



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

8. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES HEMATOLÒGICS

8.1. PROTEÏNOGRAMA I PROTEÏNÈMIA

La determinació de la quantitat relativa de cada fracció proteica del sèrum s'ha realitzat mitjançant l'electroforesi sobre cel.logel. La concentració total de proteïnes sèriques s'ha determinat mitjançant un refractòmetre Erma Optical Worns L.T.D., Tokyo.

L'electroforesi es basa en la migració de partícules carregades en un solvent conductor sota la influència d'un camp elèctric. Les proteïnes sèriques o plasmàtiques, a pH 8.6 tenen càrrega negativa neta, de manera que en un camp elèctric migren cap al ànode i es separen segons la quantitat de càrrega en albúmina, alfa-globulines, beta-globulines i gamma-globulines.

El refractòmetre es basa en la mesura de l'índex de refracció d'un sèrum o plasma. En termes generals, si s'afegeix un solut a una solució, l'índex de refracció augmenta proporcionalment a la concentració de solut.

8.1.1. Material i mètodes

Per a la realització del proteïnograma s'han utilitzat els següents reactius:

- Solució amortidora de barbital pH 8.6 (21.7 g de barbital + NaOH 10 N \equiv 4.068 g i H₂O fins a 2 l),
- Colorant: Vermell Ponceau S, utilitzat al 0.5 % P/V en àcid tricloroacètic 5 %,
- Decolorant del Vermell Ponceau S: solució d'àcid acètic al 5 %,
- Solució transparentadora preparada amb aigua, metanol, àcid

acètic i alcohol dicetona en les proporcions de volum 500:350:70:80, respectivament.

La tècnica d'electroforesi de les proteïnes sèriques s'ha realitzat sobre Cel.logel[®] amb una cubeta electroforètica Atom AC/5 i una font d'alimentació Pharmacia ECPS 2000/300. El protocol utilitzat es resumeix a continuació:

Es submergeixen les tires en la solució amortidora de barbital pH 8.6 durant uns 10 minuts. S'absorbeix l'excés de la solució amortidora entre dos fulls de paper de filtre i es monten les tires sobre el pont, amb la cara absorbent cap amunt.

Amb un aplicador individual semi-micro s'efectua l'aplicació a 1 cm de la vora catòdica i es deixa migrar 1 hora a 200 V.

Es coloren les tires submergint-les en la solució de Vermell Ponceau S durant 20 minuts i seguidament es decoloren amb 3 o 4 banys de decolorant, agitant-les fins a obtenir un fons completament blanc.

Posteriorment es submergeixen les tires en la solució transparentadora i es deixen 15 minuts, després dels quals es disposen sobre plaques de vidre i es porten a 80 °C fins a la total transparència.

La lectura dels proteïnogrames s'ha realitzat mitjançant un fotodensitòmetre automàtic Atom 429, Digiscan. Els resultats s'han expressat com a percentatge relatiu de cada fracció proteica.

La determinació de les proteïnes totals mitjançant el refractòmetre consisteix en col·locar una gota de sèrum entre dos prismes i fer passar un raig de llum. Prèviament

l'aparell es calibra amb aigua destil·lada. L'ocular dóna directament la concentració proteica de la mostra.

8.1.2. Resultats

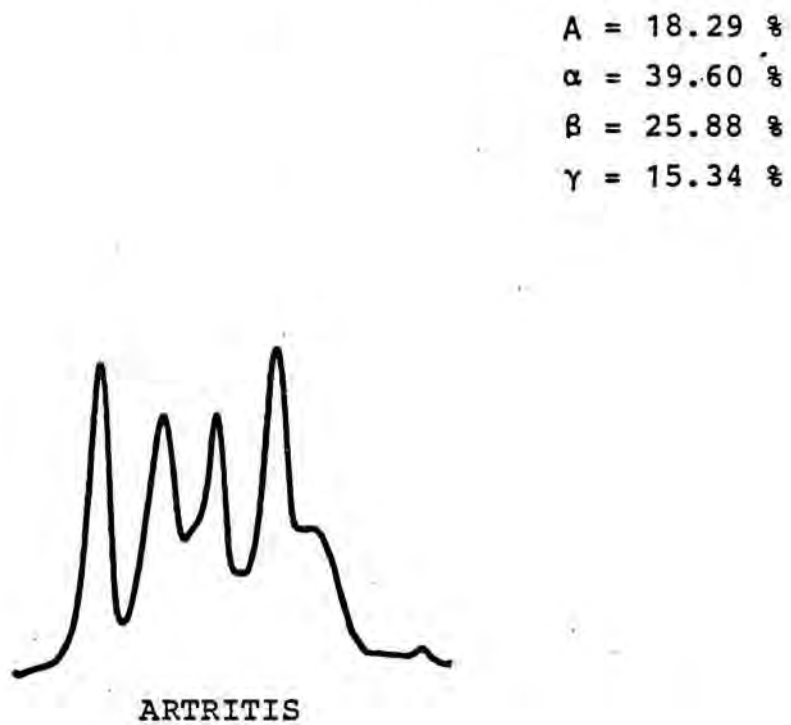
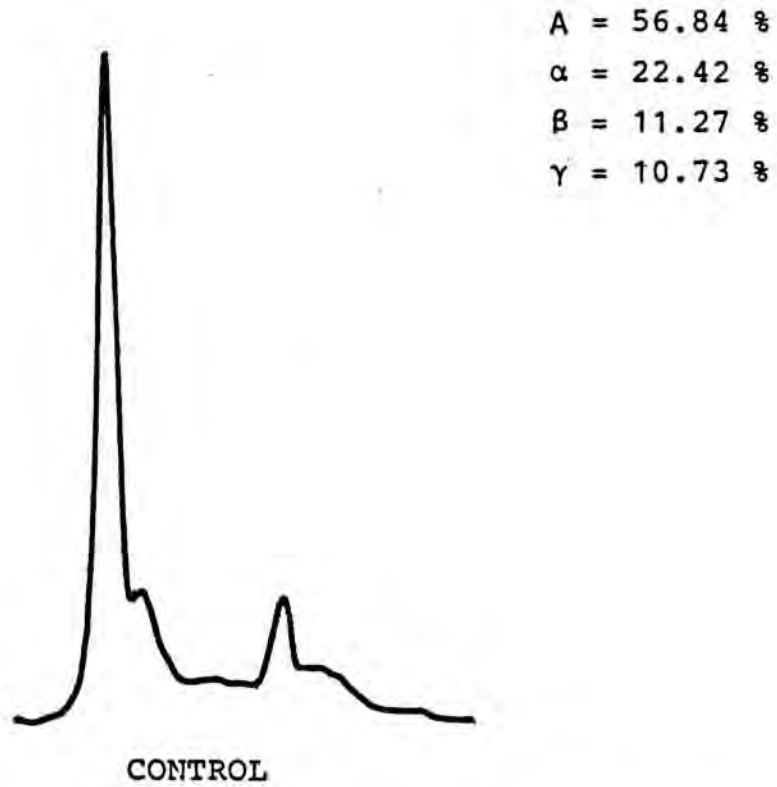
L'artritis adjuvant indueix profunds canvis en el proteïnograma, tal com es pot observar a la figura 20, on es mostra el perfil proteic d'una rata control i el corresponent a una rata artrítica el dia 14 de la inducció.

Les modificacions produïdes a causa de la patologia són una disminució dels nivells d'albúmina i un increment en els valors de les globulines motivat, principalment, per les fraccions alfa i beta. A la figura 21 es representen les concentracions relatives de cada fracció proteica i també el quocient albúmina/globulines corresponents a la sèrie III, mentre que a la taula XX es troben resumits aquests valors.

Els nivells d'albúmina determinats en els animals artrítics són significativament més baixos que els dels animals control durant tot el període estudiat ($p < 10^{-9}$), de manera que el nivell estimat per al grup artrític és de 38.24 (límits fiducials = 36.41 - 40.08) i el corresponent al grup control és de 54.78 (límits fiducials = 52.98 - 56.67).

Els valors observats per a la fracció alfa estan significativament elevats durant tot el període de l'estudi ($p < 10^{-5}$), si bé és el dia 14 quan són més elevats i després disminueixen lentament. Els valors estimats i els límits fiducials al llarg de l'estudi corresponents als dos grups considerats són:

FIGURA 20: Perfil del proteïnograma d'un animal control i d'un animal artrític



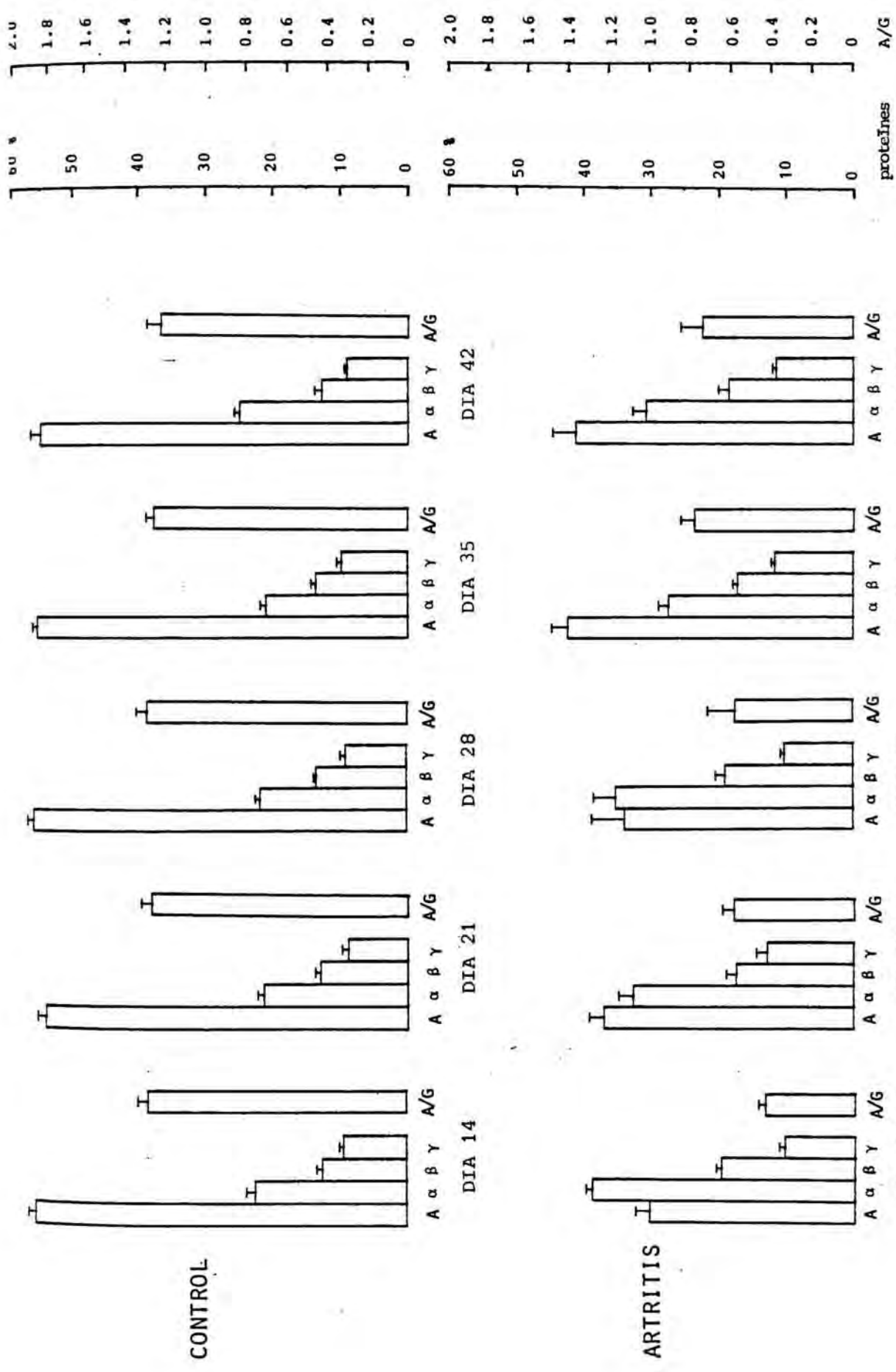


FIGURA 21: Evolució del proteïnograma (SERIE III)

TAULA XX: Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE III)

DIA	ALBÚMINA		α-GLOBULINES		β-GLOBULINES		γ-GLOBULINES		QUOCIENT A/G	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
0	57.48 8	-	22.07 0.726 8	-	11.38 0.674 8	-	7.28 0.839 8	-	1.419 0.0583 8	-
14	55.57 1.210 8	30.26 2.120 8	22.31 1.326 8	38.78 0.981 8	12.36 0.967 8	19.70 0.782 8	9.28 0.660 8	10.31 0.822 8	1.272 0.0462 8	0.439 0.0329 8
21	53.92 1.422 8	36.91 2.162 8	21.26 0.914 8	32.53 2.218 8	12.90 0.755 8	17.31 1.472 8	8.78 0.941 7	12.67 1.673 8	1.263 0.0517 7	0.502 0.0558 8
28	55.74 0.963 8	33.79 4.911 7	21.59 0.742 8	35.12 3.248 7	13.32 0.393 8	18.79 1.395 7	8.97 0.822 8	10.06 0.584 7	1.283 0.0516 8	0.576 0.1337 7
35	55.27 0.732 7	42.14 2.384 12	20.89 0.892 7	27.18 1.457 12	13.57 0.678 7	16.96 0.686 12	9.79 0.703 7	11.46 0.579 12	1.253 0.0389 7	0.781 0.0673 12
42	54.78 1.651 7	41.02 3.411 11	24.90 0.727 7	30.52 2.023 11	12.67 1.085 8	18.30 1.530 11	8.96 0.413 8	11.30 0.556 11	1.216 0.0690 7	0.737 0.1081 11

	<u>GRUP ARTRÍTIC</u>		<u>GRUP CONTROL</u>	
	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>
dia 14	37.14	(35.03 - 39.25)	21.64	(20.21 - 23.08)
dia 21	34.92	(33.44 - 36.41)	21.95	(20.77 - 23.13)
dia 28	32.71	(31.53 - 33.89)	22.25	(20.99 - 23.52)
dia 35	30.49	(29.08 - 31.90)	22.56	(20.92 - 24.20)
dia 42	28.27	(26.27 - 30.28)	22.87	(20.72 - 25.02)

Pel que fa a la concentració de beta-globulines, a la sèrie III s'han trobat valors significativament elevats en el grup artrític durant tot el període considerat ($p < 10^{-15}$), de manera que l'estimació del valor corresponent a un animal artrític des del dia 14 al 42 és de 18.34 (17.70 - 18.97) i per a un animal control és de 12.76 (12.14 - 13.38).

Els nivells de gamma-globulines quantificats en els animals artrítics són significativament més alts que els corresponents als animals control, durant tot l'estudi ($p < 10^{-4}$). Mitjançant l'anàlisi de la varianza de models lineals s'ha estimat el valor corresponent al grup artrític en 10.89 (10.31-11.47) i el valor del grup control en 9.13 (8.57 - 9.68).

El quocient albúmina/globulines (A/G) reflecteix les variacions observades en les quatre fraccions proteiques considerades. Els seus valors estan, per tant, significativament reduïts a causa de la patologia ($p < 10^{-2}$), i varien segons el dia de l'estudi. Les estimacions calculades han estat les següents:

	<u>GRUP ARTRÍTIC</u>		<u>GRUP CONTROL</u>	
	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>
dia 14	0.567	(0.503 - 0.630)	1.316	(1.262 - 1.369)
dia 21	0.603	(0.551 - 0.654)	1.280	(1.232 - 1.327)
dia 28	0.639	(0.591 - 0.686)	1.244	(1.193 - 1.295)
dia 35	0.674	(0.621 - 0.728)	1.207	(1.145 - 1.271)
dia 42	0.710	(0.644 - 0.777)	1.172	(1.092 - 1.251)

Fins aquí, només s'han tractat els resultats obtinguts en una sèrie experimental (sèrie III), però el proteïno-grama també s'ha determinat a les sèries II, V i VII. Els resultats obtinguts en aquestes sèries es troben a les taules XXI, XXII i XXIII respectivament. A la sèrie II i a les femelles de la sèrie V, les alteracions indicades per a la sèrie III es repeteixen, és a dir, la concentració d'albúmina disminueix significativament ($p < 10^{-3}$), els nivells de les alfa-globulines estan significativament augmentats ($p < 10^{-3}$), els valors de les beta-globulines són significativament més alts ($p < 10^{-6}$) i el quocient A/G està significativament reduït ($p < 10^{-3}$). Pel que fa als resultats corresponents a les gamma-globulines, aquesta fracció no varia en el cas de la sèrie V i augmenta significativament a la sèrie II ($p < 10^{-8}$).

Els resultats obtinguts a la sèrie experimental V permeten comparar les alteracions produïdes a causa de la patologia en femelles i en mascles. S'ha observat que els efectes de l'artritis no són iguals en ambdós sexes pel que fa als percentatges d'albúmina i alfa-globulines i al quocient A/G. Així, mentre l'albúmina disminueix el seu percentatge en un 27.35 (31.13 - 23.34) en les femelles artrítiques, només es redueix en un 16.27 (20.09 - 12.45) en els mascles; la diferència que hi ha entre els dos sexes, estimada en 5.48 (8.18-2.78), és significativa ($p < 10^{-3}$). De manera anàloga, els nivells d'alfa-globulines augmenten en un 18.96 (15.22 - 22.71) en les femelles del grup artrític i en un 12.76 (9.01 - 16.50) en els mascles, i la diferència estimada entre ambdós sexes és de 3.10 (0.48 - 5.72) amb un nivell de significació $p < 0.05$. En el quocient A/G queden paleses les desigualtats entre ambdós sexes: les femelles artrítiques redueixen els valors de A/G en 0.8905 (1.0209 - 0.7600) mentre que els mascles artrítics ho fan en 0.5643 (0.6948 - 0.4339); la diferència entre femelles i mascles és significativa ($p < 10^{-3}$) i s'ha estimat en 0.1631 (0.2543 - 0.0718). A la taula XII també es poden observar els resultats corresponents a un grup

TAULA XXI: Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE II)

DIA	ALBÚMINA		α-GLOBULINES		β-GLOBULINES		γ-GLOBULINES		QUOCIENT A/G	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
14	m	49.30	18.75	25.27	13.39	23.78	10.01	12.58	1.030	0.232
	e n	1.496 7	0.821 6	1.152 8	2.124 6	0.365 8	0.404 5	1.218 8	1.845 6	0.0254 6
21	m	-	19.14	-	-	21.00	-	13.76	-	0.238
	e n	-	1.044 6	-	43.91 7	1.745 6	0.335 6	-	0.803 7	-
28	m	48.34	21.73	26.58	44.12	18.82	11.30	16.69	0.946	0.283
	e n	1.422 8	1.929 7	0.717 8	0.774 6	0.523 8	0.813 7	0.800 8	1.000 7	0.0536 8
35	m	-	29.22	-	34.20	17.14	-	19.15	-	0.424
	e n	-	2.542 7	-	2.347 7	0.509 6	-	0.977 7	-	0.0513 7
42	m	47.88	29.20	26.92	35.97	18.08	12.51	17.82	0.930	0.425
	e n	1.454 8	2.651 7	0.521 8	1.764 7	0.721 8	0.956 7	0.543 7	0.0561 8	0.0577 7

TAULA XXII: Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE IV)

DIA	ALBÚMINA		α-GLOBULINES		β-GLOBULINES		γ-GLOBULINES		QUOCIENT A/G		
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	
<u>MASCLES</u>											
21	m	55.72	38.50	18.19	31.93	15.49	23.58	9.51	7.53	1.272	0.639
	e	1.743	2.117	1.434	1.650	1.037	0.646	0.673	0.716	0.0846	0.0569
n	5	8	5	8	5	8	5	8	5	8	8
<u>FEMELLES</u>											
21	m	57.27	29.42	14.20	37.54	14.25	22.57	11.03	10.76	1.346	0.420
	e	1.110	1.247	3.528	2.267	0.759	1.468	1.082	0.784	0.0572	0.0247
n	5	8	5	8	5	8	5	8	5	8	8
<u>CONTROL INGESTA</u>											
<u>MASCLES</u>											
21	m	55.99	55.20	20.59	19.45	17.85	15.41	8.72	9.93	1.139	1.246
	e	1.415	1.417	1.177	0.825	0.977	0.626	0.493	0.445	0.065	0.064
n	7	8	7	8	7	8	7	7	8	7	8
<u>FEMELLES</u>											

control al qual s'ha donat la mateixa quantitat d'aliment que la ingerida pel grup artrític.

A la taula XXIII s'expressen els resultats de la sèrie VII, sèrie que estudia la primera fase de la patologia. L'evolució de les diferents fraccions proteiques es pot observar a la figura 22. Les alteracions del proteïnograma ja es manifesten el tercer dia de la inducció, així, l'albúmina es troba significativament reduïda ($p < 10^{-8}$), les fraccions alfa i beta augmenten significativament ($p < 10^{-5}$) mentre que les gamma-globulines romanen inalterades. El quocient A/G també està significativament reduït el tercer dia ($p < 10^{-11}$).

Cal esmentar que el temps, és a dir, els primers 14 dies després de la inducció, ha estat una causa significativa en els resultats d'albúmina i alfa i beta-globulines ($p < 0.005$). Les estimacions i els límits fiducials de les concentracions de cada fracció proteica i del quocient A/G al llarg de l'estudi són els següents:

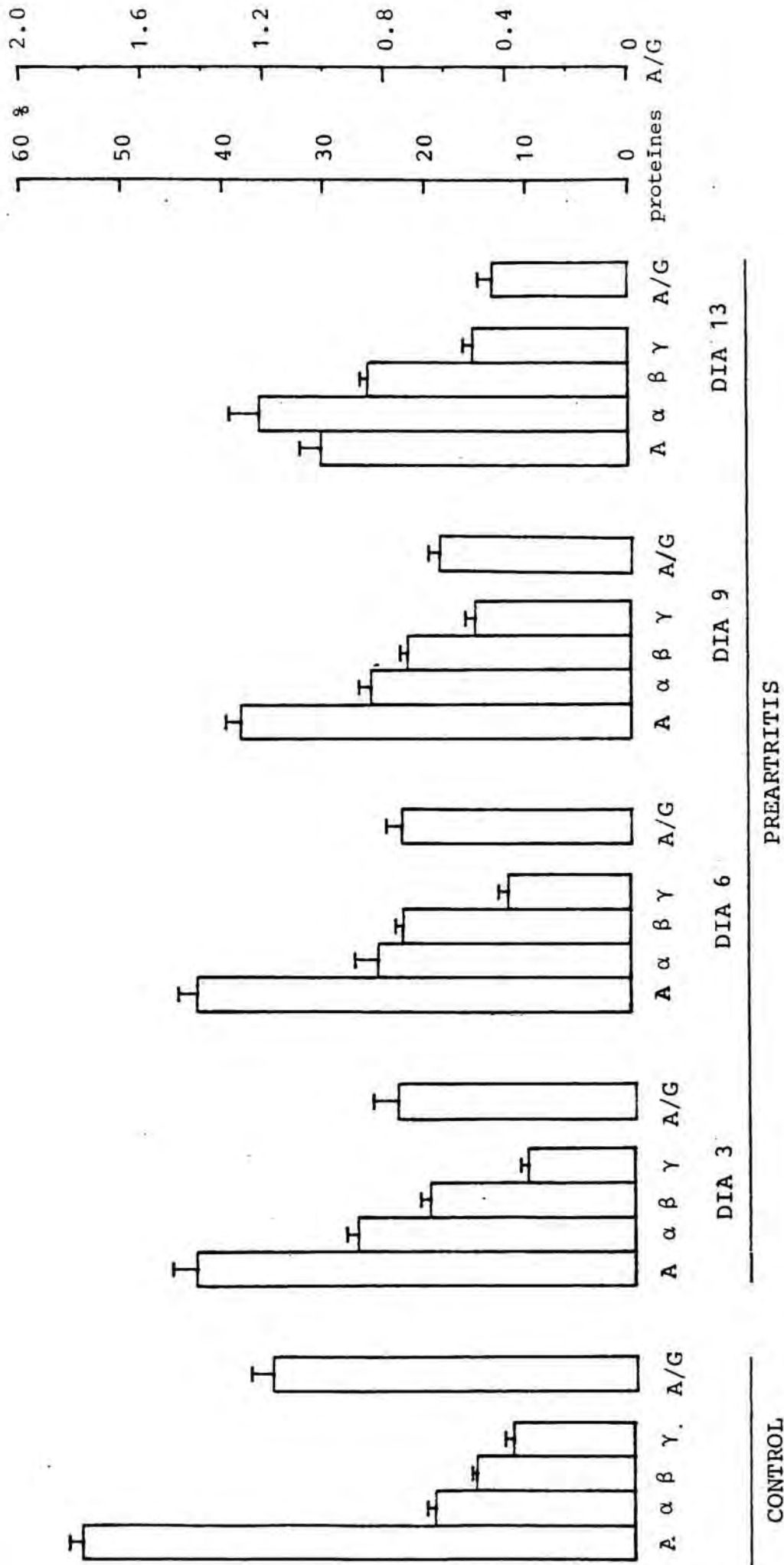
ALBÚMINA

	GRUP PREARTRÍTIC		GRUP CONTROL	
	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>
dia 3	42.30	(39.69 - 44.92)	57.44	(54.23 - 60.65)
dia 6	39.80	(37.69 - 41.92)	54.94	(52.02 - 57.87)
dia 9	37.31	(35.24 - 39.37)	52.45	(49.45 - 55.44)
dia 13	33.98	(31.28 - 36.68)	49.12	(45.54 - 52.70)

ALFA-GLOBULINES

dia 3	23.18	(20.94 - 25.43)	20.03	(17.47 - 22.58)
dia 6	26.34	(24.53 - 28.15)	20.02	(17.55 - 22.49)
dia 9	29.49	(27.40 - 31.58)	20.01	(17.13 - 22.90)
dia 13	33.69	(30.50 - 36.89)	20.00	(16.07 - 23.94)

FIGURA 22: Evolució del proteïnograma (SÈRIE VII)



TAULA XXIII: Evolució de les diferents fraccions proteiques (SÈRIE VII)

		ALBÚMINA	α-GLOBULINES	β-GLOBULINES	γ-GLOBULINES	QUOCIENT A/G
CONTROL	m e n	54.17 1.382 15	19.47 0.808 15	15.35 0.492 15	11.78 0.822 15	1.190 0.0712 14
PREARTRITIS DIA 3	m e n	42.90 2.426 8	27.09 1.020 8	19.95 0.985 8	10.37 0.744 8	0.775 0.0807 8
PREARTRITIS DIA 6	m e n	42.50 1.839 7	24.74 2.284 7	22.24 0.772 7	11.90 0.962 7	0.749 0.0527 7
PREARTRITIS DIA 9	m e n	38.24 1.495 8	25.45 1.198 8	21.79 0.772 8	15.15 0.975 8	0.626 0.0383 8
PREARTRITIS DIA 13	m e n	30.09 2.104 8	36.21 2.956 8	25.53 0.705 8	9.91 1.077 8	0.440 0.0451 8

BETA-GLOBULINES

	GRUP PREARTRÍTIC		GRUP CONTROL	
	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>	<u>estimacions</u>	<u>lím. fiducials</u>
dia 3	18.77	(17.81 - 19.74)	16.42	(15.32 - 17.51)
dia 6	20.83	(20.05 - 21.60)	16.11	(15.05 - 17.16)
dia 9	22.88	(21.99 - 23.77)	15.80	(14.56 - 17.03)
dia 13	25.62	(24.25 - 26.99)	15.39	(13.70 - 17.07)

QUOCIENT A/G

dia 3	0.796	(0.719 - 0.873)	1.301	(1.206 - 1.396)
dia 6	0.701	(0.639 - 0.763)	1.206	(1.118 - 1.294)
dia 9	0.606	(0.546 - 0.667)	1.111	(1.019 - 1.203)
dia 13	0.480	(0.400 - 0.559)	0.984	(0.874 - 1.095)

Els resultats del proteïnograma de les sèries II, III, V i VII es correlacionen significativament amb molts dels paràmetres considerats anteriorment. A la taula XXIV es troben els coeficients de correlació i els nivells de significació obtinguts.

L'artritis adjuvant no indueix cap canvi en la concentració proteica sèrica total. A la taula XXV es troben resumits els valors corresponents a la sèrie II.

8.2. GRUPS SULFHIDRIL SÈRICS

La determinació dels grups sulfhidril del sèrum o plasma tant humà com de rata es basa en la reacció colorimètrica amb un compost aromàtic descrita per primera vegada per Ellman (1959). Els grups sulfhidril de les proteïnes reaccionen amb l'àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) (DTNB) i alliberen un compost acolorat que es pot mesurar espectrofotomètricament. Aquesta reacció comprèn l'intercanvi entre els grups

TAULA XXIV: Correlacions entre els resultats corresponents al proteïnograma i diferents paràmetres

	ALBÚMINA	α -GLOBULINES	β -GLOBULINES	γ -GLOBULINES	QUOCIENT A/G
INCREMENT DE PES (%)					
sèrie II (n = 33)	0.5941 p < 0.01	-0.5348 p < 0.01	-0.6340 p < 0.01	N.S.	0.5648 p < 0.01
sèrie III (n = 74)	0.6601 p < 0.01	-0.5949 p < 0.01	-0.5781 p < 0.01	N.S.	0.6871 p < 0.01
sèrie V (n = 17)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
sèrie VII (n = 20)	0.5681 p < 0.01	-0.4781 p < 0.05	-0.5906 p < 0.01	N.S.	0.4999 p < 0.05
PES FETGE (%)					
sèrie III (n = 74)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
PES MELSA (%)					
sèrie III (n = 74)	-0.8263 p < 0.01	0.6326 p < 0.01	0.6995 p < 0.01	N.S.	-0.7842 p < 0.01
PES TIMUS (%)					
sèrie III (n = 74)	0.4212 p < 0.01	-0.3407 p < 0.01	-0.2909 p < 0.05	N.S.	0.4003 p < 0.01
PES RONYONS (%)					
sèrie III (n = 74)	-0.6109 p < 0.01	0.6277 p < 0.01	0.4564 p < 0.01	N.S.	-0.5900 p < 0.01

TAULA XXIV: Continuació.

	ALBÚMINA	α -GLOBULINES	β -GLOBULINES	γ -GLOBULINES	QUOCIENT A/G
EXTREMITAT IPSILATERAL (ml)					
sèrie II (v = 33)	-0.8221 p < 0.01	0.7391 p < 0.01	0.6499 p < 0.01	0.5550 p < 0.01	-0.8087 p < 0.01
sèrie III (v = 74)	-0.8061 p < 0.01	0.6957 p < 0.01	0.7204 p < 0.01	N.S.	-0.7815 p < 0.01
sèrie V (v = 17)	-0.8451 p < 0.01	0.7929 p < 0.01	0.7320 p < 0.01	N.S.	-0.8617 p < 0.01
sèrie VII (v = 20)	-0.8614 p < 0.01	0.8169 p < 0.01	0.8199 p < 0.01	N.S.	-0.8070 p < 0.01
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)					
sèrie II (v = 33)	-0.7190 p < 0.01	0.7116 p < 0.01	0.5705 p < 0.01	0.3726 p < 0.05	-0.6876 p < 0.01
sèrie III (v = 74)	-0.7474 p < 0.01	0.6340 p < 0.01	0.5524 p < 0.01	N.S.	-0.6811 p < 0.01
sèrie V (v = 17)	-0.8475 p < 0.01	0.8800 p < 0.01	0.4996 p < 0.05	N.S.	-0.8111 p < 0.01
sèrie VII (v = 20)	-0.5906 p < 0.01	0.7774 p < 0.01	0.4449 p < 0.05	N.S.	-0.4898 p < 0.05

TAULA XXV: Evolució de la concentració sèrica de proteïnes (g/dl)

DIA		PROTEÏNES SÈRIQUES TOTALS	
		CONTROL	ARTRITIS
14	m	6.537	6.250
	e	0.0869	0.1118
	n	7	6
21	m	-	6.900
	e	-	0.2878
	n	-	7
28	m	6.687	6.657
	e	0.1432	0.1065
	n	8	7
35	m	-	6.543
	e	-	0.1601
	n	-	7
42	m	6.557	6.328
	e	0.1232	0.1128
	n	7	7

prés dels quals es llegeix espectrofotomètricament a 440 nm (Spectronic 100, Bausch & Lomb).

Per a cada mostra es va realitzar un blanc barrejant 1.5 ml de la dilució 1/13 del sèrum amb 0.3 ml de la solució amortidora.

En cada experiment es va realitzar una corba estàndard a partir d'una solució al 0.01 % (162.69 $\mu\text{mol/l}$) de glutatió reduït en solució amortidora de fosfats. D'aquesta manera els resultats es van expressar com a $\mu\text{mol/l}$ de glutatió. L'estudi de la millor regressió de la corba estàndard es va realitzar amb un programa de l'ordinador Sharp MZ-80 B. A la figura 23 es pot observar la corba estàndard i l'estudi de les regressions corresponent a un experiment. En totes les determinacions es va utilitzar la regressió lineal i es van interpolar els resultats obtinguts amb el mateix programa de l'ordinador.

8.2.2. Resultats

La determinació dels grups sulfhidril sèrics (-SH) es va realitzar en quatre sèries experimentals: III, IV, V i VII. A la figura 24 es pot observar l'evolució dels nivells de -SH quantificats a la sèrie III. A la taula XXVI es resumeixen els valors numèrics d'aquests nivells, i a les taules XXVI i XXVII es poden observar les mitjanes i els errors estàndard determinats a les sèries IV i V.

