l'atzar Z(22)
-

A partir d'aquí s'ha dissenyat la matriu del model considerant les possibles interaccions que podien afectar cada paràmetre. Aquestes interaccions, juntament amb les variants que es consideren individualment, són les variables del model que s'assaja. Les variables es representen mitjançant la lletra X. Per a cada sèrie experimental s'ha dissenyat una matriu diferent ja que algunes condicions (tractament, temps,...) variaven d'un experiment a l'altre. A continuació es detalla la matriu del model considerada en cada sèrie.

<u>Variable</u>	<u>Definició</u> (corresponent a les sèries I i VIII)
X(1)	Constant Z(34)
X(2)	Temps de la determinació Z(4)
X(3)	Diferència entre l'estat artrític i l'estat control $Z(3) - Z(2)$
X(4)	Interacció entre l'estat artrític o control i el temps $X(2) Z(4)$

<u>Variable</u>	<u>Definició</u> (corresponent a la sèrie II)
X(1)	Constant Z(34)
X(2)	Diferència entre l'estat artrític i l'estat control Z(3) - Z(2)
X(3)	Tractament amb benoxaprofè Z(5)
X(4)	Temps de la determinació Z(4)
X(5)	Interacció entre l'estat artrític o control i el temps X(2) Z(4)
X(6)	Interacció entre el tractament amb benoxaprofè i el temps Z(5) Z(4)

<u>Variable</u>	<u>Definició</u> (corresponent a la sèrie III)
X(1)	Constant Z(34)
X(2)	Temps de la determinació Z(4)
X(3)	Diferència entre l'estat artrític i l'estat control Z(3) - Z(2)
X(4)	Interacció entre l'estat artrític o control i el temps X(3) Z(4)
X(5)	Tractament amb benoxaprofè Z(5)
X(6)	Tractament amb SOD de fetge boví Z(6)
X(7)	Tractament amb SOD d'eritròcits bovins Z(7)
X(8)	Interacció entre el tractament amb SOD de fetge boví i l'estat artrític o control Z(6) X(3)
X(9)	Interacció entre el tractament amb SOD de fetge boví i l'estat artrític o control Z(6) X(3)
X(10)	Interacció entre el tractament amb SOD d'eritròcits bovins i l'estat artrític o control Z(7) X(3)

<u>Variable</u>	<u>Definició</u> (corresponent a la sèrie IV)
X(1)	Constant Z(34)
X(2)	Diferència entre femelles i mascles Z(32) - Z(33)
X(3)	Efecte de la ingesta reduïda Z(10)
X(4)	Diferència entre l'estat artrític i l'estat control Z(3) - Z(2)
X(5)	Interacció entre l'estat artrític o control i el sexe X(4) X(2)

<u>Variable</u>	<u>Definició</u> (corresponent a la sèrie V)
X(1)	Constant Z(34)
X(2)	Temps de la determinació Z(4)
X(3)	Diferència entre l'estat artrític i l'estat control Z(3) - Z(2)
X(4)	Interacció entre l'estat artrític o control i el temps X(3) Z(4)
X(5)	Tractament amb benoxaprofè Z(5)
X(6)	Interacció entre el tractament amb benoxaprofè i el temps Z(5) Z(4)

<u>Variable</u>	<u>Definició</u> (corresponent a les sèries VIII i IX)
X(1)	Constant Z(22)
X(2)	Diferència entre l'estat artrític i l'estat control Z(17) - Z(16)
X(3)	Temps de la determinació Z(18)
X(4)	Interacció entre l'estat artrític o control i el temps X(2) Z(18)

Amb aquestes variables el programa de l'ordinador fa una primera anàlisi on les considera conjuntament i dona els valors estimats "b" que són els coeficients de l'equació general. Seguidament es mostren alguns dels resultats tal com surten de l'ordinador (corresponents a l'estudi del paràmetre "albúmina" de la sèrie III):

ANAMOLI v.C.15.5

Arxius: SERIE H CONT., SERIE H ARTR.,

Origen:

Y + Z(15)
 X(1) + Z(14)
 X(2) + Z(4)
 X(3) + Z(3)-Z(2)
 X(4) + Z(4)*X(3)
 X(5) + Z(5)
 X(6) + Z(6)
 X(7) + Z(7)
 X(8) + Z(5)*X(3)
 X(9) + Z(6)*X(3)
 X(10) + Z(7)*X(3)
 # DE RESTRICCIONS= 1
 0 < Z(-15) < 0

Mitjana d'Y = 46.69586466165414

ANALISI DE LA VARIANCA

Causa	g.l.	S.Q.	Variància	F	R2 (% total)
SO(Y)	133	306414,7885			
SO(ba)	1	290007,0022744361			
SO(Y ba)	132	16407,7862255639			
SO(error)	123	6022,1243571395	48,96036062715041		
SO(R)	10	300392,6641428605	30039,26641428605	613,542588933222	98,0346495720328
SO(R ba)	9	10385,6618684244	1153,96242982493	23,5693204674948	63,2971549339373

t(p=0,05 | v= 123) = 1,977434607977274

ANALISI DE LES VARIABLES

#	Mitjana d'Y	Estimació de b	Error típic de b	Limits fiduc.	r(y+x)
b(1)	1	42.13336278840135	1,943068609325068	45,97954003937366 38,29718553742904	0
b(2)	24,57894736842105	0,1477267741584216	0,06503360091150769	0,2764565344840423 0,0189970138323009	-0,1107282401856296
b(3)	-0,02255639097744361	-14,52068010571917	1,94306860932507	-10,67450285474685 -18,36685735669149	-0,744200489612594
b(4)	1,747368421052632	0,1998322134095626	0,06503360091150775	0,3285619737261834 0,0711024530749418	-0,64063654313816
b(5)	0,112781954887218	5,042767311414398	2,010425283118894	9,022273193572446 1,06326242925635	0,1050570458225546
b(6)	0,0977443609022556	-2,418605998109553	2,133497967080469	1,805113713978686 -6,641125710197792	-0,0922653631829681
b(7)	0,1052631378947368	-1,220208379061991	2,091643710393886	2,960259222759839 -5,340685980893871	-0,0457085245727746
b(8)	0,0075187969924812	5,676310767164201	2,010425283118891	9,657816149322243 1,698805385006159	-0,1332840673898779
b(9)	-0,0075187969924812	0,383251240354719	2,133497967080469	4,606370955442958 -7,83986846873352	-0,271498617507299
b(10)	-0,01503759399496241	1,92212929097383	2,081643710393886	6,04259789280571 -2,19835731085605	-0,234455765230855

"Y" és la resposta observada o paràmetre mesurat, que pot ser $Z(0)$, $Z(12)$, ... fins a $Z(31)$. Les variables contribuïran en part, o no contribuïran en cada resposta observada. En aquesta primera anàlisi s'observen variables que no influeixen significativament en el model general, ja que l'interval dels límits fiducials que dóna per a les estimacions "b" conté el valor zero. Amb aquesta informació encara no es poden treure conclusions.

5.3.2. Descripció dels models finals

Després de l'estudi de les variables, s'han de considerar les causes de la variació. En el nostre cas i per a totes les sèries experimentals han coincidit les causes amb les variables.

Amb el model inicial, el programa de l'ordinador fa successives anàlisis de la significació de cada causa en el valor de cada paràmetre, aplicant el test estadístic de la F d'Snedecor. Comença amb el conjunt de totes les causes i s'obtenen uns nivells de significació per a cadascuna. La causa menys significativa és eliminada del model, i amb la resta es fa una nova anàlisi. Això es va fer fins que s'arriba a un model on totes les causes són significatives. Aquest és el model final.

Un cop obtingut el model final amb totes les causes significatives, es calculen les estimacions segons les diferents opcions que poden tenir les causes significatives en aquell estudi.

A continuació es mostra la tria del model final i el càlcul de les estimacions per al mateix exemple descrit a l'apartat 5.3.1. ("albúmina", sèrie III).

MODEL UNIDIAL:

- Causa # 1: X(1)
- Causa # 2: X(2)
- Causa # 3: X(3)
- Causa # 4: X(4)
- Causa # 5: X(5)
- Causa # 6: X(6)
- Causa # 7: X(7)
- Causa # 8: X(8)
- Causa # 9: X(9)
- Causa # 10: X(10)

Causas	g.l.	S. de quadrats	Variance	Contraet F	Significacio
Error	123	6022.124357137366	48.96036062714932		
Causa # 2	1	252.6314610701951	252.6314610701951	5.15991830603688	0.024851743382155
Causa # 3	1	2734.275382674692	2734.275382674692	55.8467165611213	0.00000000774941
Causa # 4	1	462.274569101726	462.274569101726	9.44181299280274	0.002612210801972
Causa # 5	1	308.039689849051	308.039689849051	6.2916139874247	0.013432802420941
Causa # 6	1	62.88902894746892	62.88902894746892	1.284488679043674	0.259270367786848
Causa # 7	1	16.8228594528253	16.8228594528253	0.343601624606841	0.55387175322494
Causa # 8	1	390.5773441108239	390.5773441108239	7.97741967395237	0.005527591754618
Causa # 9	1	1.579891586203082	1.579891586203082	0.0322687898121201	0.857334596132219
Causa # 10	1	41.74389194125239	41.74389194125239	0.852605891920345	0.357624008893202

cal treure la causa # 9 (p > 0.0055555555555555)

Error	124	6023.704248727606	48.57826007038392		
Causa # 2	1	252.8650949941205	252.8650949941205	5.20531395375759	0.024223275504233
Causa # 3	1	3004.466601220874	3004.466601220874	61.8479664950489	0.00000000001552
Causa # 4	1	469.9052034841602	469.9052034841602	9.67315837995926	0.00232029642253
Causa # 5	1	306.5784836437183	306.5784836437183	6.3110223214978	0.013283153038175
Causa # 6	1	66.0061214165736	66.0061214165736	1.358758451227748	0.245990050694014
Causa # 7	1	17.38868257713034	17.38868257713034	0.357951942946007	0.550737136567584
Causa # 8	1	394.2703608992409	394.2703608992409	8.11618942975709	0.005138168982426
Causa # 10	1	40.1861541567242	40.1861541567242	0.827245646478474	0.36483467996711

cal treure la causa # 7 (p > 0.00625)

Error	125	6041.092931301616	48.32874345041293		
Causa # 2	1	290.8113331963727	290.8113331963727	6.01735763096667	0.015344857541239
Causa # 3	1	3166.837269779373	3166.837269779373	65.5269937450094	0.00000000006202
Causa # 4	1	512.4563025192995	512.4563025192995	10.60355113608734	0.001452929014709
Causa # 5	1	344.6566465478719	344.6566465478719	7.13130439968509	0.00858140982042
Causa # 6	1	56.73848412448059	56.73848412448059	1.174011159274115	0.280664147135644
Causa # 8	1	402.6028451187491	402.6028451187491	8.33050512748866	0.004594174947902
Causa # 10	1	50.62428684696989	50.62428684696989	1.04749851191377	0.308060353926374

cal treure la causa # 10 (p > 0.00714285714285714)

Error	126	6091.717218147333	48.34696204878876		
Causa # 2	1	267.2008700461051	267.2008700461051	5.52673547050309	0.020280193396757
Causa # 3	1	3192.32662202406	3192.32662202406	66.0295184380476	0.00000000000353
Causa # 4	1	475.7017735726751	475.7017735726751	9.83933123021526	0.002126789279625
Causa # 5	1	340.4869431087282	340.4869431087282	7.04257162559941	0.008985139682657
Causa # 6	1	57.19784617487897	57.19784617487897	1.183070119631486	0.278808099313138
Causa # 8	1	368.9929833019414	368.9929833019414	7.63216551208201	0.006592524623423

cal treure la causa # 6 (p > 0.008333333333333333)

```

**Error**      127  6148.9150e4301191  48.41662904977473
Causa # 2      1      314.385716937108  314.385716937108  6.49333678861021  0.0010193e-1448255
Causa # 3      1      3342.172934259447  3342.172934259447  69.0294173362745  0.000000000411873
Causa # 4      1      524.2870923658548  524.2870923658548  10.82365188967412  0.0002932e-307513
Causa # 5      1      391.4756969351566  391.4756969351566  8.08558867921914  0.005201565213157
Causa # 8      1      376.5575446945422  376.5575446945422  7.77747840595474  0.006104590811633

```

cal treure la causa # 2 (p > 0,01)

```

**Error**      128  6463.300731259466  50.49453735358958
Causa # 3      1      3030.843828942494  3030.843828942494  60.0232022657931  0.000000000002515
Causa # 4      1      358.7549973448341  358.7549973448341  7.10482789123586  0.008678524516707
Causa # 5      1      297.8440732789502  297.8440732789502  5.89854049346542  0.016542528482427
Causa # 8      1      300.3318250589174  300.3318250589174  5.94780823430135  0.016106805731227