A totes les sèries, l'artritis adjuvant ha produït una forta disminució en la concentració dels grups -SH sèrics, disminució que varia amb el temps, però que sempre és significativa ($p < 0.005$). Els resultats obtinguts a la sèrie V permeten observar les diferències entre mascles i femelles tant en el grup control com en el grup artrític, així com la manca d'influència de la ingesta. A continuació es de

```

y=bx+a N= 16 Asimptota= 1.272271
LINIAL      X      Y      .77511426E-02-0.02353072 0.059212037 0.98077336
LOGARITMICA  lnX  Y      0.3337545 -0.83624983 0.33572577 0.88337913
EXPONENCIAL  X      lnY  0.01978471-2.3428194 0.70095412 0.93056284
POTENCIAL    lnX  lnY  0.98937913 -4.9668053 0.075057508 0.97343658
PARABOLA V.  X      sqry  .58570904E-02 0.26200093 0.041895805 0.97575137
PARABOLA H.  sqrx  Y      0.11103253 -0.36363934 0.15390047 0.9432213
PARABOLA J.  sqrx  sqry  0.087028843-0.015301178 0.060255550 0.97954344
HIPERBOLA a1Y X      1/Y  -0.079433396 9.2929242 2.8921737 -0.7275522 4no
HIPERBOLA a1X 1/X  Y      -7.3931115 0.64042122 0.75555156 -0.70546352
MICHAELIS-M. 1/X  1/Y  128.68972 0.45983109 0.31807731 0.93921709
EXP. INV.     X  ln(C-Y) -0.032547057 1.1343724 4.8285061 -0.78654834 4no
EL MENOR ERROR Q. ES EL DE LA REGRESIO LINIAL: X Y
# de serie: 1,

```

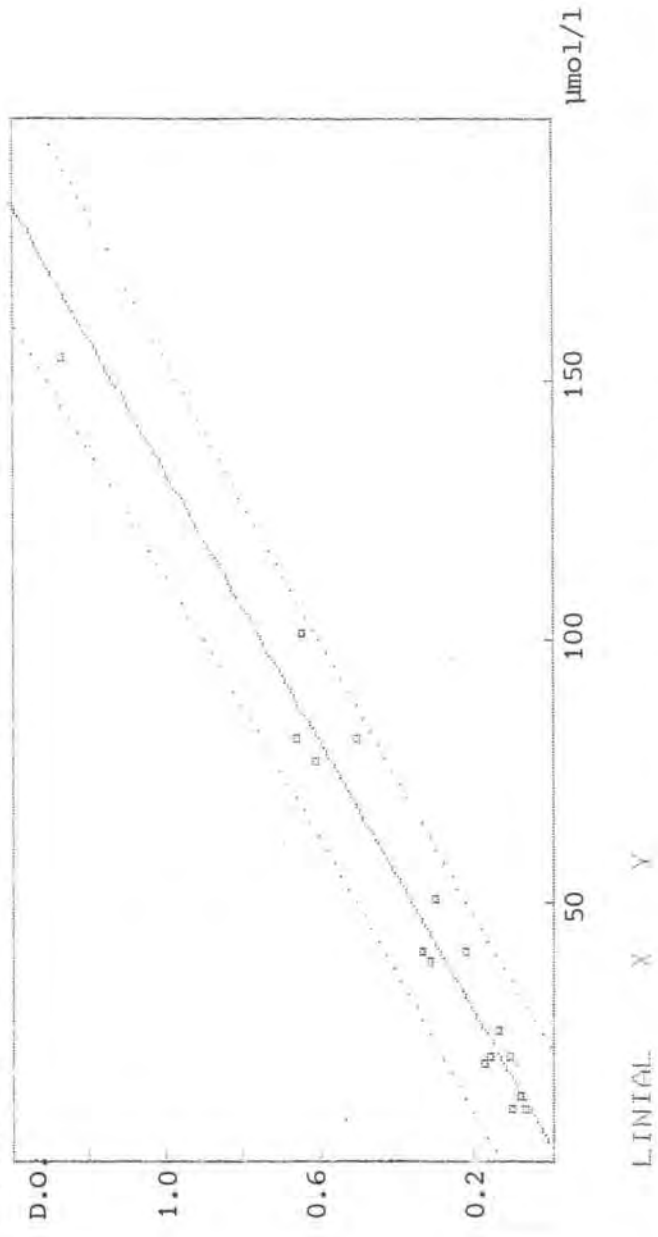
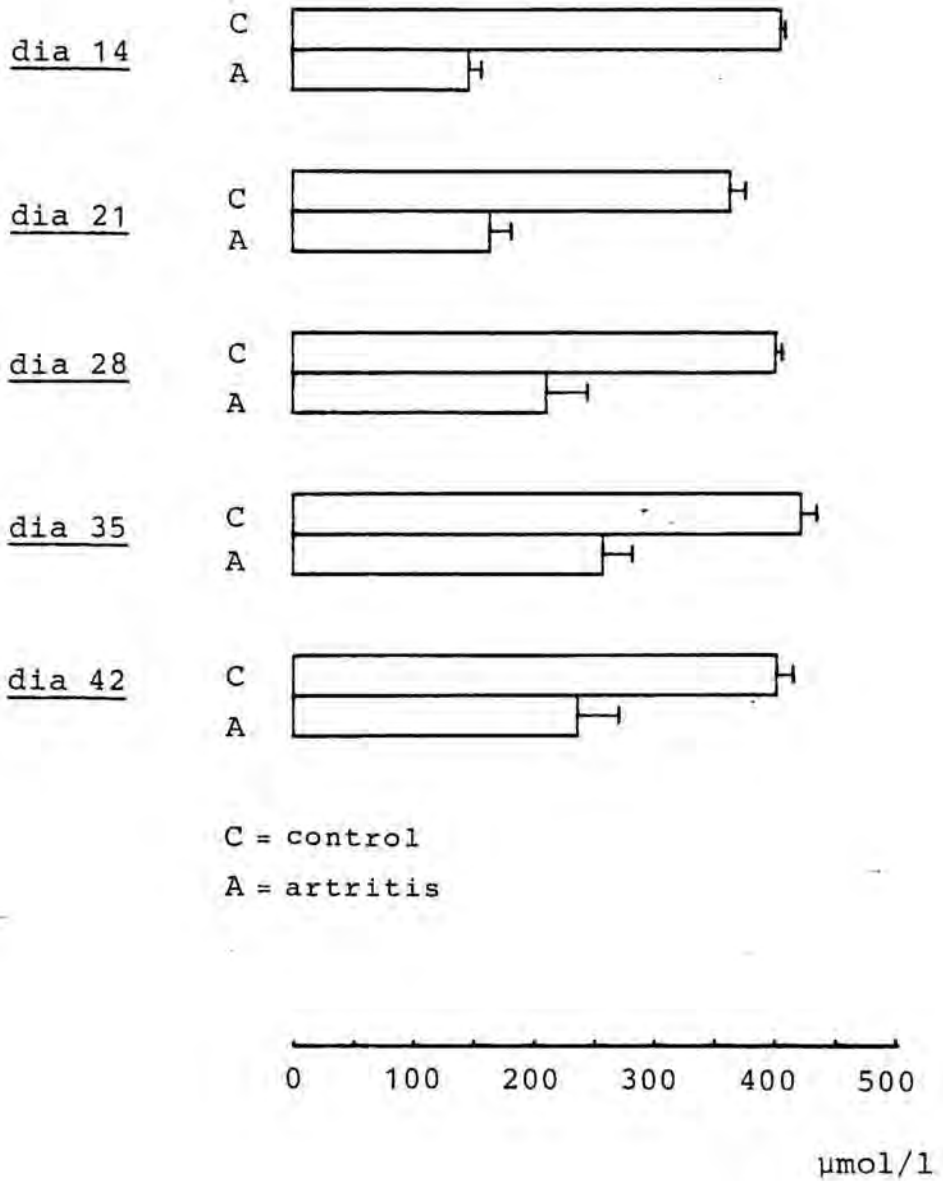


FIGURA 23: Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la determinació de grups sulfhidril sèrics

FIGURA 24: Evolució dels nivells de grups sulfhidril sèrics (SÈRIE III)



TAULA XXVI: Evolució de la concentració de grups sulfhidril sèrics ($\mu\text{mol/l}$)

DIA		SÈRIE III		SÈRIE IV	
		CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
0	m	429.09	-	315.93	-
	e	7.74	-	6.77	-
	n	8	-	8	-
14	m	405.92	147.57	318.08	123.43
	e	4.04	10.48	7.72	4.50
	n	7	8	8	6
21	m	363.96	164.76	339.52	182.63
	e	12.72	17.55	4.17	22.84
	n	8	7	8	7
28	m	400.98	211.14	347.64	176.31
	e	6.25	33.99	10.34	29.47
	n	8	8	8	7
35	m	422.40	257.55	-	-
	e	13.26	24.33	-	-
	n	8	12	-	-
42	m	414.74	235.98	-	-
	e	9.96	34.84	-	-
	n	8	12	-	-

TAULA XXVII: Evolució de la concentració de grups
sulfhidril sèrics ($\mu\text{mol/l}$) (SÈRIE IV)

DIA	GRUPS SULFHIDRIL		
	MASCLES	FEMELLES	
<u>CONTROL</u>			
21	m e n	327.01 6.72 5	373.79 12.95 4
<u>ARTRITIS</u>			
21	m e n	243.69 8.63 8	226.04 10.72 8
<u>CONTROL-INGESTA</u>			
21	m e n	341.36 10.83 8	378.15 5.04 8

tallen les estimacions de les diferències entre el grup artrític i el grup control al llarg del període estudiat, i també s'assenyalen les diferències entre mascles i femelles:

SÈRIE III

	<u>estimacions</u>	<u>límits fiducials</u>
dia 14	226.11	(259.23 - 193.00)
dia 21	202.12	(226.42 - 177.81)
dia 28	178.12	(201.11 - 155.14)
dia 35	154.12	(184.28 - 123.97)
dia 42	130.13	(171.78 - 88.48)

SÈRIE IV

dia 14	202.17	(226.80 - 177.54)
dia 21	172.56	(190.75 - 154.39)
dia 28	142.96	(170.65 - 115.27)

SÈRIE V

Diferència entre grup artrític i control. Femelles:	153.89	(177.22 - 130.56)
Diferència entre grup artrític i control. Mascles:	89.52	(111.68 - 67.36)
Diferència entre femelles i mascles artrítics:	32.18	(48.01 - 16.36)

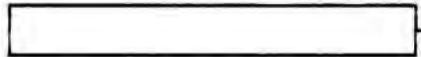
En aquestes tres sèries, la primera determinació correspon al dia 14, un cop establerta la patologia. Els resultats de la sèrie VII, esquematitzats a la figura 25, mostren l'evolució de la concentració de grups -SH durant la fase prèvia al dia 14. Els valors numèrics es troben resumits a la taula XXVIII. Aplicant l'anàlisi de la varianza de models lineals a aquests resultats, es troba que la inducció de la patologia implica una disminució significativa en la concentració de grups -SH ja al tercer dia ($p < 10^{-11}$). L'estima

CONTROL



PREARTRITIS

dia 3



dia 6



dia 9



dia 13

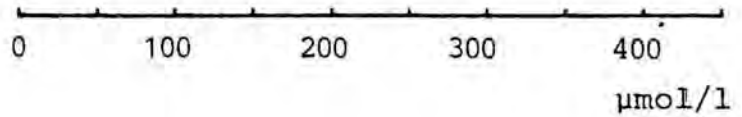


FIGURA 25: Evolució dels nivells de grups sulfhidril
sèrics (SÈRIE VII)

TAULA XXVIII: Evolució de la concentració de grups
sulfhidril sèrics ($\mu\text{mol/l}$) (SÈRIE VII)

			GRUPS SULFHIDRIL	
CONTROL			m e n	396.46 7.69 14
PREARTRITIS	DIA 3		m e n	260.29 6.21 6
PREARTRITIS	DIA 6		m e n	271.15 15.03 7
PREARTRITIS	DIA 9		m e n	294.60 12.75 8
PREARTRITIS	DIA 13		m e n	186.43 9.95 8

ció de la diferència entre el grup artrític i el grup control és de 138.59 amb uns límits fiducials de 167.52 i 109.66.

A la taula XXIX es pot observar l'estudi de les correlacions entre els nivells de grups -SH sèrics i els anteriors paràmetres estudiats, corresponents a les quatre sèries considerades.

TAULA XXIX: Correlacions entre els nivells de grups sulhidril
sèrics i diferents paràmetres

	sèrie III (v = 74)	sèrie IV (v = 60)	sèrie V (v = 17)	sèrie VII (v = 20)
INCREMENT DE PES (%)	0.7182 p < 0.01	0.5271 p < 0.01	N.S.	N.S.
PES FEIJE (%)	N.S.	N.S.	-	-0.6916 p < 0.01
PES MELSA (%)	-0.7738 p < 0.01	-	-	-0.7144 p < 0.01
PES TIMUS (%)	N.S.	-	-	N.S.
PES GLÀNDULES ADRENALS (%)	-	N.S.	-	-
PES RONYONS (%)	-0.5914 p < 0.01	-	-	-
EXTREMITAT IPSIATERAL (ml)	-0.7648 p < 0.01	-0.6919 p < 0.01	-0.8815 p < 0.01	-0.8914 p < 0.01
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	-0.6470 p < 0.01	-0.5735 p < 0.01	-0.7561 p < 0.01	-0.5912 p < 0.01
ALBÚMINA (%)	0.8892 p < 0.01	-	0.8409 p < 0.01	0.7788 p < 0.01
α-GLOBULINES (%)	-0.7779 p < 0.01	-	-0.7885 p < 0.01	-0.7514 p < 0.01
β-GLOBULINES (%)	-0.8100 p < 0.01	-	-0.7307 p < 0.01	-0.8059 p < 0.01
γ-GLOBULINES (%)	N.S.	-	N.S.	N.S.
QUOCIENT A/G	0.8920 p < 0.01	-	0.8575 p < 0.01	0.7456 p < 0.01

9. DETERMINACIONS IMMUNOLÒGIQUES

9.1. ACTIVITAT COMPLEMENTÀRIA TOTAL SÈRICA

Una de les nombroses vies per a estimar la funcionalitat del sistema del complement és la determinació de l'activitat hemolítica total. Aquest resultat representa la suma de tots els components del sistema.

Si es posa en contacte sèrum amb complement i hematies de moltó sensibilitzades amb anticossos, es produeix la lisi de les hematies, la qual es pot mesurar per l'alliberament d'hemoglobina.

En les tècniques d'immunodifusió radial es col·loca el sèrum problema en un pou de dimensions precises i es deixa difondre a través del gel d'agarosa que conté eritròcits de moltó estandaritzats i sensibilitzats amb hemolisina. Si totes les proteïnes del complement estan presents en quantitats suficients, es lisaran les hematies incorporades a l'agarosa i es formarà un anell molt clar. Amb una concentració coneguda de complement es pot realitzar una corba estàndard.

9.1.1. Material i mètodes

Per a l'anàlisi del complement total s'han utilitzat els reactius Quantiplate® de "Kallestad Laboratories, Inc.":

- Plaques d'immunodifusió amb 2.4 ml d'una barreja d'agarosa-solució salina amortidora, pH 6.9, i amb un 0.2 % d'hematies de moltó sensibilitzades amb hemolisina,
- Sèrum de referència, preparat a partir de sèrum de conills d'Índies, amb una concentració indicada per a cada lot.

La tècnica es pot resumir com segueix:

Es deixen atemperar les plaques i el sèrum de referència. Es reconstitueix aquest i es preparen diferents dilucions amb sèrum fisiològic. S'afegeixen 5 μ l de cada dilució de sèrum de referència i de cada sèrum problema sense diluir, als corresponents pous. Es tapen les plaques, es deixen 5 minuts perquè el sèrum difongui i s'incuben invertides durant 6 hores a 37 °C.

La lectura es realitza mesurant el diàmetre de l'anell.

A la figura 26 es pot observar l'estudi de les regressions i de la corba estàndard realitzada segons la regressió lineal, corresponent a un dels experiments. Els diàmetres mesurats de les mostres problema s'han interpolat sempre a partir de la regressió lineal.

9.1.2. Resultats

A la sèrie experimental II s'ha determinat l'activitat complementària sèrica total. A la figura 27 es troben representats els corresponents nivells al llarg de l'estudi i a la taula XXX es resumeixen aquests valors.

Mitjançant l'anàlisi de la variança de models lineals s'ha trobat que els nivells d'activitat complementària total determinats en els animals artrítics són significativament més baixos que els corresponents als animals control ($p < 10^{-4}$). S'ha pogut estimar que el valor mig representant del grup artrític és de 49.38, amb uns límits fiducials de 45.55 i 53.23, mentre que el valor mig del grup control s'ha estimat en 65.52, amb uns límits fiducials de 59.18 i 71.87.

No s'ha trobat cap correlació significativa entre els nivells d'activitat complementària i els anteriors resultats exposats per a la sèrie II.

y=bx+a N= 23 Asimptota= 5,1061.

Model	Y	Y	Y	Y	Y	Y
LINIAL	X	Y	0,015547829	4,0902062	0,37652062	0,57795387
LOGARITMICA	lnX	Y	0,78719455	1,9787306	1,1945629	0,9282693
EXPONENCIAL	X	lnY	0,30090236F-02	1,4264865	0,37686623	0,9773740
POTENCIAL	lnX	lnY	0,15490587	1,0093933	0,97985427	0,94158102
PARABOLA v.	X	sqY	0,34166735E-02	2,0322749	0,37270791	0,97829001
PARABOLA h.	sqX	Y	0,2355874	3,296316	0,58876639	0,96531265
PARABOLA l.	sqX	sqY	0,051935837	1,8565655	0,52784275	0,94883124
HIPERBOLA a1Y	X	1/Y	-0,58704625E-03	0,23706855	0,40908865	0,97518881
HIPERBOLA a1X	1/X	Y	-24,207293	5,6925144	3,1056814	-0,80025074
MICHAELIS-M.	1/X	1/Y	0,96974399	0,17507968	2,7164842	0,84675614
EXP. INV.	X	ln(C-Y)	-0,038798951	1,7495064	11,368059	-0,80895621

EL MENOR ERROR Q. ES EL DE LA REGRESSIO PARABOLA v.: X sqY

de serie: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

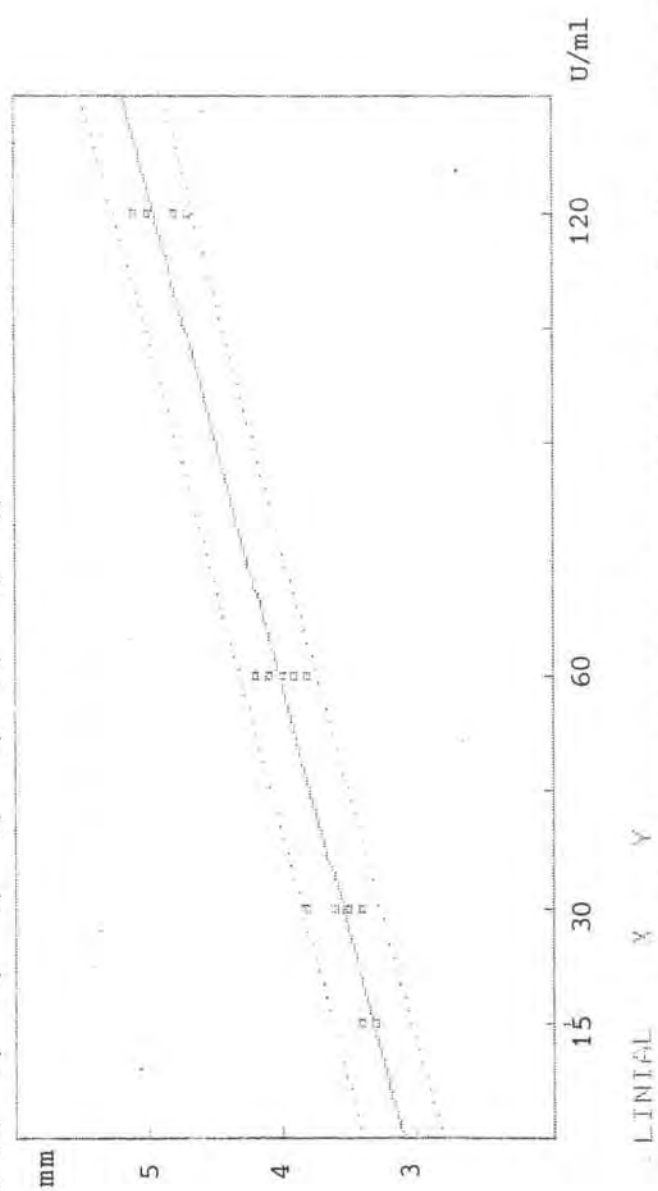


FIGURA 26: Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la determinació de l'activitat complementària total.

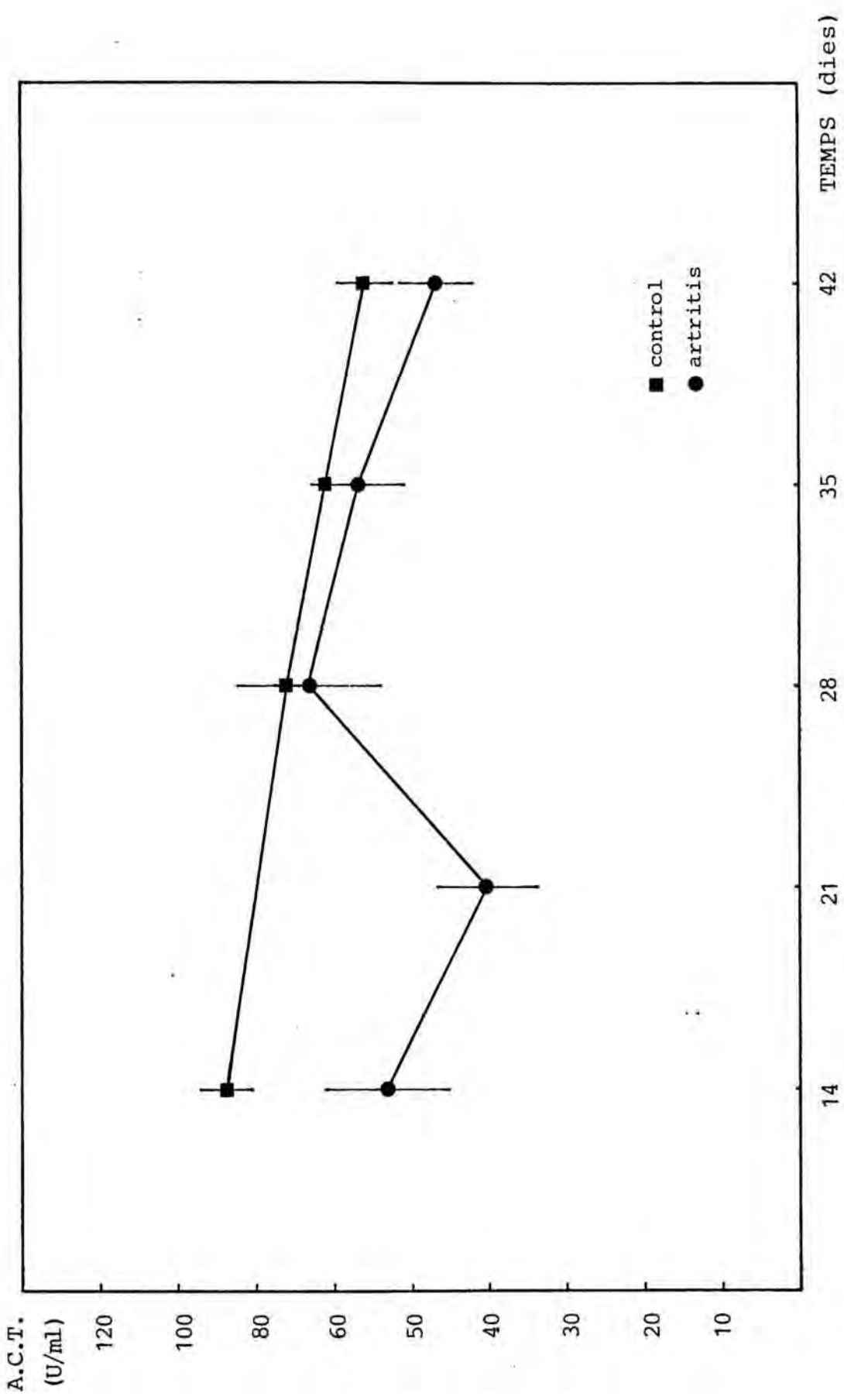


FIGURA 27: Evolució dels nivells d'activitat complementària total

TAULA XXX: Evolució de l'activitat complementària sèrica total (U/ml)

DIA		ACTIVITAT COMPLEMENTÀRIA TOTAL	
		CONTROL	ARTRITIS
14	m	73.78	53.15
	e	3.424	8.040
	n	8	6
21	m	-	40.13
	e	-	6.497
	n	-	7
28	m	65.86	63.10
	e	1.677	9.279
	n	7	7
35	m	-	56.67
	e	-	6.071
	n	-	7
42	m	55.75	46.56
	e	3.674	4.745
	n	7	7

9.2. ANTICOSSOS ANTINUCLEARS

L'anàlisi dels anticossos antinuclears (ANA) es realitza principalment en sèrums de pacients amb diferents malalties del teixit conjuntiu i principalment amb lupus eritematós sistèmic. En l'artritis reumatoide s'han trobat ANA en el 35 - 39 % de pacients seropositius i en el 10 % de malalts seronegatius, quasi sempre a baixes titulacions (Aitcheson, 1980).

La tècnica d'immunofluorescència és la més utilitzada per detectar aquests autoanticossos, que pertanyen principalment a la classe IgG, encara que també se'n han descrit del tipus IgM. Aquesta tècnica es basa en la propietat dels anticossos ANA de no ser específics d'òrgans o d'espècies. Així, a la primera fase de la prova es fan reaccionar els anticossos antinuclears amb l'antigen nuclear situat sobre un portaobjectes. Després d'un procés de rentat, es revela el resultat amb anticossos antiimmunoglobulines de rata marcats amb fluoresceïna i posteriorment al rentat del conjugat, es visualitza la reacció amb un microscopi adient per a fluorescència.

9.2.1. Material i mètodes

En aquesta tècnica el material utilitzat ha estat el següent:

- Portaobjectes amb el substrat (cèl.lules de ronyó de ratolí), de Quantafluor[®], Kallestad,
- Conjugat antiimmunoglobulines de rata/FITC (Dako, F-234),
- Conjugat antiimmunoglobulines humanes/FITC de Quantafluor[®], Kallestad,
- Control positiu humà de Quantafluor[®], Kallestad,
- Control negatiu humà de Quantafluor[®], Kallestad,
- Solució salina amortidora preparada a base de fosfats (PBS), pH 7.2.

La tècnica de determinació d'ANA es pot resumir:

- 1.- Es descongela el nombre apropiat de portaobjectes i es deixen atemperar,
- 2.- Es col·loca el portaobjectes en una cambra humida i s'afegeixen 25 µl dels controls positiu i negatiu i dels sèrums problema diluïts 1/10 i 1/20,
- 3.- S'incuba 30 minuts a temperatura ambient i a la foscor,
- 4.- Rentat: amb PBS, primer amb ajuda d'una pipeta Pasteur, i tenint en compte de no aplicar-lo directament sobre la mostra; després es submergeix el portaobjectes en un recipient amb la solució i es deixa 15 minuts, canviant el PBS entre mig,
- 5.- Es treu el portaobjectes i s'asseca l'excés de PBS,
- 6.- Es col·loca en una cambra humida i es posa una gota de l'antisèrum corresponent conjugat amb fluoresceïna: anti-sèrum anti-humà/FITC sobre els controls, i anti-sèrum anti-rata/FITC sobre els sèrums problema. També s'afegeix anti-sèrum anti-rata/FITC sobre els controls humans,
- 7.- S'incuba a temperatura ambient durant 30 minuts a la foscor,
- 8.- Es repeteix el rentat,
- 9.- Es monta el cubreobjectes i s'observa en un microscopi especial per a fluorescència (Leitz Dialux, provist de dispositiu de fluorescència per a llum incident Ploemopak 2.3).

9.2.2. Resultats

S'han estudiat diferents sèrums d'animals artrítics de la sèrie experimental II i no s'han observat anticossos antinuclears. Aquests sèrums eren representatius dels diferents estadis de la malaltia i s'han analitzat conjuntament amb sèrums control. La possibilitat d'un resultat negatiu a causa d'un dèficit per part del conjugat s'ha de rebutjar pel fet d'observar fluorescència en el control humà positiu, malgrat la diferent especificitat del conjugat.

9.3. ANTICOSSOS ANTIIMMUNOGLOBULINES

9.3.1. Metodologia preparativa: fraccionament salí

Les diferents classes d'immunoglobulines difereixen entre si, i d'altres proteïnes sèriques, per la seva solubilitat en les solucions aquoses, la seva mida molecular, la seva densitat electrostàtica i pel punt isoelèctric.

En augmentar la concentració salina del medi, es produeix una interferència en la interacció de les molècules d'aigua amb els grups polars de les molècules proteiques, s'origina una interacció hidrofòbica més gran entre les molècules i s'insolubilitzen. La concentració salina a la qual cada proteïna precipita és diferent, però entre molècules estretament relacionades, com les immunoglobulines, la diferència no és suficient com per donar un alt grau de puresa. Aquest procediment, però, serveix per a separar l'albúmina, que queda en solució, mentre precipiten les immunoglobulines.

La precipitació mitjançant sulfat amònic és la tècnica més utilitzada.

9.3.1.1. Material i mètodes

Els reactius necessaris per al fraccionament salí són:

- Solució saturada de sulfat amònic, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Es prepara dissolvent el sulfat amònic en aigua en proporció 1 kg/1 l, s'ha d'agitar i escalfar. Un cop la solució és transparent es deixa refredar tota la nit a temperatura ambient i posteriorment es filtra. S'ajusta el pH de la solució saturada a 7.2,
- Solució salina amortidora a base de fosfats (PBS), pH 7.2, 0.15 M.

La tècnica es pot resumir en les següents fases:

Es dissol el sèrum 1/2 amb sèrum fisiològic. Se li afegeix la solució saturada de la sal fins que quedi al 45 % V/V. L'addició ha de ser amb agitació i molt lenta.

Es deixa en agitació contínua durant 30 minuts a la temperatura ambient i després es centrifuga a 1,000 g durant 15 minuts a 4 °C.

El precipitat es renta amb una solució de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45 % i posteriorment es redissol en un volum de PBS igual al del sèrum inicial.

Es centrifuga per eliminar qualsevol material insoluble i es precipiten de nou les gamma-globulines utilitzant una concentració final de sulfat amònic del 40 % V/V.

Es centrifuga i es renta el precipitat amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40 %. El precipitat així obtingut es redissol en un volum mínim de PBS. El concentrat d'immunoglobulines resultant es dialitza contra PBS per eliminar l'excés de sal. Es deixa 48 - 72 hores i es canvia diverses vegades la solució amortidora.

La concentració proteica de la mostra resultant es mesura espectrofotomètricament a 280 nm (Espectrofotòmetre Beckman DB-G).

9.3.2. Tècnica d'aglutinació del làtex

Una de les tècniques més utilitzades en el diagnòstic de rutina per a la detecció de factor reumatoide en el sèrum de pacients amb artritis reumatoide és la tècnica d'aglutinació del làtex. Aquesta tècnica es basa en l'aglutinació experimentada per partícules de làtex sensibilitzades amb IgG humana, en presència d'un sèrum que conté FR (antiIgG) (Hudson i col.,

1979). A la figura 28 es pot veure un esquema d'aquesta tècnica.

Per tal d'investigar la presència de FR o d'algun tipus d'anticòs antiimmunoglobulina (antiIg) en el sèrum dels animals artrítics, vam sensibilitzar partícules de làtex amb immunoglobulines de rata i les vam enfrontar al sèrum artrític i al control, estudiant la possible aglutinació.

9.3.2.1. Reactius

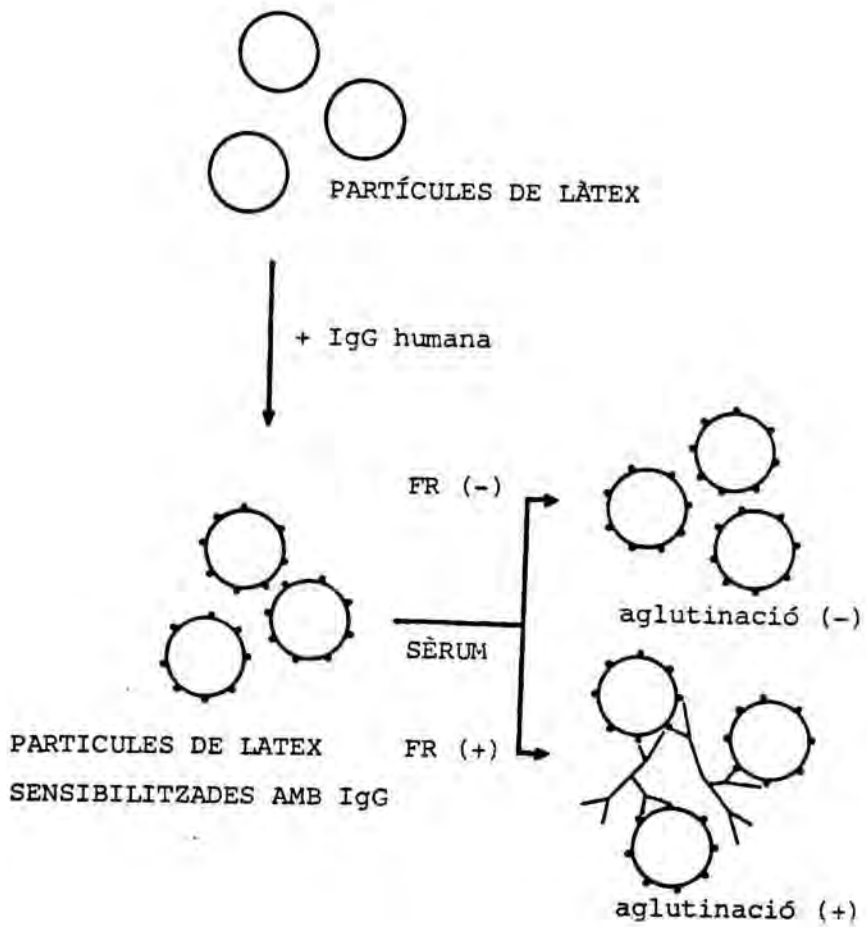
- Partícules de làtex de poliestirè, de 0.8 μm de diàmetre i un 20 % de pes sec, subministrades gentilment pel Dr. G. Solé Nolla (Derypol, Les Franqueses del Vallès, Barcelona),
- Solució salina amortidora de glicina (GBS), de pH 8.2 i preparada a partir de glicina 0.1 M i NaCl 0.17 M. S'utilitza per realitzar les dilucions del làtex,
- Solució salina amortidora de fosfats (PBS), de pH 7.2, 0.15 M. S'utilitza per realitzar les dilucions de les mostres,
- Antisèrum antiIgG de rata obtingut en conill (Miles-Yeda) amb una concentració de 4.0 mg/ml,
- Immunoglobulines de rata obtingudes a partir d'una barreja de sèrum de rates Sprague-Dawley control a través de la tècnica del fraccionament salí (apartat 9.3.1.).

9.3.2.2. Metodologia general

Preparació de làtex sensibilitzat: A una suspensió de làtex en GBS s'afegeix, lentament i amb agitació, una solució d'immunoglobulines de rata en GBS. Després d'incubar 1 hora a temperatura ambient i d'agitar, s'ajusta el pH a 8.2 i es deixa tota la nit a 4 °C. El dia següent, un cop atemperat el làtex sensibilitzat es mira de nou el pH.

L'estudi de la presència d'anticossos antiimmunoglobulines es va realitzar en portaobjectes. Per això, es barreja-

FIGURA 28: Esquema de la tècnica d'aglutinació del làtex



ven 25 µl de la preparació de làtex amb 25 µl de la mostra i s'observava la formació d'aglutinat durant 5 minuts, sense deixar d'agitar la mostra amb un suau moviment de vaivé.

En el cas d'un resultat positiu es procedia a la dilució de la mostra fins que no aglutinés. Els resultats s'han expressat com la inversa de l'última dilució que dóna una aglutinació positiva i se'ls ha anomenat títols de làtex.

La sensibilitat de cada preparació de làtex es va valorar enfrontant aquesta a dilucions seriades de l'antisèrum antiIgG de rata utilitzat com a referència en tots els experiments.

9.3.2.3. Ajust de les condicions experimentals

L'objectiu de la tècnica va ser trobar una preparació de làtex capaç de ser aglutinada pels sèrums procedents dels animals artrítics, i de donar reacció negativa davant dels sèrums control i les solucions amortidores.

Es va partir d'una suspensió 1/6 del làtex i es va sensibilitzar, al llarg de diferents experiments, amb concentracions d'immunoglobulines de rata entre 7.143 mg/ml i 44.64 µg/ml. Les preparacions de làtex obtingudes s'enfrontaven a diferents sèrums artrítics, a sèrums control i a les solucions amortidores, i a més es valoraven amb l'antisèrum antiIgG.

Els resultats obtinguts en els primers experiments van ser negatius per a ambdós tipus de sèrums i dèbilment positius per a l'antisèrum. Es va observar que la positivitat augmentava a mida que disminuïa la concentració d'immunoglobulines que sensibilitzaven les partícules de làtex (taula XXXI).

S'ha observat que l'addició d'albúmina estabilitza les preparacions de làtex (Niето, 1982). Aleshores vàrem fer dilu-

TAULA XXI: Estudi de diferents preparacions de làtex

LÀTEX	CONCENTRACIÓ Ig RATA	AGLUTINACIÓ AMB ANTIIGG
1	7.14 mg/ml	negativa
2	5.37 "	negativa
3	3.57 "	negativa
4	1.79 "	negativa
5	1.34 "	positiva fins 1/1
6	892.86 µg/ml	positiva fins 1/1
7	446.43 "	positiva fins 1/8
8	357.14 "	positiva fins 1/8
9	267.86 "	positiva fins 1/16
10	178.57 "	positiva fins 1/32
11	89.28 "	positiva fins 1/64
12	44.64 "	positiva fins 1/64

cions de làtex amb una barreja de sèrums control que constituïa la font de proteïnes. Aquesta barreja de sèrums control es va utilitzar a dilucions 1/50 i 1/100 en GBS. Les preparacions de làtex realitzades amb aquests sèrums se'ls anomenava làtex amb protecció 1/50 o 1/100. A la taula XXXII es poden comparar els resultats obtinguts per a una preparació de làtex sensibilitzada amb igual concentració d'immunoglobulines, però preparada amb protecció i sense.

La preparació de làtex òptima per a l'estudi de la presència d'anticossos antiimmunoglobulines (antiIg) va ser la suspensió resultant de barrejar en igual proporció una preparació amb 178.57 µg d'immunoglobulines de rata sense protecció i la mateixa preparació amb protecció 1/100. El reactiu així format era, de tots els assajats, el que millor discriminava un sèrum artrític d'un control, encara que la seva titulació amb l'antisèrum no fos gaire elevada.

9.3.2.4. Resultats

A les figures 29 i 30 es poden observar els títols individuals dels animals artrítics i control corresponents a les sèries II i III respectivament. El títol màxim determinat en el grup control és d'1, i per això s'ha considerat com a títol positiu aquell que és superior a la unitat. Aplicat aquest criteri, els percentatges de resultats positius en els animals artrítics han estat de 100 %, 86 %, 86 %, 29 % i 29 % els dies 14, 21, 28, 35 i 42 respectivament, per a la sèrie II; i per a la sèrie III han estat de 83 %, 50 %, 88 %, 75 % i 42 % els dies 14, 21, 28, 35 i 42 respectivament.

Mitjançant l'anàlisi de la varianza de models lineals, s'ha trobat que hi ha diferència significativa entre els valors obtinguts en els animals artrítics i els corresponents als animals control en ambdues sèries experimentals ($p < 10^{-7}$).

TAULA XXII: Estudi de preparacions de látex amb protecció i sense

LÀTEX	1	2	3
Concentració Ig rata	178.57 µg/ml	178.57 µg/ml	178.57 µg/ml
Protecció	NO	1/50	1/100
RESULTATS:			
PBS	-	-	-
GBS	-	-	-
Sèrum artritis	+	-	+
Sèrum control	-	-	-
Antisèrum antiIgG	+ fins 1/32	+ fins 1/4	+ fins 1/16

FIGURA 29: Evolució dels títols de làtex (SÈRIE II)

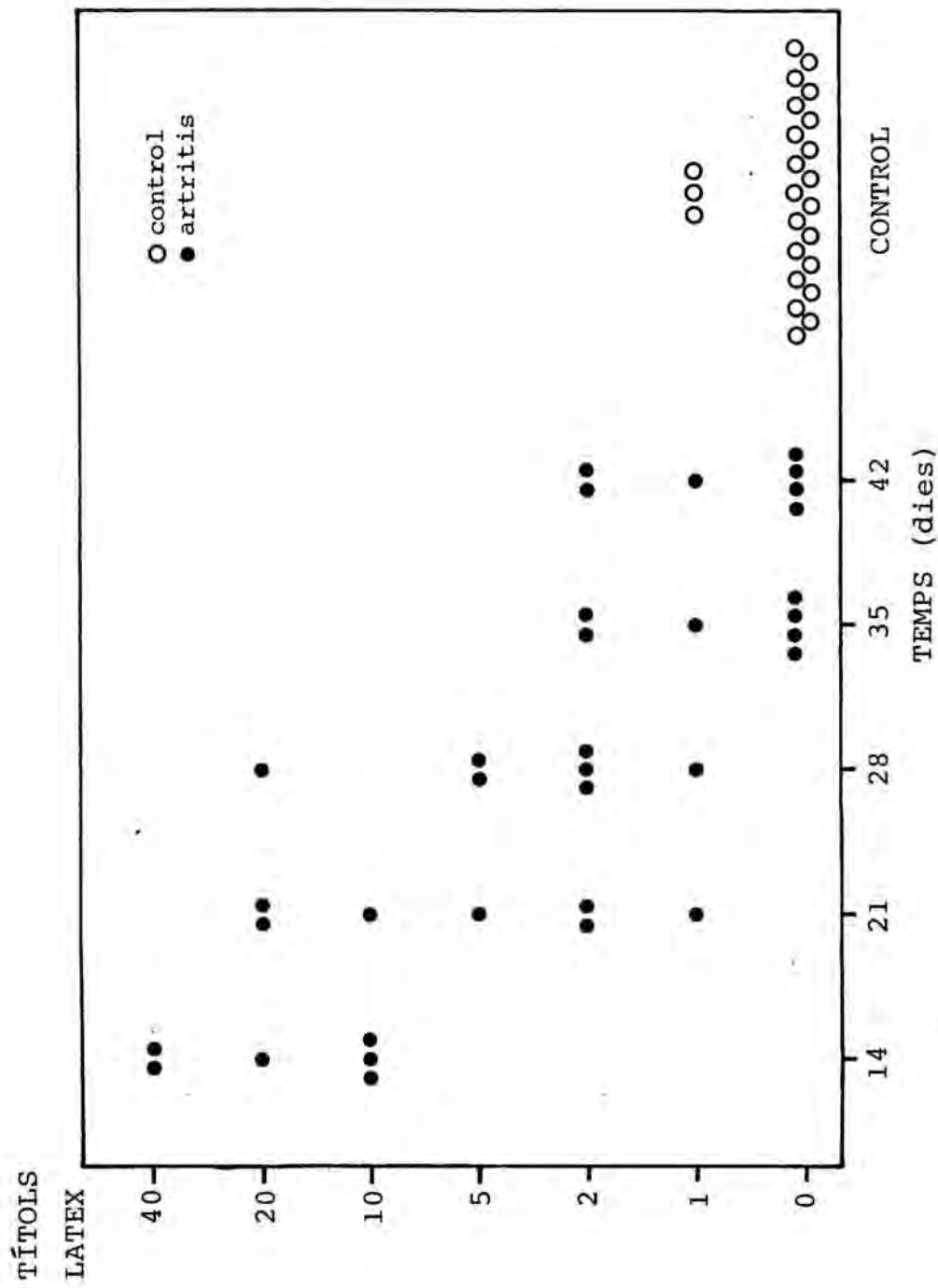
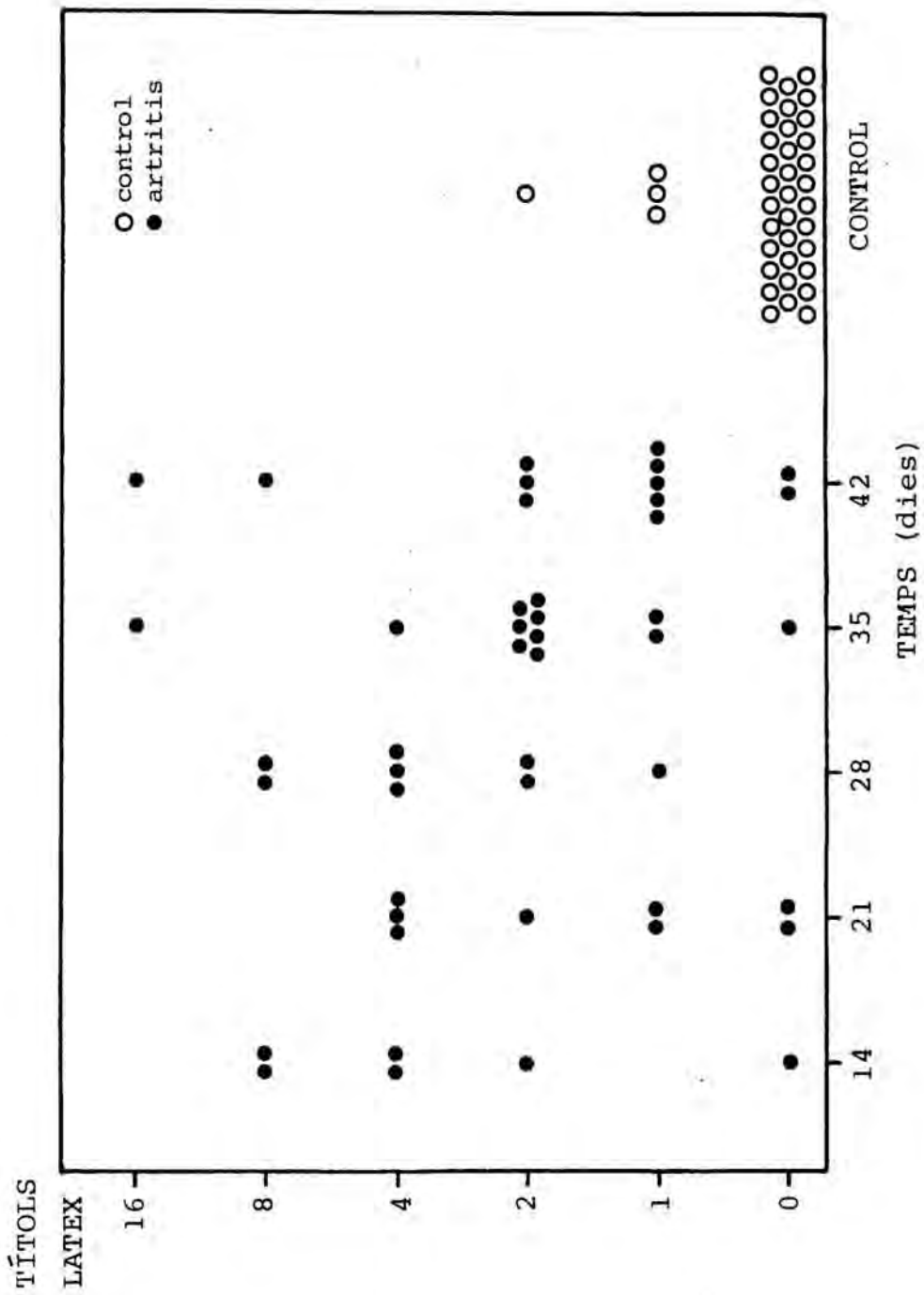


FIGURA 30: Evolució dels títols de làtex (SÈRIE III)



L'estudi de les correlacions dels resultats de la prova del làtex amb els anteriors paràmetres determinats s'ha realitzat mitjançant el test d'Spearman. En ambdues sèries experimentals s'ha observat una correlació significativa entre els títols de làtex i l'increment de volum de l'extremitat contralateral, els percentatges d'albúmina i alfa i beta-globulines i el quocient A/G. A la taula XXXIII es poden observar els coeficients d'Spearman i els nivells de significació de les correlacions estudiades.

9.3.3. Tècniques d'ELISA

Al 1971, Engvall i Perlmann van descriure per primera vegada una tècnica d'enzimoimmuno assaig en la qual la substància que es volia detectar reaccionava o bé amb un antigen o bé amb un anticòs, units a una superfície sòlida. Van anomenar aquesta tècnica "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA), i des de llavors s'han anat desenvolupant una gran quantitat d'aplicacions analítiques.

En aquest treball s'han utilitzat diferents variants d'ELISA per a la detecció i quantificació d'antiimmunoglobulines totals, d'antiIg de la classe IgG i d'immunoglobulina G.

En general les tècniques d'ELISA es basen en la detecció d'un antigen o d'un anticòs mitjançant la reacció d'aquests amb l'anticòs o antigen específics, respectivament, units a la fase sòlida, i la unió posterior d'un antigen o un anticòs marcats amb un enzim per a revelar la substància problema fixada.

Segons la naturalesa immunològica de la substància problema i segons el reactiu marcat enzimàticament, les tècniques d'ELISA es divideixen en:

- ELISA competitiu, en el qual una quantitat d'antigen que es

TAULA XXXIII: Correlacions entre els títols de làtex i diferents paràmetres (correlació d'Spearman)

	sèrie II (v = 56)	sèrie III (v = 104)
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	0.4514 p < 0.01	0.6031 p < 0.01
ALBUMINA (%)	-0.5582 p < 0.01	-0.5644 p < 0.01
α -GLOBULINES (%)	0.5818 p < 0.01	0.5051 p < 0.01
β -GLOBULINES (%)	0.5654 p < 0.01	0.5439 p < 0.01
QUOCIENT A/G	-0.5582 p < 0.01	-0.5809 p < 0.01
GRUPS SULFHIDRIL ($\mu\text{mol/l}$)	-	0.5674 p < 0.01

vol determinar competeix amb una concentració coneguda de l'antigen marcat enzimàticament per l'anticòs unit a la fase sòlida,

- ELISA no competitiu, que a la vegada es divideix en:
 - ELISA indirecte, utilitzat per a la detecció i mesura d'anticòssos,
 - ELISA sandvitx de doble anticòs, sistema de detecció i quantificació d'antígens.

En aquest treball s'ha aplicat un ELISA competitiu per a la quantificació d'anticòssos i també els dos mètodes d'ELISA no competitiu. De més a més s'han fet assaigs d'ELISA amplificat, tècnica amb la qual es pot obtenir encara més sensibilitat.

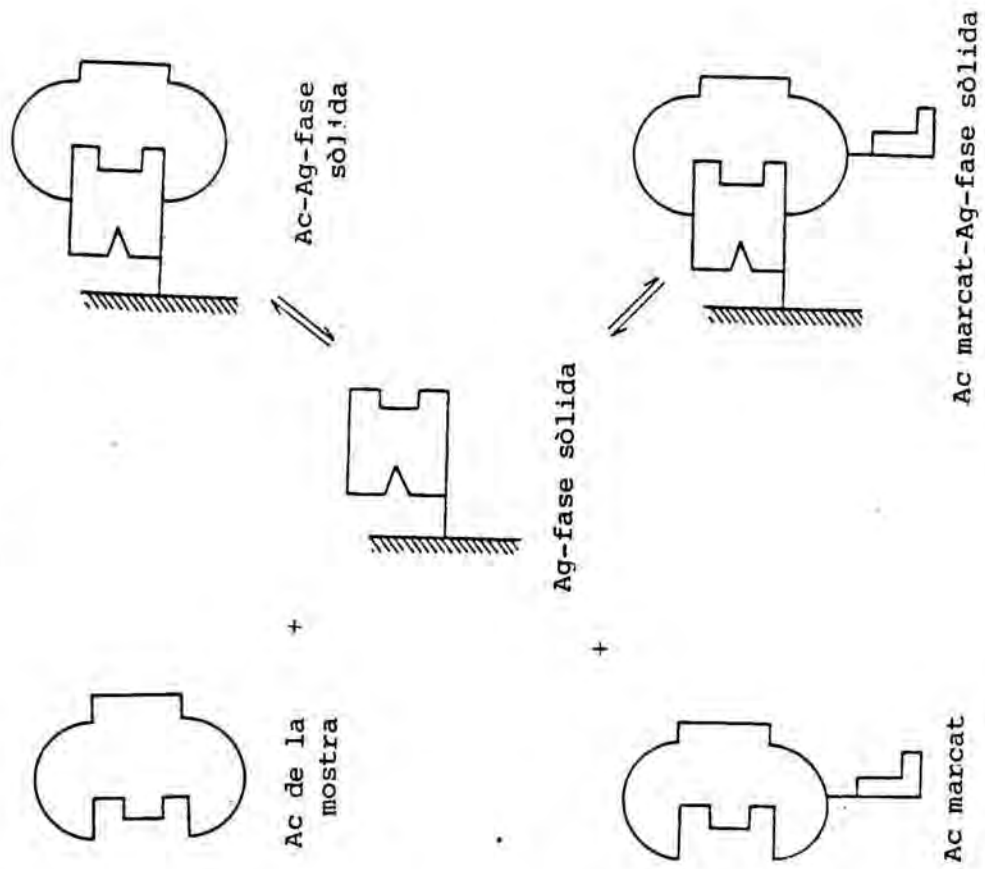
ELISA competitiu per a la detecció d'anticòssos (fig 31)

Basat en la tècnica d'Engvall i col. (1971), en aquest assaig s'absorbeix a la fase sòlida l'antigen específic per a l'anticòs problema. Després de rentar l'antigen no unit, s'afegeix, al mateix temps, la solució problema que conté l'anticòs i una quantitat coneguda del mateix anticòs marcat amb un enzim. Després d'incubar i de rentar s'afegeix un substrat enzimàtic que en degradar-se canvia de color. La quantitat de color es pot mesurar i és inversament proporcional a la concentració d'anticòs de la mostra.

ELISA no competitiu: ELISA indirecte (fig 31)

En aquesta tècnica no competitiva per a la detecció d'anticòssos, que es basa en la descrita per Engvall i col. (1972), s'uneix l'antigen específic a la fase sòlida; després de rentar la fracció no absorbida, s'afegeix el sèrum problema diluït i s'incuba. Posteriorment a un nou rentat, s'addi-

ELISA competitiu



ELISA indirecte

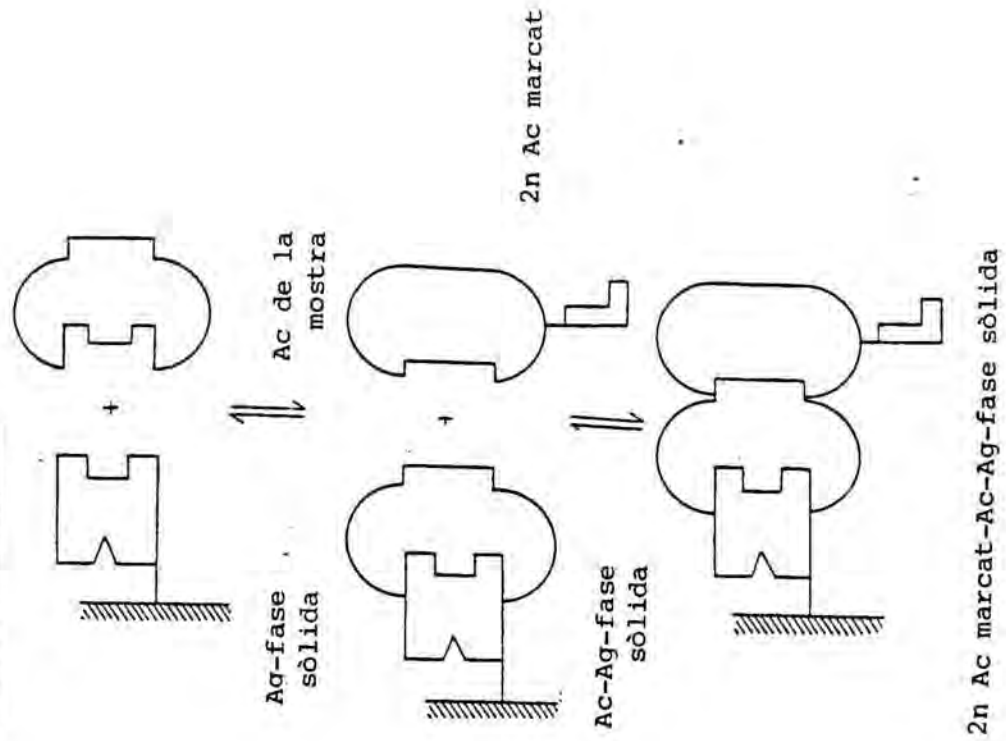


FIGURA 31: ELISA competitiu per a la detecció d'anticossos i ELISA indirecte

ciona antiimmunoglobulina marcada enzimàticament (anticòs produït en una espècie animal diferent de la del anticòs lligat), es deixa reaccionar i es renta. Per últim s'afegeix el substrat enzimàtic. La quantitat de color és proporcional a la concentració d'anticòs en el sèrum problema.

ELISA no competitiu: ELISA sandvitx de doble anticòs (fig 32)

S'anomena així perquè l'antigen problema és atrapat entre dos anticòs diferents, un dels quals conté l'enzim. Es basa en la tècnica de Clark i col. (1977).

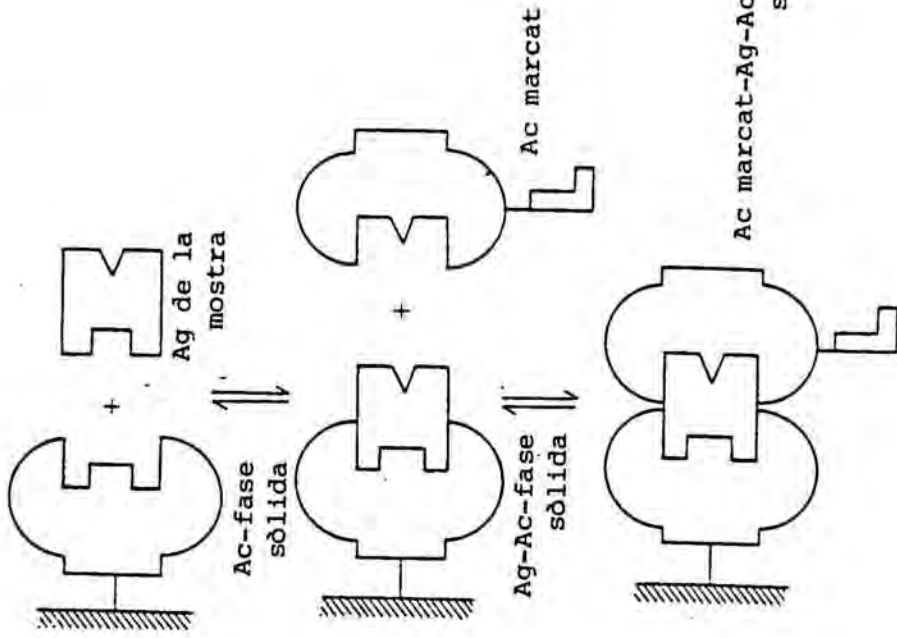
En aquest assaig s'uneixen a la fase sòlida immunoglobulines que contenen l'anticòs específic per a l'antigen que s'ha de determinar o bé l'anticòs específic purificat. Després de rentar s'incuba la solució problema que es creu que conté l'antigen. Posteriorment al rentat s'addiciona un anticòs específic marcat amb un enzim, es deixa reaccionar, es renta i s'afegeix un substrat enzimàtic. La quantitat de color desenvolupada és proporcional a la concentració d'antigen.

ELISA amplificat (fig 32)

Aquesta tècnica va ser utilitzada per primera vegada per Butler i col. (1978) per detectar anticòs en el sèrum de rata.

L'assaig és idèntic a l'ELISA indirecte fins a l'addició del conjugat enzimàtic. A l'ELISA amplificat s'addiciona antiimmunoglobulina marcada o no amb un enzim i després d'incubar i rentar, s'afegeix un nou anticòs obtingut contra l'antiimmunoglobulina. Aquest nou anticòs ha d'estar marcat enzimàticament. La unió d'un anticòs sobre l'altre produeix una amplificació de la resposta obtinguda en un ELISA indirecte.

ELISA sandvitx de doble anticòs



ELISA amplificat

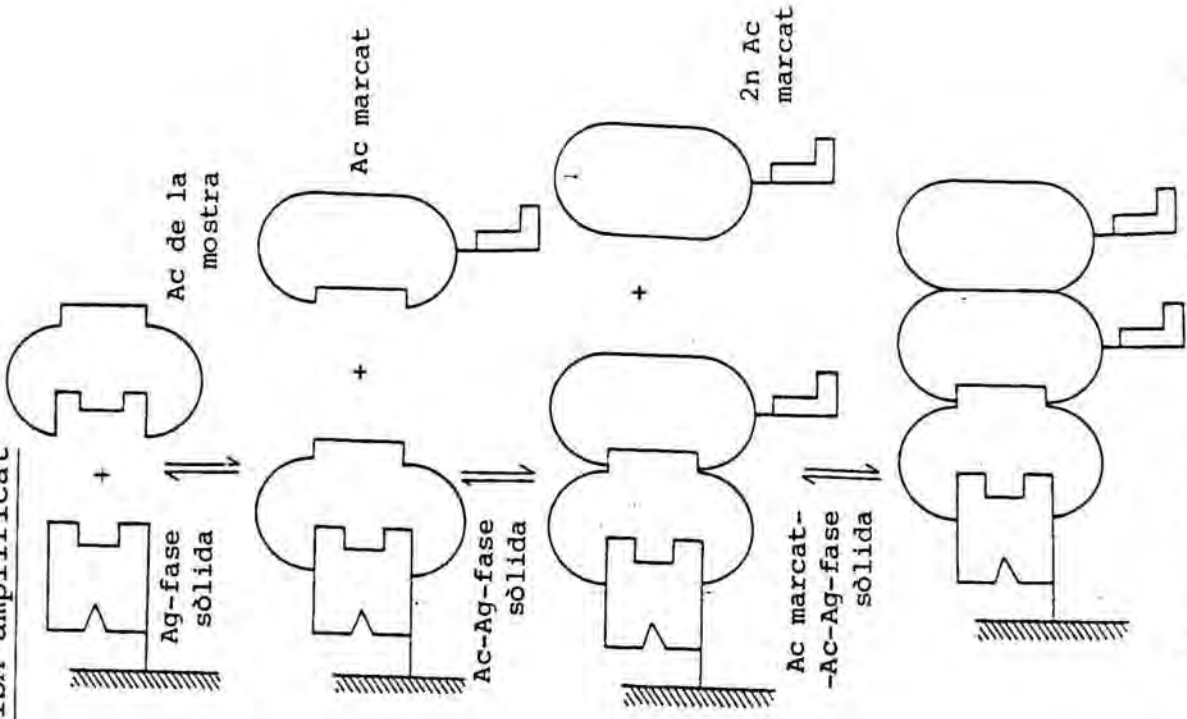


FIGURA 32: ELISA sandvitx de doble anticòs i ELISA amplificat

Ac marcat-Ac marcat-Ac-Ag-fase sòlida

9.3.3.1. Material

- Plaques microELISA de 96 pous, Dynatech® M-129-B (esterilitzades amb cobalt),
- Solució salina amortidora de fosfats (PBS), pH 7.2, 0.15 M,
- Tween 20, Merck,
- Albúmina bovina sèrica (BSA), Merck,
- Solució amortidora carbonat/bicarbonat, 0.1 M pH 9.6 preparada a partir de Na_2CO_3 i NaHCO_3 ,
- Solució amortidora de fosfats, 0.1 M pH 7, preparada a partir de KH_2PO_4 i Na_2HPO_4 ,
- Solució 2 M d'àcid sulfúric,
- Solució 180 mM d'àcid dimetilbenzoic (DMAB) pH 7, en solució amortidora de fosfats, pH 7. La concentració de la solució un cop preparada s'estableix llegint l'absorbància d'una dilució 1/120 a 305 nm i ha d'ésser de 1.287,
- Solució 1.8 mM de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) pH 6.5, en solució amortidora de fosfat pH 7. L'absorbància d'una dilució 1/10 a 285 nm ha de ser de 0.930,
- Immunoglobulina humana, obtinguda a partir del fraccionament salí d'una barreja de sèrums humans control procedent de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Es conserva en alíquotes a -20°C ,
- Immunoglobulines de ratolí (Ig-ratolí), obtingudes a partir del fraccionament salí d'una barreja de sèrums de ratolins. Es conserven a -20°C en alíquotes,
- Sèrum de referència de rates Sprague-Dawley i Wistar (Miles) amb 131.0 mg/dl d'IgM; 24.3 mg/dl d'IgA i 1,320 mg/dl d'IgG.
- Sèrum de ratolí i conill per neutralitzar les reaccions creuades,
- Antisèrum antiIgG de rata obtingut en conill (Miles). Es va realitzar el fraccionament salí d'aquest antisèrum per treballar amb la fracció globulínica i evitar així reaccions inespecífiques (antiIgG rata),
- Antisèrum antiimmunoglobulines de rata obtingut en conill,

- marcat amb peroxidasa (Dako) (antiIg rata-PO),
- Antisèrum antiIgG de rata obtingut en conill marcat amb peroxidasa (Miles) (antiIgG rata-PO),
 - Antisèrum antiimmunoglobulines de ratolí obtingut en conill marcat amb peroxidasa (Miles) (antiIg ratolí-PO),
 - Antisèrum antiimmunoglobulines de conill obtingut en cabra, marcat amb peroxidasa (Nordic) (antiIg conill-PO).

9.3.3.2. Metodologia general

Tots els assaigs realitzats han estat tècniques de microELISA, fets en plaques de poliestirè de 96 pous. L'addició dels reactius comuns per a tota la placa s'ha efectuat amb una pipeta de 8 canals (Titertek 7785900).

1) Adsorció a la fase sòlida:

L'adsorció de proteïnes a la placa segueix la isoterma de Langmuir (Langmuir, 1918), i es forma així una monocapa de proteïna unida hidrofòbica a un nombre limitat de llocs actius del plàstic. S'ha de determinar la concentració de proteïna capaç de saturar una certa superfície, que és diferent per a cada proteïna. L'ús de concentracions superiors pot donar lloc a una interacció proteïna-proteïna que produirà l'alliberament de part de la proteïna fixada durant els rentats.

Es prepara la dilució adient d'antigen o d'anticòs en solució amortidora de carbonat pH 9.6. S'afegeixen 100 µl d'aquesta solució a cada pou i s'incuba a temperatura ambient i cambra humida tota una nit.

2) Bloqueig:

Un cop adsorbida la proteïna, és convenient el bloqueig de la fase sòlida per tal d'evitar fixacions inespecífiques.

ques posteriors. Aquest bloqueig generalment es realitza amb proteïnes inerts de baix pes molecular.

D'aquesta manera, després de tota la nit d'incubació, es buida la placa i s'afegeixen 200 µl d'una solució de BSA a l'1 % en PBS. Es deixa una hora en cambra humida i es renta.

3) Rentat:

Es realitza amb solució amortidora de fosfats pH 7.2 i un detergent no iònic, que en el nostre cas ha estat el Tween-20, afegit en un 0.5 % V/V (Voller i col., 1977). La solució de rentat utilitzada s'ha designat com a PBS-T.

Es realitzen tres rentats successius amb 200 µl de PBS-T i posteriorment, només un amb PBS. En aquestes condicions les plaques es poden mantenir a -20 °C fins la seva utilització.

4) Reacció amb l'antigen o anticòs problema:

El sèrum problema es dilueix amb una solució de PBS-T a la qual s'ha afegit un 1 % de BSA (PBS-T-B). El detergent d'aquesta solució evitarà en certa part les reaccions inespecífiques i l'albumina en excés competirà amb la proteïna que es vol quantificar pels possibles llocs actius del plàstic que hagin quedat lliures durant el rentat.

S'addicionen 100 µl de la dilució problema a cada pou i es deixen reaccionar tres hores a temperatura ambient, en cambra humida. Després d'aquest temps es procedeix al rentat (fase 3).

5) Reacció amb el conjugat enzimàtic:

Tots els conjugats utilitzats s'han mantingut conge-

lats en alíquotes amb el fi de no perdre activitat enzimàtica. Un cop descongelats es dilueixen en PBS-T-B, per les mateixes raons exposades. S'afegeixen 100 µl de la dilució de conjugat a cada pou i es deixen incubar tota la nit a 4 °C en cambra hu mida.

Després d'aquest període es renta (fase 3). En el cas de l'ELISA amplificat, després del rentat s'afegeix el segon conjugat diluït en PBS-T-B i es torna a incubar tota la nit a 4 °C en cambra humida. De manera anàloga, després es renta.

6) Addició del substrat enzimàtic:

Ngo i col. (1980), van descriure com a substrat el sistema MBTH-DMAB, que en presència de peròxid d'hidrogen i peroxidasa dóna lloc a una indamina catiònica de color púrpu ra que presenta un màxim d'absorció a 590 nm (fig 33).

Les solucions que constitueixen el substrat es guar den per separat a -20 °C i en el moment del revelat es prepa ra aquest segons les proporcions: 4.7 ml de DMAB 180 mM, 9.3 ml de MBTH 1.8 mM, 7 ml de solució amortidora de fosfats pH 7 i 5 µl de H₂O₂ al 30 %.

S'afegeixen 200 µl del substrat a cada pou i es deixen en agitació (Agitador rotatiu Atom 85). Als 20 minuts s'atura la reacció addicionant 50 µl de H₂SO₄ 2 M.

Les lectures dels assaigs realitzats en aquest tre ball s'han dut a terme en un lector Titertek Multiskan amb lec tura simultània de 8 pous i sortida impresa dels resultats. L'aparell utilitzat ha estat el del Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. S'ha d'assenya lar que aquest aparell s'ha pogut utilitzar gràcies a la col laboració i gentilesa de l'esmentat Servei Hospitalari.

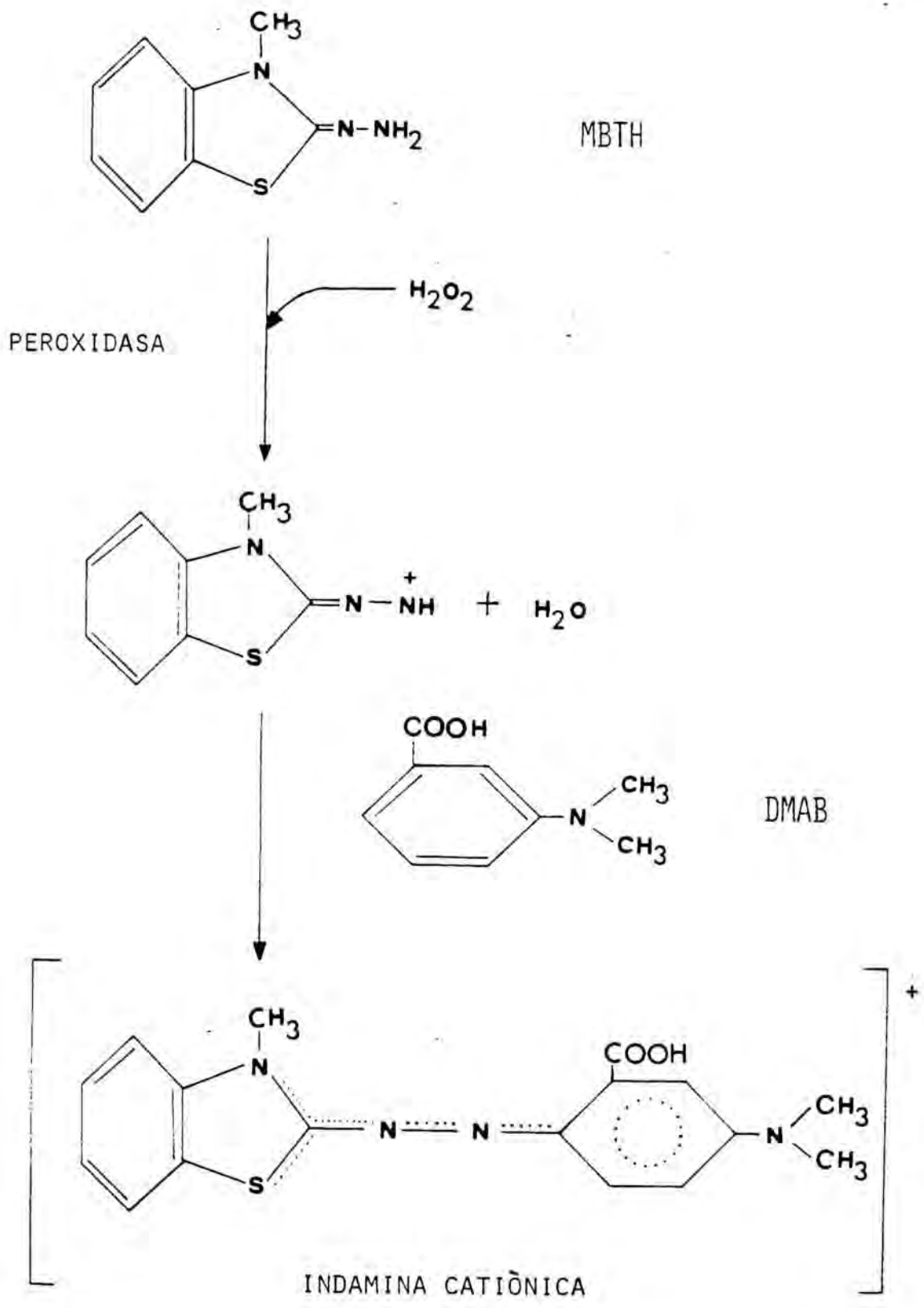


FIGURA 33: Reacció de l'enzim amb el substrat

9.3.3.3. Ajust de les condicions experimentals

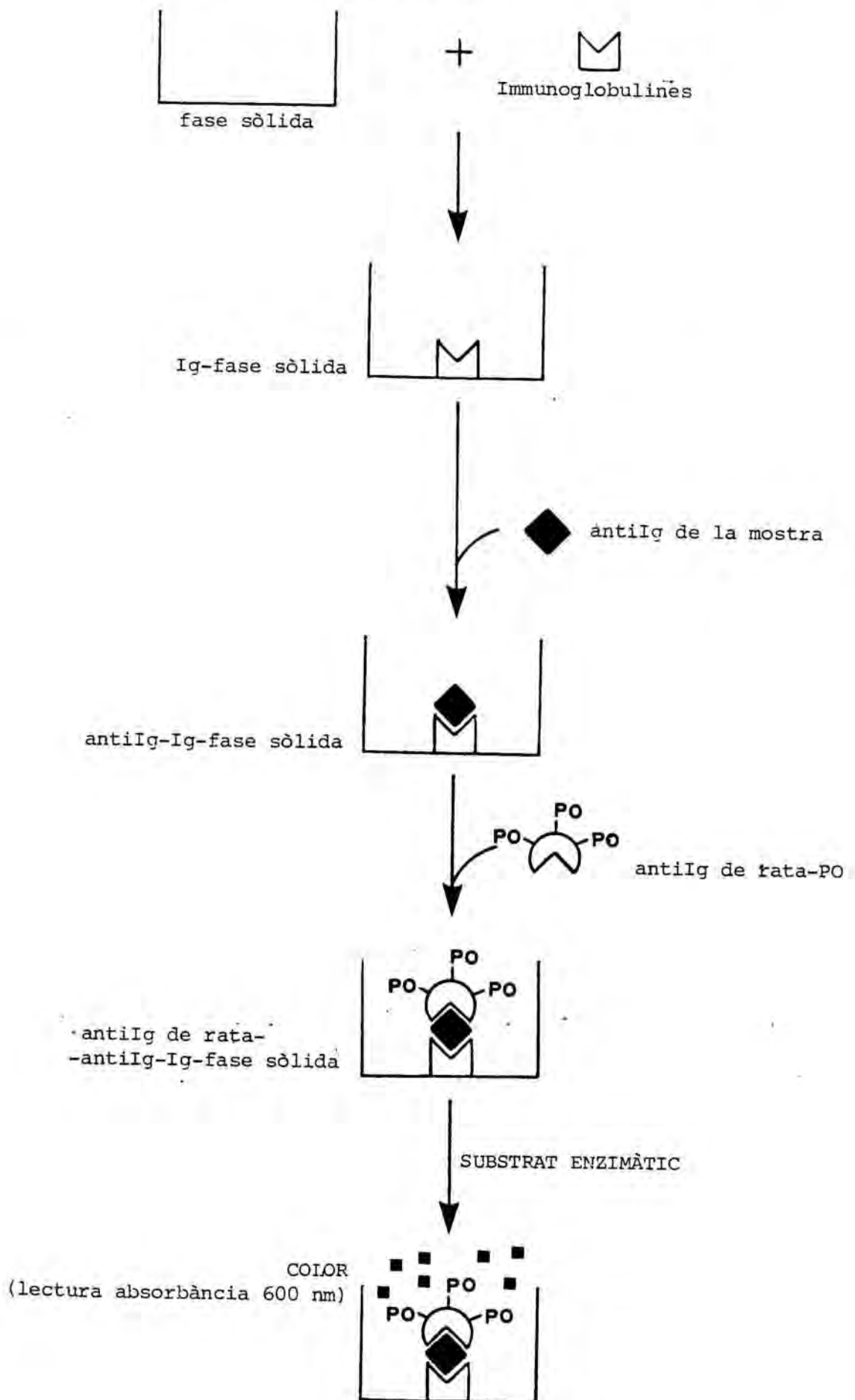
Mitjançant la tècnica semiquantitativa d'aglutinació del làtex es van detectar anticossos antiIg en el sèrum d'animals artrítics. Amb la finalitat de quantificar els esmentats anticossos i d'obtenir més sensibilitat es va posar a punt una tècnica de microELISA.