```

cal treure la causa # 5 (p > 0,0125)

```

**Error**      129  6731.144854538418  52.41197561657686
Causa # 3      1      2891.123374100607  2891.123374100607  55.1615034558286  0.000000000441123
Causa # 4      1      305.5374003907261  305.5374003907261  5.82953412452727  0.017132511191503
Causa # 8      1      327.4846052666424  327.4846052666424  6.24827821149839  0.013686314841888

```

cal treure la causa # 4 (p > 0,01666666666666667)

```

**Error**      130  7066.682254929322  54.35909426868709
Causa # 3      1      9049.625509965525  9049.625509965525  166.4785926203052  -0.000000000000001
Causa # 8      1      253.9080439849046  253.9080439849046  4.6709395621988  0.03250962886003

```

cal treure la causa # 8 (p > 0,025)

```

**Error**      131  7320.59029391405  55.83236869400038
Causa # 3      1      9087.195926649903  9087.195926649903  162.6129339006619  0.000000000841455

```

MODEL FINAL:

Causa # 1: X(1)

Causa # 3: X(3)

t(p=0,05 | v= 131)= 1.978234467845681

ANALISI DE LES VARIABLES

#	Mitjana d'X	Estimacio de b	Error tipic de b	Limites fiduc.	r(y-h)
b(1)	1	46.50936877828054	0.6483687779259267	47.79199424264839 45.22674331391269	0
b(3)	-0.02255639097744361	-8.267984162895928	0.6483687779259267	-6.985358699528076 -9.55060962726378	-0.744200489612594

ESTIMACIO corresponent a la poblacio per X... = 1 1
 #= 38.24139461538461 l.f.: 36.40713477740347 ~ 40.07563445336575

ESTIMACIO corresponent a la poblacio per X... = 1 -1
 #= 54.77735294117647 l.f.: 52.98402088624477 ~ 56.57068499610817

5.3.3. Hipòtesis

Sobre el model final també es poden realitzar hipòtesis. En general s'han plantejat com la diferència entre el grup artrític i el grup control. D'aquesta manera, d'un paràmetre influenciat a causa de la patologia, s'ha pogut expressar la diferència entre els dos grups amb un valor numèric i uns límits fiducials.

5.3.4. Correlacions

Amb el mateix programa de l'ordinador s'han pogut calcular les correlacions simples entre totes les variables. Els índex de correlació s'han considerat significatius si eren superiors als tabulats per a un nivell de probabilitat del 95 % (Neave, 1983).

El grau de correlació entre els títols de làtex i els altres paràmetres s'ha determinat mitjançant el coeficient de correlació d'Spearman.

5.4. COEFICIENT DE CORRELACIÓ D'SPEARMAN

Se suposen dos grups de N dades ordenats d'acord amb dues variables. S'ordenen independentment els dos conjunts de dades i s'assignen a cada element els números d'ordre de cada variable x_i i y_i . A cada element se li pot calcular la diferència entre la posició aconseguida amb una variable i amb l'altra fent:

$$d_i = x_i - y_i$$

tot seguit es calcula el coeficient r_s segons la fórmula:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N d_i^2}{N^3 - N}$$

En cas de trobar valors iguals en alguna de les classificacions es pren el valor mitjà per a cada un d'ells.

La significació estadística de la correlació es troba comparant el valor de r_s a les taules d'Spearman.

5.5. REGRESSIONS

L'estudi de les diferents corbes estàndard utilitzades i la interpolació dels resultats s'ha fet mitjançant un programa de l'ordinador Sharp MZ - 80 B.

Un cop entrats els resultats de la corba estàndard, l'ordinador analitza totes les possibles regressions i les imprimeix. Després de triar la més adient, s'interpolen tots els resultats amb el mateix programa.

6. DETERMINACIONS SOMATOMÈTRIQUES

6.1. CORBA PONDERAL TOTAL I D'ÒRGANS.

ESTUDI DE LA INGESTA

En totes les sèries realitzades es va seguir semanalment l'evolució del pes corporal de cada animal. Les determinacions es van realitzar amb una balança Sauter KM 1000. Els resultats s'han expressat com a percentatge d'increment de pes respecte al dia de la inducció.

També es va determinar el pes de fetge, melsa, timus, ronyons i glàndules adrenals en els animals sacrificats cada 7 dies. La mesura va ser pràcticament simultània al sacrifici i es va realitzar mitjançant una balança Sartorius mod. 1219 MP (0.001 g).

A la sèrie experimental V es va estudiar la quantitat d'aliment ingerida pels animals artrítics comparativament amb la ingerida pel grup control. La determinació es va fer gàbia per gàbia. A l'inici de l'estudi es va posar a cada gàbia una quantitat fixa d'aliment. Aquesta quantitat es va calcular segons unes taules on figurava la mitjana d'ingesta d'una rata d'un pes determinat. La mitjana es va multiplicar pel nombre de rates de la gàbia i per 3 dies, i es va posar un excés d'aliment per assegurar-se que no els en mancava. Després de 3 dies es determinava el pes dels animals de cada gàbia i al mateix temps es mesurava la quantitat d'aliment que romania al menjador. La diferència entre la quantitat d'aliment inicial i la final es referia aleshores al pes total dels animals de la gàbia. Els resultats s'han expressat com a grams d'aliment ingerits per quilograms d'animal i dia.

A la mateixa sèrie V, un cop establerta la quantitat d'aliment ingerit pels animals artrítics i per tal d'estudiar la influència de la ingesta en els paràmetres mesurats, es va donar la mateixa quantitat d'aliment a un grup control.

6.1.1. Resultats

A l'inici de l'estudi el pes de tots els animals emprats va oscil·lar entre 160 i 230 g. A la figura 11 es pot observar l'evolució de l'increment de pes en els animals artrítics i control estudiats a la sèrie experimental I. En aquesta sèrie i sobre els mateixos animals es van realitzar determinacions 3 vegades a la setmana (dilluns, dimecres i divendres) durant un període de 60 dies. A la taula XII es mostra la mitjana i l'error estàndard corresponents a cada dia de mesura.

L'increment de pes mesurat en els animals artrítics és més baix que el corresponent als animals control. Aplicant l'anàlisi de la variança de models lineals a aquests valors s'observa una diferència significativa entre els resultats obtinguts en el grup artrític i els del grup control ($p < 10^{-9}$). Aquesta diferència està estimada, el dia 14, en 19.15 amb uns límits fiducials de 21.57 i 16.73. L'increment de pes deixa de ser significativament diferent el dia 51 de la mesura.

A les taules XIII - XVIII es resumeixen els valors d'increment de pes de cada sèrie estudiada. En tots els experiments, es van observar diferències significatives entre els valors determinats en el grup artrític i en el grup control un cop establerta la patologia (dia 14) i durant tot el període estudiat. Aquestes diferències van oscil·lar entre 12.45 (17.07 i 7.83), observada a la sèrie IV, i 27.19 (34.02 i 20.34) a la sèrie V ($p < 10^{-6}$ en tots els casos).

A la sèrie VII es pot observar com l'increment de pes es va reduint progressivament els primers 14 dies de la inducció. En els animals artrítics d'aquesta sèrie la diferència el dia 3 és de 1.49 (límits fiducials de 2.24 i 0.73) i el dia 13 és de 6.94 (límits fiducials de 10.47 i 3.40) ($p < 10^{-3}$).

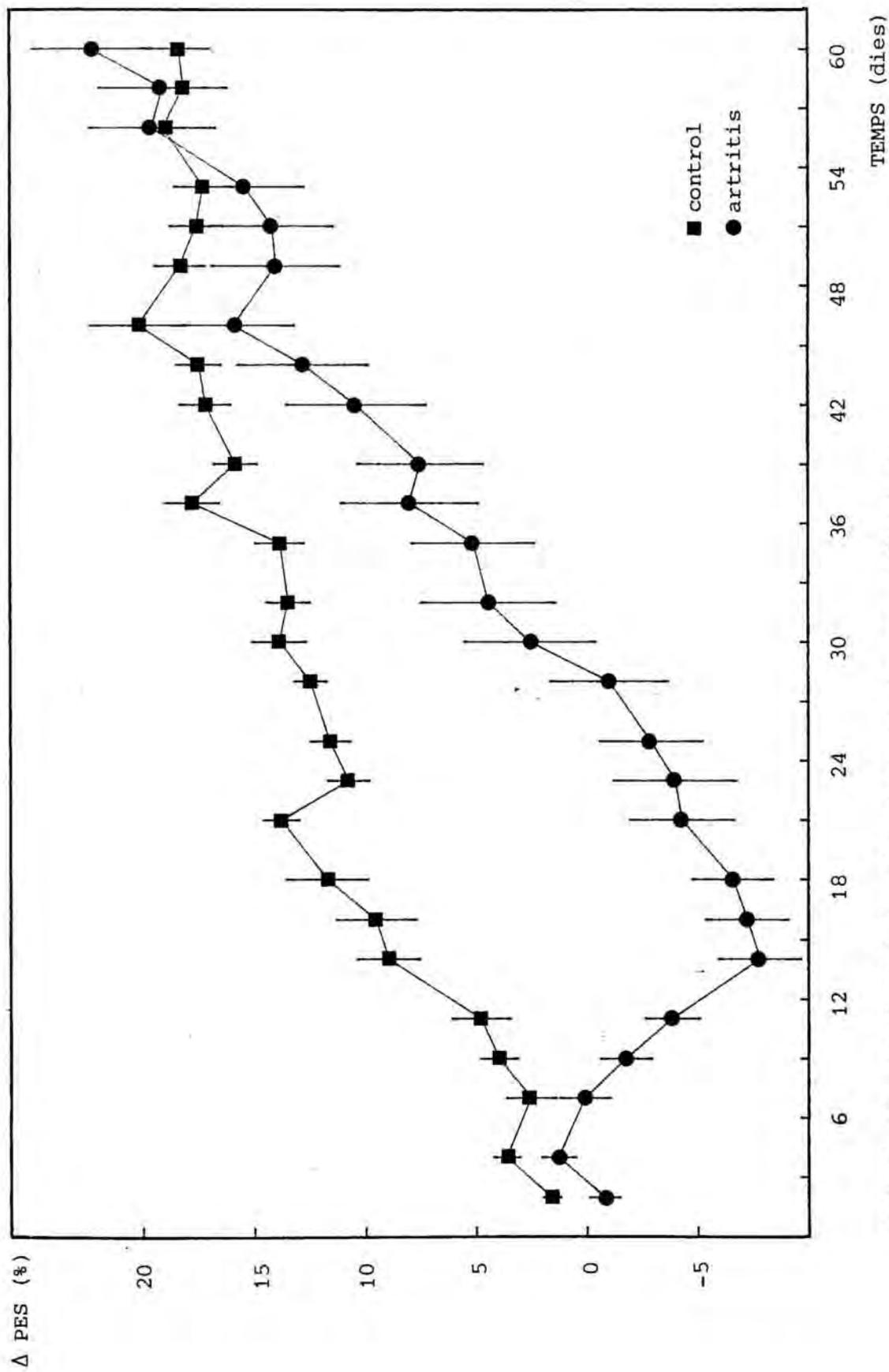


FIGURA 11: Evolució de l'increment de pes (SÈRIE I)

Pel que fa al pes d'òrgans, a la figura 12 es troben representats els valors corresponents al pes de fetge, melsa, timus i ronyons, estudiats a la sèrie III. Els resultats corresponents es troben a la taula VIII. A la sèrie V també es va determinar el pes del fetge a més del de les glàndules adrenals, i a la sèrie VII, que és un estudi durant els primers 14 dies de la inducció, es van mesurar els percentatges de pes corresponents a la melsa i al timus. A les taules IX i X es troben resumits els valors corresponents a aquestes dues sèries.

L'estudi dels resultats del pes del fetge a través de l'anàlisi de la varianza de models lineals no mostra diferències significatives entre els grups estudiats a les sèries III i IV.

A la sèrie III s'ha observat que el pes de la melsa està significativament augmentat en el grup artrític ($p < 10^{-15}$) i s'ha estimat que la diferència entre els dos grups considerats és de 0.1701, amb uns límits fiducials de 0.1377 i 0.2023. Anàlogament, a la sèrie VII s'ha trobat que el pes de la melsa està augmentat en els animals als quals s'havia induït l'artritis i aquest increment és ja significatiu el dia 3 de la inducció ($p < 10^{-4}$). Les diferències estimades entre el grup control i el grup preartrític donen idea de l'augment progressiu del pes de la melsa en aquest últim grup:

	<u>estimacions</u>	<u>límits fiducials</u>
dia 3	0.0342	(0.0196 - 0.0488)
dia 6	0.0684	(0.0391 - 0.0976)
dia 9	0.1025	(0.0587 - 0.1464)
dia 13	0.1481	(0.0848 - 0.2114)

Pel que fa al pes del timus, al contrari de la melsa, el seu valor està significativament reduït en els animals ar-

trítics ($p < 10^{-3}$). La disminució d'aquest resultat entre els dos grups estudiats s'ha estimat en 0.0282, amb uns límits fiducials de 0.0437 i 0.0127. L'estudi previ al dia 14, mostra que aquesta reducció ja es manifesta el dia 3 i va augmentant progressivament. El nivell de significació en aquest estudi previ és de $p < 0.05$ i les estimacions del decrement durant els dies 3, 6, 9 i 13 són, respectivament 0.0083 (0.0162 i 0.0004), 0.0166 (0.0324 i 0.0007), 0.0248 (0.0487 i 0.0011) i 0.0359 (0.0703 i 0.0015).