La posta a punt d'aquesta tècnica va ser un procés laboriós en el qual es van provar tota una sèrie de condicions i variants. Es van fer estudis de l'ELISA indirecte, de l'ELISA competitiu i de l'ELISA amplificat, fins a trobar les condicions idònies per treballar amb un ELISA indirecte. En general a la fase sòlida s'unien IgG o immunoglobulines, que actuaven com a antigen de l'anticòs que es volia detectar i després d'incubar el sèrum problema s'afegia el conjugat constituït per antiimmunoglobulines de rata marcades amb peroxidasa (fig 34).

Per realitzar les proves es va fer una barreja de sèrums control, que donessin la prova del làtex negativa (designada com a sèrum negatiu), i una barreja de sèrums artrítics corresponents als títols més alts d'aglutinació del làtex (designada com a sèrum positiu). Cada prova consistia en la unió a la fase sòlida d'una quantitat fixa d'antigen (IgG o immunoglobulines totals), la incubació de diferents dilucions d'ambdues barreges de sèrum i l'addició de diverses concentracions de conjugat. Aleshores s'estudiaven les diferències entre els sèrums positiu i els negatiu; en el cas de trobar una bona diferència (es va considerar un increment en l'absorbància d'un 0.2) es fixava la concentració de conjugat que s'havia d'utilitzar i s'estudiaven diferents dilucions de l'antigen per tal d'obtenir la màxima sensibilitat.

Els assaigs realitzats s'han resumit a continuació:

FIGURA 34: Disseny general de l'ELISA per a la determinació d'antiimmunoglobulines



9.3.3.3.1. Assaig amb immunoglobulines humanes

Basant-se en la capacitat del factor reumatoide per a reaccionar enfront d'antígens (IgG) de diferents espècies, es van fixar immunoglobulines humanes a la placa. Per a una concentració de 10 µg/ml d'immunoglobulines humanes, es van probar el sèrum positiu i el sèrum negatiu a dilucions compreses entre 1/1 i 1/1024. Posteriorment es va afegir el conjugat enzimàtic antiIg rata-PO diluït des de 1/100 a 1/2000.

Amb aquestes condicions no es va observar reacció entre el sèrum de rata i les immunoglobulines humanes: l'absorbància va ser molt baixa per a tota la placa i no hi havia diferència entre positius i negatius.

9.3.3.3.2. Assaig amb immunoglobulines de ratolí

Estudis previs realitzats per nosaltres, van indicar que el sèrum procedent de rates artrítiques aglutinava partícules de làtex sensibilitzades amb immunoglobulines de ratolí (Ig-ratolí). Per això, es va realitzar un ELISA indirecte utilitzant Ig-ratolí com a antigen unit a la fase sòlida. Les condicions emprades van ser: 10 µg/ml d'Ig-ratolí; dilucions de sèrum positiu i negatiu compreses entre 1/1 i 1/1024, i conjugat antiIg rata-PO a dilucions de 1/100, 1/200, 1/400 i 1/800. A les solucions del conjugat enzimàtic, s'hi van afegir dilucions de sèrum de ratolí (1/20, 1/40, 1/80 i 1/160, respectivament) per adsorbir la reacció creuada entre les Ig-ratolí i el conjugat a conseqüència de la proximitat filogenètica.

Els resultats obtinguts van mostrar diferències entre el sèrum positiu i el negatiu a dilucions de 1/1 fins a 1/32, utilitzant conjugat diluït 1/200. Per a les dilucions 1/400 i 1/800 d'antiIg rata-PO no es van observar diferències mentre que a dilució 1/100 la diferència es va observar només fins a

la dilució sèrica de 1/8.

Establertes aquestes condicions que mostraven ja la presència d'anticossos antiimmunoglobulines en el sèrum dels animals artrítics, es va intentar millorar la sensibilitat de l'assaig i així es van realitzar proves d'ELISA competitiu i d'ELISA amplificat.

9.3.3.3.3. ELISA competitiu

En aquesta tècnica s'utilitza un estàndard d'immunoglobulines de ratolí de concentració coneguda, per saber la dilució d'estàndard capaç d'inhibir en un 50 % la unió del conjugat antiIg ratolí-PO amb l'antigen en fase sòlida.

A la placa es van unir concentracions d'Ig-ratolí compreses entre 0.1 i 5 µg/ml. Es van estudiar dilucions de sèrums entre 1/2 i 1/32 i l'estàndard es va utilitzar en concentracions compreses entre 1 i 500 µg/ml. El conjugat antiIg ratolí-PO es va diluir a 1/200, 1/400 i 1/800 i se li va afegir sèrum de rata a diferents concentracions (1/125, 1/250 i 1/500, respectivament) per evitar la reacció creuada amb el sèrum problema.

En aquest assaig el problema o l'estàndard es barregen amb el conjugat enzimàtic just abans de la seva addició a la fase sòlida.

Els resultats d'aquest assaig no van fer palès cap tipus de competència per part dels sèrums estudiats, ni tan sols a dilucions de 1/2. El FR de l'artritis humana té una dèbil afinitat per a l'antigen (Wagner i col., 1978), per això es va creure que els autoanticossos desenvolupats per les rates artrítics podien tenir també aquesta propietat i no ser capaços de competir amb el conjugat enzimàtic.

9.3.3.3.4. ELISA amplificat

Les condicions estudiades en aquest assaig es poden resumir en el següent esquema:

Bloqueig	BSA a l'1 %, al 2 %, al 4 % i al 6 %
Temps de bloqueig per a cada concentració de BSA	1 h, 6 h o tota la nit a 4 °C

Dilucions de sèrum positiu assajades	1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512
Dilucions de sèrum negatiu assajades	1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512

Dilucions de conjugat antiIg rata-PO estudiades	1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600
Quantitat de sèrum neutralitzant (sèrum de ratolí) afegit	0.5, 1 i 2 vegades el volum de conjugat sense diluir

Dilucions de conjugat antiIg conill-PO assajades	1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200
Quantitat de sèrum neutralitzant (sèrum de ratolí) afegit	0.5, 1 i 2 vegades el volum de conjugat sense diluir

En tots els assaigs es va observar un gran color de fons a conseqüència de la reacció creuada entre el conjugat antiIg rata-PO i les Ig-ratolí de la fase sòlida, amplificat per l'addició del segon conjugat. Aquest color de fons va constituir el principal problema de la tècnica, que per altra

banda va permetre observar de nou diferències entre sèrums artrítics i no artrítics.

Alguns dels resultats observats es poden veure a la figura 35.

9.3.3.4. Optimització de l'assaig amb IgG de ratolí

Els estudis realitzats amb l'ELISA competitiu i l'ELISA amplificat no van suposar cap millora en la tècnica indirecta prèviament desenvolupada.

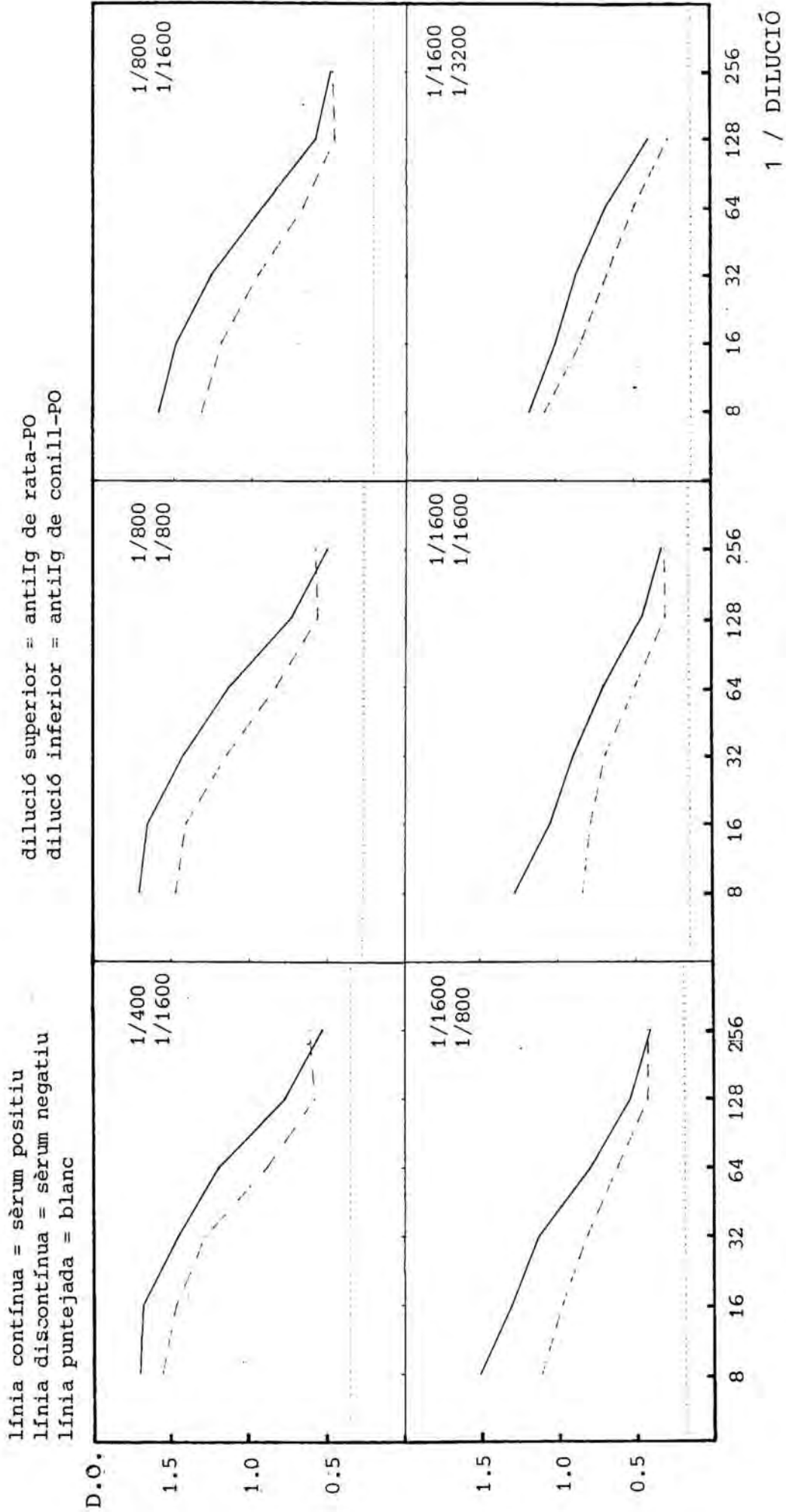
Amb l'ELISA indirecte es van observar diferències entre el sèrum procedent de rates artrítiques i el sèrum procedent de rates control utilitzant Ig-ratolí a una concentració de 10 µg/ml; dilucions de sèrum fins a 1/32 i conjugat antiIg rata-PO a dilució 1/200. Aleshores es van provar diferents concentracions d'Ig-ratolí per estudiar quina d'elles representava més sensibilitat a la tècnica. Les concentracions estudiades i els resultats obtinguts es poden observar a la figura 36.

La concentració de 2 µg/ml d'Ig-ratolí va ser la que millors resultats va donar ja que a més de proporcionar més pendent a la recta de regressió, les diferències s'hi mantien fins a dilucions de sèrum de 1/64.

9.3.3.5. Corba estàndard i expressió dels resultats

Es va utilitzar com a estàndard una barreja de sèrums procedents d'animals artrítics. A aquest estàndard es van assignar unes unitats arbitràries d'antiIg (200 U/ml) i a cada placa realitzada es van afegir quatre dilucions d'aquest (1/32, 1/64, 1/128 i 1/256). D'aquesta manera els sèrums problema analitzats a la resta de la placa es referien sempre a

FIGURA 35: Resultats de l'ELISA amplificat



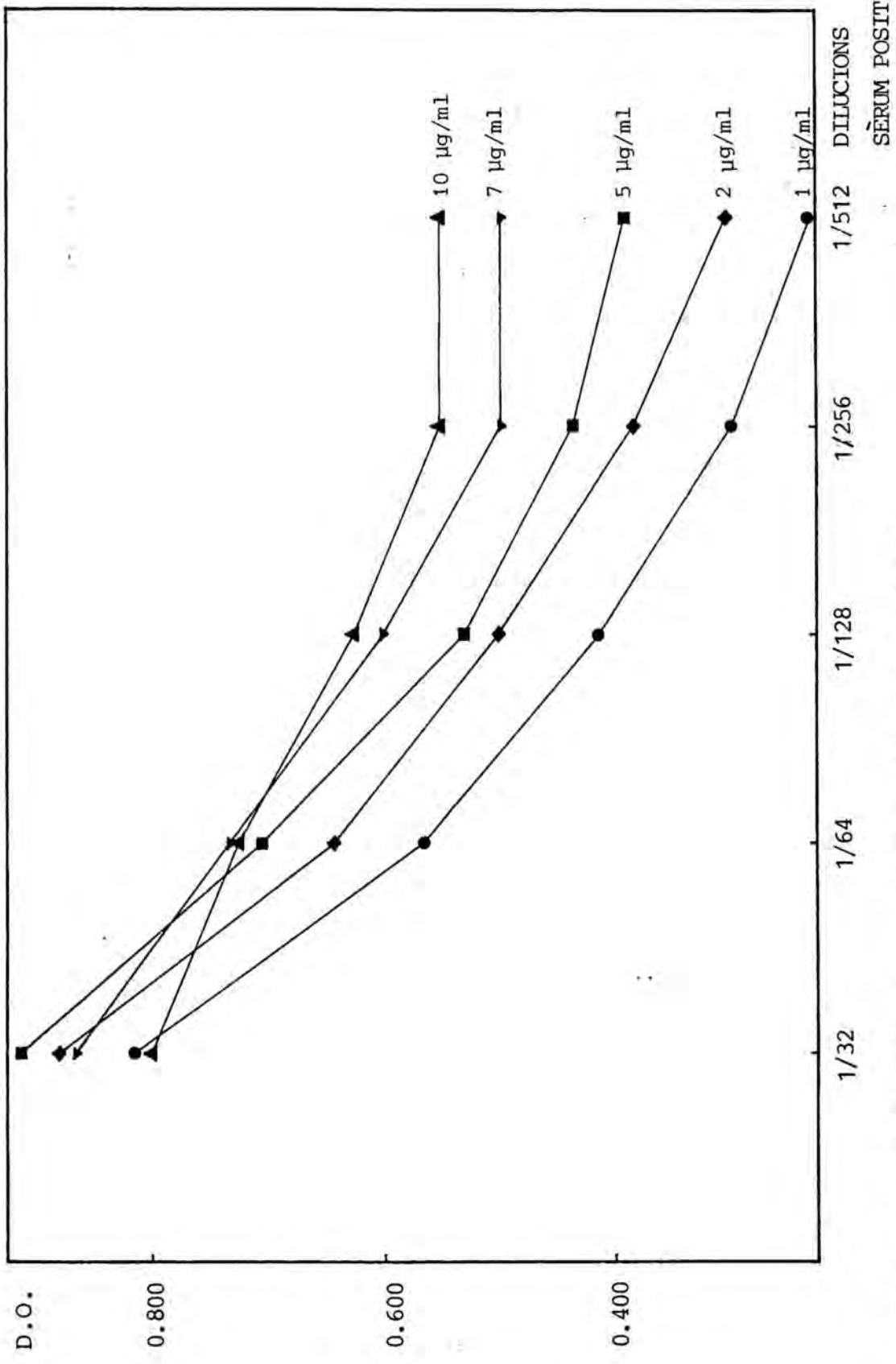


FIGURA 36: Optimització de l'assaig amb IgG de ratolí

la seva corba estàndard.

A la figura 37 es pot observar l'estudi de les regresions i la corba estàndard corresponents a diferents plaques.

Cada sèrum problema es va assajar, per triplicat, a dilucions 1/32 i 1/64. Les absorbàncies de les dues dilucions s'interpolaven en la corba estàndard i la mijana d'ambdós resultats era el nivell d'antiIg del sèrum estudiat. Es van trobar sèrums que, a causa d'una afinitat pel substrat més elevada que l'estàndard, tenien desiguals els resultats de les dues dilucions. En aquests casos es va procedir a fer dilucions seriades del sèrum problema fins que les dilucions donessin resultats del mateix ordre.

En el cas que les dues dilucions assajades per a cada sèrum tinguessin una absorbància superior a la de l'estàndard, es feien dilucions superiors.

9.3.3.6. Resultats

A la figura 38 es poden observar els valors individuals i les mitjanes corresponents al grup artrític i al grup control de la sèrie experimental II. A les taules XXXV-XXXVIII es troben resumits els resultats d'antiIg de les sèries II, III, IV i VII.

A cada sèrie experimental s'ha considerat que els valors normals estan compresos dins de l'interval definit per la mitjana del grup control més dues desviacions estàndard. D'aquesta manera, s'han considerat com a resultats negatius els que estaven per sota de 81 U/ml a la sèrie II, de 61 U/ml a la sèrie III, de 72 U/ml a la sèrie IV i de 64 U/ml a la sèrie VII. A les taules XXXV - XXXVIII també es pot observar l'evolució dels percentatges de resultats positius al llarg de l'estudi.

y=bx+ta N= 50 Asimptota= 1.453452

Model	Parameter	Value	Model	Parameter	Value	Model	Parameter	Value
LINEAL	X	0.3895699E-02	LINEAL	Y	1.1991348	LINEAL	Asimptota	1.453452
	lnX	0.36394385		lnY	0.17851072		0.32008824	
LOGARITHICA	X	0.47895694E-02	LOGARITHICA	lnX	2.4348989	LOGARITHICA	lnY	0.98951517
	lnX	0.47904887		lnY	0.56063322		0.84764408	
EXPONENCIAL	X	0.082652191	EXPONENCIAL	lnX	1.6308882	EXPONENCIAL	lnY	0.97519521
	lnX	0.045828727		lnY	0.48769127		0.83811839	
POTENCIAL	X	0.67149705E-02	POTENCIAL	lnX	0.82828558	POTENCIAL	lnY	0.96829568
	lnX	0.69428054		lnY	12.468255		0.94923644	
PARABOLA 1.	X	1.2296667	PARABOLA 1.	lnX	1.1984043	PARABOLA 1.	lnY	-0.75057379
	lnX	0.61467807		lnY	0.92013899		-0.92013899	
PARABOLA 2.	X	34.587846	PARABOLA 2.	lnX	0.17657107	PARABOLA 2.	lnY	0.98972096
	lnX	0.25643981		lnY	0.22282118		-0.95306678	
HIPERBOLA 1.	X	-0.011881158	HIPERBOLA 1.	lnX	0.22282118	HIPERBOLA 1.	lnY	-0.95306678
	lnX	0.22282118		lnY	0.22282118		-0.95306678	

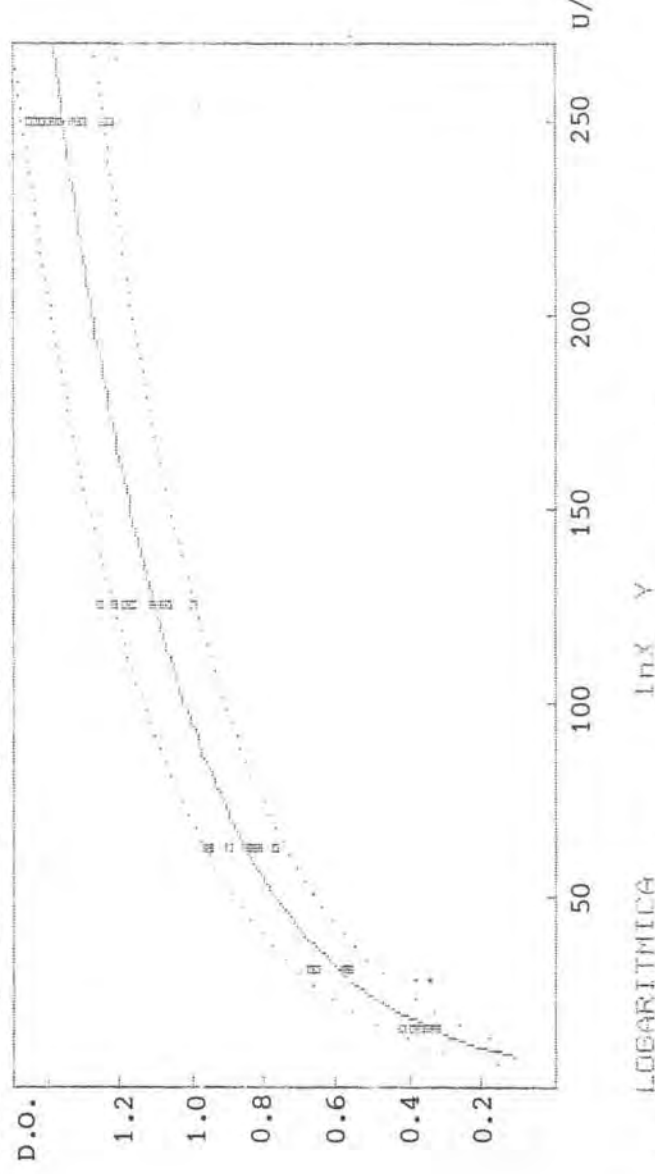
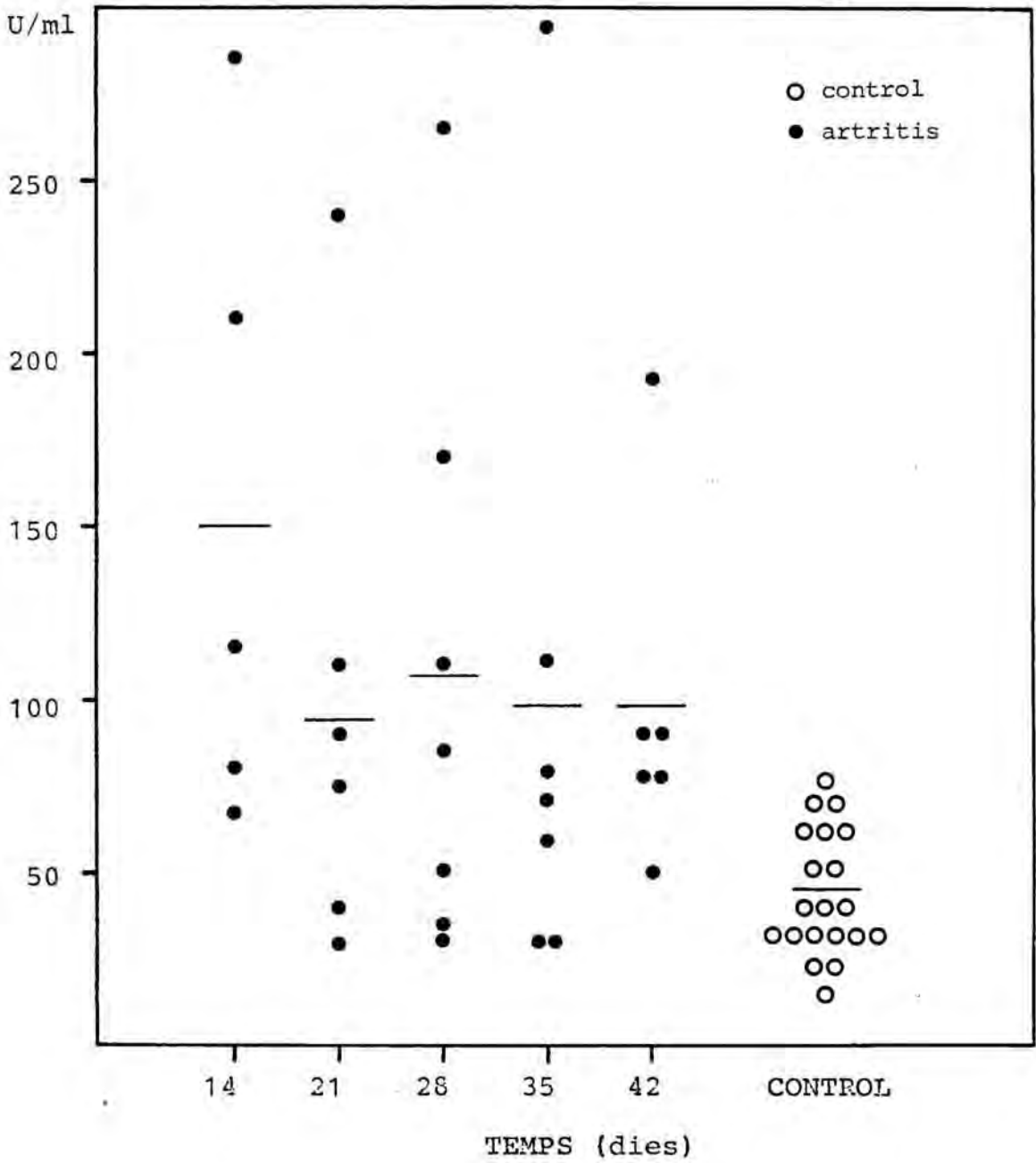


FIGURA 37: Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la determinació d'antiIg totals

FIGURA 38: Evolució de la concentració d'antiIg totals (SÈRIE II)



Aplicant l'anàlisi de la varianza de models lineals, es demostra que la patologia augmenta significativament els nivells d'antiimmunoglobulines ($p < 10^{-4}$), la presència de les quals és ja significativa el dia 3 de la inducció, com ho demostren els resultats obtinguts a la sèrie VII (taula XXXVII). A la sèrie IV, però, s'observa una disminució gradual del nivell d'antiIg i, el dia 28 de la inducció, no hi ha diferència entre els resultats del grup artrític i els del grup control.

Les diferències estimades entre els nivells d'antiIg dels dos grups estudiats a les sèries experimentals II, III i VII han estat, respectivament, 63.69 (32.99 - 94.39), 62.48 (38.08 - 86.88) i 99.43 (58.36 - 140.50). A la sèrie IV l'esciació del dia 14 és de 42.31 (22.83 - 61.79) i el dia 21 és de 23.75 (8.31 - 39.19).

Els resultats d'antiIg es correlacionen amb alguns dels paràmetres estudiats fins ara. A la taula XXXIV es poden observar els coeficients de correlació i els graus de significació obtinguts.

9.3.4. Anticossos antiimmunoglobulines de la classe IgG

Un cop detectades les antiIg totals es va determinar la proporció d'aquestes que pertanyien a la fracció IgG. El mètode es basa, a l'igual que l'utilitzat per a la detecció d'antiIg totals, en la reacció del sèrum problema amb immunoglobulines de ratolí unides a la fase sòlida. Posteriorment s'afegeix conjugat amb especificitat per a l'anticòs IgG marcat amb peroxidasa (antiIgG rata-PO).

TAULA XXXIV: Correlacions entre els nivells d'antiIg totals i diferents paràmetres

	sèrie II (v = 33)	sèrie III (v = 74)	sèrie IV (v = 60)	sèrie VII (v = 20)
INCREMENT DE PES (%)	-0.3643 p < 0.05	-0.4137 p < 0.01	N.S.	N.S.
PES FEIJE (%)	-	0.2420 p < 0.05	N.S.	N.S.
PES MELSA (%)	-	0.3079 p < 0.01	-	N.S.
PES TIMUS (%)	-	N.S.	-	N.S.
PES RONYONS (%)	-	0.2600 p < 0.05	-	-
EXTREMITAT IPSILATERAL (ml)	0.4138 p < 0.05	0.2522 p < 0.05	N.S.	N.S.
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	0.4391 p < 0.05	N.S.	N.S.	N.S.
ALBÚMINA (%)	-0.4996 p < 0.01	-0.3506 p < 0.01	-	-0.4630 p < 0.05
α-GLOBULINES (%)	0.4549 p < 0.01	N.S.	-	N.S.
β-GLOBULINES (%)	0.5588 p < 0.01	0.2945 p < 0.05	-	0.5041 p < 0.05
γ-GLOBULINES (%)	N.S.	N.S.	-	N.S.
QUOCIENT A/G	-0.4776 p < 0.01	-0.3439 p < 0.01	-	-0.5015 p < 0.05
GRUPS SULFHIDRIL SÈRICS (μmol/l)	-	-0.3959 p < 0.01	-0.4005 p < 0.01	N.S.
ACT. COMPLEMENTÀRIA TOTAL (U/ml)	N.S.	-	-	-
TÍTOLS LÀTEX (Coef. Spearman)	0.4316 p < 0.01	0.2350 p < 0.01	-	-

9.3.4.1. Ajust de les condicions experimentals

Es van provar concentracions de 2 i 4 $\mu\text{g/ml}$ d'Ig-ratolí amb sèrum diluït des de 1/8 a 1/64, i conjugat a dilucions de 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 i 1/1600. A aquest conjugat es va afegir sèrum de ratolí per neutralitzar la reacció creuada.

Els resultats es poden veure a la figura 39. Les millors condicions van ser de 2 $\mu\text{g/ml}$ d'Ig-ratolí, sèrum diluït 1/16 i conjugat a dilució 1/800 al qual prèviament s'addicionava sèrum de ratolí fins a obtenir una dilució 1/80.

A l'igual que en la determinació d'antiIg, conjuntament amb els problemes, es va realitzar a cada placa una corba estàndard amb una barreja de sèrums artrítics, a la qual es van assignar unes unitats arbitràries d'autoanticòs (200 U/ml) i que va permetre l'extrapolació de tots els problemes. L'estudi de les regressions corresponent als diferents assaigs realitzats es pot observar a la figura 40.

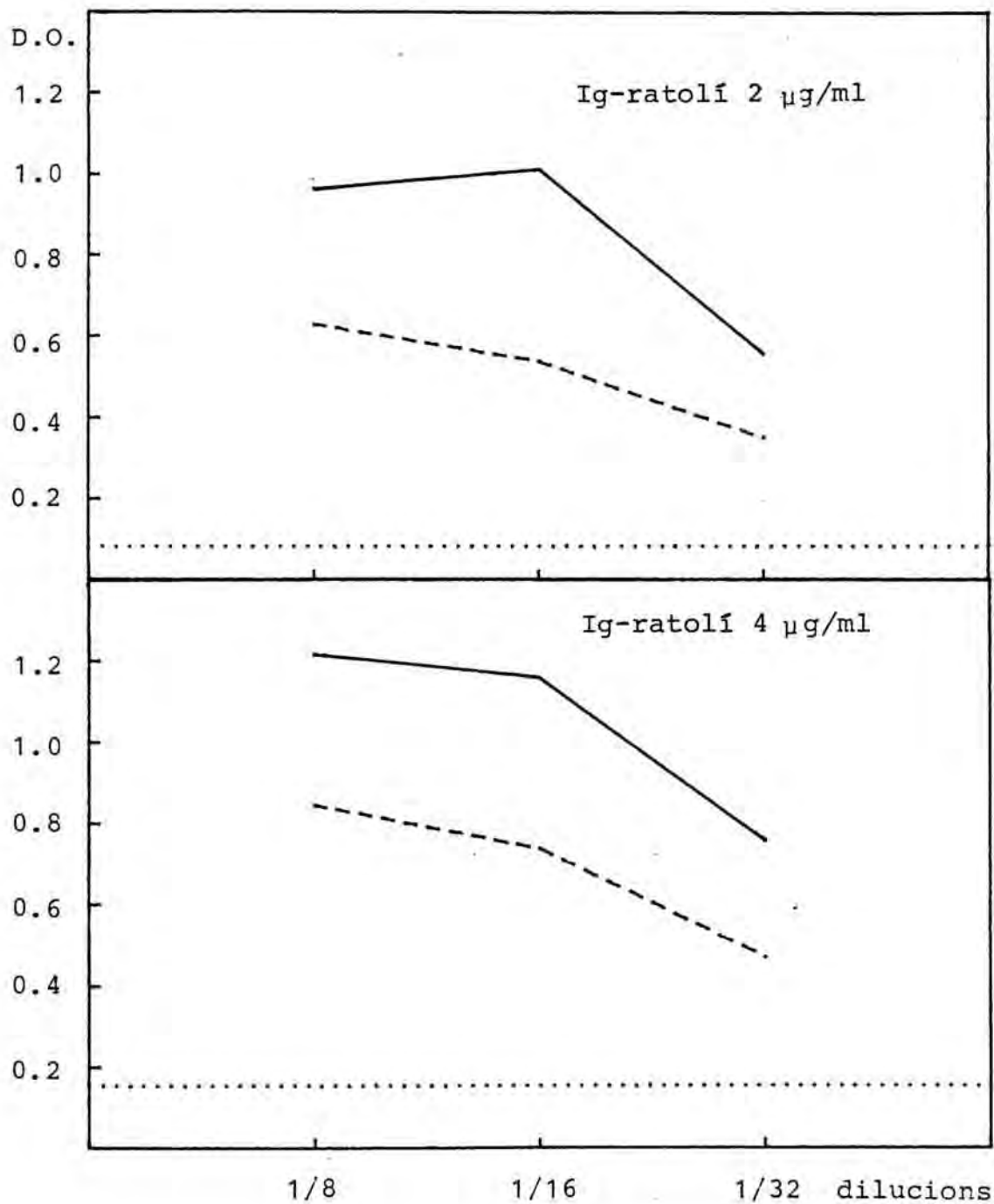
9.3.4.2. Resultats

A la figura 41 es troba representada l'evolució dels valors individuals i de les mitjanes corresponents al grup artrític i al grup control, determinada a la sèrie II. A les taules XXXV - XXXVIII es poden observar els resultats d'anti Ig IgG corresponents a les sèries II, III, IV i VII.

A l'igual que en el cas de les antiIg totals, s'ha considerat com a resultat positiu aquell que superava el valor mig de la mitjana dels controls més dues desviacions estàndard. Aquest nivell ha estat de 58 U/ml per a la sèrie II, de 37 U/ml per a la sèrie III, de 25 U/ml per a la sèrie IV i de 43 U/ml per a la sèrie VII. L'evolució dels percentatges de resultats positius de les antiIg de la classe IgG, per a

FIGURA 39: Ajust de les condicions experimentals

línia contínua = sèrum positiu
línia discontinua = sèrum negatiu
línia puntejada = blanc

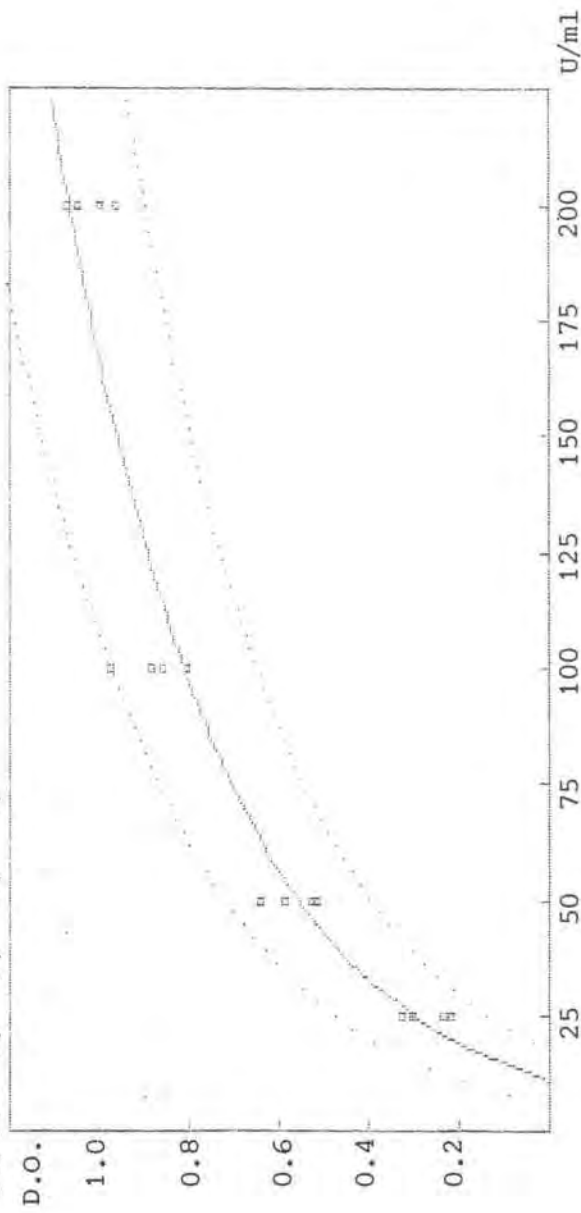


y=b*x+a N= 16 Asimptota= 1.068067

REGRESSIÓ	COEFICIENTS	COEFICIENTS	COEFICIENTS	COEFICIENTS
LINIAL	X	Y	X	Y
LOGARITMICA	lnX	Y	lnX	Y
EXPONENCIAL	X	lnY	X	lnY
POTENCIAL	lnX	lnY	lnX	lnY
PARABOLA v.	X	sqY	X	sqY
PARABOLA h.	sqX	Y	sqX	Y
PARABOLA I.	sqX	sqY	sqX	sqY
HIPERBOLA a11Y	X	1/Y	X	1/Y
HIPERBOLA a11X	1/X	Y	1/X	Y
MICHAELIS-M.	1/Y	1/Y	1/Y	1/Y
EXP. INV.	X	ln(C-Y)	X	ln(C-Y)

EL MENOR ERROR Q. ES EL DE LA REGRESSIO EXP. INV. X ln(C-Y)

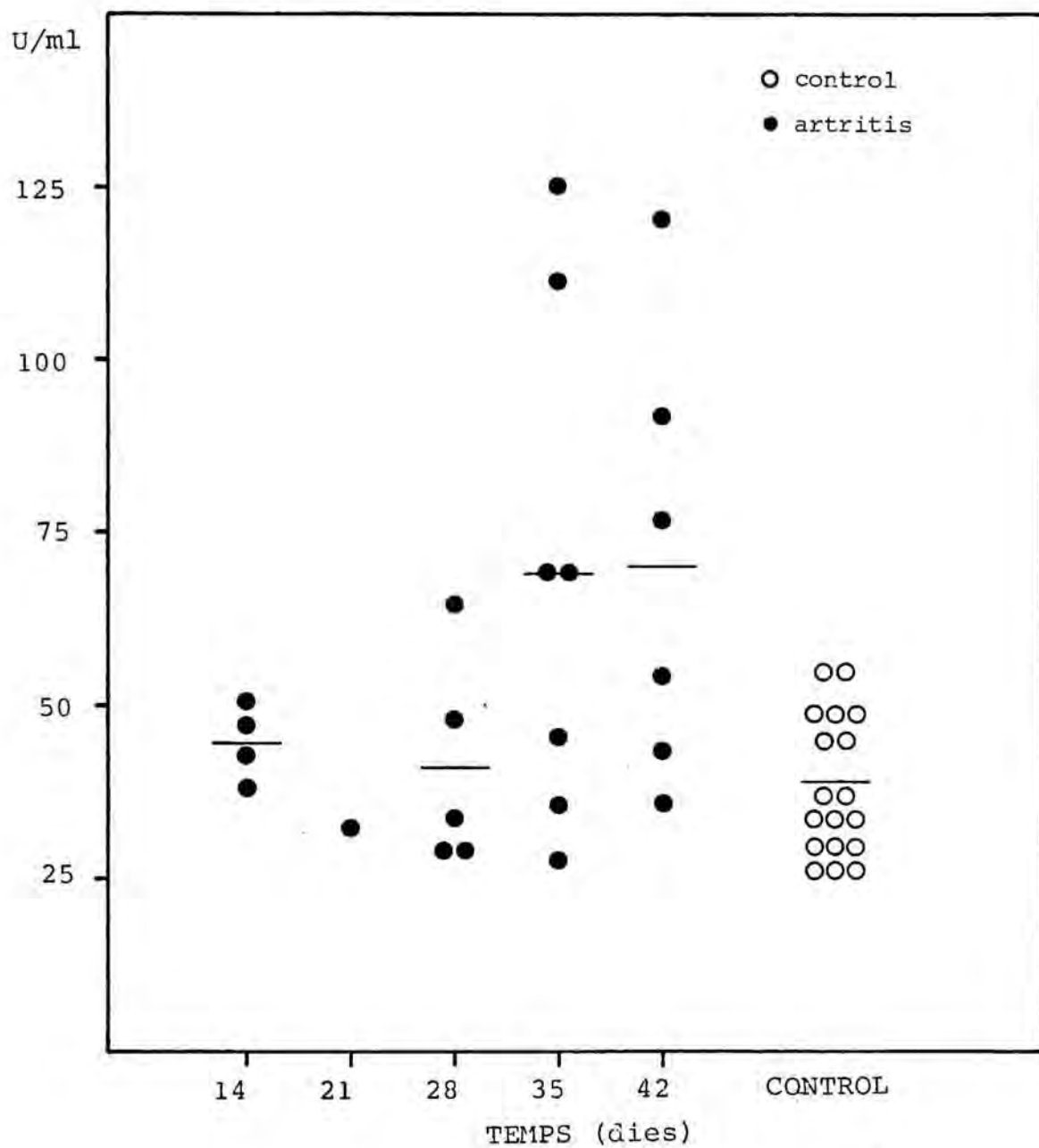
de serie: 1, 2, 3, 4,



LOGARITMICA lnX Y

FIGURA 39: Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la determinació d'antiIg de la classe IgG

FIGURA 41: Evolució de la concentració d'antiIg IgG
(SÈRIE II)



TAULA XXXV: Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE II)

DIA		ANTIIMMUNOGLOBULINES		ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG	
		CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
14	m	43.80	151.18	32.49	44.45
	e	6.499	41.358	2.761	2.718
	n	8	5	7	4
	% positius	-	60.0	-	0
21	m	-	96.94	-	32.32
	e	-	31.311	-	-
	n	-	6	-	1
	% positius	-	50.0	-	0
28	m	46.92	107.14	43.73	40.83
	e	7.109	32.389	5.650	6.875
	n	5	7	5	5
	% positius	-	57.0	-	20.0
35	m	-	96.86	-	69.00
	e	-	34.588	-	14.063
	n	-	7	-	7
	% positius	-	28.6	-	57.1
42	m	43.11	97.74	39.80	70.20
	e	8.458	20.180	3.226	13.127
	n	7	6	6	6
	% positius	-	50.0	-	50.0

TAULA XXXVI: Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE III)

DIA		ANTIIMMUNOGLOBULINES		ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG	
		CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
0	m	25.78	-	14.96	-
	e	4.361	-	1.330	-
	n	8	-	7	-
			-		-
14	m	36.40	52.78	19.02	37.55
	e	4.369	4.190	1.570	3.926
	n	7	8	7	8
	% positius	-	25.0	-	50.0
21	m	41.11	183.68	26.83	123.70
	e	3.459	48.922	3.791	27.434
	n	8	8	8	8
	% positius	-	87.5	-	100.0
28	m	42.71	76.22	20.58	29.11
	e	4.464	15.178	1.063	3.049
	n	7	8	8	8
	% positius	-	50.0	-	25.0
35	m	40.60	72.20	20.50	36.24
	e	7.367	12.670	1.316	10.542
	n	4	12	8	12
	% positius	-	50.0	-	25.0
42	m	32.09	104.60	20.20	31.48
	e	4.181	25.458	2.219	2.934
	n	5	11	7	11
	% positius	-	72.7	-	18.8

TAULA XXXVII: Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE IV)

DIA	ANTIIMMUNOGLOBULINES		ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG		
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS	
0	m	36.9	-	19.24	-
	e	5.889	-	1.040	-
	n	8	-	6	-
	% positius	-	-	-	-
14	m	36.00	95.96	20.20	49.73
	e	7.584	17.751	1.005	16.804
	n	8	7	6	7
	% positius	-	71.4	-	71.4
21	m	32.60	63.29	18.40	20.96
	e	6.430	4.306	0.829	1.651
	n	7	7	7	7
	% positius	-	28.6	-	14.3
28	m	41.4	45.58	21.16	19.42
	e	0.183	6.724	1.232	1.414
	n	4	7	8	7
	% positius	-	14.3	-	14.3

TAULA XXXVIII: Evolució de la concentració d'antiIg i d'antiIg IgG (U/ml) (SÈRIE VII)

		ANTIIMMUNOGLOBULINES	ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG
CONTROL		m e n	35.13 3.912 14
			30.59 1.654 15
PREARTRITIS	DIA 3	m e n	107.92 21.722 8
		% positius	37.51 4.741 7
			87.5
PREARTRITIS	DIA 6	m e n	126.91 21.382 7
		% positius	33.66 4.912 7
			85.7
PREARTRITIS	DIA 9	m e n	190.13 37.134 8
		% positius	115.24 46.532 8
			87.5
PREARTRITIS	DIA 13	m e n	112.34 14.406 8
		% positius	42.40 11.199 8
			75

cada sèrie estudiada s'indica a la taules XXXV - XXXVIII.

Les antiIg de la classe IgG estan significativament elevades un cop establerta la patologia. A la sèrie II, l'increment presentat pels animals artrítics augmenta progressivament amb el temps i els valors corresponents als dies 14, 21, 28, 35 i 42 s'han estimat en 9.45 (3.69 - 15.20), 14.17 (5.52 - 22.81), 18.89 (7.38 - 30.41), 23.62 (9.22 - 38.01) i 28.34 (11.07 - 45.61), respectivament. A la sèrie III, els nivells d'antiIg IgG observats en el grup artrític es mantenen elevats durant tot l'estudi, i s'ha estimat que l'increment correspon a 25.01 (12.50 - 37.51). A la sèrie IV, els títols d'antiIg IgG dels animals artrítics disminueixen progressivament i el dia 28 ja no són significatius respecte al grup control. Les estimacions d'aquesta sèrie els dies 14 i 21 de la inducció són respectivament, 22.59 (12.10 - 33.09) i 11.02 (4.43 - 17.61). Les mostres procedents dels animals artrítics de la sèrie VII, que correspon als 14 primers dies de la inducció, no presenten increments significatius d'antiIg IgG.

Pel que fa a les correlacions entre aquest paràmetre i els considerats anteriorment, a les quatre sèries els valors d'antiIg de la classe IgG es correlacionen significativament amb els resultats obtinguts per a les antiIg totals (sèrie II: $r = 0.3903$, $p < 0.05$; sèrie III: $r = 0.6691$, $p < 0.01$; sèrie IV: $r = 0.6551$, $p < 0.01$ i sèrie VII: $r = 0.7000$, $p < 0.01$). A més, a la sèrie III, les antiIg IgG presenten una correlació significativa amb els percentatges d'albumina ($r = -0.3233$, $p < 0.01$) i de beta-globulines ($r = 0.2295$, $p < 0.05$) així com amb el quocient A/G ($r = -0.3012$, $p < 0.05$). A la sèrie III i a la sèrie IV els resultats d'antiIg IgG es correlacionen amb els nivells de grups sulfhidril sèrics ($r = -0.4061$, $p < 0.01$ i $r = -0.2856$, $p < 0.05$, respectivament).

9.4. DETERMINACIÓ D'IgG

L'elevació observada en la fracció gamma-globulínica per a les sèries experimentals II i III, i el fet de trobar autoanticossos pertanyents a la classe IgG en el sèrum d'animals artrítics, ens va portar a la determinació de la IgG total, experiment que només es va fer en aquestes dues sèries.

La tècnica utilitzada va ser un ELISA sandvitx de doble anticòs (fonament a l'apartat 9.3.3.). Els dos anticossos eren antiIgG de rata obtinguda en conill i antiIgG de rata-PO obtinguda també en conill. Els resultats d'absorbància es van poder expressar en mg/ml en disposar d'un sèrum comercial (Miles) del qual es coneixia la seva concentració en IgG (1,320 mg/dl).

9.4.1. Ajust de les condicions experimentals

L'antisèrum comercial, antiIgG de rata, es va sotmetre prèviament a un fraccionament salí (apartat 9.3.1.) per treballar amb la fracció globulínica i evitar reaccions inespecífiques. Es van estudiar concentracions entre 1 i 20 µg/ml d'aquest anticòs.

Els sèrums es van diluir fins a $1/10^{10}$ com a conseqüència de l'elevada concentració d'IgG al sèrum de rata. Les dilucions de conjugat provades estaven entre 1/200 i 1/3200, i se'ls va afegir sèrum de conill per evitar una reacció creuada.

A la figura 42 es poden observar els resultats obtinguts per a diferents concentracions d'antiIgG fixada a la fase sòlida i per a una barreja de sèrums a tres dilucions diferents. Es va treballar amb 10 µg/ml d'antiIgG i els sèrums es van provar a dilucions de $1/10^5$ i $1/5 \times 10^5$. La dilució òptima de conjugat va ser de 1/1600.

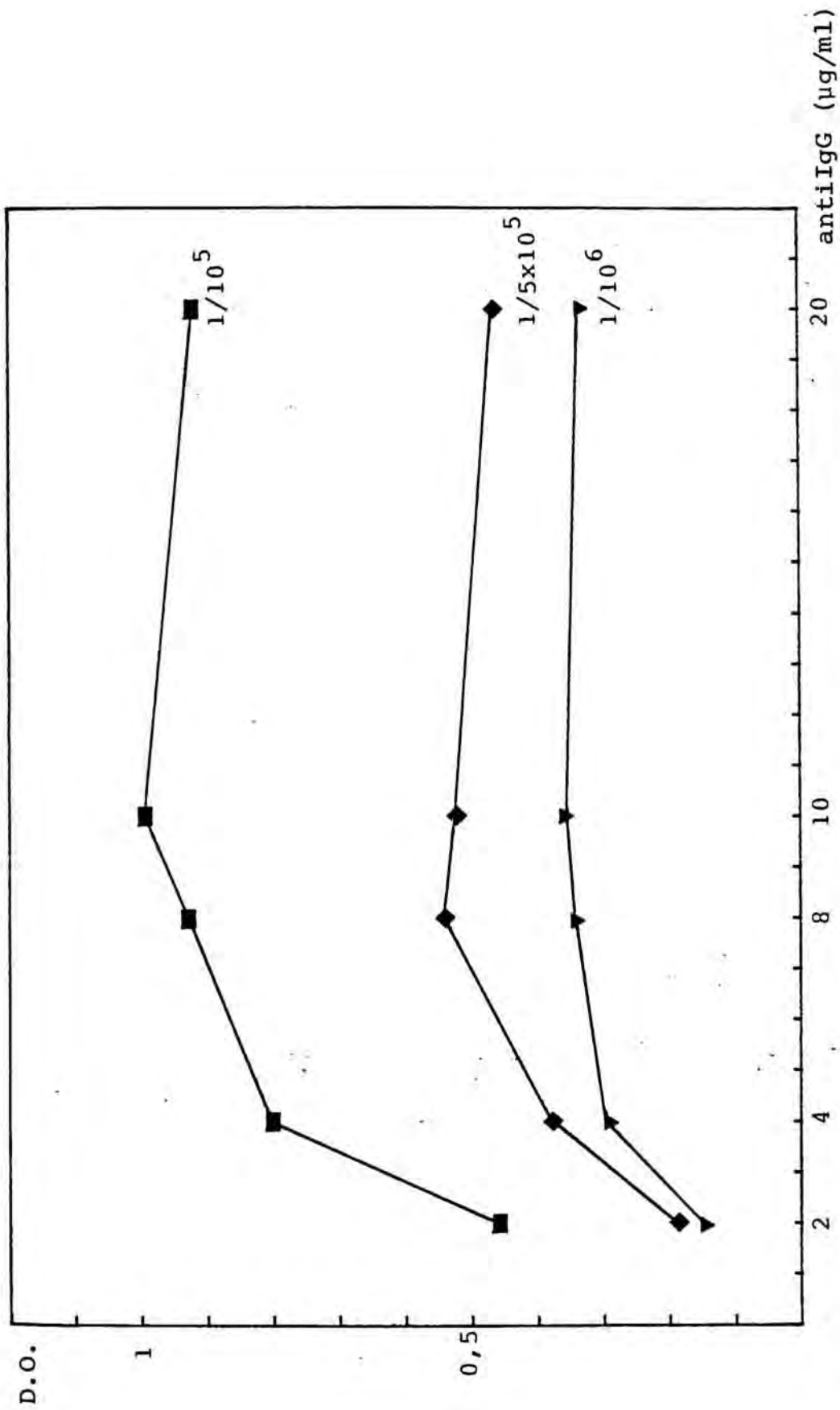


FIGURA 42: Determinació de la concentració adient d'antiIgG

Com a estàndard de la prova es va utilitzar una barreja de sèrums control en la qual s'havia determinat anteriorment la concentració d'IgG mitjançant el sèrum estàndard comercial. Els resultats dels problemes es van referir a la corba estàndard de cada placa. A la figura 43 es pot observar l'estudi de les regressions i la corba estàndard corresponent a diferents plaques.

9.4.2. Resultats

A la taula XXXIX es poden observar els nivells d'immunoglobulina G determinats a les sèries experimentals II i III.

La patologia artrítica no indueix canvis significatius pel que fa a la concentració d'IgG. S'ha trobat, però, que els resultats de la sèrie II es correlacionen significativament amb els nivells d'antiIg ($r = 0.4213$, $p < 0.05$) i d'antiIg de la classe IgG ($r = 0.3958$, $p < 0.05$). També s'ha observat una correlació significativa entre la concentració d'IgG corresponent a la sèrie II i els percentatges d'albumina ($r = -0.3642$, $p < 0.05$) i de gamma-globulines ($r = 0.3988$, $p < 0.05$) així com amb el quocient A/G ($r = -0.3692$, $p < 0.05$).

$y = bx + a$ N= 12 Asimptota= 1.195194
LINEAL X Y
 .41154863E-03 0.25547826 0.063920997 0.9743233
 0.4152557 -2.0835456 0.018195833 0.99275844
LOGARITMICA lnX Y
 .61504136E-03 -1.1434264 0.20945323 0.92081745
EXPONENCIAL lnY
 0.65559348 -4.8734562 0.032484621 0.99117399
POTENCIAL X sqry
 .2474403E-03 0.54523256 0.11489641 0.95205875
PARABOLA V. sqrx Y
 0.027723994 -0.15205856 0.016031875 0.99362243
PARABOLA h. sqrx sqry
 0.016882826 0.29364864 0.045015196 0.98338169
PARABOLA l. X 1/Y
 -.10567272E-02 2.9857509 1.3993795 -0.83954435
HIPERBOLA aIIY 1/X Y
 -256.75214 1.1176956 0.17669903 -0.92728882
HIPERBOLA aIIX 1/X 1/Y
 820.50633 0.50779637 .83442124E-02 0.99444715
MICHAELIS-M. X ln(C-Y)
 -.20418406E-02 0.78791222 0.40378709 -0.84372325
EXP. INV. EL MENOR ERROR Q. ES EL DE LA REGRESSIO MICHAELIS-M.: 1/X 1/Y
 # de serie: 7, 8, 9,

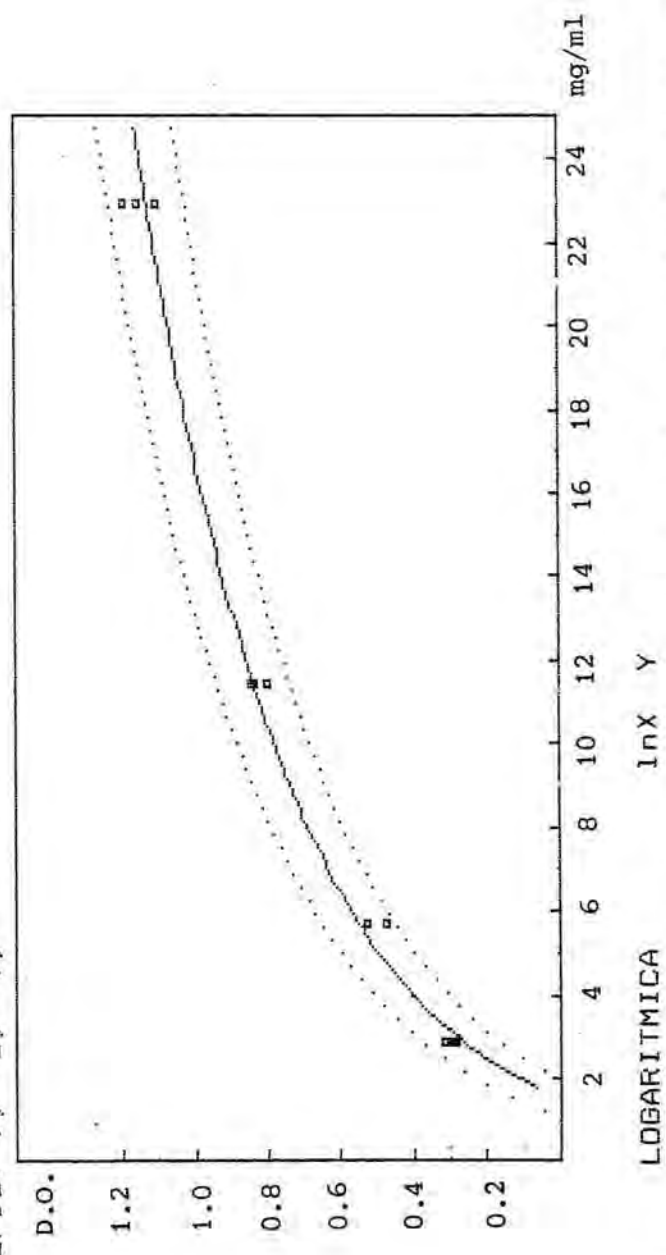


FIGURA 43: Estudi de totes les regressions possibles i corba de regressió utilitzada per a la determinació d'IgG

TAULA XXXIX: Evolució de la concentració d'IgG sèrica (mg/ml)

DIA	SÈRIE II		SÈRIE III	
	CONTROL	ARTRITIS	CONTROL	ARTRITIS
0	-	-	17.70 ± 1.366 (7)	-
14	19.46 ± 1.843 (8)	22.18 ± 1.278 (4)	16.26 ± 1.179 (8)	15.99 ± 1.517 (8)
21	-	19.82 ± 2.826 (5)	19.78 ± 2.130 (8)	18.06 ± 1.516 (6)
28	19.79 ± 2.201 (8)	20.80 ± 2.748 (6)	-	-
35	-	25.33 ± 3.634 (7)	-	-
42	22.94 ± 2.033 (8)	23.05 ± 2.672 (5)	-	-

10. INFLUÈNCIES TERAPÈUTIQUES

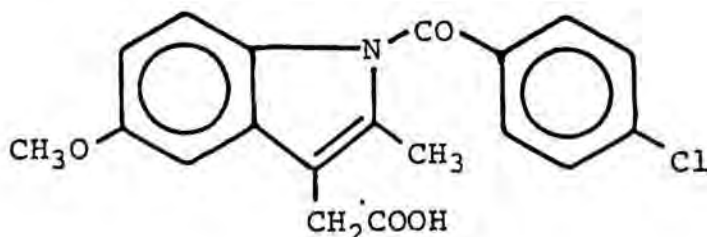
S'ha estudiat l'efecte de tres agents antiinflamatoris sobre l'artritis adjuvant: la indometacina, el benoxaprofè i la superòxid dismutasa.

En termes generals els agents antiinflamatoris no esteroïdals, als quals pertanyen la indometacina i el benoxaprofè, exerceixen la seva acció inhibint la síntesi de prostaglandines. D'aquesta manera redueixen la inflamació però no l'eliminen completament, ja que, com es pot deduir de la part teòrica del treball, les prostaglandines només són responsables parcials del procés inflamatori. Els agents antiinflamatoris no esteroïdals realitzen la seva intervenció principalment a nivell de la formació de PGG_2 a partir de l'àcid araquidònic via prostaglandin sintetasa (Ford i col., 1984).

La majoria dels agents antiinflamatoris no esteroïdals són de naturalesa acídica, i s'acumulen a les àrees corporals amb un pH àcid, com succeeix a l'estómac, als ronyons i al teixit inflamat (Hamor, 1981). En aquestes àrees és on aquestes substàncies produeixen els seus efectes terapèutics o els seus efectes adversos.

10.1. TRACTAMENT CURATIU AMB INDOMETACINA

És l'àcid 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acètic.



S'ha utilitzat en el tractament de l'artritis reumatoide, l'osteoartritis, l'espondilitis anquilosant, la gota i la bursitis aguda o tendonitis (Turner, 1984).

És un potent agent antiinflamatori (Calabro, 1975) i a més té acció antipirètica i un cert poder analgèsic. És un fàrmac que inhibeix la síntesi de prostaglandines, disminueix la quimiotàxia i la mobilitat dels PMN i pot afectar la funcionalitat dels limfòcits T i B. També s'ha observat que a dosis elevades inhibeix l'alliberament d'enzims lisosomals (Damas i col., 1982) i també inhibeix el metabolisme de l'àcid araquidònic via lipoxigenasa (Bragt i col., 1980).

S'absorbeix ràpidament i completament al tracte gastrointestinal i arriba a les màximes concentracions plasmàtiques entre 30 minuts i 2 hores. La indometacina en sang circula en un 98 % unida a l'albumina (Bhat i col., 1980; Ekman i col., 1980). És matabolitzada al fetge i al ronyó i és excretada per l'orina, principalment com a glucurònid. Té una vida mitjana plasmàtica de 13.7 ± 6.9 hores, existint una gran variació entre individus, fet atribuïble al cicle entero-hepàtic que té el fàrmac (Fredj i col., 1982).

Els principals efectes adversos observats durant l'administració perllongada d'indometacina, són cefalees, vertígens i alteracions gastrointestinals. També es poden observar depressions, somnolència, confusió, edema i guany de pes, erupcions cutànies, etc. (Roe, 1977; Martindale, 1982).

En aquest treball el tractament amb indometacina (Lâbex S.A.) s'ha realitzat en la sèrie experimental IV. La dosi utilitzada ha estat d'1 mg/kg/dia, administrada en forma de suspensió extemporània en carboximetilcel.lulosa i Tween-80, per via oral mitjançant una sonda gàstrica metel.lica. El tractament es va iniciar al dia 14 de la inducció, en animals prèviament seleccionats com a artrítics. Les administra

cions van ser diàries i es van perllongar fins al dia 28. Simul·taniament es va administrar la mateixa dosi a un grup control.

També es va estudiar, únicament en un grup artrític, la dosi de 3 mg/kg/dia. Aquest tractament va durar només una setmana, donat l'elevat índex de mortalitat presentat pels animals tractats (62.5 %).

10.1.1. Efecte sobre les determinacions somatomètriques

El tractament amb indometacina a dosis d'1 mg/kg/dia exerceix en efecte curatiu sobre la inflamació mesurada en les extremitats ipsilateral i contralateral. A la taula XL es poden observar els resultats de l'increment de volum d'ambdues extremitats obtinguts després d'una setmana de tractament conjuntament amb els valors dels animals control i artrítics sense tractar. L'administració amb indometacina provoca una reducció significativa en l'increment de volum de l'extremitat contralateral ($p < 10^{-11}$) que s'ha estimat en 1.20 (0.92-1.49) al dia 21 i en 1.38 (1.02 - 1.72) al dia 28. Aquesta disminució a causa del tractament fa que no existeixin diferències significatives entre els animals control i els artrítics tractats després d'una setmana de tractament.

Anàlogament, en els animals artrítics tractats es redueix significativament la inflor desenrotllada a l'extremitat ipsilateral ($p < 10^{-11}$), i aquest decrement s'ha estimat en 1.86 (1.51 - 2.21) al dia 21 i 2.47 (2.01 - 2.94) al dia 28. Malgrat això, els valors d'increment de volum de l'extremitat ipsilateral en els animals artrítics tractats són encara, significativament més elevats que els del grup control ($p < 10^{-3}$ el dia 28).

La indometacina a dosis de 3 mg/kg/dia produeix un efecte curatiu molt marcat sobre els increments de volum de

de les extremitats (taula XL). Després d'una setmana de tractament, els animals administrats presentaven una disminució de l'increment de volum de l'extremitat contralateral estimada en 1.49, amb uns límits fiducials de 1.08 i 1.91, i una reducció de l'increment de volum de l'extremitat ipsilateral estimada en 2.40, amb uns límits fiducials de 1.84 i 2.96. Aquest efecte curatiu comporta que no hagin diferències significatives entre el grup tractat i el grup control.

10.1.2. Efecte sobre els paràmetres hematològics

També s'ha pogut observar l'efecte curatiu de la indometacina a dosis d'1 mg/kg/dia, sobre la concentració de grups sulfhidril sèrics. A la taula XL es resumeixen els valors obtinguts a partir dels animals tractats i dels animals no tractats, els dies 21 i 28 de la patologia. Després d'una setmana de tractament els valors dels -SH dels animals artrítics tractats han augmentat significativament ($p < 0.005$) i presenten un increment de l'ordre de 38.99 (63.81 - 14.16). A la segona setmana del tractament, la normalització de la concentració de grups -SH sèrics és més gran: s'ha estimat que l'increment és de 87.30 (114 - 60.07) i la significació és de $p < 10^{-7}$. Malgrat aquest efecte de la indometacina, els nivells de -SH en els animals artrítics tractats encara estan significativament reduïts respecte als animals control el dia 28 de l'estudi ($p < 10^{-3}$).

Els animals artrítics tractats amb 3 mg/kg/dia d'indometacina no han mostrat diferències significatives pel que fa als nivells de -SH respecte al grup artrític no tractat.

10.1.3. Efecte sobre les determinacions immunològiques

A la sèrie IV també s'han estudiat els nivells d'anti-Ig i d'antiIg de la classe IgG, els quals estaven significati-

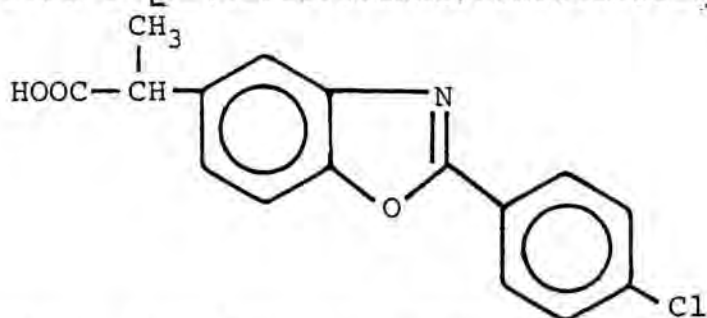
TAULA XL: Efecte de la indometacina (IND) sobre l'increment de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral i sobre la concentració sèrica de grups sulfhidril.

	DIA	CONTROL	CONTROL + IND (1 mg/kg/dia)	ARTRITIS	ARTRITIS + IND (1 mg/kg/dia)	ARTRITIS + IND (3 mg/kg/dia)
EXTREMITAT IPSIATERAL (ml)	21	m	0.499	3.881	1.880	1.345
		e	0.047	0.267	0.160	0.248
		n	16	13	14	6
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	28	m	0.429	3.536	1.126	-
		e	0.047	0.342	0.111	-
		n	8	7	7	-
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	21	m	0.421	2.173	0.812	0.492
		e	0.038	0.266	0.115	0.109
		n	16	13	14	6
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	28	m	0.440	1.841	0.589	-
		e	0.046	0.368	0.101	-
		n	8	7	7	-
GRUPS SULFIDRIL SÈRICS (µmol/l)	21	m	339.52	182.63	205.67	142.97
		e	4.17	22.64	21.86	9.14
		n	8	7	7	6
GRUPS SULFIDRIL SÈRICS (µmol/l)	28	m	347.64	176.31	285.37	-
		e	10.34	29.47	9.25	-
		n	8	7	7	-

vament elevats en el grup artrític els dies 14 i 21 (apartats 9.3.3.5. i 9.3.4.2.). El tractament amb indometacina, a les dues dosis esmentades no modifica l'evolució dels nivells d'antiIg ni antiIg IgG (taula XLI).

10.2. TRACTAMENT CURATIU AMB BENOXAPROFÈ

És l'àcid 2-[2-(4-clorofenil)benzoxazol-5]-propiònic.



Té accions analgèsiques, antiinflamatòries i antipirètiques. S'ha utilitzat en el tractament de l'artritis reumatoide i de l'osteoartritis, pero avui dia està retirat del mercat per causa de l'elevada incidència dels seus efectes secundaris.

A diferència dels altres agents antiinflamatoris no esteroïdals, el benoxaprofè actua sobre l'enzim que catalitza la síntesi de prostaglandines, i també inhibeix la lipoxigesa (Walker i col., 1979). També s'ha descrit que el benoxaprofè inhibeix "in vitro" la mobilitat de cèl.lules mononuclears humanes, de rata i de conillet d'Índies (Meacock i col., 1982) i la dels PMN, tant "in vitro" com "in vivo" (Anderson i col. 1984).

S'absorbeix bé al tracte gastrointestinal, arribant entre 2 i 6 hores a les màximes concentracions plasmàtiques. Es troba lligat a les proteïnes plasmàtiques en un 99 %, i té una vida mitjana de 30 a 35 hores. S'excreta sobretot per orina en forma de glucurònid.

TAULA XLI: Efecte de la indometacina (IND) sobre els nivells d'antiIg totals i d'antiIg IgG.