El pes dels ronyons, quantificat únicament a la sèrie III, s'ha trobat significativament augmentat en el grup artrític ($p < 10^{-8}$), i s'ha estimat que l'increment és de 0.1345, amb uns límits fiducials de 0.1078 i 0.1612. De la mateixa manera, el pes relatiu de les glàndules adrenals determinat a la sèrie IV, està significativament elevat en els animals artrítics ($p < 10^{-5}$), increment que s'ha estimat en 0.01176 (0.00727 - 0.01624).

Dels pesos d'òrgans considerats a la sèrie III, s'ha trobat correlació lineal entre el pes de fetge i el de melsa ($r = 0.4628$, $p < 0.01$) així com entre el pes de fetge i el de ronyons ($r = 0.3080$, $p < 0.01$). Així mateix s'ha observat que el pes de melsa es correlaciona amb el pes de timus, tant en la sèrie III com en la VII ($r = -0.3045$, $p < 0.01$; i $r = -0.4540$, $p < 0.05$, respectivament) i amb el pes de ronyons ($r = 0.5705$, $p < 0.01$). Per últim s'ha vist que el pes de timus i el de ronyons es correlacionen linealment amb un coeficient de -0.2502 ($p < 0.05$).

A la taula XI s'han resumit els resultats corresponents a la quantitat d'aliment ingerida pel grup artrític i el grup control durant 21 dies. L'estudi estadístic mitjançant la t d'Student mostra una reducció significativa de la ingesta del grup artrític ($p < 0.05$) tant en els mascles com en les femelles.

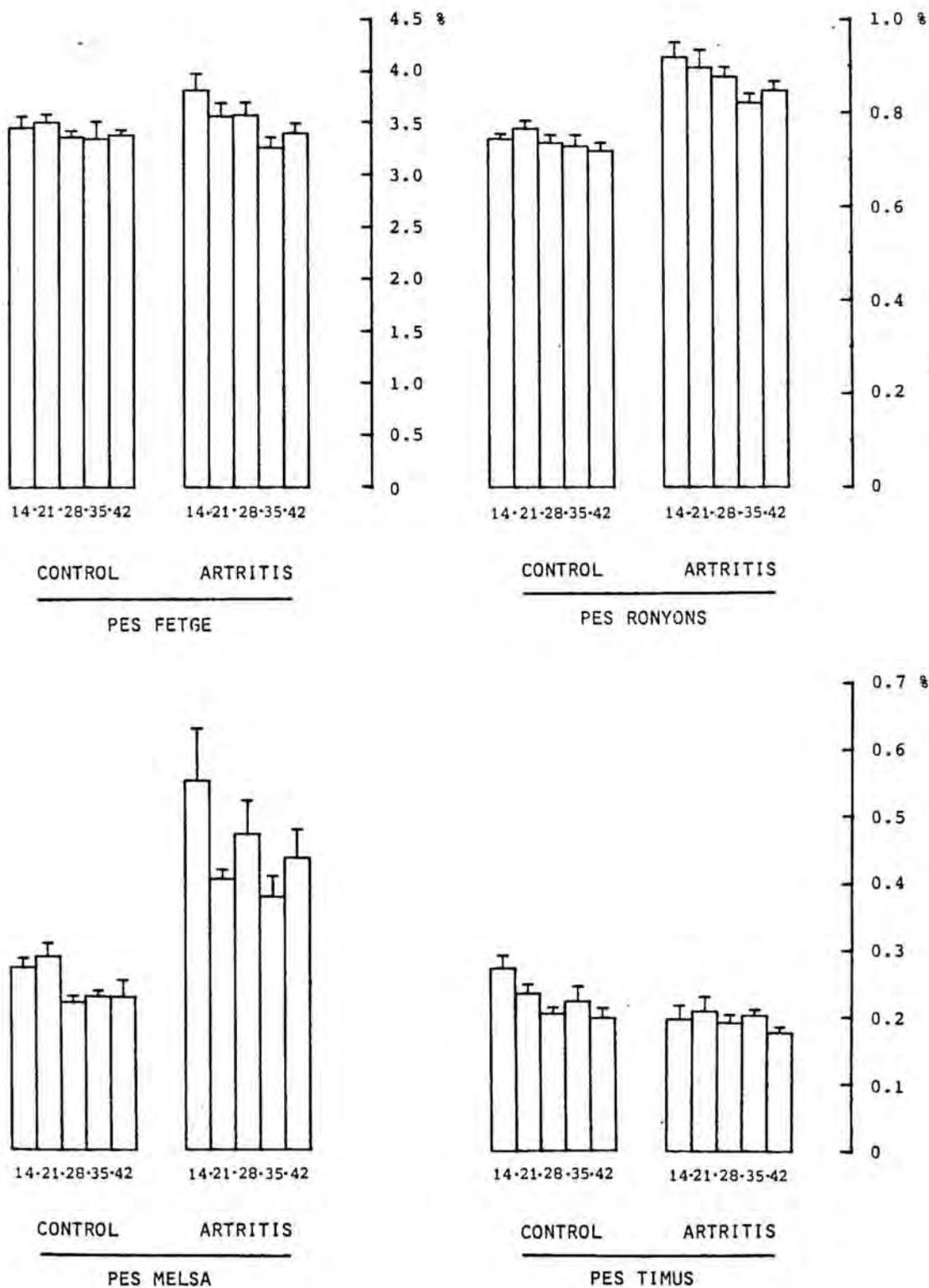


FIGURA 12: Evolució del pes dels òrgans (SÈRIE III)

TAULA VIII: Evolució del pes del fetge, de la melsa, del timus i dels ronyons (SÈRIE III)

DIA	PES FETGE		PES MELSA		PES TIMUS		PES RONYONS	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
0	3.956 0.1018 8	- - -	0.3041 0.0494 8	- - -	0.3275 0.0125 8	- - -	0.7813 0.0195 8	- - -
14	3.448 0.1094 8	3.803 0.1618 7	0.2712 0.0135 8	0.5480 0.0782 8	0.2723 0.0189 8	0.1960 0.0210 8	0.7426 0.0113 8	0.9180 0.0316 8
21	3.495 0.0800 8	3.554 0.1271 8	0.2877 0.0193 8	0.4025 0.0139 8	0.2342 0.0137 8	0.2077 0.0217 8	0.7650 0.0174 8	0.8960 0.0384 8
28	3.354 0.0614 8	3.564 0.1220 8	0.2188 0.0095 8	0.4690 0.0504 8	0.2032 0.0101 8	0.1910 0.0120 8	0.7341 0.0174 8	0.8760 0.0204 8
35	3.338 0.1629 8	3.254 0.1006 12	0.2279 0.0087 8	0.3757 0.0310 12	0.2220 0.0227 8	0.2022 0.0102 12	0.7271 0.0247 8	0.8205 0.0239 12
42	3.370 0.0520 8	3.393 0.0945 13	0.2268 0.0252 8	0.4331 0.0428 13	0.1963 0.0152 8	0.1764 0.0104 13	0.7163 0.0183 8	0.8466 0.0244 13

TAULA IX: Evolució del pes del fetge i de les glàndules suprarenals (SÈRIE IV)

DIA	PES FETGE		PES ADRENALS		
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	
14	m e n	5.418 0.1770 8	5.866 0.3421 7	0.0170 0.0037 4	0.0245 0.0040 4
21	m e n	5.845 0.2800 6	5.467 0.1267 6	0.0210 0.0009 3	0.0273 0.0036 4
28	m e n	6.420 0.1703 8	6.269 0.3322 7	0.0193 0.0012 4	0.0333 0.0035 4

TAULA X: Evolució del pes de la melsa i del timus (SÈRIE VII)

DIA		PES MELSA		PES TIMUS	
		CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
0	m	0.3054	-	0.1982	-
	e	0.0190	-	0.0083	-
	n	8	-	8	-
3	m	-	0.3286	-	0.1851
	e	-	0.0135	-	0.0089
	n	-	8	-	8
6	m	-	0.3198	-	0.1783
	e	-	0.0220	-	0.0105
	n	-	8	-	8
9	m	-	0.3437	-	0.1973
	e	-	0.0188	-	0.0154
	n	-	8	-	8
13	m	0.2839	0.4799	0.2002	0.1527
	e	0.0105	0.0431	0.0104	0.0188
	n	8	7	7	8

TAULA XI: Quantitat d'aliment ingerida pel grup control i pel grup artrític

DIA	CONTROL		ARTRITIS	
	MASCLES	FEMELLES	MASCLES	FEMELLES
4	23.66	16.59	17.09	13.81
7	21.46	16.08	15.75	12.46
11	22.32	13.64	14.66	9.72
14	21.17	15.62	16.00	9.50
18	20.69	10.34	14.50	10.06
21	16.67	16.04	13.62	10.58
m	20.99	14.72	15.27	11.02
e	0.9644	0.9704	0.5087	0.7065
n	6	6	6	6

6.2. VOLUM DE LES EXTREMITATS

En totes les sèries estudiades es va mesurar el volum de les extremitats posteriors dels animals artrítics i dels animals control (apartat 3) cada setmana. Les determinacions s'han expressat com a increment de volum respecte al dia 0.

6.2.1. Resultats

A les figures 13 i 14 es pot observar l'evolució de l'increment de les extremitats ipsilateral i contralateral en el grup artrític i en el grup control corresponents a la sèrie experimental I. A la taula XII s'indiquen les mitjanes i els errors estàndard de les dues extremitats durant els 60 dies estudiats.

L'estudi dels resultats de l'extremitat ipsilateral mitjançant l'anàlisi de la variança de models lineals indica un increment significatiu del volum corresponent al grup artrític respecte al grup control ($p < 10^{-5}$) que es manifesta ja el dia 3 de la inducció i es manté durant tot el període estudiat. L'estimació d'aquesta diferència és de 2.81 amb uns límits fiducials de 2.60 i 3.03. Pel que fa referència a l'extremitat contralateral, l'increment de volum de la qual serveix per a l'avaluació de l'artritis, la diferència entre el grup artrític i el grup control es va incrementant progressivament fins al dia 14. A partir d'aquest dia els nivells es mantenen gairebé constants i estan significativament augmentats en el grup artrític respecte al grup control ($p < 10^{-15}$). L'augment estimat de l'increment de volum de l'extremitat contralateral en el grup artrític és de 1.61 amb uns límits fiducials de 1.48 i 1.75. Com es pot observar, la inflor produïda a causa de la inflamació aguda en l'extremitat ipsilateral és molt més gran que la inflamació sistèmica mesurada en l'extremitat contralateral.

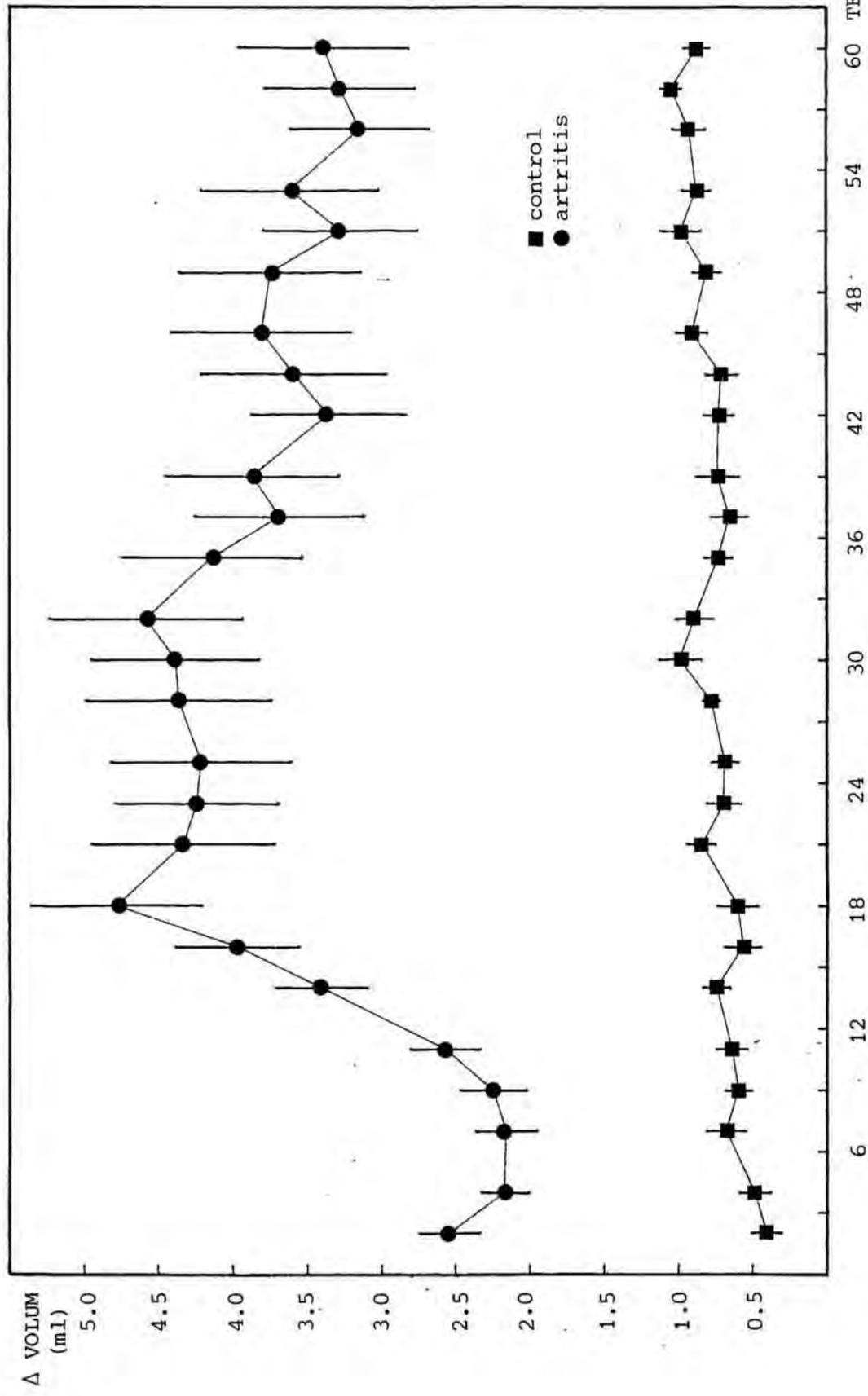


FIGURA 13: Evolució de l'increment de volum de l'extremitat ipsilateral (SÈRIE I)

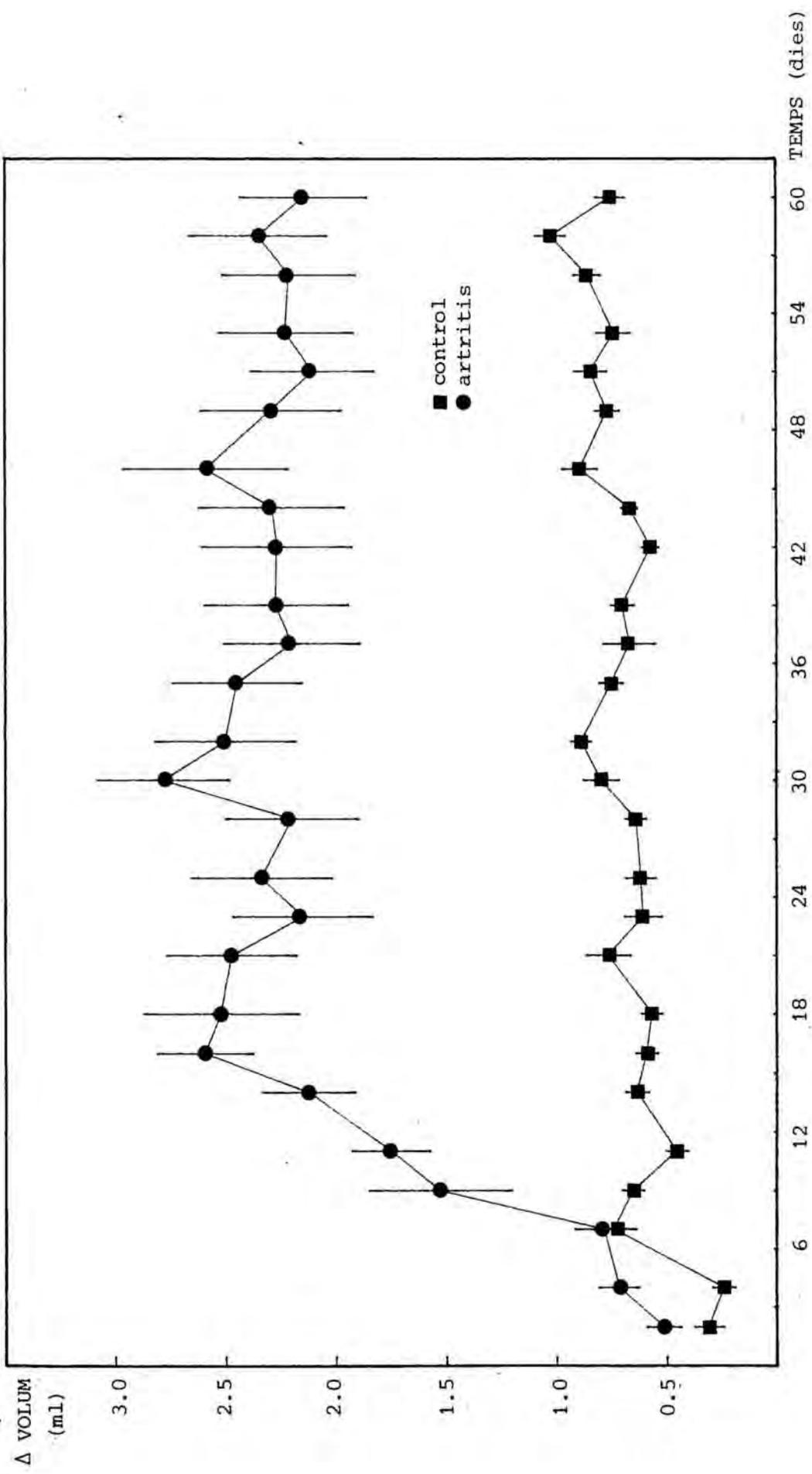


FIGURA 14: Evolució de l'increment de volum de l'extremitat contralateral (SÈRIE I)

TAULA XII: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE I)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
2	1.58 ± 0.419*	-0.81 ± 0.690	0.407 ± 0.099	2.542 ± 0.205	0.310 ± 0.067	0.513 ± 0.078
4	3.60 ± 0.611	1.28 ± 0.782	0.485 ± 0.105	2.168 ± 0.161	0.243 ± 0.052	0.719 ± 0.090
7	2.50 ± 1.162	0.08 ± 1.136	0.676 ± 0.131	2.158 ± 0.208	0.741 ± 0.101	1.074 ± 0.704
9	3.96 ± 0.836	-1.76 ± 1.162	0.594 ± 0.085	2.246 ± 0.223	0.717 ± 0.087	1.529 ± 0.325
11	4.77 ± 1.333	-3.86 ± 1.246	0.636 ± 0.102	2.569 ± 0.236	0.455 ± 0.050	1.752 ± 0.176
14	8.93 ± 1.427	-7.78 ± 1.868	0.740 ± 0.091	3.402 ± 0.310	0.635 ± 0.054	2.123 ± 0.209
16	9.48 ± 1.818	-6.62 ± 1.838	0.562 ± 0.122	3.966 ± 0.419	0.590 ± 0.053	2.594 ± 0.216
18	11.70 ± 1.846	-6.57 ± 1.832	0.600 ± 0.136	4.780 ± 0.573	0.570 ± 0.049	2.515 ± 0.354
21	13.78 ± 0.907	-4.30 ± 2.340	0.838 ± 0.096	4.330 ± 0.615	0.766 ± 0.103	2.473 ± 0.297
23	10.74 ± 1.062	-3.99 ± 2.786	0.690 ± 0.113	4.236 ± 0.547	0.606 ± 0.085	2.151 ± 0.318
25	11.53 ± 1.004	-2.95 ± 2.335	0.683 ± 0.088	4.213 ± 0.604	0.619 ± 0.069	2.338 ± 0.319
28	12.47 ± 0.826	-1.04 ± 2.662	0.775 ± 0.054	4.364 ± 0.626	0.860 ± 0.062	2.251 ± 0.323
30	13.86 ± 1.368	2.54 ± 2.979	0.985 ± 0.139	4.385 ± 0.565	0.795 ± 0.080	2.784 ± 0.300

* m ± e; n = 10 en tots els casos

TAULA XII: Continuació

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
	32	13.46 ± 1.110	4.42 ± 3.040	0.890 ± 0.117	4.581 ± 2.050	0.955 ± 0.089
35	13.82 ± 1.239	5.11 ± 2.776	0.728 ± 0.092	4.135 ± 0.609	0.749 ± 0.054	2.446 ± 0.296
37	17.77 ± 1.390	7.96 ± 3.109	0.655 ± 0.121	3.683 ± 0.572	0.666 ± 0.118	2.199 ± 0.310
39	15.84 ± 1.109	7.48 ± 2.830	0.732 ± 0.146	3.865 ± 0.588	0.699 ± 0.523	2.270 ± 0.329
42	17.18 ± 1.314	10.36 ± 3.160	0.720 ± 0.097	3.352 ± 0.519	0.612 ± 0.061	2.265 ± 0.341
44	17.47 ± 1.117	12.76 ± 2.967	0.705 ± 0.105	3.586 ± 0.626	0.703 ± 0.056	2.289 ± 0.333
46	20.20 ± 2.193	15.88 ± 2.750	0.902 ± 0.104	3.804 ± 0.606	0.890 ± 0.080	2.589 ± 0.378
49	18.32 ± 1.279	13.99 ± 2.908	0.802 ± 0.093	3.742 ± 0.616	0.765 ± 0.056	2.293 ± 0.321
51	17.57 ± 1.332	14.15 ± 2.800	0.978 ± 0.135	3.268 ± 0.520	0.841 ± 0.074	2.103 ± 0.281
53	17.26 ± 1.465	15.41 ± 2.704	0.871 ± 0.093	3.913 ± 0.599	0.736 ± 0.077	2.224 ± 0.309
56	19.06 ± 1.126	15.41 ± 2.704	0.921 ± 0.108	3.140 ± 0.470	0.855 ± 0.063	2.209 ± 0.302
58	18.14 ± 1.242	21.17 ± 2.226	1.040 ± 0.085	3.275 ± 0.505	1.022 ± 0.071	2.348 ± 0.311
60	18.33 ± 1.520	22.31 ± 2.650	0.869 ± 0.085	3.382 ± 0.605	0.751 ± 0.068	2.143 ± 0.288

A les taules XIII - XVIII es poden observar les mitjanes i els errors estàndard corresponents a les altres sèries estudiades. El primer dia de la determinació de l'increment de volum de les extremitats va ser el dia 14, i en aquest dia ja s'observa un augment significatiu del volum d'ambdues extremitats en els animals artrítics. A continuació es detalla el nivell de significació, la diferència estimada i els límits fiducials de l'extremitat contralateral en cada sèrie experimental.

<u>sèrie</u>	<u>estimacions</u>	<u>límits fiducials</u>
II ($p < 10^{-12}$)	1.52	(1.18 - 1.85)
III ($p < 10^{-9}$)	2.42	(1.73 - 3.12)
IV ($p < 10^{-15}$)	1.61	(1.35 - 1.86)
V mascles ($p < 0.05$)	0.426	(0.0676 - 0.7851)
V femelles ($p < 10^{-7}$)	1.23	(0.873 - 1.590)
VI ($p < 10^{-15}$)	1.39	(1.18 - 1.59)
VII ($p < 10^{-3}$), dia 14	1.01	(0.453 - 1.574)

La sèrie V, realitzada en mascles i femelles, permet indicar que la inflamació desenvolupada a l'extremitat contra lateral per les femelles és significativament més gran que la dels mascles ($p < 10^{-3}$). L'estimació de la diferència entre ambdós sexes és de 0.4026 ml amb uns límits fiducials de 0.1830 i 0.6222.

Per últim, s'ha d'afegir que els valors corresponents als pesos de melsa, timus i ronyó, descrits a l'apartat 6.1.1., es correlacionen amb els increments de les extremitats ipsilateral i contralateral. A la taula XIX es poden observar els valors corresponents als coeficients de correlació i als graus de significació.