DIA	CONTROL	CONTROL + IND (1 mg/kg/dia)	ARTRITIS	ARTRITIS + IND (1 mg/kg/dia)	ARTRITIS + IND (3 mg/kg/dia)
21	m	32.60	63.29	78.90	103.37
	e	6.430	4.306	24.772	15.984
	n	7	7	7	6
	% positius	-	28.6	28.6	83.3
28	m	41.40	45.58	53.58	-
	e	9.183	6.724	12.910	-
	n	4	7	7	-
	% positius	-	14.3	14.3	-
ANTIIMMUNOGLOBULINES					
21	m	18.40	20.96	32.01	22.66
	e	0.829	1.651	8.638	2.049
	n	7	7	7	6
	% positius	-	14.3	42.8	16.7
28	m	20.16	19.42	24.90	-
	e	1.232	1.414	1.471	-
	n	8	7	7	-
	% positius	-	14.3	57.1	-
ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG (U/ml)					

Els efectes secundaris provocats pel benoxaprofè inclouen erupcions cutànies, reaccions de fotosensibilitat, onicòlisi i alteracions gastrointestinals (Martindale , 1982).

En aquest estudi s'ha administrat benoxaprofè (Lilly S.A.) a dosis de 5 mg/kg/dia per via oral, en suspensió en carboximetilcel.lulosa i Tween-80. El tractament es va iniciar el dia 14 de la inducció i es va donar diàriament fins al dia 42 en la sèrie II i fins al dia 21 en la sèrie III. En aquesta última sèrie es va administrar simultàniament a un grup control la mateixa dosi.

10.2.1. Efecte sobre les determinacions somatòmriques

A la sèrie II, s'ha observat que el benoxaprofè disminueix significativament les inflamacions de les extremitats ipsilateral i contralateral en els animals artrítics ($p < 10^{-4}$). A la taula XLII es troben resumits els resultats d'ambdues extremitats corresponents als animals control, artrítics i tractats. La disminució de l'increment de volum de l'extremitat contralateral s'ha estimat en 0.75, amb uns límits fiducials de 0.43 i 1.08. Aquest decrement, que és manté durant tot el període, no és suficient per aconseguir normalitzar els valors. Pel que fa a l'extremitat ipsilateral, després d'una setmana de tractament, s'observa una disminució significativa en el volum d'aquest paràmetre ($p < 10^{-10}$). La diferència entre els animals artrítics no tractats i els tractats va augmentant progressivament i s'ha estimat en 0.87 (0.64 - 1.09) el dia 21 de la inducció, i en 1.74 (1.29 - 2.19) el dia 42. Malgrat aquesta recuperació progressiva, al dia 42 el grup tractat encara presenta una diferència significativa amb el grup control ($p < 10^{-6}$).

El tractament amb benoxaprofè durant 7 dies en els animals artrítics de la sèrie III, disminueix significativa-

TAULA XLII: Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre l'increment de volum de les extremitats ipsilaterals i contralaterals (SÈRIE II)

DIA	EXTREMITAT IPSILATERAL				EXTREMITAT CONTRALATERAL			
	CONTROL	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX		CONTROL	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX	
21	m e n	0.726 0.066 16	3.605 0.139 28	3.046 0.140 28	0.529 0.040 16	1.904 0.142 28	1.253 0.102 28	
28	m e n	0.749 0.062 16	3.928 0.224 21	2.368 0.157 21	0.561 0.064 16	1.939 0.155 21	1.201 0.097 21	
35	m e n	0.733 0.099 8	3.749 0.236 14	2.319 0.182 14	0.561 0.111 8	1.932 0.218 14	1.372 0.156 14	
42	m e n	0.796 0.082 8	3.713 0.381 7	1.999 0.266 7	0.498 0.088 8	1.581 0.343 7	1.319 0.206 7	

ment els resultats del volum de les extremitats ipsilateral i contralateral ($p < 0.01$), encara que aquests resultats no arriben als nivells control (taula XLIII).

En la sèrie III es van observar modificacions en el pes de melsa, timus i ronyons induïdes per la patologia, i el tractament amb benoxaprofè no ha exercit cap efecte curatiu sobre aquests paràmetres després d'una setmana de tractament. A la taula XLIII es poden veure aquests resultats.

10.2.2. Efecte sobre els paràmetres hematològics

Pel que fa a les alteracions induïdes per l'artritis sobre el proteïnograma, a la sèrie II, el fàrmac considerat té efecte sobre les quatre fraccions proteïques i sobre el quocient A/G. A la taula XLIV es poden observar els resultats obtinguts en els animals tractats així com en el grup artrític i en el control d'aquesta sèrie. El benoxaprofè eleva significativament els reduïts nivells d'albúmina a causa de la patologia ($p < 10^{-15}$), fet que ja és palès el dia 21. L'increment proporcionat pel tractament és de 16.01 amb uns límits fiducials de 18.97 i 13.06. La recuperació dels valors normals d'albúmina en els animals tractats és progressiva, de manera que el dia 42, després de 4 setmanes de tractament, no presenten diferències amb els nivells control.

El benoxaprofè disminueix significativament els valors elevats d'alfa i beta-globulines ($p < 0.001$). La diferència entre els animals artrítics i els tractats, significativa ja el dia 21, s'ha estimat en 9.06 (6.40 - 11.73) per a la fracció alfa; per a la fracció beta aquesta diferència ha variat amb el temps i s'ha estimat en 1.20 (0.58 - 1.81) el dia 21, en 1.59 (0.78 - 2.41) el dia 28, en 1.99 (0.97 - 3.01) el dia 35 i en 2.39 (1.17 - 3.62) el dia 42. El dia 35 i el dia 42 de l'estudi els valors d'alfa i beta-globulines del grup

TAULA XLIII: Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre l'increment de volum de les extremitats ipsi lateral i contralateral, i sobre el pes d'òrgans (SÈRIE III).

		CONTROL	CONTROL + BNX	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX
EXTREMITAT IPSI LATERAL (ml)	m	1.001	0.908	5.590	3.344
	e n	0.049 32	0.147 8	0.378 41	0.281 7
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	m	0.765	0.523	2.998	1.458
	e n	0.040 32	0.063 8	0.264 41	0.108 8
PES MELSA (%)	m	0.2877	0.2900	0.4025	0.3937
	e n	0.0193 8	0.0166 8	0.0139 8	0.0310 8
PES TIMUS (%)	m	0.2342	0.2412	0.2077	0.2416
	e n	0.0137 8	0.0162 8	0.0217 8	0.0176 8
PES RONYONS (%)	m	0.7650	0.7555	0.8960	0.8737
	e n	0.0174 8	0.0219 8	0.0384 8	0.0267 8

TAULA XLIV: Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre el proteïno
grama (SÈRIE II)

		DIA	CONTROL	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX
ALBÚMINA	21	m	-	19.14	32.98
		e	-	1.044	2.038
		n	-	6	7
	28	m	48.34	21.73	43.88
		e	1.422	1.929	2.783
		n	8	7	7
	35	m	-	29.22	45.96
		e	-	2.542	1.023
		n	-	7	6
	42	m	47.88	29.20	42.27
		e	1.454	2.651	2.407
		n	8	7	7
α -GLOBULINES	21	m	-	43.91	37.04
		e	-	1.745	1.605
		n	-	7	7
	28	m	26.58	44.12	28.30
		e	0.717	0.774	2.461
		n	8	6	7
	35	m	-	34.20	28.28
		e	-	2.347	2.776
		n	-	7	6
	42	m	26.92	35.97	30.34
		e	0.510	1.764	2.033
		n	8	7	7
β -GLOBULINES	21	m	-	21.00	20.55
		e	-	0.335	0.836
		n	-	6	7
	28	m	13.88	18.82	17.83
		e	0.523	0.813	0.620
		n	8	7	7
	35	m	-	17.14	16.15
		e	-	0.509	0.604
		n	-	6	6
	42	m	13.95	18.08	14.33
		e	0.721	0.956	0.498
		n	8	7	6

TAULA XLIV: Continuació.

		DIA	CONTROL	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX
γ-GLOBULINES	21	m	-	13.76	12.38
		e	-	0.803	0.360
		n	-	7	6
	28	m	11.30	16.69	11.74
		e	0.800	1.000	0.460
		n	8	7	7
	35	m	-	19.15	13.76
		e	-	0.977	1.574
		n	-	7	6
	42	m	12.51	17.82	12.58
		e	0.543	0.924	0.939
		n	7	7	7
QUOCIENT A/G	21	m	-	0.238	0.500
		e	-	0.0155	0.0450
		n	-	6	7
	28	m	0.946	0.283	0.809
		e	0.0536	0.0334	0.0926
		n	8	7	7
	35	m	-	0.424	0.871
		e	-	0.0513	0.0814
		n	-	7	7
	42	m	0.930	0.425	0.751
		e	0.0561	0.0577	0.0729
		n	8	7	7

tractat, respectivament, no presenten diferència significativa amb els del grup control.

L'increment de la fracció gamma en els animals artrítics de la sèrie II és reduït significativament a conseqüència del tractament ($p < 10^{-7}$). La diferència entre el grup artrític i el grup tractat, el dia 21, s'ha estimat en 2.90 amb uns límits fiducials de 1.98 i 3.82. Els valors de gamma globulines dels animals artrítics després d'una setmana de tractament no es diferencien significativament dels del grup control.

L'efecte del tractament sobre el quocient A/G és un increment significatiu ($p < 10^{-13}$) estimat en 0.3825 amb uns límits fiducials de 0.4656 i 0.2994, i al dia 42 la diferència entre els valors del grup control i els del grup tractat no és significativa.

Aquests efectes descrits corresponen a la sèrie II, el tractament de la qual es va realitzar des del dia 14 fins al dia 42. Com ja s'ha dit, a la sèrie III es va estudiar també l'efecte del benoxaprofè després d'una setmana d'administració diària (des del dia 14 al 21). A la taula XLV es poden observar els resultats del proteinograma, que corresponen a aquesta sèrie. El fàrmac no té una influència significativa sobre les nivells d'albúmina ni sobre els valors de beta-globulines. En canvi, s'ha observat que el tractament és capaç de reduir significativament els elevats percentatges d'alfa-globulines ($p < 10^{-5}$), reducció que s'ha estimat en 8.04 (4.68 - 11.39), però que és insuficient per a arribar als valors normals. L'administració de benoxaprofè redueix significativament els valors de les gamma-globulines ($p < 0.001$) en 2.10 (0.90 - 3.30), i el grup tractat no presenta diferències amb el grup control. Per últim, a la sèrie III s'ha observat que després d'una setmana de tractament, els animals artrítics augmentaven significativament els valors del quocient A/G ($p < 0.001$), increment estimat en 0.1866 (0.2850 - 0.0882)

TAULA XLIV: Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre el proteïnograma (SÈRIE III)

	CONTROL	CONTROL + BNX	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX
ALBÚMINA	m e n 53.92 1.422 8	54.01 1.068 8	36.91 2.162 8	45.63 2.393 8
α-GLOBULINES	m e n 21.26 0.914 8	21.19 0.959 8	32.53 2.218 8	26.89 1.054 8
β-GLOBULINES	m e n 12.90 0.755 8	13.04 1.010 8	17.31 1.472 8	17.42 0.905 8
γ-GLOBULINES	m e n 8.78 0.941 7	8.33 0.486 8	12.67 1.673 8	8.89 0.929 8
QUOCIENT A/G	m e n 1.263 0.0517 7	1.190 0.0395 8	0.592 0.0558 8	0.886 0.0893 8

però no normalitzaven els resultats (diferència amb el grup control, $p < 10^{-3}$).

El segon paràmetre hematològic considerat en aquest treball és la concentració sèrica de grups sulfhidril, que està reduïda en els animals artrítics. S'ha observat, a la sèrie III, que el benoxaprofè recupera significativament els nivells dels grups -SH ($p < 0.01$), però no arriba a normalitzar-los. L'increment detectat per efecte del fàrmac s'ha estimat en 52.3, amb uns límits fiducials de 44.2 i 60.4. A la taula XLVII es poden observar aquests resultats.

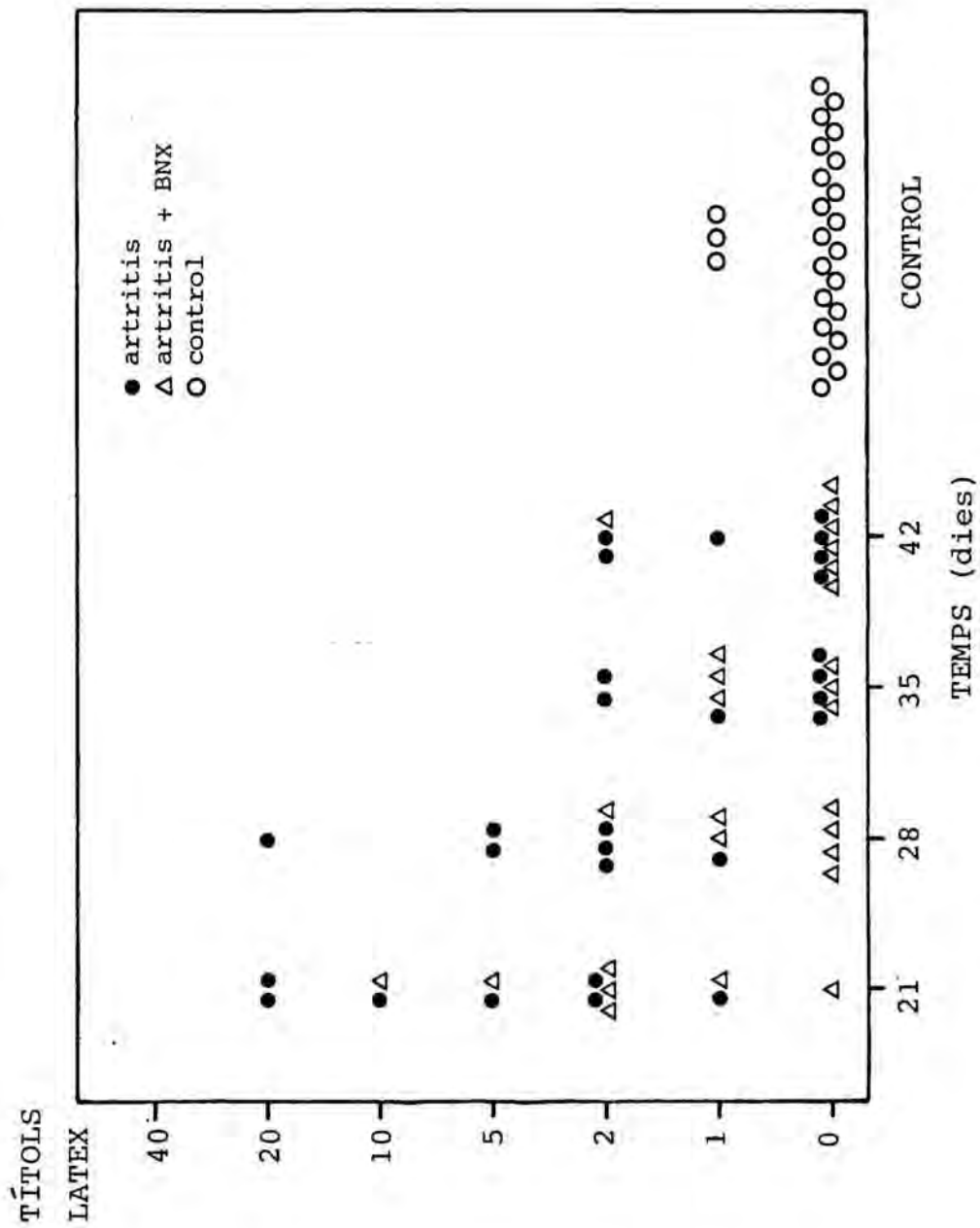
10.2.3. Efecte sobre les determinacions immunològiques

A la sèrie II es van trobar en els animals artrítics, els valors d'activitat complementària total significativament reduïts. El tractament amb benoxaprofè durant 4 setmanes no modifica d'una manera significativa aquests resultats (taula XLVI).

Pel que fa a la determinació d'antiimmunoglobulines mitjançant la tècnica d'aglutinació del làtex, a la sèrie II s'ha observat que el tractament redueix significativament els títols obtinguts ($p < 0.001$) de manera que el dia 21 aquests valors ja són normals. A la figura 44 es poden observar els títols de làtex obtinguts en els animals artrítics, en els tractats i en els control.

Per últim s'ha vist que els nivells d'antiimmunoglobulines detectats en el grup artrític tant en la sèrie II com en la sèrie III, no es modifiquen amb l'administració de benoxaprofè. El mateix succeeix amb els valors d'antiimmunoglobulines de la classe IgG de la sèrie II i de la sèrie III. A les taules XLVI i XLVII es pot observar l'efecte del tractament sobre les antiIg d'ambdues sèries experimentals.

FIGURA 44: Efecte del tractament amb benoxaprofè (BNX) sobre els títols de làtex



TAULA XLVI: Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre l'activitat complementària sèrica total i sobre els nivells d'antiimmunoglobulines (SÈRIE II)

	DIA		CONTROL	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX
ACTIVITAT COMPLEMENTÀRIA TOTAL (U/ml)	21	m	-	40.13	48.40
		e	-	6.497	3.367
		n	-	7	7
	28	m	65.85	63.10	44.60
		e	1.677	9.279	1.994
		n	7	7	6
	35	m	-	56.67	40.28
		e	-	6.071	4.523
		n	-	7	6
	42	m	55.75	46.56	50.24
		e	3.674	4.745	5.197
		n	7	7	7
ANTIIMMUNOGLOBULINES (U/ml)	21	m	-	96.44	84.42
		e	-	31.311	18.523
		n	-	6	7
		% positius	-	50.0	57.1
	28	m	46.92	107.14	69.86
		e	7.109	32.389	11.330
		n	5	7	7
		% positius	-	57.0	42.9
	35	m	-	96.86	65.38
		e	-	34.588	9.197
		n	-	7	6
		% positius	-	28.6	33.3
42	m	43.11	97.74	51.01	
	e	8.458	20.280	17.843	
	n	7	6	7	
	% positius	-	50.0	14.3	
ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG (U/ml)	21	m	-	32.32	37.31
		e	-		3.576
		n	-	1	7
		% positius	-	0	0
	28	m	43.73	40.83	52.75
		e	5.650	6.875	8.202
		n	5	5	6
		% positius	-	20.0	33.3
	35	m	-	69.00	40.25
		e	-	14.063	8.400
		n	-	7	6
		% positius	-	57.1	16.7
42	m	39.80	70.20	46.99	
	e	3.226	13.127	14.340	
	n	6	6	7	
	% positius	-	50.0	14.3	

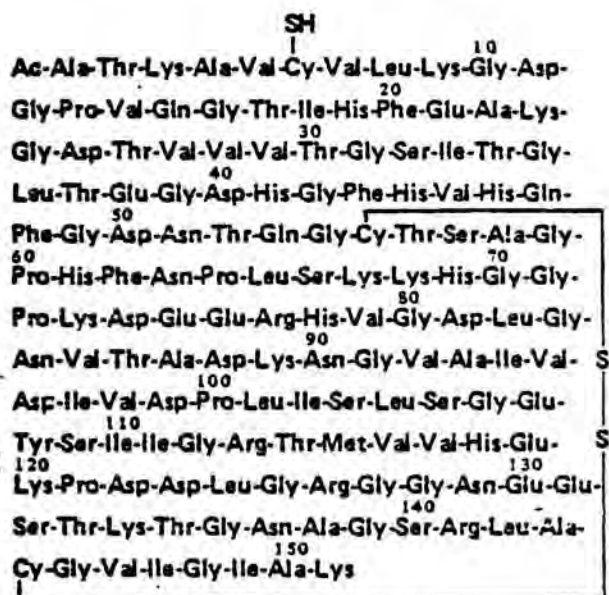
TAULA XLVII: Efecte del benoxaprofè (BNX) sobre la concentració de grups sulfhidril sèrics i sobre els nivells d'antiimmunoglobulines (SÈRIE III)

		CONTROL	CONTROL + BNX	ARTRITIS	ARTRITIS + BNX
GRUPS SULFHIDRIL SÈRICS (µmol/l)	m	363.96	374.99	164.76	224.26
	e	12.72	19.65	17.55	19.16
	n	8	8	7	8
ANTIIMMUNOGLOBULINES (U/ml)	m	41.11	44.81	183.68	69.56
	e	3.46	6.39	48.92	11.41
	n	8	8	8	8
ANTIIMMUNOGLOBULINES IgG (U/ml)	m	26.83	29.96	123.70	24.41
	e	3.79	8.32	27.43	3.01
	n	8	8	8	8

10.3. TRACTAMENT CURATIU AMB SUPERÒXID DISMUTASA

Les superòxid dismutases són un grup de metal.loenzims que es troben a baixes concentracions en bacteris, llevats, plantes i mamífers. Els eucariotes contenen generalment l'enzim amb coure i zinc (SOD-CuZn) i els procariotes tenen l'enzim amb ferro i manganès (SOD-FeMn) (Arrigoni-Martelli, 1980). Les SOD catalitzen el pas de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 i O_2 (apartat 3.7. de la part teòrica), aquesta reacció implicarà la reducció i reoxidació alternatives de l'enzim (Klug, 1972).

L'enzim aïllat a partir de fetge i eritròcits bovins és una SOD-CuZn que s'ha anomenat orgoteïna. L'orgoteïna està formada per dues subunitats idèntiques, cadascuna d'elles formada per 151 aminoàcids amb un pont disulfur entre les cisteïnes en posicions 55 i 144, i té un pes molecular de 32,600.



La SOD-CuZn té, selectivament, activitat antiinflamatòria. Administrada exògenament, l'orgoteïna no és capaç de travessar la membrana cel.lular, per això es creu que actua a nivell extracel.lular i que el seu efecte antiinflamatori està associat a la degradació de l'aniò radical superòxid, alliberat de les cèl.lules fagocítiques (McCord i col., 1980). Un altre mecanisme d'acció proposat és l'estabilització de cèl.lules o orgànuls cel.lulars implicats

en el procés inflamatori ja que s'ha observat que la SOD extracel.lular protegeix els granulòcits de la seva lisi (Arri-goni-Martelli, 1980).

Després de l'administració intravenosa, l'orgoteïna és ràpidament inactivada en el ronyó. La vida mitjana en rates i gossos és de 6-15 minuts. Després de l'administració i.p., i.m. i s.c., l'activitat enzimàtica arriba al màxim a la sang en 1-2 hores i després disminueix gradualment, de manera que a les 6-8 hores no és detectable (Beauchamp i col., 1971).

En aquest treball s'ha utilitzat SOD procedent de dues fonts, el fetge i els eritròcits bovins (Sigma). Els resultats d'ambdós tipus han estat els mateixos i, per això, es parlarà només d'una substància, la SOD. Es va administrar la dosi de 5 mg/kg/dia per via parenteral i el vehicle va ser solució salina amortidora de fosfats, 0.01 M, pH 7.4. A l'igual que els altres fàrmacs, el tractament va ser diari i es va iniciar el dia 14, un cop establerta la malaltia i seleccionats els animals artrítics, i es va prolongar fins el dia 21; al mateix temps es va administrar SOD a la mateixa dosi a un grup control, i també es va administrar el vehicle per via parenteral al grup control i al grup artrític sacrificats el dia 21. Els resultats presentats en aquest tractament corresponen a la sèrie III.

10.3.1. Efecte sobre les determinacions somatomètriques

La SOD comporta una disminució significativa de la inflamació desenvolupada en l'extremitat contralateral dels animals artrítics ($p < 0.01$), que s'ha estimat en 0.92, amb uns límits ficucials de 0.24 i 1.60.

D'altra banda la superòxid dismutasa no indueix canvis

en la mesura d'increment de volum de l'extremitat ipsilateral. A la taula XLVIII es poden observar els resultats dels grups tractats pel que fa als increments de les dues extremitats.

La influència de la SOD sobre els diversos pesos d'òrgans determinats no és tampoc significativa. Aquesta substància no és capaç de disminuir el pes relatiu de la melsa ni dels ronyons, ni de normalitzar el pes del timus (taula XLVIII).

10.3.2. Efecte sobre els paràmetres hematològics

Els efectes de la SOD sobre les diferents fraccions del proteïnograma es centren únicament sobre la fracció alfa. A la taula XLIV es poden observar els resultats del proteïnograma que corresponen al grup artrític, al grup control i al grup tractat, el dia 21 de la patologia. L'enzim indueix una reducció significativa sobre les alfa-globulines ($p < 0.005$), de manera que els animals artrítics tractats presenten uns percentatges d'aquest paràmetre normals. La reducció produïda per la SOD s'ha estimat en 1.30, amb uns límits ficucials de 4.73 i 2.12.

L'administració de superòxid dismutasa no té una influència significativa sobre la concentració sèrica de grups sulfhidril dels animals artrítics (taula L).

10.3.3. Efecte sobre les determinacions immunològiques

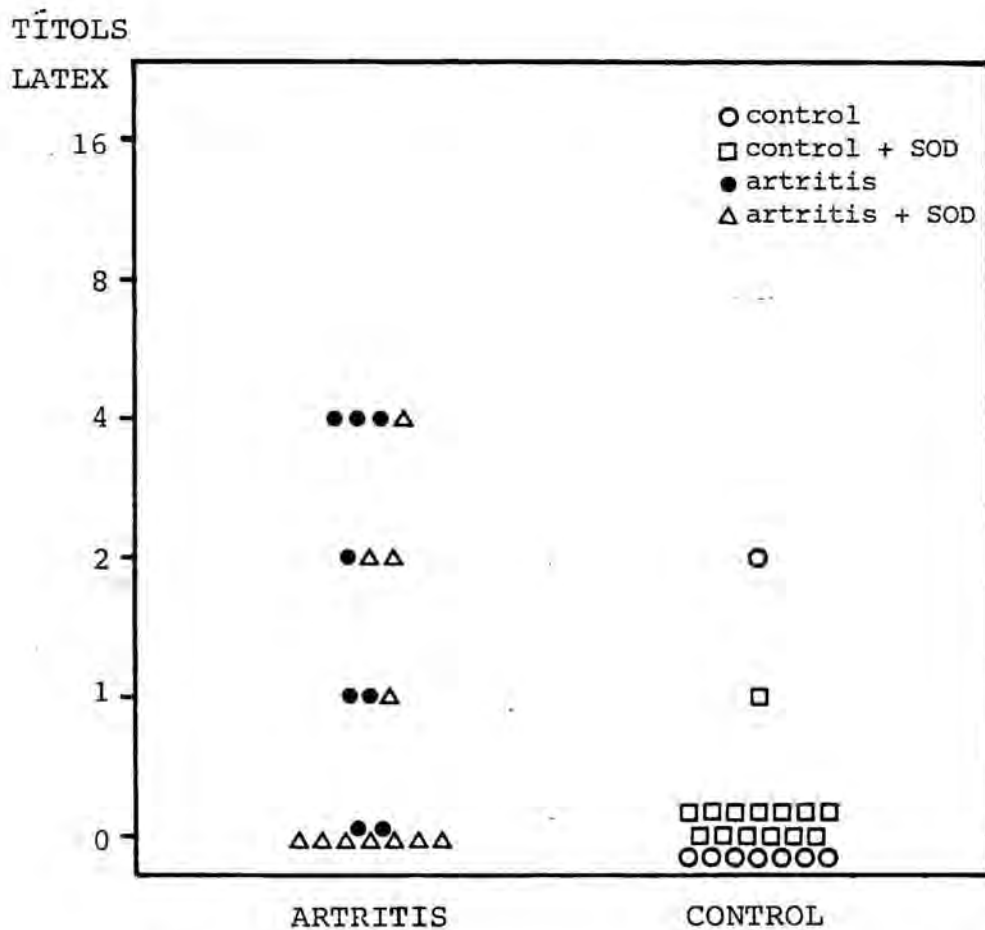
No s'ha observat cap modificació significativa en els títols de làtex dels animals artrítics tractats amb SOD. A la figura 45 es poden observar aquests resultats.

El tractament amb SOD no normalitza els valors d'anti-Ig totals ni d'antiIg IgG després d'una setmana de tractament (taula L).

TAULA XLVIII: Efecte de la SOD sobre l'increment de volum de les extremitats ipsilateral i contralateral, i sobre el pes d'òrgans

	CONTROL	CONTROL + SOD	ARTRITIS	ARTRITIS + SOD
EXTREMITAT IPSI LATERAL (ml)	m e n 1.001 0.049 32	0.925 0.066 15	5.590 0.378 41	5.001 0.419 14
EXTREMITAT CONTRALATERAL (ml)	m e n 0.765 0.040 32	0.635 0.056 15	2.998 0.264 41	1.989 0.187 13
PES MELSA (%)	m e n 0.2877 0.0193 8	0.3194 0.0200 15	0.4025 0.0139 8	0.4443 0.0255 14
PES TIMUS (%)	m e n 0.2342 0.0137 8	0.2509 0.0142 14	0.2077 0.0217 8	0.2290 0.0102 13
PES RONYONS (%)	m e n 0.7650 0.0174 8	0.7744 0.0090 15	0.8960 0.0384 8	0.8686 0.0174 13

FIGURA 45 : Efecte de la SOD sobre els títols de làtex



TAULA XLIX: Efecte de la SOD sobre el proteïnograma

		CONTROL	CONTROL + SOD	ARTRITIS	ARTRITIS + SOD
ALBÚMINA	m e n	53.92 1.422 8	52.58 1.011 15	36.91 2.162 8	36.74 1.505 12
α -GLOBULINES	m e n	21.26 0.914 8	22.61 0.847 15	32.53 2.218 8	30.68 1.440 12
β -GLOBULINES	m e n	12.90 0.755 8	13.44 0.545 15	17.31 1.472 8	19.02 0.416 12
γ -GLOBULINES	m e n	8.78 0.941 7	9.28 0.717 15	12.67 1.673 8	10.73 0.499 12
QUOCIENT A/G	m e n	1.263 0.0517 7	1.198 0.0344 15	0.592 0.0558 8	0.622 0.0382 12

TAULA L: Efecte de la SOD sobre la concentració de grups sulfhidril sèrics i sobre els nivells d'antiimmunoglobulines

	CONTROL	CONTROL + SOD	ARTRITIS	ARTRITIS + SOD
GRUPS SULFHIDRIL SÈRICS (mol/l)	m e n	363.96 12.72 8	335.42 12.34 14	164.76 17.55 7
				170.27 8.88 11
ANTIIMMUNOGLOBULINES (U/ml)	m e n	41.11 3.46 8	45.57 2.40 5	183.68 48.92 8
	% positius	-	-	87.5
				184.04 39.82 13
ANTIIMMUNOGLOBULINES (U/ml)	m e n	26.83 3.79 8	30.08 3.18 4	123.70 27.43 8
	% positius	-	-	100
				194.10 15.09 13
				100

D I S C U S S I Ó

L'artritis adjuvant és una patologia induïda en rata mitjançant l'administració, via intradèrmica, d'adjuvant complet de Freund. Stoerk, al 1954, i Pearson, al 1956, van ser els que primer van induir aquesta patologia que ha estat àmpliament utilitzada per a l'estudi de fàrmacs antiinflamatoris. L'artritis adjuvant es manifesta com una poliartritis subaguda o aguda que afecta a turmells, canells i petites articulacions de les extremitats, incloent bastant sovint, articulacions interfalàngiques terminals. Es presenta com una sinovitis seguida de periartritis, peritendinitis, periostitis, formació de pannus, destrucció del cartílag i de l'os, i finalment anquilosi fibrosa (Pearson i col., 1961).

L'artritis adjuvant es pot dividir en quatre fases (De Castro Costa i col., 1981): una fase preclínica (des del dia 1 al 10) en la qual hi ha absència de símptomes clínics sistèmics; una fase aguda (del dia 10 fins al 30) en la qual s'observen els signes de la inflamació: vermellor, edema i calor, localitzats principalment a les potes posteriors i a la base de la cua; una fase postaguda (des del dia 30 fins al 50) en la qual els signes de la inflamació estan més reduïts, i una fase tardana (a partir del dia 50) en la qual s'observen senyals de recuperació clínica.

S'ha induït la patologia en rates Sprague-Dawley, si bé altres soques, com Wistar, Lewis, Holtzman, Charles River, etc., són també susceptibles (Mohr i col., 1976). El que s'ha vist és que diferents ventrades tenen diferent susceptibilitat (Waksman i col., 1960), fet que pot explicar la variació entre la incidència de l'artritis observada en aquest treball. Hi ha autors que no troben diferències entre sexes (Glenn i col., 1965; Rosenthale, 1970), però en aquest treball s'ha observat que a les femelles la incidència és més gran i també la gravetat de la patologia, fet que coincideix amb els

treballs de Berczi i col. (1984).

L'artritis es pot induir mitjançant diferents espècies de micobacteris com Mycobacterium phlei, Mycobacterium butyricum i Mycobacterium tuberculosis, sense cap diferència ni avantatge (Pearson i col., 1959) encara que les espècies més utilitzades són les dues últimes. En aquest treball s'ha utilitzat M. butyricum al 0.5 %, homogeneïtzat en vaselina líquida i injectat via intradèrmica.

La inoculació via intradèrmica és la més efectiva sobretot si l'administració es realitza a l'extremitat posterior o a la cua (Waksman i col., 1960). La via subcutània és la segona via d'elecció, mentre que injeccions intraperitoneals o intramusculars són menys efectives (Owen, 1980).

Durant la primera setmana després de la inducció, s'observa una inflamació a l'extremitat inoculada. Més tard, entre els dies 10 i 14 s'inflamen les altres articulacions, fet manifest sobretot a l'extremitat posterior no injectada. Les extremitats anteriors i la cua estan menys afectades que les posteriors, on s'observa que el turmell és l'articulació més alterada (Pearson i col., 1959); els genolls, els malucs i les espatlles rarament s'afecten (Pearson i col., 1963). S'ha vist que el grau de precocitat de la inflamació és proporcional a la intensitat del procés posterior (Waksman i col., 1960).

En cada sèrie experimental realitzada s'ha utilitzat un criteri de selecció dels animals artrítics. Aquest criteri, aplicat el dia 14, es basa en el càlcul de l'interval de valors normals del volum de l'extremitat contralateral (mitjana dels animals control més-menys dues desviacions estàndard). Hi ha autors que també estableixen un nivell per seleccionar els animals artrítics, però no ho fan calculant els marges de normalitat (Benslay i col., 1982; Francis i col., 1983), mentre que d'altres no fan cap tipus de selecció (Toivonen i col., 1982).

Rosenbaum i col., 1983; Taurog i col., 1983).

El valor del volum de l'extremitat contralateral s'ha prèes com a indicatiu de l'artritis, ja que reflecteix la impli cació sistèmica de la patologia induïda. Aquest paràmetre s'ha mantingut elevat en totes les sèries estudiades i no s'han observat fluctuacions ni remissions com descriuen alguns autors (Pearson i col., 1961; De Castro Costa i col., 1981).

En els animals artrítics hem observat una disminució en el pes corporal durant els primers dies i posteriorment un retard a la corba ponderal en comparació als animals control. Cap al dia 50 de la inducció l'increment de pes dels animals artrítics s'igualava al dels controls. L'evolució d'aquest paràmetre durant la patologia està d'acord amb les descrites per altres autors (Pearson i col., 1959; Currey i col., 1968; Chang, 1976; De Castro Costa i col., 1981). Hem pogut observar que la disminució en el creixement dels animals artrítics està associada a una disminució en la quantitat d'aliment ingerida, fet que podria ser conseqüència del dolor que acompanya a la inflamació, com ha postulat Colpaert i col. (1982). Hem compro vat, però, que aquesta reducció de la ingesta no produeix "per se" les alteracions observades en els paràmetres mesurats.

La patologia artrítica està associada a una sèrie de manifestacions extraarticulares com són lesions nodulars en orelles, superfície de la cua, prepuci i peus, lesions cutà nies i oculars, lesions genitourinàries, diarrea (Pearson i col., 1961; Mohr i col., 1976; Owen, 1980), granulomes en pul mons, fetge i nòduls limfàtics (Pearson, 1961), etc. S'ha vist també que hi ha un augment en els nòduls limfàtics que drenen al lloc d'inoculació (Rosenthale, 1970), en la melsa (Glenn i col., 1965) i en les glàndules suprarenals (Persellin i col., 1972). També s'ha descrit una disminució en el pes del timus, però no de la tiroides, dels ronyons, del fetge ni del cor (Piliro i col., 1966). En aquest sentit, les determinacions dels pesos d'òrgans realitzades en aquest treball indiquen un

augment en el pes relatiu de melsa i de glàndules adrenals, i una disminució en el del timus. Aquestes alteracions en el pes de melsa i timus es manifesten ja tres dies després de la inducció . Aquests canvis són, probablement, reaccions no específiques a causa de la inflamació i/o l'stress (Owen, 1980). Hem trobat també que el pes dels ronyons està incrementat a conseqüència de l'artritis, fet que podria ser degut al desenvolupament d'una glomerulonefritis mitjançada per immunocomplexos, de manera similar a la que es produeix en ratolins MRL/l autoimmunes, que presenten manifestacions artrítiques associades a la malaltia del lupus eritematós sistèmic (Tarkowski i col., 1984).

Pel que fa a l'estudi dels paràmetres locomotors, s'ha de considerar que en animals amb artritis adjuvant s'han observat canvis en la seva conducta. De Castro Costa i col. (1981) descriuen que en les rates artrítiques augmenta un comportament que anomenen "freezing" que consisteix en estar immòbil, mirant fixament i amb els ulls ben oberts, i també s'observa un increment en l'acció de gratar-se. Aquest autor troba també una disminució de la mobilitat dels animals artrítics, mesura que fa mitjançant l'observació directa dels animals. Aquesta reducció, conjuntament amb les alteracions de la conducta, l'atribueix al dolor experimentat pels animals. D'altra banda s'ha observat que l'artritis adjuvant provoca una disminució del llindar del dolor (Okuyama i col., 1984) i s'ha proposat aquesta patologia com un model animal de dolor crònic (Colpaert i col., 1980; 1982).

En aquest treball hem observat que la inducció de l'artritis produeix una disminució en l'activitat motora total dels animals i una reducció del contingut de potència de l'harmonic circadiari amb una variació de l'acrofase i una disminució en l'amplitud del moviment. Totes aquestes alteracions van associades

al procés artrític ja que no es manifesten fins als dies 10 - 14 i es correlacionen amb la inflamació sistèmica, és a dir, amb la mesura de l'extremitat contralateral. La reducció de l'activitat motora total del contingut de potència de l'harmònic circadiari i de l'amplitud es pot considerar com a resultat del dolor experimentat pels animals, ja que segueix la mateixa evolució que aquest, quantificat en rates amb artritis adjuvant mitjançant la tècnica de "vocalització" (Pircio, 1975) per Colpaert i col. (1982). La variació de l'acrofase s'ha descrit a la bibliografia tant en models animals com a l'home, com a conseqüència d'una depressió psíquica (Kripke i col., 1978; Wehr i col., 1979; Lloyd, 1980; Reite i col., 1982). A l'artritis adjuvant aquesta depressió podria ésser causada, probablement, per la cronicitat del dolor i de l'stress, donat que estudis realitzats en situacions d'stress agut no mostren modificacions en l'acrofase (Díez-Noguera i col., 1985).

Respecte als canvis hematològics, s'ha descrit que en animals amb artritis adjuvant la velocitat de sedimentació globular està incrementada (Piliero i col., 1966), el volum globular i el nombre total d'eritròcits estan reduïts (Glenn i col., 1965), la concentració de mucoproteïnes i gluco-proteïnes està elevada, els nivells de fibrinogen, α_1 , α_2 i beta-globulines estan augmentats i la concentració d'albúmina, així com el quocient d'albúmina/globulines estan disminuïts (Glenn i col., 1965; Piliero i col., 1966; Ishizuki i col., 1984). D'acord amb aquests resultats, en aquest treball s'ha observat que la concentració d'albúmina està reduïda, mentre els nivells d'alfa i beta-globulines estan augmentats. Aquests canvis s'han trobat ja el dia 3 de la inducció, de manera anàloga a les dades descrites per Owen (1980) i són similars als canvis proteïcs observats a l'artritis reumatoide (Ballantyne i col., 1971; Owen, 1980). Pel que fa als nivells de gamma-globulines, mentre que nosaltres hem trobat nivells elevats en dues de les quatre sèries considerades,

hi ha autors que descriuen concentracions lleugerament més baixes (Glenn i col., 1965) i d'altres troben valors normals (Piliero i col., 1966). La concentració proteica total determinada en aquest estudi no manifesta cap variació a conseqüència de l'artritis, tal com assenyalen altres autors (Owen, 1980), encara que Glenn i col. (1965) observen una lleugera disminució. S'ha vist, però, que les alteracions descrites en el proteïnograma poden tenir lloc en altres patologies diferents a l'artritis i semblen estar relacionades amb processos inflamatoris inespecífics (Glenn i col., 1965; Owen, 1980). S'ha observat també que a la inflamació aguda disminueix la síntesi hepàtica d'algunes proteïnes com l'albumina (Jamieson i col., 1973; Princen i col., 1981; Schreiber i col., 1982) i s'ha suggerit que aquesta disminució pot ser deguda al fet que el fetge té una capacitat de síntesi proteica limitada, de manera que a la inflamació augmenta la síntesi de proteïnes de fase aguda i disminueix la d'albumina (Mahu i col., 1984).

Un altre paràmetre hematològic mesurat en aquest treball ha estat la concentració sèrica de grups sulfhidril. Aquests valors s'han trobat significativament reduïts de manera anàloga a altres estudis d'artritis adjuvant (Glenn i col., 1965; Butler i col., 1959; Barbier i col., 1984) i també tal com s'ha descrit a l'artritis reumatoide humana (Grimaldi, 1980; Pickup i col., 1980; Di Simplicio, 1983; Sitton i col., 1983): Aquesta disminució apareix ja el dia 3 de la inducció, encara que no s'observen canvis en la patologia articular sistèmica fins als dies 10 - 14. Aquest fet fa pensar que la modificació dels grups sulfhidrils sèrics pot formar part dels esdeveniments primaris que són fonamentals en el desenvolupament del procés articular crònic. Així, els radicals oxidants alliberats pels fagòcits durant la inflamació en els primers estadis poden ser responsables d'un consum de grups sulfhidril (reductors). A l'artritis adjuvant s'han descrit alteracions hepàtiques (Ishizuki i col., 1983)

que podrien implicar un menor recanvi ("turnover") de grups reductors i així no podrien solventar el consum d'aquests.

En condicions normals, s'ha descrit que la majoria de grups sulfhidril sèrics detectats pertanyen a l'albúmina (Di Simplicio, 1983). Aleshores es podria postular que la reducció de -SH és un reflex de la disminució d'albúmina en el plasma, però els nostres resultats mostren que el decrement observat en la concentració de -SH és superior al del percentatge d'albúmina. Així, per exemple, en la sèrie III s'ha trobat el dia 14 de la inducció, que la reducció de l'albúmina a causa de la patologia és del 46 %, mentre que la dels grups -SH és del 64 %. De la mateixa manera, el dia 21 els percentatges de disminució són 23 % i 39 % respectivament. Per tant, s'ha de considerar l'existència d'un factor addicional que condiciona en part la reducció de grups sulfhidril sèrics.

A l'artritis reumatoide, Gerber (1964) ha suggerit que els baixos nivells de -SH detectats poden estar associats a una alteració de la reacció d'intercanvi sulfhidril-disulfur. Aquest fet pot implicar l'agregació de proteïnes sèriques, particularment d'IgG amb l'exposició de nous llocs antigènics i la subseqüent producció d'autoanticossos (factor reumatoide). Com a model d'aquesta hipòtesi, s'ha vist que l'agregació de la IgG a causa de la calor és parcialment dependent de grups sulfhidril i es pot inhibir per acció d'agents que contenen -SH com l'aurotiomalat i la D-penicil·lamina (Gerber, 1964) o la cisteïna i el glutatió (Queralt i col., 1982).

En aquest treball els grups sulfhidril sèrics mesurats es correlacionen amb la inflamació sistèmica determinada a través de l'increment de volum de l'extremitat contralateral i també amb les diferents proteïnes sèriques i amb el quocient A/G. Els tractaments amb indometacina (1 mg/kg/dia) i benoxaprofè (5 mg/kg/dia) a partir del dia 14, incrementen els

valors de grups -SH. Anàlogament, en pacients amb artritis reumatoide s'ha vist que el tractament amb diferents antiinflammatoris recupera els valors plasmàtics de -SH (Grimaldi, 1980).

Aquests resultats indiquen que la determinació dels grups sulfhidril sèrics podria ésser utilitzada com a una prova objectiva de la patologia i així constituir un paràmetre útil per a l'estudi de l'eficàcia terapèutica, paral·lelament a altres índex com les proteïnes de fase aguda, que donen idea de diferents aspectes del procés. S'ha d'esmentar, a més, que la determinació de -SH és ràpida i senzilla i, ja que en el procés preartrític experimental s'ha detectat en fases primerenques, constitueix un marcador precoç de la patologia.

En relació als paràmetres immunològics estudiats per nosaltres ens hem de referir ineludiblement al principal grup d'autoanticossos detectats a l'artritis reumatoide, els factors reumatoides. Aquests són autoanticossos que reconeixen determinants antigènics situats sobre els fragments Fc de la IgG (Pasquali i col., 1982). S'han descrit FR de les classes IgM, IgG, IgA i IgE (Francklin i col., 1957; Bokisch i col., 1972; Moshi i col., 1981) i s'han evidenciat en grans quantitats en el sèrum i fluid sinovial de la majoria de pacients amb artritis reumatoide, encara que no són específics d'aquesta malaltia. El factor reumatoide de la classe IgM s'ha detectat, mitjançant la tècnica d'aglutinació del làtex, en un 70-80 % de malalts amb artritis reumatoide (Pasquali i col., 1982).

A nivell experimental, s'han detectat autoanticossos del tipus del factor reumatoide en el sèrum de conills després d'una hiperimmunització amb bacteris morts (Abruzzo i col. 1961; Christian, 1963) o amb artritis induïda per injecció intraarticular de fragments d'IgG (Fehri col., 1982). També s'han

trobat aquests anticossos en el sèrum de ratolins, com en algunes soques que desenvolupen patologies del tipus de l'artritis reumatoide o del lupus eritematós (Capra i col., 1971; Hang i col., 1982; Van Snick i col., 1983; Tarkowski i col., 1984), després d'una immunització secundària amb una varietat d'antígens proteics (Couli i col., 1983; Nemazee i col., 1983; Couli i col., 1985; Nemazee i col., 1985) o també en absència de patologia, de manera espontània, com per exemple en la soca 129/Sv (Van Snick i col., 1979; Van Snick, 1981; Stassin i col., 1983).

En rates, Glenn (1966) no va aconseguir detectar factor reumatoide en el sèrum d'animals amb artritis adjuvant. En aquesta patologia l'únic tipus d'autoanticòs detectat ha estat l'anticòs anticol.lagen (Trentham i col., 1980).

En aquest treball s'han trobat en rates amb artritis adjuvant autoanticossos contra les immunoglobulines autòlogues. Això s'ha realitzat mitjançant tres tècniques que han quantificat diferents classes d'autoanticossos.

Mitjançant la tècnica d'aglutinació del làtex s'ha pogut detectar la presència d'autoanticossos de la classe IgM. Les partícules de làtex s'han sensibilitzat amb immunoglobulines autòlogues i per això els anticossos detectats s'han anomenat antiimmunoglobulines. Els títols de làtex desenvolupats en els animals artrítics són relativament baixos si es comparen amb els que normalment es troben pel factor reumatoide a l'artritis humana, en la qual es consideren valors positius títols superiors a 1/20 o 1/40 i segons aquest criteri el 95 % de la població normal no té un resultat positiu. En aquest estudi, el límit de positivitat establert per nosaltres a la dilució 1/1, exclou el 90 % dels animals control.

Ja que, mitjançant la tècnica d'aglutinació del làtex es van posar de manifest els autoanticossos a l'artritis adjuvant, es van dissenyar dues tècniques d'ELISA

que permetessin quantificar les antiimmunoglobulines i també les antiIg de la classe IgG ja que a l'artritis humana s'ha vist que els nivells de factor reumatoide IgG es correlacionen millor amb la patologia (Pasquali i col., 1982).

La primera tècnica posada a punt va ser un ELISA capaç de quantificar els autoanticossos totals. Els antígens units a la fase sòlida varen ésser immunoglobulines de ratolí. Els factors reumatoides es caracteritzen per no ser específics d'espècie (Pasquali i col., 1982) i en canvi, les antiIg de rata detectades per nosaltres, malgrat tenir reacció creuada amb les immunoglobulines de ratolí, sembla que no presenten tota la inespecificitat característica del FR, ja que no són capaces de reaccionar amb immunoglobulines humanes, si bé en aquest sentit no s'han assajat les possibles reaccions creuades amb altres espècies.

Els nivells d'antiIg s'han manifestat ja durant el període preartrític, al tercer dia de la inducció, i s'han mantingut elevats durant tot el període considerat (fins el dia 42) en dues de les tres sèries estudiades. Aquests resultats es correlacionen amb els títols de làtex obtinguts.

Els autoanticossos de la classe IgG s'han detectat mitjançant la utilització de conjugat enzimàtic específic per a la IgG. Els nivells d'antiIg IgG no són significatius durant el període preartrític, sinó que comencen a ser significatius el dia 14 i es mantenen també elevats durant tot el procés considerat com succeeix a les antiIg totals. Els resultats d'antiIg IgG es correlacionen amb els d'antiIg totals.

Els nivells d'autoanticossos totals quantificats es poden considerar com la suma de les antiIg de la classe IgM detectades mitjançant la tècnica d'aglutinació del làtex i

de les antiIg de la classe IgG determinades mitjançant una tècnica d'ELISA. A aquesta addició s'haurien d'afegir potser, les antiIg pertanyents a les altres classes d'immunoglobulines però no es creu que la seva participació sigui tant important, ja que els FR IgA i IgE tenen una petita implicació en l'artritis reumatoide (Pasquali i col., 1982). Durant el període preartrític es detecten nivells significatius d'antiIg totals però no d'antiIg IgG, per tant, es pot considerar que en aquest període dominen els autoanticossos IgM, probablement com a resultat d'una resposta primària, i a partir del dia 14 es comencen a formar autoanticossos IgG possiblement com a resposta secundària, donada la persistència de l'antigen inductor.

Cal assenyalar que els nivells d'antiIg totals, d'antiIg IgM i d'antiIg IgG es correlacionen amb diferents paràmetres indicadors de la patologia com són les concentracions d'albúmina i beta-globulines, al quocient A/G i la concentració de grups sulfhidril sèrics.

A la vista d'aquests resultats sembla evident que després de la inducció de la patologia artrítica es produeix, ràpidament, una alteració del sistema immune que es tradueix en un augment, o inici, de la síntesi d'autoanticossos. El mecanisme capaç d'induir aquesta síntesi d'autoanticossos no es coneix amb certesa, però es poden postular dues vies no excloents: un canvi conformacional a la IgG o un desequilibri immunològic.

En relació a la primera teoria, s'ha de considerar que la inducció de la patologia es realitza amb Mycobacterium butyricum termoinactivat, les parets cel·lulars del qual estan formades per diferents components polimèrics que posseeixen propietats immunològiques (Stewart-Tull, 1980). L'adjuvant complet de Freund, a l'igual que altres adjuvants, és un activador policlonal de les cèl·lules B (Countinho i col., 1975) i és capaç d'induir una resposta en IgM i IgG visible

ja a partir del dia 3 de l'administració (Hadjipetrou i col., 1984). En ratolins, s'ha vist que l'administració d'activadors inespecífics de les cèl.lules B estimula la producció d'anti-IgG, és a dir, augmenta la síntesi d'autoanticossos (Dresser, 1978; Koopman i col., 1980).

Les parets dels micobacteris estan constituïdes per peptidoglicans formats per una cadena de glicà amb residus de N-acetil-D-glucosamina i àcid muràmic (Stewart-Tull, 1980). Quan un bacteri penetra al organisme i és fagocitat, els enzims lisosòmals actuen sobre els peptidoglicans de la paret i separen els constituents peptídics, però en el cas dels micobacteris, la paret està protegida de l'atac enzimàtic gràcies a una sèrie de components lipídics associats a les capes més externes (Stewart-Tull, 1980). La fagocitosi "frustrada" d'aquest material comporta l'alliberament sostingut de radicals oxigenats amb una gran capacitat reactiva. Aquests radicals lliures poden actuar sobre la IgG, provocar un canvi en la seva conformació i fer-la així antigènica. De fet, a l'artritis reumatoide s'ha postulat que canvis conformacionals de la IgG induïts per una inflamació inespecífica poden donar un caràcter antigènic a la immunoglobulina (Steffen, 1983; Harris, 1984).

La segona teoria que pot explicar l'etiologia de les patologies autoimmunes es basa en el desequilibri de la xarxa immunitària postulada per Jerne al 1974. Aquest autor suggereix que l'equilibri del sistema immune es manté gràcies a una complicada sèrie d'interaccions entre anticossos (idiotipus) i autoanticossos (antiidiotipus), regulada a la vegada per l'equilibri entre cèl.lules T col.laboradores (T_c) i cèl.lules T supressores (T_s).

S'ha postulat que les malalties autoimmunes poden ser conseqüència d'un efecte selectiu de les cèl.lules T supressores (Fundenberg i col., 1976). Aquestes cèl.lules exerceixen un control de retroalimentació negativa sobre els lim-

fòcits B, i juguen un paper essencial en la tolerància a antígens propis i estranys (Pierce i col., 1975). En aquest sentit es creu que les anormalitats immunològiques observades en el lupus eritematos sistèmic són degudes a una manca o pèrdua de funcionalitat de les cèl.lules T_S amb la subseqüent deficiència dels efectes moduladors sobre les cèl.lules B i T. Anàlogament, en l'artritis reumatoide s'ha vist un increment de la relació T_C/T_S (Pfreundschuh i col., 1981; Veys i col., 1981; Raeman i col., 1982). D'aquesta manera, un desequilibri en la relació T_C/T_S pot comportar un augment en la síntesi d'autoanticossos, s'ha de remarcar també que s'ha trobat un dèficit de cèl.lules T_S en rates amb artritis adjuvant (Arrigoni-Martelli i col., 1984).

A l'artritis reumatoide s'han descrit a més del factor reumatoide, autoanticossos com els anticossos antinuclears (Aitchison, 1980; García-De la Torre i col., 1982) i els anticossos anticol.lagen (Beard i col., 1980; Trentham i col., 1980). Aquests últims es formen probablement a conseqüència de canvis conformacionals que poden tenir lloc a causa de radicals lliures i proteases alliberades pels fagòcits (Beard i col., 1980).

A l'artritis adjuvant els anticossos anticol.lagen poden tenir un paper cronificador de la malaltia, però no es creu que en siguin els inductors. Contràriament s'ha descrit un model experimental d'artritis induïda per col.lagen (Trentham i col., 1977) en el qual els animals s'immunitzen amb col.lagen de tipus II i, després de la reinoculació, desenvolupen una patologia artrítica paral·lela a una resposta immune humoral i cel·lular al col.lagen (Morgan i col., 1980; Stuart i col., 1984). Aquesta patologia experimental cursa amb sinovitis i implica la destrucció del cartílag i de l'os (Stuart i col., 1979), i en ella no s'han detectat altres autoanticossos que els anticol.lagen, la inducció dels quals és sens dubte produïda per la immunització. A l'artritis reu-

matoide i a l'artritis adjuvant la presència d'anticossos anticol.lagen i d'antiimmunoglobulines no es produeix per cap tipus d'immunització específica, sinó que altres factors immunològics relacionats amb la inflamació han d'intervenir per induir la resposta en autoanticossos.

Un cop formats els autoanticossos, aquests s'uniran als antigens autòlegs i formaran immunocomplexos que, a través de l'activació del sistema de complement, poden ser responsables de lesions tissulars. A l'artritis reumatoide s'ha observat en el fluid sinovial, una disminució de l'activitat complementària total (Palmer, 1978; Kim i col., 1980) i un augment en la concentració dels fragments C3c i C3d, productes resultants de l'activació del component C3, fets que reflecteixen el consum del complement en aquest nivell (Berkowicz i col., 1983). Al sèrum s'han observat valors d'activitat complementària total normals, reduïts i augmentats (Palmer, 1978; Kim i col., 1980), resultats que no indiquen si hi ha activació del complement, però els nivells de C3d s'han trobat elevats (Nydegger i col., 1977; Bourke i col., 1982; Berkowicz i col., 1983; Aguado i col., 1984) fet que reflecteix un consum. En estudis metabòlics s'ha posat de manifest un augment en la síntesi dels components del complement, associat amb la síndrome inflamatòria característica de l'artritis reumatoide (Weinstein i col., 1972; Kaplan i col., 1980), i així s'entén que malgrat un consum de complement, si hi ha un augment de la síntesi dels components, els nivells d'aquest en el plasma siguin normals o fins i tot elevats, fet que explicaria la dispersió trobada a la bibliografia. S'ha observat, però, que pacients amb manifestacions extraarticulares presenten nivells inferiors (Aguado i col., 1984), i que hi ha una correlació entre els nivells de C3d i els d'immunocomplexos (Bourke i col., 1982).

A l'artritis adjuvant, hi ha autors que troben un augment en l'activitat complementària total sèrica quan es manifesta l'artritis (Flax i col., 1963; Glenn i col., 1965;

Owen, 1980) mentre que altres demostren nivells normals (Berczi i col., 1982). Els nostres resultats mostren que en les rates artrítiques els valors d'activitat complementària sèrica estan reduïts. Així, anàlogament a l'artritis humana hi ha disparitat en els resultats. De totes maneres, el sistema de complement ha de tenir un paper important en aquesta patologia experimental, ja que s'ha vist que la descomplementació dels animals retarda l'inici de la malaltia (Kourounakis i col., 1973).

A més de les alteracions humorals comentades fins ara, no s'han d'excloure altres mecanismes d'hipersensibilitat retardada postulats per diferents autors (Waksman i col., 1960; Chang, 1976; Mohr i col., 1976; Nagao i col., 1980). Durant el procés inflamatori induït per les parets bacterianes dels micobacteris, s'alliberaran limfoquines i altres mediadors (apartat 3. de la part teòrica) que contribuiran en aquest mecanisme d'hipersensibilitat retardada.

Per últim, s'ha de considerar l'efecte del tractament utilitzat. La indometacina i el benoxaprofè són dos fàrmacs, que a les dosis emprades, tenen un efecte inhibidor sobre el metabolisme de l'àcid araquidònic a través de la via ciclooxigenasa i la via lipoxigenasa (Siegel i col., 1979; Walker i col., 1979; Bragt i col., 1980; Walker i col., 1980; Ford-Hutchinson i col., 1981). Aquestes substàncies, administrades diàriament un cop establerta la patologia, han exercit un efecte curatiu sobre la inflamació de les extremitats posteriors, fet que coincideix amb les observacions d'altres autors (Benslay i col., 1982). S'ha vist també que tenen el mateix efecte sobre l'artritis induïda pel col.lagen (Phadke i col., 1982). A més en aquest estudi hem vist que la indometacina a dosis d'1 mg/kg/dia té un efecte normalitzador en la concentració sèrica de grups sulfhidril, i el benoxaprofè restaura també aquest paràmetre així com les alteracions observades en el proteïnograma. Ambdós fàrmacs, però, no són capaços de rebai-

xar els nivells d'antiimmunoglobulines.

La indometacina i el benoxaprofè són fàrmacs que actuen sobre els símptomes de la inflamació, però no combaten la causa d'aquesta, és a dir, són medicaments pal·liatius però no curatius (Higgs i col., 1981). A través de l'actuació sobre la cicloxigenasa inhibeixen la síntesi de prostaglandines, que són importants mediadors de la inflamació (apartat 3.6.1. de la part teòrica) i, mitjançant la seva acció sobre la lipoxigenasa, inhibeixen la formació de substàncies químio-tàctiques com el LTB_4 i per tant, l'acumulació de cèl·lules als llocs inflamats.

El fet que no actuen sobre els nivells d'antiimmunoglobulines fa pensar que aquestes poden tenir un paper primari en el desenvolupament de la inflamació. Això està d'acord amb els estudis realitzats amb alguns immunosupressors, capaços de reduir la patologia artrítica en rates (Stevens i col., 1969; Bicker, 1982).

Durant la inflamació es produeix l'acumulació de granulòcits i macròfags que, durant la fagocitosis, produiran l'anió radical superòxid. Aquest radical pot reaccionar amb altres molècules i donar lloc al radical hidroxil, considerat com l'iniciador de la peroxidació lipídica (apartat 3.7. de la part teòrica). La superòxid dismutasa és un enzim capaç de catalitzar el pas d'anió radical superòxid a peròxid d'hidrogen i hi ha estudis que mostren que aquest enzim té activitat antiinflamatòria. S'ha vist que té eficàcia a l'artritis adjuvant (Borrelli i col., 1979; Hirschelmann i col., 1981), a l'edema induït per carragenina (Oyanagui i col., 1982) i a l'edema induït per serotonina, histamina, bradicinina i kallikreïna en el ratolí (Oyanagui i col., 1981). En el nostre estudi, després d'una setmana de tractament hem observat una recuperació de la inflamació produïda a l'extremitat contralateral, però no hem detectat modificacions en els paràmetres hematològics alterats a causa de la patologia, i és més, hem observat

un augment en el nivell d'antiimmunoglobulines tant en animals artrítics com en els control.

Per acció de la SOD l'anió radical superòxid passa a peròxid d'hidrogen, però és necessària la presència de catalasa per a degradar el peròxid a aigua. Així podria ser que l'efecte terapèutic de la SOD depengués de l'existència de catalasa en el lloc de la inflamació, de manera que en exhaurir-se aquesta, l'efecte de la SOD podria ésser advers a conseqüència de l'acumulació de peròxid d'hidrogen. Això està d'acord amb els treballs de Bragt i col. (1980), que observen que la SOD administrada sola, no té efectes sobre la inflamació, però conjuntament amb la catalasa té una acció antiinflamatòria.

En resum, en aquest treball s'ha demostrat la presència d'uns autoanticossos al sèrum d'animals amb artritis adjuvant que fins ara no s'havien descrit. Aquest model experimental ha estat molt utilitzat per a l'estudi de fàrmacs antiinflamatoris i antireumàtics, i hi ha molts treballs que mostren les similituds trobades a nivell histològic entre l'artritis reumatoide i l'artritis adjuvant (Pearson i col., 1961; Mohr i col., 1976).

Està ben establert que els processos immunològics estan implicats en la malaltia humana i en la patologia experimental. En el cas de l'artritis reumatoide es coneixen bé les alteracions del sistema immune tant a nivell humoral com cel·lular, però a l'artritis adjuvant no s'havien descrit, fins fa poc, altres alteracions que les desenvolupades a nivell cel·lular. Els treballs de Trentham (1980) sobre els anticossos anticol·lagen van ser els primers indicatius d'una resposta en autoanticossos a la patologia experimental. Els nostres resultats, permeten considerar que a l'artritis adjuvant hi ha alteracions a nivell del sistema immune humoral de

la mateixa manera com succeeix a l'artritis reumatoide, fet que constitueix una nova relació de semblança entre les dues patologies.

D'altra banda, els anticossos antiimmunoglobulines poden constituir un paràmetre indicatiu de la inflamació crònica, de manera que els tractaments pal·liatius, però no els curatius, no restauren aquests nivells. En aquest sentit l'artritis adjuvant pot ser un model experimental per a la recerca de nous agents terapèutics, que haurien d'ésser capaços, no només d'actuar a nivell articular, sinó d'aturar la cronificació del procés, restablint l'homeostasi immunològica.

C O N C L U S I O N S

1. L'artritis adjuvant induïda per Mycobacterium butyricum produeix una inflamació articular sistèmica que es manifesta a partir del dia 14 de la inducció i es manté durant els 40 - 60 dies estudiats.
2. S'observen diferències en funció del sexe pel que fa a la incidència de l'artritis i a les modificacions dels paràmetres somatomètrics i hematològics induïts per la inflamació. Les alteracions són sempre superiors en les femelles.
3. L'augment de pes dels animals artrítics és més petit que el corresponent als animals control. Aquest menor creixement s'acompanya d'una reducció en la ingesta d'aliment.
4. La ingesta reduïda d'aliment no produeix "per se" les alteracions observades en els paràmetres hematològics estudiats.
5. A conseqüència del procés artrític, s'aprecia un increment en el pes de la melsa, de les glàndules suprarenals i dels ronyons, i una reducció en el pes del timus. Les alteracions observades en la melsa i el timus ha són significatives tres dies després de la inducció.
6. L'artritis adjuvant comporta una disminució de l'activitat motora total dels animals, una pèrdua del ritme circadiari i una reducció de l'amplitud del moviment. També s'observa una variació en l'acrofase. Aquests canvis es manifesten després de 10 - 14 dies, coincidint amb l'inici de la inflamació sistèmica.

Hi ha correlació entre la inflamació articular i les alteracions locomotores observades.

7. A partir del dia 3 de la inducció, hi ha una disminució d'albúmina i un augment en les alfa i beta-globulines sèriques. La fracció gamma-globulínica augmenta a partir del dia 14. El quocient albúmina/globulines és un bon indicador de les alteracions articulars.
8. Els grups sulfhidril sèrics disminueixen des dels primers dies després de la inducció de l'artritis, s'observen els valors mínims el dia 14 i es mantenen reduïts durant tot el procés artrític.
9. L'activitat complementària sèrica està disminuïda en els animals artrítics durant tot el període estudiat.
10. No es detecten anticossos antinuclears a conseqüència de la patologia. Tampoc s'ha trobat variació en la concentració d'immunoglobulina G total.
11. S'ha desenvolupat una tècnica d'aglutinació del làtex capaç de detectar antiimmunoglobulines de la classe IgM. Les partícules de làtex s'han sensibilitzat amb immunoglobulines de rata.
12. S'han posat a punt dues tècniques d'ELISA, d'elevada sensibilitat, per quantificar antiimmunoglobulines totals i antiimmunoglobulines de la classe IgG en el sèrum de rates. El substrat utilitzat per a la determinació ha estat constituït per immunoglobulines de ratolí.
13. Els animals artrítics desenvolupen autoanticossos antiimmunoglobulines de la classe IgM i de la classe IgG.

14. S'han detectat antiimmunoglobulines totals a partir del dia 3 de la inducció de l'artritis mentre que els autoanticossos de la classe IgG no s'observen fins fins al dia 14.
15. Els nivells d'antiimmunoglobulines totals es correlacionen amb els títols de làtex i amb els valors d'antiimmunoglobulines IgG.
16. La indometacina (1 mg/kg/dia), després d'una setmana de tractament redueix la inflamació articular (63 %), augmenta els nivells sèrics dels grups sulfhidril (13 %) i no modifica els nivells d'antiimmunoglobulines totals ni d'antiimmunoglobulines IgG.
17. El benoxaprofè (5 mg/kg/dia), administrat diàriament durant una setmana redueix la inflamació articular (51 %), restaura el quocient albúmina/globulines (50 %), augmenta els nivells de grups sulfhidril sèrics (36 %) i disminueix els títols de làtex. Aquest fàrmac, però, no modifica la concentració d'antiimmunoglobulines totals ni d'antiimmunoglobulines IgG.
18. La superòxid dismutasa (5 mg/kg/dia), després d'una setmana de tractament, disminueix la inflamació articular (34 %), i no modifica el reduït valor del quocient albúmina/globulines ni els nivells sèrics dels grups sulfhidril. Tampoc afecta les concentracions d'antiimmunoglobulines totals ni les d'antiimmunoglobulines IgG.

B I B L I O G R A F I A

- ABRUZZO JL, CHRISTIAN CL (1961). The induction of a rheumatoid factor-like substance in rabbits. *J. Exp. Med.* 114: 791.
- ADAMS DO, MARINO P (1983). Activation of mononuclear phagocytes for destruction of tumor cells as a model for study of macrophage development. *En Contemporary Topics in Hematology-Oncology, III*. AS Gordon, R Silber i J LoBue. Plenum. New York.
- AGNELLO V, ARBETTER A, IBANEZ G, POWER R, TAN EM, JOSLIN F (1980). Evidence for a subset of rheumatoid factors that cross react with DNA histone and have distinct idio^utype. *J. Exp. Med.* 151:1514.
- AGUADO MT, CELADA A, LAMBERT PH (1984). Hemolytic activity of the alternative complement pathway in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Inmunología* 3:12.
- AITCHESON CT, PEEBLES C, JOSLIN F, TAN EM (1980). Characteristics of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. Reactivity of rheumatoid factors with a histone-dependent nuclear antigen. *Arthritis Rheum* 23:528.
- AL-HABOUI HA, ZEITLIN IJ (1982). The actions of cimetidine hydrochloride and mepyramine maleate in rat adjuvant arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 78:175.
- ALTMAN LC (1978). *En Leukocyte Chemotaxis*. JI Gallin i PG Quie. Raven Press. New York. Pàg. 267.
- ANBALAGAN K, SADIQUE J (1984). Role of prostaglandins in acute phase proteins in inflammation. *Biochem. Med.* 31:236.
- ANDERSON R, LUKEY PT, NAUDE SPE, JOONE G (1984). Benoxaprofen: A pro-oxidant anti-inflammatory drug?. *Agent: Action* 14: 238.
- ANDERSON SE, REMINGTON JS (1974). Effect of normal and activated human macrofages on toxoplasma gondii. *J. Exp. Med.* 139: 1154.
- ARRIGONI-MARTELLI E (1980). Orgotein - A review. *Drugs Today* 16:97.
- ARRIGONI-MARTELLI E, BINDERUP L (1984). Immunotherapy of chronic inflammatory diseases. *Agent Action* 15:69.
- ASWANIKUMAR SB, CORCORAN B, SCHIFFMANN E, DAY AR, FREER RJ, SHOWELL HJ, BECKER EL (1977). Demost^ration of a receptor on rabbit neutrophils for chemotactic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74:210.