TAULA XIII: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE II)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
14	15.92 ± 0.844* (24)	-4.42 ± 1.242 (34)	0.568 ± 0.055 (24)	4.094 ± 0.181 (34)	0.364 ± 0.054 (24)	1.952 ± 0.155 (34)
21	21.42 ± 1.154 (16)	-4.05 ± 2.001 (28)	0.726 ± 0.066 (16)	3.605 ± 0.139 (28)	0.529 ± 0.040 (16)	1.904 ± 0.142 (28)
28	24.78 ± 1.876 (16)	1.26 ± 2.006 (21)	0.749 ± 0.062 (16)	3.928 ± 0.224 (21)	0.561 ± 0.064 (16)	1.939 ± 0.155 (21)
35	27.99 ± 1.336 (8)	9.27 ± 2.010 (14)	0.733 ± 0.099 (8)	3.749 ± 0.236 (14)	0.561 ± 0.111 (8)	1.932 ± 0.218 (14)
42	29.94 ± 1.588 (8)	14.24 ± 3.370 (7)	0.796 ± 0.082 (8)	3.713 ± 0.381 (7)	0.498 ± 0.088 (8)	1.581 ± 0.343 (7)

* m ± e
(n)

TAULA XIV: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE III)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
14	25.08 ± 0.681* (40)	-0.60 ± 1.138 (49)	0.782 ± 0.056 (40)	4.751 ± 0.211 (49)	0.429 ± 0.038 (40)	2.632 ± 0.170 (49)
21	32.26 ± 0.910 (32)	2.13 ± 1.677 (41)	1.001 ± 0.049 (32)	5.590 ± 0.378 (41)	0.765 ± 0.040 (32)	2.998 ± 0.264 (41)
28	38.21 ± 1.180 (24)	13.93 ± 1.551 (33)	1.099 ± 0.045 (24)	6.355 ± 0.555 (33)	0.696 ± 0.038 (24)	3.767 ± 0.545 (33)
35	39.58 ± 1.510 (16)	24.05 ± 1.970 (25)	1.148 ± 0.117 (16)	5.910 ± 0.713 (25)	0.829 ± 0.093 (16)	3.949 ± 0.711 (25)
42	47.34 ± 1.460 (8)	32.78 ± 2.820 (13)	1.118 ± 0.139 (8)	6.192 ± 1.086 (13)	0.675 ± 0.093 (8)	3.561 ± 1.061 (13)

* m ± e
(n)

TAULA XV: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE IV)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
14	7.75 ± 1.436 (24)	1.74 ± 1.493 (21)	0.566 ± 0.030 (24)	3.851 ± 0.303 (21)	0.480 ± 0.031 (24)	1.918 ± 0.180 (21)
21	18.69 ± 1.814 (16)	2.52 ± 2.405 (14)	0.499 ± 0.047 (16)	3.881 ± 0.267 (13)	0.421 ± 0.038 (16)	2.173 ± 0.266 (13)
28	28.47 ± 3.652 (8)	16.59 ± 3.722 (7)	0.429 ± 0.047 (8)	3.536 ± 0.342 (7)	0.440 ± 0.046 (8)	1.841 ± 0.368 (7)

* m ± e
(n)

TAULA XVI: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE V)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
MASCLES						
4	16.33 ± 1.417*	2.50 ± 0.520	1.029 ± 0.124	3.809 ± 0.537	0.688 ± 0.075	0.191 ± 0.044
7	24.08 ± 0.539	9.10 ± 0.847	0.782 ± 0.105	3.124 ± 0.488	0.510 ± 0.091	0.215 ± 0.043
11	34.76 ± 1.636	9.09 ± 1.527	0.891 ± 0.075	2.648 ± 0.432	0.585 ± 0.076	1.605 ± 0.342
14	37.49 ± 2.070	13.14 ± 2.542	0.841 ± 0.108	3.740 ± 0.465	0.531 ± 0.088	1.929 ± 0.249
18	47.61 ± 2.082	12.34 ± 3.836	0.860 ± 0.078	3.864 ± 0.506	0.572 ± 0.073	1.450 ± 0.299
21	44.82 ± 1.675	13.07 ± 3.981	0.935 ± 0.069	4.602 ± 0.681	0.668 ± 0.073	1.222 ± 0.339
FEMELLES						
4	5.50 ± 0.631	1.48 ± 0.655	1.060 ± 0.105	4.022 ± 0.364	0.762 ± 0.056	0.306 ± 0.055
7	11.21 ± 1.284	3.39 ± 0.694	0.892 ± 0.134	3.862 ± 0.419	0.579 ± 0.083	0.396 ± 0.071
11	7.81 ± 1.944	-2.82 ± 1.306	0.576 ± 0.060	3.710 ± 0.334	0.379 ± 0.063	1.651 ± 0.236
14	16.00 ± 1.985	-5.08 ± 2.244	0.706 ± 0.088	4.012 ± 0.510	0.415 ± 0.054	1.766 ± 0.268
18	20.20 ± 1.978	-4.65 ± 1.943	0.770 ± 0.082	4.579 ± 0.556	0.481 ± 0.042	2.050 ± 0.226
21	23.51 ± 1.723	-1.45 ± 2.353	0.381 ± 0.104	4.760 ± 0.488	0.131 ± 0.069	2.124 ± 0.511

* m ± e, n = 10 en tots els casos

TAULA XVII: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE VI)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
14	48.67 ± 5.547* (6)	16.13 ± 3.533 (6)	0.435 ± 0.095 (6)	4.893 ± 0.524 (6)	0.511 ± 0.091 (6)	1.792 ± 0.228 (6)
21	67.46 ± 3.189 (6)	23.31 ± 3.615 (6)	0.790 ± 0.095 (6)	6.421 ± 0.346 (6)	0.790 ± 0.025 (6)	2.625 ± 0.155 (6)
28	74.51 ± 3.163 (6)	42.24 ± 4.014 (6)	0.978 ± 0.050 (6)	6.283 ± 0.622 (6)	0.810 ± 0.054 (6)	2.228 ± 0.279 (6)
35	84.11 ± 3.799 (6)	54.41 ± 4.222 (6)	1.035 ± 0.086 (6)	5.225 ± 0.569 (6)	0.830 ± 0.115 (6)	2.037 ± 0.243 (6)
42	81.33 ± 3.495 (6)	64.33 ± 4.634 (6)	0.893 ± 0.039 (6)	4.223 ± 0.413 (6)	0.768 ± 0.109 (6)	1.978 ± 0.172 (6)

* m ± e
(n)

TAULA XVIII: Evolució de l'increment de pes i dels increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (SÈRIE VII)

DIA	PES (%)		EXTR. IPSILATERAL (ml)		EXTR. CONTRALATERAL (ml)	
	CONTROL	PREARTRITIS	CONTROL	PREARTRITIS	CONTROL	PREARTRITIS
3	1.60 ± 0.052* (8)	-3.21 ± 1.114 (32)	0.071 ± 0.033 (8)	3.066 ± 0.187 (32)	0.076 ± 0.032 (8)	0.071 ± 0.018 (32)
6	3.99 ± 0.600 (8)	-4.27 ± 0.874 (24)	0.072 ± 0.044 (8)	2.485 ± 0.204 (24)	0.080 ± 0.030 (8)	0.101 ± 0.021 (24)
9	4.46 ± 1.060 (8)	-1.59 ± 0.729 (16)	0.065 ± 0.032 (8)	2.902 ± 0.264 (16)	0.092 ± 0.036 (8)	0.250 ± 0.026 (16)
13	2.61 ± 1.746 (8)	-6.20 ± 1.394 (8)	0.058 ± 0.038 (8)	5.011 ± 0.572 (8)	0.089 ± 0.038 (8)	1.378 ± 0.451 (8)

* m ± e
(n)

TAULA XIX: Correlacions entre els increments de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral (ml) i els resultats corresponents al pes d'òrgans (%)

	EXTREMITAT IPILATERAL	EXTREMITAT CONTRALATERAL
PES FETGE		
sèrie III (v = 74)	N.S.	N.S.
sèrie IV (v = 60)	N.S.	N.S.
PES MELSA		
sèrie III (v = 74)	0.7410 p < 0.01	0.7045 p < 0.01
sèrie VII (v = 20)	0.7712 p < 0.01	0.7380 p < 0.01
PES TIMUS		
sèrie III (v = 74)	-0.3425 p < 0.01	-0.3654 p < 0.01
sèrie VII (v = 20)	-0.4696 p < 0.05	-0.5068 p < 0.05
PES RONYONS		
sèrie III (v = 74)	0.5332 p < 0.01	0.5022 p < 0.01
PES GLÀNDULES ADRENALS		
sèrie IV (v = 60)	N.S.	N.S.

7. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES LOCOMOTORS

La mesura de l'activitat motora i del ritme circadiari en animals control i animals artrítics es va realitzar enregistrant, primer, els moviments dels animals mitjançant unes plaques sensores especials i després, estudiant el registre obtingut a través de l'anàlisi de Fourier.

El disseny per a aquesta determinació, que correspon a les sèries experimentals X i XI, consisteix en la inducció de l'artritis, tal com s'ha assenyalat a l'apartat 3., el dia 0. Tres dies abans però, els animals s'havien col·locat en gàbies individuals i s'havien situat sobre les plaques instal·lades en una cambra insonoritzada per tal d'habituar-s'hi. Després de l'administració de l'adjuvant a un grup i del vehicle a un altre, els animals es van tornar a la seva placa i es van registrar els seus moviments durant els 27 dies següents, a intervals de 30 minuts. Cada 7 dies es treien els animals de la cambra i es mesurava el pes i el volum de les extremitats de cadascun.

7.1. MATERIAL

- Animals: Els animals utilitzats es van col·locar individualment en gàbies de plàstic opaques on tenien lliure accés al menjar i a la beguda.
- Plaques: Es va disposar de 6 plaques sensores Actisystem Panlab^R, damunt de les quals es van col·locar les gàbies.

L'experiment es va realitzar en el nostre departament en una cambra insonoritzada de 2.5 x 1.5 x 2.3 m de dimensions.

7.2. REGISTRE DELS MOVIMENTS

El moviment dels animals és enregistrat a les plaques sensores perquè es produeix una variació en la inducció d'una bobina que queda situada just sota la gàbia. Aquesta bobina forma part d'un circuit oscil·lador que, com a conseqüència de les variacions d'inducció, varia proporcionalment la seva freqüència d'oscil·lació. Finalment, aquesta freqüència és comparada amb la d'un oscil·lador de referència, de manera que cada cop que la freqüència de l'oscil·lador-detector s'allunya de la del de referència es produeix un impuls apte per a ser enregistrat en un comptador.

El nombre d'impulsos per a cada variació de freqüència és proporcional a la magnitud d'aquesta variació i, per tant, al moviment efectuat per l'animal.

El recompte dels impulsos provinents de les plaques es va realitzar en una habitació anexas a la cambra insonoritzada, amb un comptador digital de dos canals Panlab tipus PB 0602 i amb dos comptadors més de dos canals, construïts en el Departament amb circuits integrats de la família SN 74 Texas Instrument (Casamitjana, 1980).

Tots els comptadors tenien la sortida TTL numèrica codificada en BCD. Les 6 sortides BCD anaven cap a un multiplexor programable Panlab 1099 connectat a una impressora mecànica Panlab 0125 que imprimia les dades dels 6 animals sobre una tira de paper.

El multiplexor es va programar per fer una impressió cada 30 minuts, després de la qual, el comptador tornava a zero. Les dades es varen anar gravant sistemàticament a un disc Sharp MZ-80 FB mitjançant un microordinador Sharp MZ-80 B.

Les dades enregistrades durant les 4 hores que se-
guien a la inducció es van rebutjar per evitar la possible al-
teració produïda per la sortida de la cambra i la manipulació
dels animals.

L'estudi de les dades obtingudes es va realitzar
amb el mateix ordinador connectat a una impressora gràfica
Sharp MZ-80P5. Es va aplicar l'anàlisi de Fourier, basat en
la descomposició de la funció periòdica en una sèrie de fun-
cions periòdiques sinusoïdals, anomenades harmònics, on el pe-
ríode de cada una d'elles és submúltiple del de la funció de
què procedeixen. Si les dades segueixen un comportament periò-
dic a través del temps, és a dir, es comporten com una funció
periòdica, i es sotmeten a l'anàlisi de Fourier, es troba que
la funció de partida està formada per funcions de diferents
períodes. Per veure la participació d'aquestes funcions (har-
mònics) dins de la funció fonamental, es calcula el contingut
de potència de cada harmònic. Si el ritme és circadiari, en
descomposar la funció periòdica, s'obté que l'harmònic 1 és
el més important.

En aquest estudi s'han considerat l'activitat moto-
ra dels animals (AM) expressada pel nombre d'impulsos enregis-
trats per unitat de temps, el contingut de potència de l'har-
mònic circadiari (CPHC), l'acrofase i l'amplitud del ritme.
L'acrofase és la localització del màxim de la variació en
l'escala del temps per al període considerat respecte a un
punt de referència. L'amplitud és la meitat de la variabili-
tat total del ritme per al període considerat.

7.3. RESULTATS

A les figures 15, 16, 17 i 18 estan representats els nivells corresponents a l'AM, al CPHC, a l'acrofase i a l'amplitud, respectivament, mesurats en el grup artrític i en el grup control.

A la figura 19 es pot observar l'actograma de cada animal estudiat. Mitjançant aquesta figura es pot seguir l'evolució de la distribució de l'activitat motora durant el dia. Cada actograma es pot dividir en dues meitats idèntiques i dins de cada una, un traçat horitzontal correspon a 24 hores i cada ratlleta vertical a 500 moviments de l'animal. Així es pot veure en tots els animals que durant el període de foscor és quan hi ha més moviment. L'activitat dels animals artrítics disminueix cap al dia 14 de l'estudi, però progressivament es recupera el ritme normal.

Amb l'anàlisi de la variança de models lineals es troba una activitat motora significativament reduïda en el grup artrític respecte al grup control ($p < 10^{-4}$). Com es pot observar, la disminució no es comença a mostrar fins al dia 10 de la inducció. Aquesta disminució a partir del dia 14 s'ha estimat en 5.02, amb uns límits fiducials de 2.03 i 8.01.

Pel que fa al contingut de potència de l'harmònic circadiari, s'ha observat una disminució significativa en el grup artrític a partir del dia 10 ($p < 0.05$), que a partir del dia 14 es manté en 11.79, amb uns límits fiducials de 7.96 i 15.62.

L'estudi estadístic de l'acrofase ha revelat una disminució significativa d'aquests valors un cop desenvolupada l'artritis ($p < 0.01$), que s'ha estimat en 44.05, amb uns límits fiducials de 80.81 i 7.30.

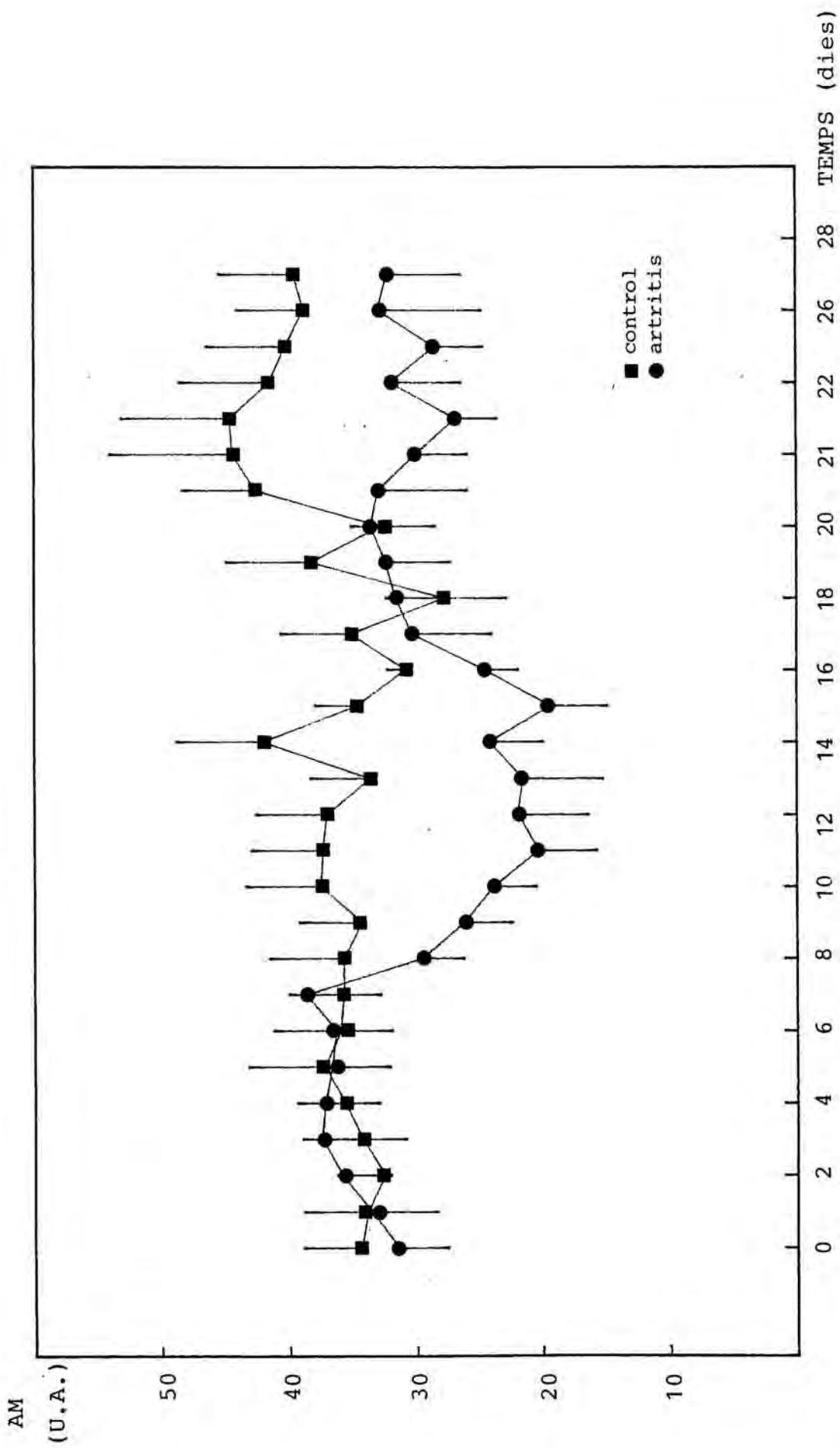


FIGURA 15: Evolució de l'activitat motora (mesurada en unitats arbitràries)

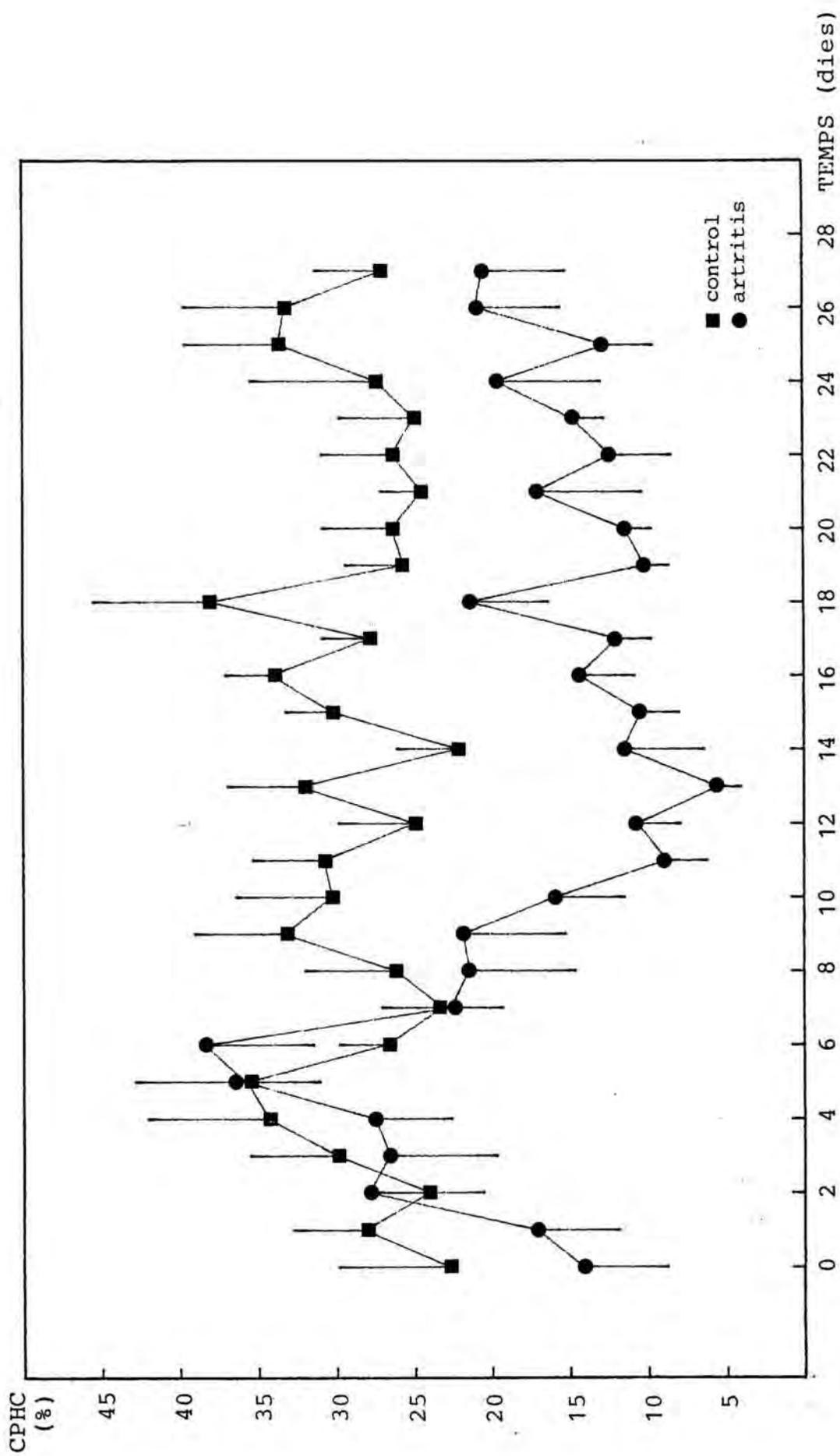


FIGURA 16: Evolució del contingut de potència de l'harmònic circadiari (% respecte a la potència total de la funció)

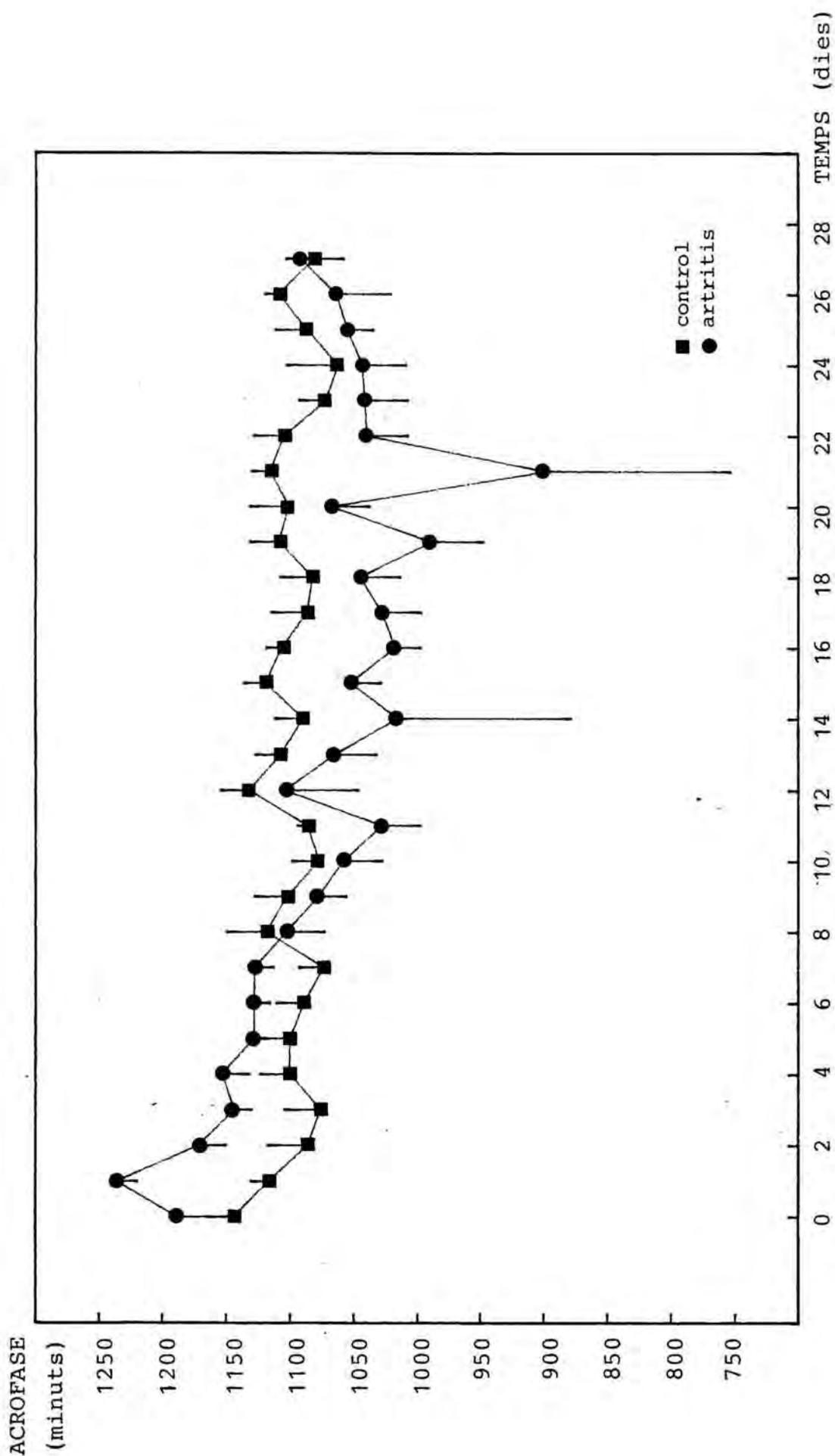


FIGURA 17: Evolució de l'acrofase (minuts)

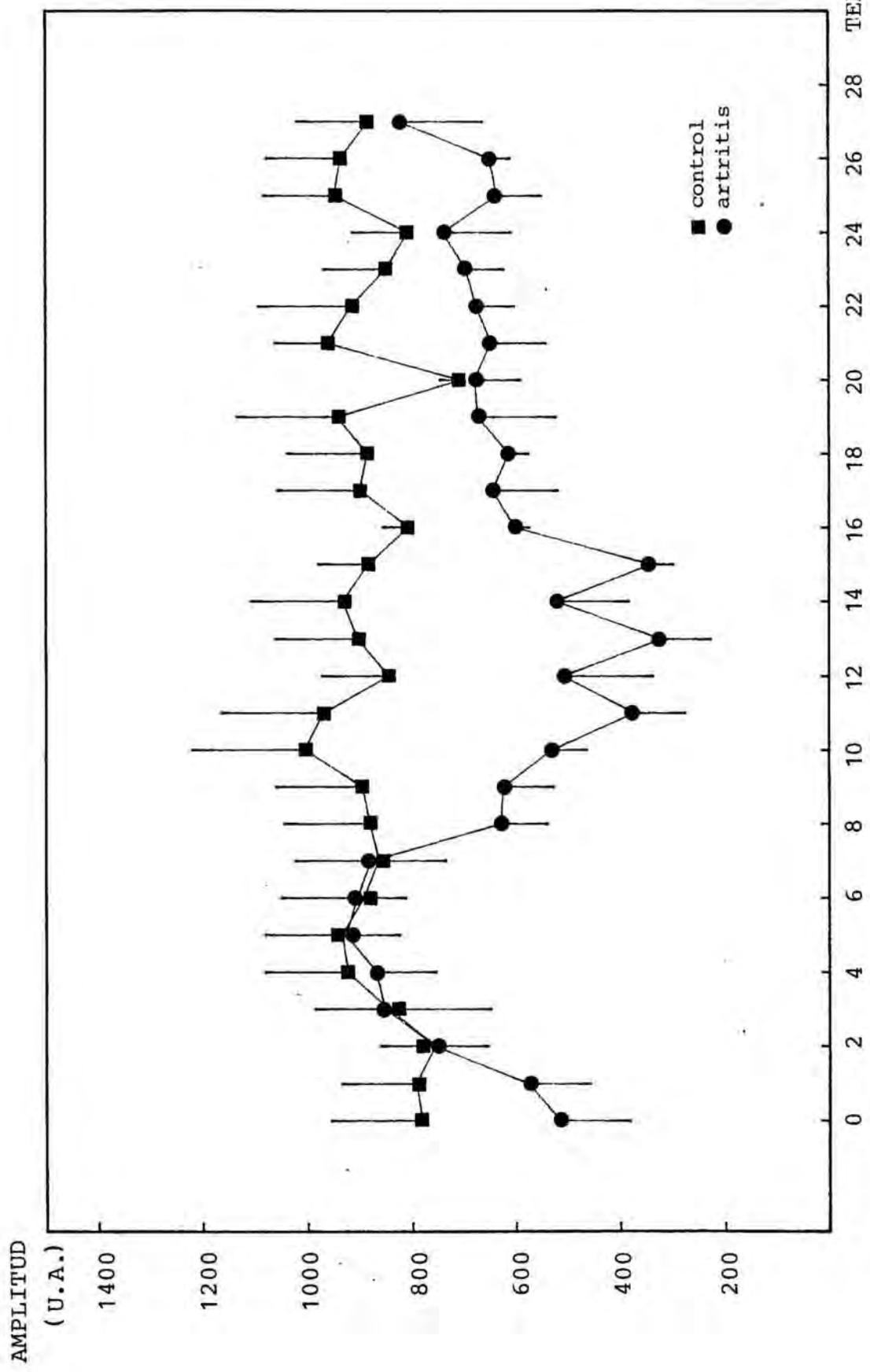


FIGURA 18: Evolució de l'amplitud (mesurada en unitats arbitràries)

FIGURA 19: Actogrammes

1) animals control de la sèrie VIII

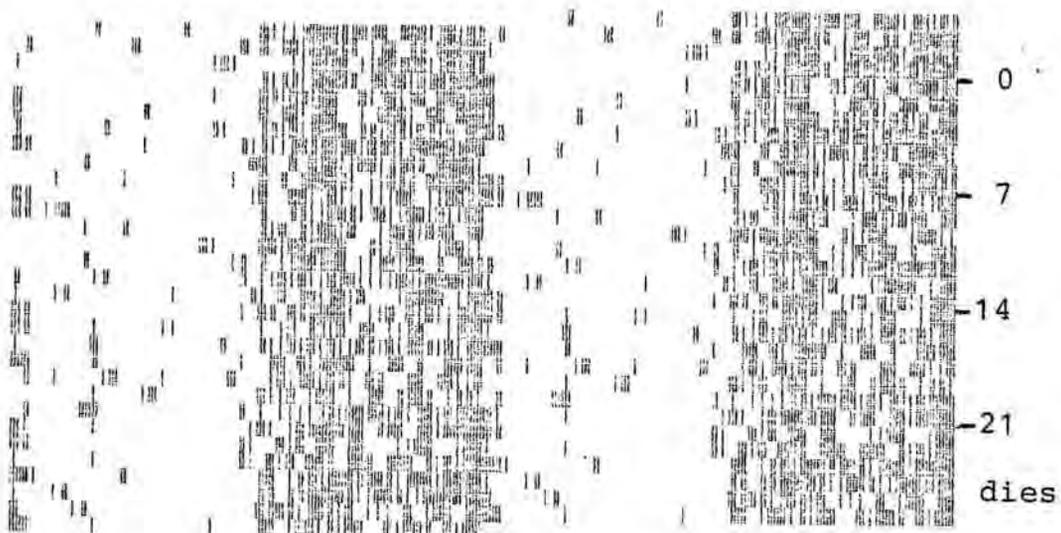
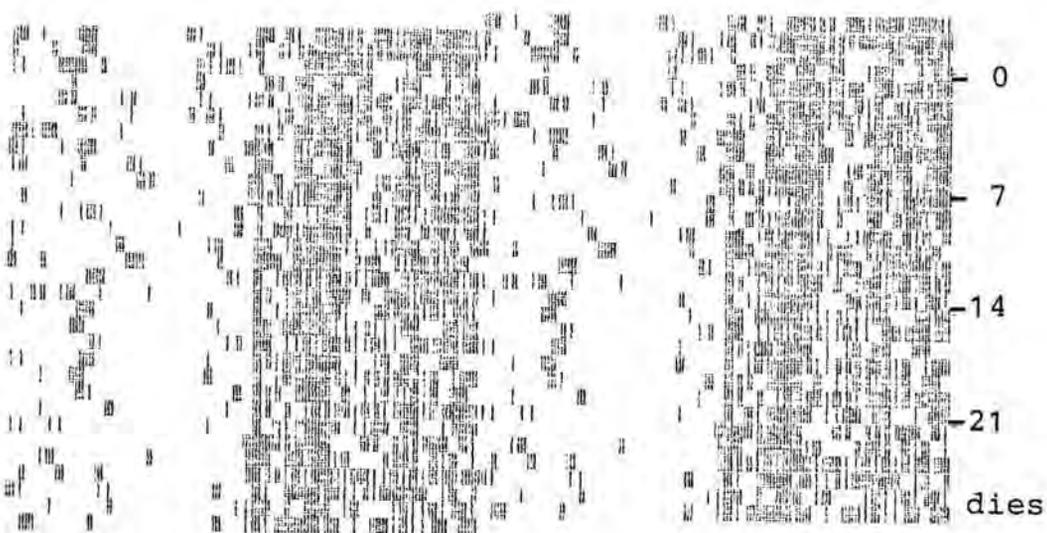
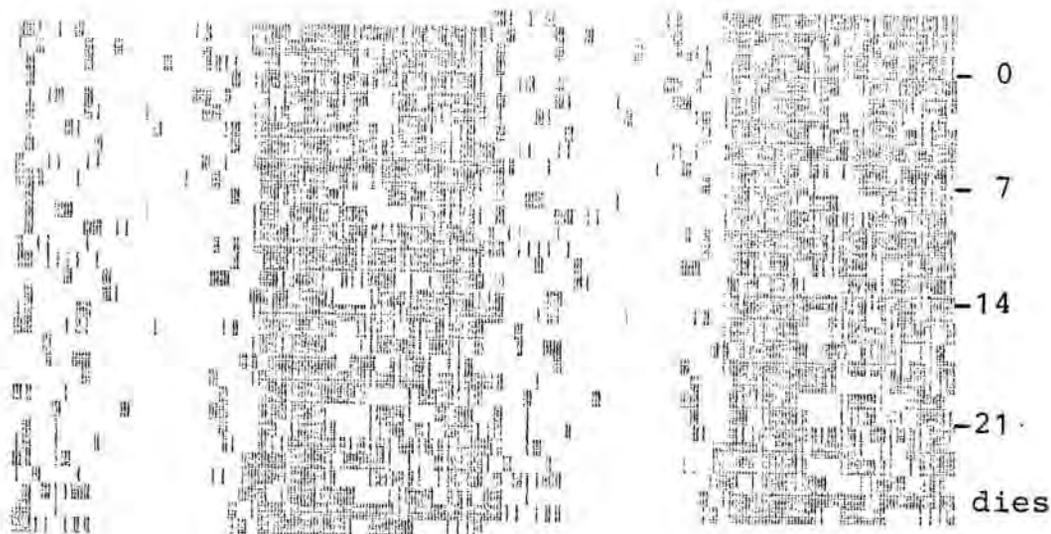


FIGURA 19: Continuació

2) animals artrítics de la sèrie VIII

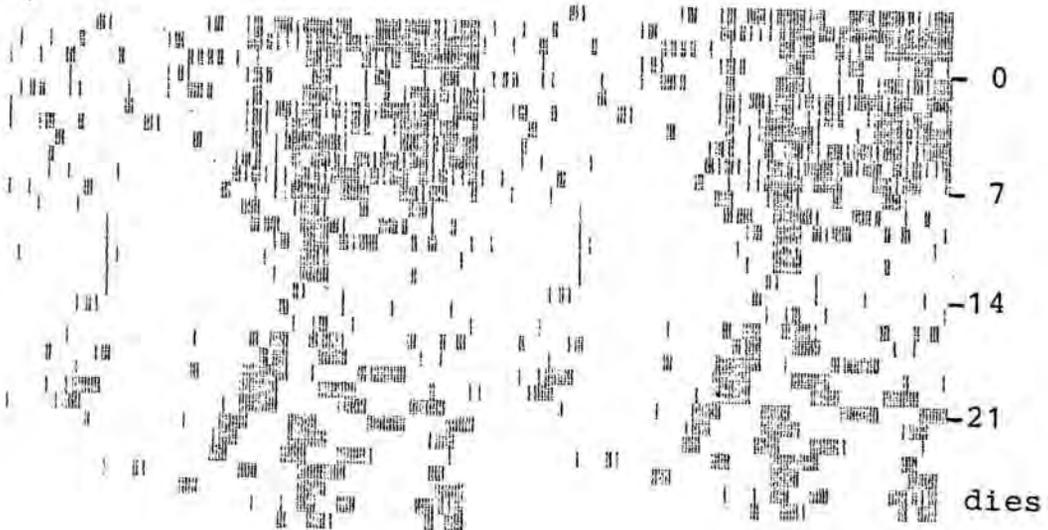
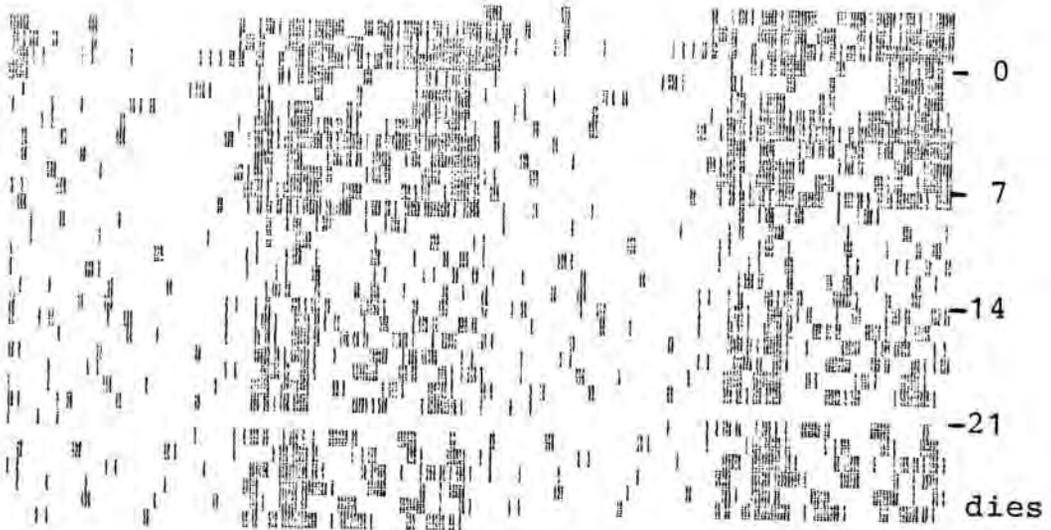
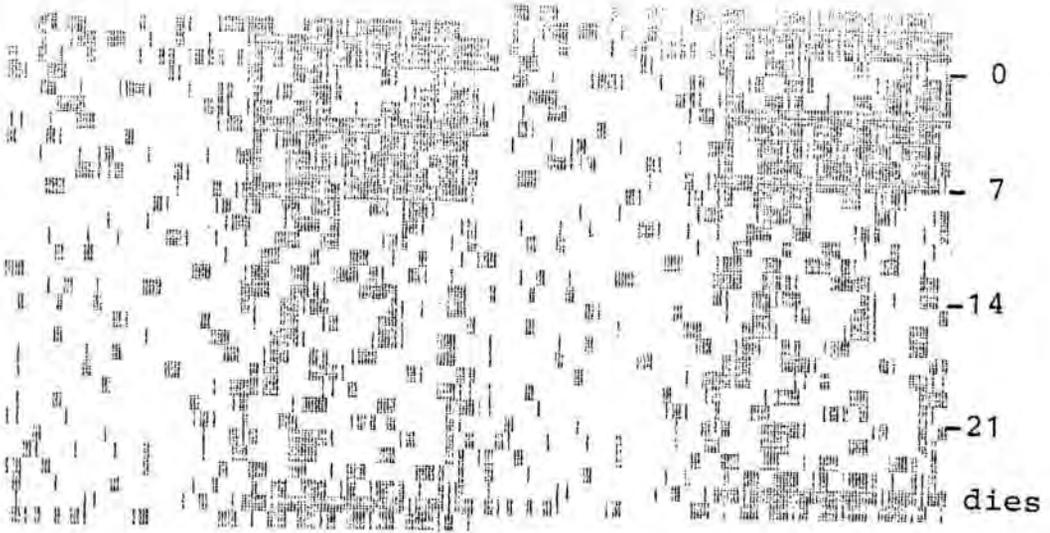


FIGURA 12: Continuació.

3) animals control de la sèrie I

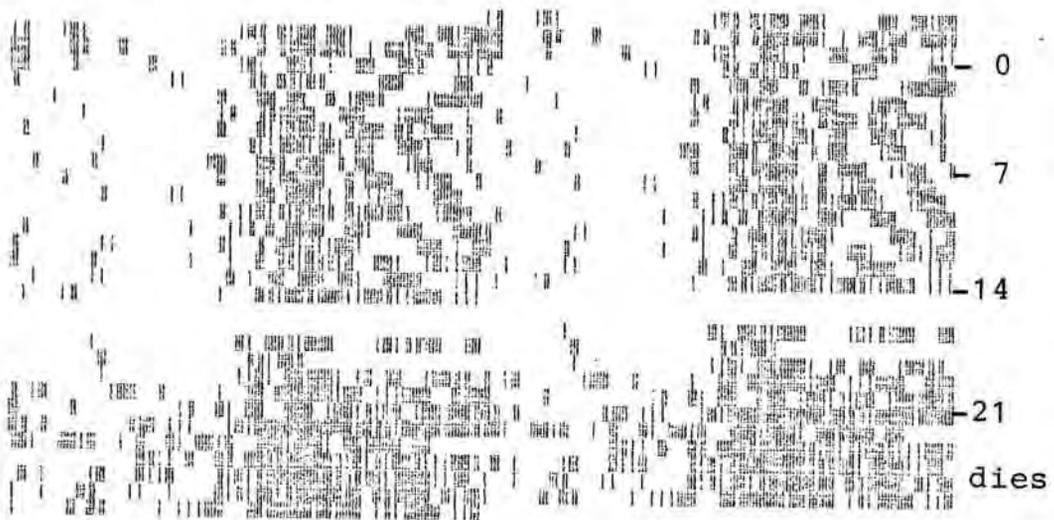
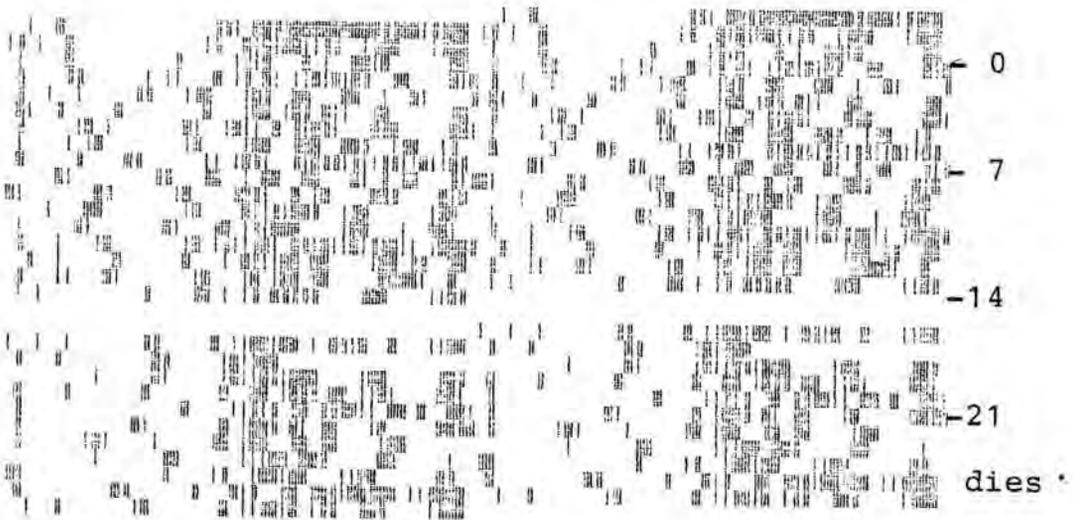
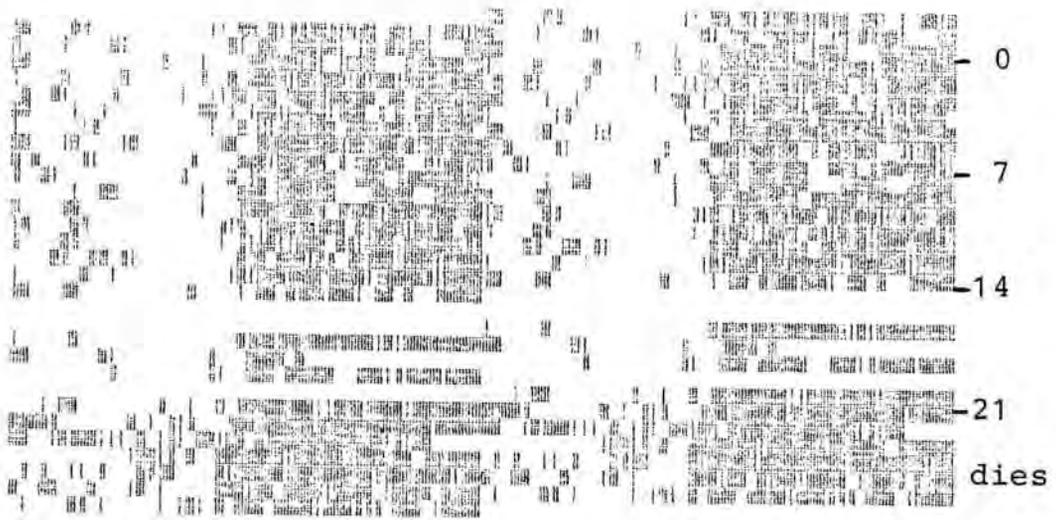
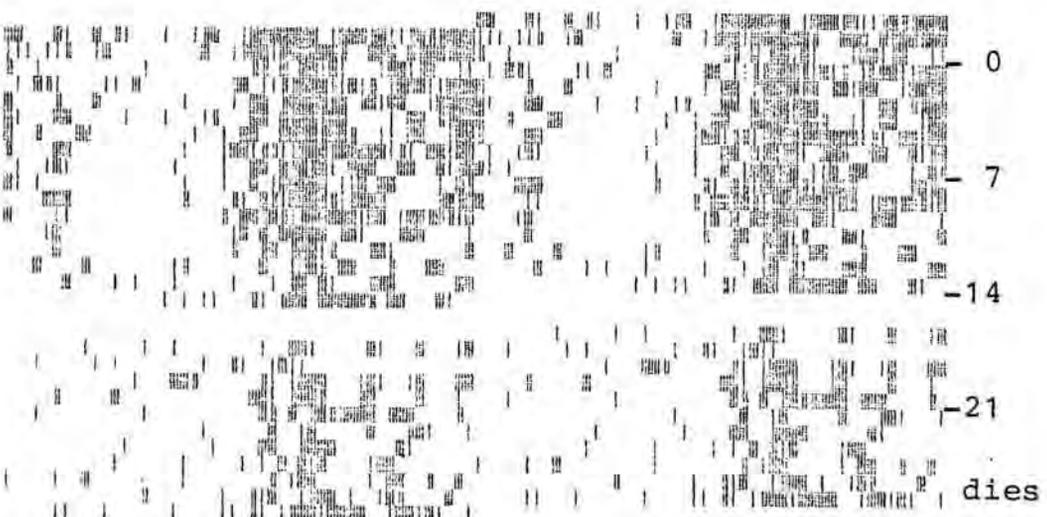
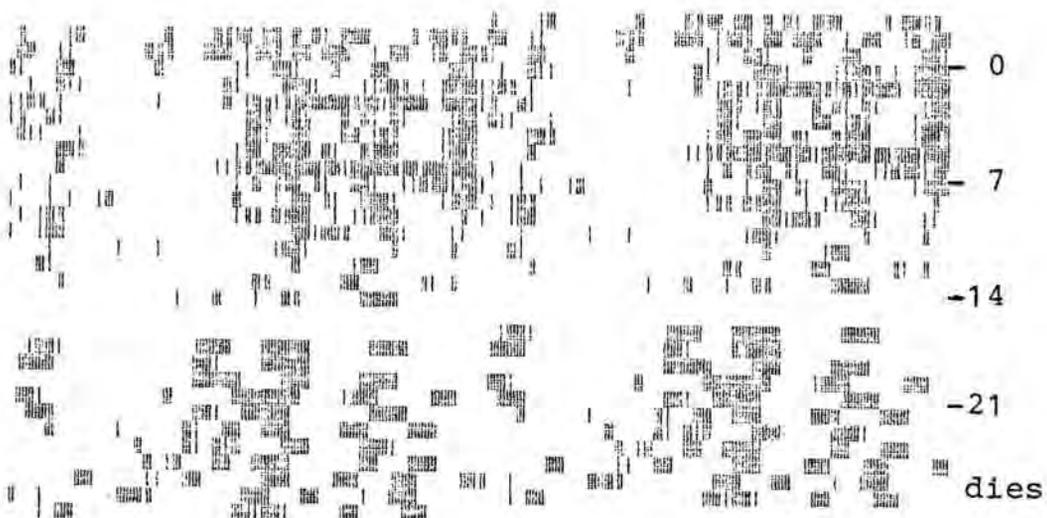
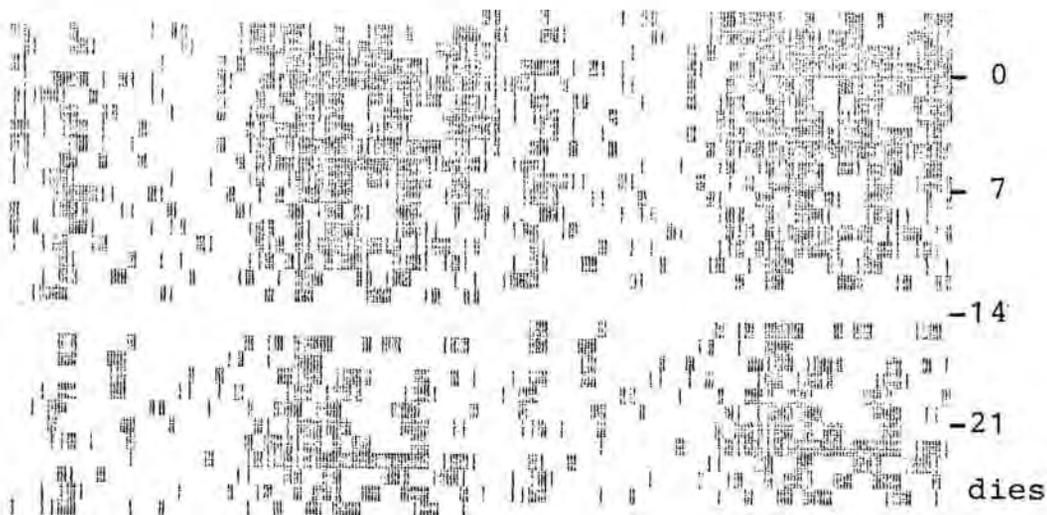


FIGURA 19: Continuació.

4) animals artrítics de la sèrie IX



Per últim, també s'ha observat una disminució significativa ($p < 10^{-4}$) en l'amplitud de la funció del grup artrític respecte al grup control. Aquesta diferència es manté des del dia 14 fins al 27 i la seva estimació és de 164.57, amb uns límits fiducials de 240.72 i 88.41.