- BABIOR BM (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298:659.
- BABIOR BL, ROSEN RE, McMURRICH BJ, PETERS WA, BABIOR BM (1981). Arrangement of respiratory burst oxidase in the plasma membrane of the neutrophil. *J. Clin. Invest.* 67:1724.
- BADWEY JA, KARNOVSKY ML (1980). Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* 49:695.
- BAGGIOLINI M (1980). The neutrophil, en *The Cell Biology of Inflammation, Handbook of Inflammation 2*. LE Glynn, JC Houck i G Weissman. Elsevier North Holland, Amsterdam. Päg. 163-187.
- BALLANTYNE FC, FLECK A, DICK WC (1971). Albumin metabolism in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 30:265.
- BARBIER A, NAVARRO J, BRELIERE JC, RONCUCCI R (1984). Biochemical changes in rats with developing adjuvant arthritis. *Agent Action* 15:103.
- BARKAS T (1978). Biological activities of complement. *Biochem. Soc. Trans.* 6:798.
- BARRET AJ (1975). Lysosomal and related proteinases, en *Proteases and Biological Control*. E Reich, DB Rifkin i E Shaw. Cold Spring Harbor Labs. New York. Päg. 467.
- BARTFELD H, ATOYNATAN T (1971). Activity and properties of macrophage migration in inhibitory factor produced in MLC. *Nature* 230:246.
- BASRAN GS, PAUL W, MORLEY J, TURNER-WARWICK M (1982). Evidence in man of synergistic interaction between putative mediators of acute inflammation and edema. *Lancet* 1:1935.
- BAZIN S, DELAUNAY A (1971). Biochemistry of inflammation, IX, Chemical and physiological characterization of two cathepsins isolated from inflamed tissues. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 120:50.
- BEARD HK, RYVAR R, SKINGLE J, GREENBURY CL (1980). Anti-collagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. *J. Clin. Pathol* 33:1077.
- BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to a acrylamide gels. *Ann. Biochem* 44:276.
- BEAVEN MA (1976). Histamine. *N. Engl. J. Med.* 294:30.
- BECKER EL, SHOWELL HL, HENSON PM, HSU LS (1974). The ability

- of chemotactic factors to induce lysosomal enzyme release I. The characteristics of the release, the importance of surfaces and the relation of enzyme release to chemotactic responsiveness. *J. Immunol.* 112:2047.
- BENDTZEN K (1977). Human leukocyte migration inhibitory factor (LIF). III. Further investigation on the serine protease nature of this lymphokine and its preference for arginine amides. *Scand. J. Immunol.* 6:1055.
- BENSLAY DN, NICKANDER R (1982). Comparative effects of benoxaprofen and other anti-inflammatory drugs on bone damage in the adjuvant arthritic rat. *Agent Action* 12:313.
- BENTLEY C, ZIMMER B, HADDING U (1981). The macrophage as a source of complement components. *Lymphokines* 4:147.
- BERCZI I, NAGY E (1982). A possible role of prolactin in adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 25:591.
- BERCZI I, NAGY E, ASA SL, KOVACS K (1984). The influence of pituitary hormones on adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 27:682.
- BERKOWICZ A, KAPPELGAARD E, PETERSEN J, NIELSEN H, INGEMAN-HANSEN T, HALJOER-KRISTENSEN J, SORENSEN H (1983). Complement of C3c and C3d in plasma and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. C* 91:83.
- BERLIN RD, OLIVER JM, UKENA TE, YIN HH (1975). The cell surface. *N. Engl. J. Med.* 292:515.
- BESEDOVSKY HO, del REY AE, SORKIN E (1983). What do the immune system and the brain know about each other?. *Immunol. Today* 4:346.
- BHAT R, VIDYASAGAR D, FISHER E, HASTREITER A, RAMIREZ JR, BURNS L, EVANS M (1980). Pharmacokinetics of oral and intravenous indomethacin in preterm infants. *Dev. Pharmacol. Ther.* 1:101.
- BIANCO C, GRIFFIN F, SILVERSTEIN SC (1975). Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J. Exp. Med.* 141:1278.
- BICKER U (1982). Effect of the immunomodulant 2-cyanaziridine derivative BM-41.332 on adjuvant arthritis in the rat. *Arzneimittel Forschung/Drug Res.* 32-2:746.
- BIESECKER G, PODACK ER, HALVERSON CA, MÜLLER-EBERHARD J (1979). C5b-9 dimer: isolation from complement lysed cells and ultrastructural identification with complement dependent

- membrane lesions. *J. Exp. Med.* 149:448.
- BISGAARD H, KRISTENSEN J, SONDERGAARD J (1983). The effect of leukotriene C₄ and D₄ on microcirculatory flow in humans. *Brit. J. Dermatol.* 109 (suppl. 25):124.
- BLOCK LH, BERNHEIM HA, JACKSCHE H (1980). *En Biochemical Characterization of Lymphokines.* A Weck. Academic Press. New York. Pàg. 79.
- BOGGS DR (1975). Physiology of neutrophil proliferation, maturation and circulation. *Clin. Haematol.* 4:535.
- BOKISH VA, MÜLLER-EBERHARD HJ, COCHRANE CG (1969). Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylotoxin inactivator of human serum. *J. Exp. Med.* 129:1109.
- BOKISH VA, BERNSTEIN D, KRAUSE RM (1972). Occurrence of 19S and 7S anti-IgG during hyperimmunization of rabbits with streptococci. *J. Exp. Med.* 136:799.
- BONTA JL, PARNHAM MJ (1978). Prostaglandins and chronic inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 27:1611.
- BONTA JL, PARNHAM MJ (1979). Chronic inflammatory conditions and mechanisms by which they may be modulated by prostaglandin E. *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* 2:97.
- BOREL JP (1982). Clinical chemistry of inflammation and the role of connective disease. XI Int. Congress Clin. Chem. E Kaiser, F Gabl, MM Müller i M Bayer, Berlin-New York.
- BORRELLI F, SERAFINI C, MATTALIA G, CAPRINO L (1979). Additional pharmacological aspects of orgotein a metalloprotein with superoxide-dismutase activity. *Arzneim. Forsch.* 29: 781.
- BOROS DL (1980). The role of lymphokines in granulomatous in inflammations. *En Lymphokines,* E Pick i M Landy. Academic Press, New York. Pàg 257-281.
- BOURKE BE, MOSS IK, MUMFORD P, HORSFALL A, MAINI RN (1982). The complement fixing ability of putative circulating immune complexes in rheumatoid arthritis and its relationship to extra-articular disease. *Clin. Exp. Immunol.* 48: 726.
- BRAGT PC, BANSBERT JI, BONTA IL (1980). Antiinflammatory effects of free radical scavengers and antioxidants. Further support for proinflammatory roles of endogenous hydrogen peroxide and lipid peroxides. *Inflammation* 4:289.
- BRAGT PC, BONTA IL (1980). Indomethacin inhibits in vivo for-

- mation of the lipoxygenase product HETE (12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid) during granulomatous inflammation in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 32:143.
- BRAY MA, CUNNINGHAM FM, FORD-HUTCHINSON AW, SMITH MJ (1981). Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability. *Brit. J. Pharmacol.* 72:483.
- BRAY MA (1982). Leukotriene B₄: an inflammatory mediator with vascular actions in vivo. *Agent Action* 11 (Suppl. 1):51.
- BROMBERG Y, PICK E (1983). Unsaturated fatty acids as second messengers of superoxide generation by macrophages. *Cell. Immunol.* 76:240.
- BROWN PB, NARDELLA FA, MANNIK M (1982). Human complement activation by self-associated IgG rheumatoid factors. *Arthritis Rheum* 25:1101.
- BRUNE K (1984). The concept of inflammatory mediators, en *Discoveries in Pharmacology*, vol. 2: Haemodynamics, hormones and inflammation. MJ Parnham i J Bruinvels. Elsevier Science Publishers. Pàg. 487-498.
- BULKLEY GB (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 94:407.
- BURLEIGH MC, BARRETT AJ, LAZARUS GS (1974). Cathepsin B₁: A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem. J.* 137:387.
- BUTLER M, GIANNINA T, CARGILL DI, POPICK F, STEINETZ BG (1969). Abnormal sulfhydryl-dysulfide interchange in serum of rats with adjuvant arthritis: correction by anti-inflammatory agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132:484.
- CALABRO JJ (1975). Long-term reappraisal of indomethacin. *Drug Ther.* 5:47.
- CAPRA JD, WINCHESTER RJ, KUNKEL HG (1971). Hypergammaglobulinemia purpura. Studies on the unusual anti-gamma-globulins characteristic of the sera of these patients. *Medicine* 50:125.
- CARDELLA CJ, DAVIES P, ALLISON AC (1974). Immune complexes induce selective release of lysosomal enzymes by macrophages. *Nature (London)* 247:46.
- CARSON DA, LAWRENCE S, CATALANO MA, VAUGHAN JH, ABRAHAM G (1977). Radioimmunoassay for IgG and IgM rheumatoid factors reacting with human IgG. *J. Immunol.* 119:295.
- CASAMITJANA N (1980). Efecte de l'aïllament en l'activitat motora del ratolí. Estudi comparatiu dels mètodes de detec

- ció (inductiu i òptic). Tesi de Llicenciatura, Facultat de Farmàcia.
- CHANG Y (1977). Adjuvant polyarthritis I: Incorporation of quantitative measurements of humoral and cellular immune response. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutic* 201:1.
- CHENOWETH DE, TUGLI TE (1978). Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3943.
- CHRISTIAN CL (1963). Rheumatoid factor properties of hyperimmune rabbit sera. *J. Exp. Med.* 118:827.
- CLARK RA, GALLIN JI, KAPLAN AP (1975). The selective eosinophil chemotactic activity of histamine. *J. Exp. Med.* 142:1462.
- CLARK MF, ADAMS AN (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Urol.* 24:475.
- CLARK WR (1983). The experimental foundations of modern immunology, 2.^a edició. J Wiley & Sons, New York. Pàg. 143-147.
- COHEN S, WARD PA (1971). In vitro and in vivo activity of a lymphocyte and immune complex-dependent chemotactic factor for eosinophils. *J. Exp. Med.* 133:133.
- COHN ZA (1978). The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J. Immunol* 121:813.
- COLLEY DG (1973). Eosinophils and immune mechanism: I Eosinophil stimulation promoter (ESP): A lymphokine induced by specific antigen or phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 110:1419.
- COLPAERT FC, DE WITTE P, MAROLI AN, AWOUTERS F, NIEMEGERES CJE, JANSSEN PAJ (1980). Self-administration of the analgesic suprofen in arthritic rats: evidence of Mycobacterium butyricum induced arthritis as an experimental model of chronic pain. *Life Sci* 27:921.
- COLPAERT FC, MEERT TH, DE WITTE PH, SCHMITT P (1982). Further evidence validating adjuvant arthritis as an experimental model of chronic pain in the rat. *Life Sci.* 31:67.
- COOPER EL (1982). General Immunology. 5.^a edició. Pergamon Press, New York. Pàg. 119-129.
- COULIE P, VAN SNICK J (1983). Rheumatoid factors and secondary immune responses in the mouse: II Incidence, kinetics and induction mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 13:895.

- COULIE PG, VAN SNICK J (1985). Rheumatoid factor (RF) production during anamnestic immune responses in the mouse. III Activation of RF precursor cells is induced by their interaction with immune complexes and carrier-specific helper T cells. *J. Exp. Med.* 161:88.
- COUTINHO A, MOLLER G (1975). Thymus-independent B cell induction and paralysis. *Adv. Immunol.* 21:114.
- CRUNKHORN P, WILLIS AL (1971). Interaction between prostaglandins E and F given intradermally in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 41:507.
- CURREY HLF, ZIFF M (1968). Suppression of adjuvant disease in the rat by heterologous antilymphocyte globulin. *J. Exp. Med.* 127:185.
- CUTTERIDGE JM (1981). Thiobarbituric acid reactivity follow iron dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.* 128:343.
- CZARNETZKI BM, KONIG W, LUCHENSTEIN LM (1976). Eosinophil chemotactic factor (ECF)I. Release from polymorphonuclear leucocytes by the calcium ionophore A23187. *J. Immunol.* 117:229.
- DALE HH, LAIDLAW PP (1919). Histamine shock. *J. Physiol.* 52:355.
- DAMAS J, BOURDON V (1982). Inhibition de la liberation d'enzymes lysosomiales par l'indometacine in vivo. *C. R. Soc. Biol.* 176:744.
- DANCEY JT, DEUBELBEISS KA, HARKER LA, FINCH CA (1976). Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* 58:705.
- DANEN WC, ARUDI RL (1978). *J. Am. Chem. Soc.* 100:3944.
- DAVID JR (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:72.
- DAVIES P, ALLISON AC (1976). Secretion of macrophage enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation. *En Immunobiology of the macrophage*. DS Nelson. Academic Press, New York-San Francisco-London. Pàg. 428.
- DAVIES P, BAILEY PJ, GOLDENBERG MM, FORD-HUTCHINSON AW (1984). The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 2:335.
- DAVIS JM, GALLIN JI (1981). The neutrophil. *En Cellular functions in immunity and inflammation*. JJ Oppenheim, DL Rosensreich i M Potter. Elsevier North Holland, New York. Pàg. 75-102.

- DAYER JM, KRANE SM, GRAHAM R, RUSSELL G, ROBINSON DR (1976). Production of collagenase and prostaglandins by isolated adherent rheumatoid synovial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:945.
- DE CASTRO COSTA M, DE SUTTER P, GYBELS J, VAN HEES J (1981). Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain. Pain 10:173.
- DEL MAESTRO RF (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol. Scand. suppl. 492:153.
- DEMOPOULOS CA, PINCKARD RN, HANAHAN DJ (1979). Platelet activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol 1,3-phosphorycholine as the active component (a new class of lipid mediators). J. Biol. Chem. 254:9355.
- DEWITT DL, SMITH WL (1983). Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is a hemoprotein. J. Biol. Chem. 258:3285.
- DI SIMPLICIO P (1983). An improved method of determination of SH group concentration and reactivity in plasma of patients with various clinical disorders and in rats after administration of indomethacin or carbon tetrachloride. Pharmacol. Res. Commun. 15:805.
- DIAMOND B, YELTON DE (1981). A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG3. J. Exp. Med. 153:514.
- DIEZ-NOGUERA A, CAMBRAS T, RIBOT M, TORRALBA A (1985). Detection of changes in the mouse circadian system induced by stress. Int. Cronobiol. (en premsa).
- DINARELLO CA (1982). Human pyrogen: a monocyte product mediating host defences. En Advances in Host Defence Mechanisms, vol. 1. JI Gallin i AS Fauci. Raven Press, New York. Pàg. 57-74.
- DRATH DB, KARNOVSKY ML (1975). Superoxide production by phagocytic leukocytes. J. Exp. Med. 141:257.
- DRESSER DW (1978). Most IgM-producing cells in the mouse secrete auto-antibodies (rheumatoid factor). Nature (London) 274:480.
- DUMONDE DC, HAMBLIN A (1983). Lymphokines. En Immunology in Medicine, 2.^a edició. EJ Holborow i WG Reeves. Academic Press, London-New York. Pàg. 121-150.
- DUNN CDR (1971). The differentiation of haemopoietic stem cells. Series Haematologica IV:3.

- DVORAK AM, HAMMOND ME, DVORAK HF, KARNOSKY MJ (1972). Loss of cell surface material from peritoneal exudate cells associated with MIF activity. *Lab. Invest.* 27:561.
- EDELMAN GM, KUNKEL HG, FRANKLIN EC (1958). Interaction of rheumatoid factor with antigen-antibody complex and aggregated gamma globulin. *J. Exp. Med.* 108:105.
- EISENBERG R (1976). The specificity and polyvalency of binding of monoclonal rheumatoid factor. *Immunochem.* 13:358.
- EKMAN B, SJÖDIN T, SJÖHOLM I (1980). Binding of drugs to human serum albumin XV. Characterization and identification of the binding sites of indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* 29:1759.
- ELLMAN GL (1959). Tissue sulphidryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70.
- ENGVALL E, PERLMANN (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochem.* 8:871.
- ENGVALL E, HONSSON K, PERLMANN P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay: II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta* 251:427.
- ENGVALL E, PERLMANN P (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin. *J. Immunol.* 109:129.
- FALKOFF RJM, ZHU LP, FAUCI AS (1982). Separate signals for human B cell proliferation and differentiation in response to Staphylococcus aureus. Evidence for a two-signal model of B cell activation.
- FANTONE JC, KUNKEL SL, WARD PA, ZURIER RB (1980). Suppression by prostaglandin E₁ of vascular permeability induced by vasoactive inflammatory mediators. *J. Immunol.* 125:2591.
- FANTONE JC, WARD PA (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* 107:395.
- FARRAR JJ, BENJAMIN WR, HILFIKER ML, HOWARD M, FARRAR WL, FULLER-FARRAR J (1982). The biochemistry, biology and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol. Rev.* 63:129.
- FEE JA, VALENTINE JS (1977). Chemical and physical properties of superoxide, superoxide and superoxide dismutases. AM Michelson, JM McCord i I Fridovich. Academic Press, New York. Pàg. 19-60.

- FEHR K, VELVART M, ENGLER H, RAUBER M, BÖNI A (1982). Rheumatoid-factor positive arthritis of rabbits caused by intra-articular injection of autologous IgG fragments: comparison with chronic experimental allergic monoarthritis. En *Advances in Inflammation Research*, vol. 3: Rheumatoid Arthritis. S. Gorini i col. Raven Press, New York. Păg. 91-107.
- FERNANDEZ HN, HENSON PM, OTANI A, HUGLI TE (1978). Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylotoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J. Immunol* 120:109.
- FERREIRA SH (1972). Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature* 240:200.
- FERREIRA SH, LORENZETTI BB, COREA FMA (1978). Central and peripheral antialgic action of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 53:39.
- FERREIRA SH, NAKAMURA M (1979). Prostaglandin hyperalgesia. 1. A cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandin* 18:179.
- FLAX MH, WAKSMAN BH (1963). Further immunologic studies of adjuvant disease in the rat. *Int. Arch. Allergy* 23:331.
- FLOWER RJ, MONCADA S, VANE JR (1980). Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents: drugs employed in the treatment of gout. En *The pharmacological bases of therapeutics*. 6.ª ediciã. AG Gilman, LS Goodman i A Gilman. McMillan, New York. Păg. 682-728.
- FONTANA A, OTZ V, de WECK AL, GROB PJ (1982). Glia cell stimulating factor (GSF): a new lymphokine. 2. Cellular sources and partial purification of human GSF. *J. Neuroimmunol* 2: 73.
- FORD SW, KING EK, PENTO JT (1984). Biosynthetic inhibitors of prostaglandins and other arachidonic acid metabolites: a mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Drug Today* 20:175.
- FORD-HUTCHISON AW, BRAY MA, DOIG MV, SHIPLEY ME, SMITH MJH (1980). Leukotriene B: a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leucocytes. *Nature* 286:264.
- FORD-HUTCHINSON AW, BRAY MA, SHIPLEY ME, DOIG MV, SMITH MJH (1981). Leukotriene B: a biologically active release product of polymorphonuclear leucocytes. En *Inflammation: mechanisms and treatment*. MTP Press Limited England. Păg. 241-248.
- FORD-HUTCHINSON AW (1983). The role of leukotriene B₄ as a

mediator of leukocyte function.

- FOWLES RE, FAJARDO IM, LEBOWITCH JL, DAVID JR (1973). The enhancement of macrophage bacteriostasis by products of activated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138:952.
- FRANCIS MD, HORN PA, McCREARY LD (1983). Penetration and effect of topically applied dimethylsulfoxide or indomethacin on adjuvant arthritis in the rat. *Arthritis Rheum.* 26:861.
- FRANCKLIN E, HOLMAN HR, MÜLLER-EBERHARDT HJ, KUNKEL HG (1957). An unusual protein of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 105:425.
- FREDJ G, RENAT B, PETIT-JEAN O, PERRET G, ASTIER A (1982). Cinétique comparée d'une forme à libération prolongée et instantanée d'indomethacin. *Thérapie* 37:557.
- FRIDOVICH I (1975). Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 44:147.
- FRIOU GJ (1964). Immunofluorescence and antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 7:161.
- FUNDENBERG HH, WELLS JW (1976). The paradox of immunosuppression: T-cell deficiency as the cause of autimmunity. In *Infection and Immunity in the Rheumatic Diseases*. DC Du monde. Blackwell Scientific Publications. Pâg. 549-562.
- GALLIN JI, WRIGHT DG, SCHIFFMANN E (1978). Role of secretory events in modulating human neutrophil chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 62:1364.
- GARCIA DE LA TORRE I, MIRANDA MENDEZ L (1982). Studies of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 9:603.
- GERBER DA (1964). Role of the sulfhydryl group in the denaturation of human gammaglobulin. *J. Immunol.* 92:885.
- GHEBREHIWET B, MÜLLER-EBERHARD HJ (1979). C3e: an acidic fragment of human C3 with leukocytosis inducing activity. *J. Immunol.* 123:616.
- GILLILAND BC, FORD DK, MANNIK M (1978). Synthesis by an established cell line from a rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 21:330.
- GLENN EM, GRAY J, KOOYERS W (1965). Chemical changes in adjuvant-induced polyarthritis of rats. *Am. J. Vet. Res.* 26:1195.

- GLENN EM, KOOYERS WM (1966). Plasma inflammation units: an objective method for investigating effects of drugs on experimental inflammation. *Life Sci.* 5:619.
- GLOVSKY MM, HUGLI TE, ISHIZAKA T, LICHTENSTEIN LM, ERICKSON BW (1979). Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocyte binding and histamine release. *J. Clin. Invest.* 64:804.
- GOEZL EJ, AUSTEN KF (1975). Purification and synthesis of eosinophilotactic tetrapeptides of human lung tissue: identification as eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4123.
- GOETZL EJ, SUN FF (1979). Generation of unique mono-hydroxy eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils. *J. Exp. Med.* 150:406.
- GOETZL EJ, PICKETT WC (1980). The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acid (HETEs). *J. Immunol.* 125:1789.
- GOETZL EJ, BRINDLEY LL, GOLDMAN DW (1983). Enhancement of human neutrophil adherence by synthetic leukotriene constituents of the slow-reacting substance of anaphylaxis. *Immunol.* 50:35.
- GOLDSTEIN IM, HOFFSTEIN S, GALLIN J, WEISSMAN G (1973). Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes: Microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2916.
- GORDON S; TOOD J, COHN ZA (1974). In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 139:1228.
- GORDON S, UNKELESS JC, COHN ZA (1974). Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: Evidence for a two-stage process. *J. Exp. Med.* 140:995.
- GORSKI JP, HUGLI TH, MÜLLER-EBERHARD (1979). The third anaphylotoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5299.
- GREENBAUM LM (1972). Leukocyte kininogenases and leukokinins from normal and malignant cells. *Am. J. Pathol* 68:613.
- GREENE BM, COLLEY DG (1974). Eosinophils and immune mechanisms II. Partial characterization of the lymphokine eosinophil stimulation promoter. *J. Immunol.* 113:910.
- GREINER DK, CONNORTON KJ, DAVID JR (1979). Plasminogen activator production by human monocytes I Enhancement by activ-

- ated lymphocytes and lymphocyte products. *J. Immunol.* 123:2808.
- GRIFFIN FM (1984). Activation of macrophage complement receptors for phagocytosis. *Contemp. Top. Immunobiol.* 14:57.
- GRIFFITHS ID (1981). Autoantibodies in the rheumatic diseases. En *Immunological aspects of rheumatology*. W Carson Dick. MTP Press Limited, Lancaster. Pãg. 41-62.
- GRIMALDI MG (1980). Serum sulfhydryl concentrations and anti-rheumatic drugs in rheumatoid patients. *J. Pharm. Pharmacol.* 32:876.
- HADDING U, HAMURO J, BITTER-SUERMAN D (1978). Biological activities of the purified Ba fragment derived from guinea-pig factor B of the alternative pathway. *J. Immunol.* 120:1776 (abstr.).
- HADJIPETROU-KOUROUNAKIS L, MOLLER E (1984). Adjuvants influence the immunoglobulin subclass distribution of immune responses in vivo. *Scand. J. Immunol.* 19:219.
- HALLIVER B, CUTTERIDGE JM (1981). Formation of a thiobarbituric acid reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 128:347.
- HAMOR GH (1981). Nonsteroidal anti-inflammatory agents. En *Principals of Medicinal Chemistry*, 2.^a ediciã. WO Foye. Lea & Febiger, Philadelphia. Pãg. 561-590.
- HANG LM, THEOFILOPOULOS AN, DIXON FJ (1982). A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/1 mice. *J. Exp. Med.* 155:1690.
- HANNESTAD K, JOHANNESSEN A (1976). Polyclonal human antibodies to IgG (rheumatoid factor) which cross reacts with cell nuclei. *Scand. J. Immunol.* 5:541.
- HARRIS ED (1984). Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop. Related Res.* 182:14.
- HARRISON JE, SCHULTZ J (1976). Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 251:1371.
- HART H, MARION BO (1977). Rubella virus and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 36:3.
- HASSAN HM, FRIDOVICH I (1981). Chemistry and biochemistry of superoxide dismutase. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* 4:160.
- HAWKINS D (1972). Neutrophilic leukocytes in immunologic reactions: Evidence for the selective release of lysosomal constituents. *J. Immunol.* 108:310.

- HAYASHI H, YOSHINAGA M, YAMAMOTO M (1974). The nature of a mediator of leukocyte chemotaxis in inflammation. *Antibiot. Chemother.* 19:296.
- HENSON PM, OADES ZG (1973). Enhancement of immunologically induced granule exocytosis from neutrophils by cytochalasin B. *J. Immunol.* 110:290.
- HERTZ F, CLOAREC A (1984). Pharmacology of free radical: recent views on their relation to inflammatory mechanisms. *Life Sci.* 34:713.
- HIRSCHELMANN R, BEKEMEIER H (1981). Effects of catalase, peroxidase, superoxide dismutase and 10 scavengers of oxygen radicals in carrageenin edema and in adjuvant arthritis of rats. *Experientia* 37:1313.
- HOFFSTEIN ST (1980). Intra- and extracellular secretion from polymorphonuclear leukocytes. En *The Cell Biology of Inflammation*. G Weissan. Elsevier North Holland, Amsterdam. Pàg. 387-430.
- HOLGATE ST (1983). Mast cells and their mediators. En *Immunology in Medicine*, 2.^a edició. EJ Holborow i WG Reeves. Academic Press, London-New York. Pàg. 79-94.
- HOLMBERG P (1984). The physics and chemistry of free radicals. *Med. Biol.* 62:68.
- HOWE GB, FORDHAM JN (1981). Polymorphonuclear leukocytes (PMN): Origins, functions and roles in the rheumatic diseases. En *Immunological aspects of rheumatology*. W Carson Dick. MTP Press Limited. Lancaster. Pàg. 149-170.
- HORNSTRA G (1982). Thromboxanes and ischaemic vascular disease. *Neth. J. Med.* 25:6.
- HORWITZ AL, HANCE AJ, CRYSTAL RG (1977). Granulocyte collagenase: selective digestion of type III relative to type III collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:897.
- HOUCK JC (1979). *Handbook of inflammation*. Elsevier North Holland, Amsterdam. Pàg. 1.
- HOWELL DS, ALTMAN RD, PITA JC, KUETTNER K (1974). Presence and role of lysozyme in human osteoarthritic cartilage. *J. Rheumatol.* 1 (suppl. 1): 31.
- HUBER W (1981). Future trends in free radical studies. En *Inflammation. Mechanisms and treatment*. DA Willoughby i JP Giroud. MTP Press Limited, London.
- HUDSON L, HAY FC (1979). En *Inmunología práctica*. Ed. JIMS, Barcelona. Pàg. 143.

- HURST N, NUKI G (1981). The macrophage: origins, functions and role in the rheumatic diseases. En Immunological aspects of rheumatology. W Carson Dick. MTP Press Limited, Lancaster. Pãg. 183-209.
- IRVINE R (1982). How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? Biochem. J. 204:3.
- ISHIZAKA T, HIRATA F, STERK AR, ISHIZAKA K, AXELROD J (1981). Biochemical analysis of triggering signals for mediator release. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6812.
- ISHIZUKI S, FURUHATA K, KANETA S, FUJIHARA E (1983). Reduced drug metabolism in isolated hepatocytes from adjuvant arthritic rats. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 39: 261.
- ISHIZUKI S, FUJIHARA E (1984). Peroxidative status of isolated hepatocytes from adjuvant arthritic rats. Res. Comun. Chem. Pathol. Pharmacol. 44:431.
- JACKSON TE (1984). Comparison of a class regression equations. Am J. Physiol. 246:R271.
- JAMIELSON JC, ASHTON FE (1973). Studies on acute phase proteins of rat serum. III. Site of synthesis of albumin and alpha₁-acid glycoprotein and the contents of these proteins in liver microsome fractions from rats suffering from inflammation. Can. J. Biochem. 51:1034.
- JANOFF A, BLONDIN J, SANDHAUS RA, MOSSER A, MALEMOD C (1975). Human neutrophil elastase: in vitro effects on natural substrates suggest important physiological and pathological actions. En Proteases and Biological Control. E Reich, DB Rifkin i E Shaw. Cold Spring Harbor Labs, New York. Pãg. 603.
- JERNE NK (1974). Towards a network theory of the immune system. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 125C:373.
- JOHNSON PM, FAULK WP (1976). Rheumatoid factor: its nature, specificity and production in rheumatoid arthritis. Clin. Immunol. Immunopathol. 6:414.
- JOHNSTON RB, GODZICK CA, COHN ZA (1978). Increased superoxide anion production by immunologically activated chemically elicited macrophages. J. Exp. Med. 148:115.
- JUBIZ W, RADMARK O, MALMSTEN C, HANSSON G, LINDGREN JA, PALM-BLAD J, UDEN A, SAMUELSSON B (1982). A novel leukotriene produced by stimulation of leukocytes with formylmethionyl leucylphenylalanine. J. Biol. Chem. 257:6106.
- KAPLAN AP, AUSTEN KF (1971). A prealbumin activator of prekall

- likrein from active Hageman factor by digestion with plasmin. *J. Exp. Med.* 133:672.
- KAPLAN RA, CURD JG, DEHEER DH (1980). Metabolism of C4 and factor B in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 23:911.
- KAPLAN AP (1981). Coagulation, kinins and inflammation. En Cellular functions in immunity and inflammation. JJ Oppenheim, DL Rosenstreich i M Potter. Elsevier North Holland, New York. Päg. 397-410.
- KAY AB, PETTER DS, EWART MR (1973). Generation of chemotactic activity for leucocytes by the action of trombin on human fibrinogen. *Nature (London)* 24:56.
- KIM HJ, McCARTY DJ, KOZIN F, KOETHE S (1980). Clinical significance of synovial fluid total hemolytic complement activity. *J. Rheumatol.* 7:143.
- KLEBANOFF SJ (1968). Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* 95:2131.
- KLUG D, RABANI J, FRIDOVICH I (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* 247:4839.
- KOOPMAN WJ, SCHROHENLONER RE (1980). In vitro synthesis of IgM rheumatoid factor by lymphocytes from healthy adults. *J. Immunol.* 125:934.
- KOOPMAN WJ, SCHROHENLOHER RE, SOLOMON A (1982). A quantitative assay for IgA rheumatoid factor. *J. Immunol. Method.* 50: 89.
- KOTKES P, PICK E (1975). Studies of the inhibition of macrophage migration induced by soluble antigen-antibody complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 19:105.
- KOUROUNAKIS L, NELSON NA, KUPUSTA MS (1973). The effect of a cobra venom factor on complement and adjuvant-induced disease in rats. *Arthritis Rheum.* 16:71.
- KRIPKE DF, MULLANEY DJ, ATKINSON M, WOLF S (1978). Circadian rhythm disorders in manic-depressives. *Biol. Psychiatry* 13:335.
- KRSITENSEN F, WECK AL (1982). Use of cytofluorometric techniques for assay of cell cycle regulating lymphokines. En Human Lymphokines: the biological immune response modifiers. A Khan i NO Hill. Academic Press, New York. Päg. 451-547.
- LANGEVOORT HL, COHN ZA, HIRSCH JG, HUMPHREY JH, SPECTOR WG, VAN FURTH R (1970). The nomenclature of mononuclear phagocytic cells: a proposal for a new classification. En Mononuclear Phagocytes. R van Furth. Blackwell Scient. Publ.

Oxford-Edinburg. Pàg 1.

- LANGMUIR I (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40:1361.
- LARREA GAYARRE A, NOGUERA HERNANDO E, CRUZ MARTINES J, BOOTE-LLO GIL A, KREISLER GARCIA M, FERNANDEZ CRUS E (1978). Estudio de las correlaciones clínico-inmunológicas en la artritis reumatoidea. *Rev. Esp. Reum.* 5:17.
- LAY WH, NUSSENZWEIG V (1968). Receptors for complement on leukocytes. *J. Exp. Med.* 128:991.
- LEE CW, LEWIS RA, COREY EJ, BARTON A, OH H, TAUBER AI, AUSTEN FK (1982). Oxidative inactivation of leukotriene C₄ by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4166.
- LEWIS GP (1979). Introduction to prostaglandins and inflammation. *Agent Action* 6 (suppl.):7.
- LLOYD C (1980). Life events and depressive disorder reviewed II. Events as precipitating factors. *Arch. Gen. Psychiat.* 37:541.
- MAAS RL, BRASH AR (1983). Evidence for a lipoxygenase mechanism in the biosynthesis of epoxide and dihydroxy leukotrienes for 15(S)-hydroperoxeicosatetraenoic acid by human platelets and porcine leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2884.
- MAHU JL, FELDMAN G, ENGLER R (1984). Effect of an acute inflammatory reaction on the haptoglobin, albumin, cytochrome P-450 contents and glucose-6-phosphatase activity in hepatic microsomal fractions in the rat. *En Marker Proteins in Inflammation*, vol. 2. P Arnaud, J Bienvenu i P Laurent. Walter de Gruyter & Co., Berlin. Pàg. 581-584.
- MAINI RN, HOLIAN J, GRIFFITHS ID (1979). Circulating anti-DNA antibodies: aspects of clinical application. *En Laboratory Test in Rheumatic Diseases*, capítol 17. EC Dumonde i MW Stewart. MTP Press, Lancaster.
- MAJNO G, GILMORE V, LEVENTHAL M (1967). On the mechanism of vascular leakage caused by histamine-type mediators.
- MALECH HL, ROOT RK, GALLIN JI (1977). Structural analysis of human neutrophil migration: centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. *J. Cell. Biol.* 75:666.
- MARCEAU F, LUSSIER A, REGOLI D, GIROUD JP (1983). Pharmacology of kinins their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmac.* 14:209.

- MARNETT LJ, WLODAWER P, SAMUELSSON B (1975). Co-oxygenation of organic substrates by the prostaglandin synthetase of sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.* 250:8510.
- MARTINDALE. The Extra Pharmacopeia. 28.^a edició. JEF Reynolds. The Pharmaceutical Press, London, 1982. Pàg. 247, 257-261.
- MAYER MM (1972). Mechanism of cytolysis by complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2954.
- MAYER MM (1978). Complement, past and present. The Harvey Lectures, series 72. Academic Press, New York. Pàg. 139.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049.
- MCCORD JM (1974). Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185:529.
- MCCORD JM, DAY ED jr. (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* 86:139.
- MCCORD JM, STOKES SM, WONG K (1980). En Advances in Inflammation Research. G Weissmann i col. Raven Press, New York. Pàg 273-280.
- MCCUTCHEON M (1946). Chemotaxis in leukocytes. *Physiol. Rev.* 26:319.
- MCDONALD JA, KELLEY DG (1980). Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase:Release of biologically active fragments. *J. Biol. Chem.* 255:8848.
- MEACOCK SCR, CIVIL GW, DAWSON W, KITCHEN EA (1982). Studies of leukocyte-drug interaction with benoxaprofen. *Eur. J. Rheumatol. Inflammation* 5:51.
- MELEWICZ FM, SPIEGELBERG HL (1980). Fc receptors for IgG on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 125:1026.
- MELTZER M, FRANKLIN EC, ELIAS K, McCLUSKEY KJ, COOPER N (1966). Cryoglobulinemia - a clinical and laboratory study. II. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Amer. J. Med.* 40:837.
- MERETAY K, FALUS A, ERHARDT CC, MAINI RN (1982). IgE and IgE-rheumatoid factors in circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 41:405.
- MESHULAM DH, BLAIR HE, WONG BL, CHARM S, MINOWADA J, ROCKLIN

- RE (1982). Purification of a lymphoid cell line product with leukocyte inhibitory factor activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:601.
- METCALFE DD, KALINER M (1981 a). Mast cells and basophils. En Cellular functions in immunity and inflammation. JJ Oppenheim, DL Rosenstreich i M Potter. Elsevier North Holland, London-New York. Pàg 301-322.
- METCALFE DD, KALINER M (1981 b). Teh role of prostaglandins in allergic inflammation. En Cellular functions in immunity and inflammation. JJ Oppenheim, DL Rosenstreich i M Potter. Elsevier North Holland, London-New York. Pàg. 355-371.
- METCHNIKOFF (1893). Lectures in the comparative pathology of inflammation. Kegan-Paul, London.
- METZ SA (1981). Anti-inflammatory agents as inhibitors of prostaglandin synthesis in man. Med. Clin. N. Am. 65:713.
- MILLER ME, NILSSON VR (1974). A major role of the fifth component of complement (C5) in the opsonitization of yeast particles. Partial dichotomy of function and immunochemical measurement. Clin. Immunol. Immunopathol. 2:246.
- MOHR W, WILD A (1976). Adjuvant Arthritis. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 26:1860.
- MOLSKI TFP, NACCAHE PH, BORGEAT P, SHAAFI RI (1981). Similarities in the mechanisms by which formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, arachidonic acid and leukotriene B₄ increase calcium and sodium influxes in rabbit neutrophils. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103:227.
- MONBOISSE JC, BRAQUET P, RANDOUX A, BOREL JP (1983). Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective effect of flavonoids. Biochem. Pharmacol. 32:53.
- MONCADA S, HERMAN AG, HIGGS EA, VANE JR (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) of layers of arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. Thomb. Res. 11:323.
- MONCADA S, FLOWER RJ, VANE JR (1980). Prostagandins, prostacyclin, and thromboxane A₂. En The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6.^a edició. Ag Gilman, LS Goodman i A Gilman. Macmillan, New York. Pàg. 668-681.
- MORGAN K, CLAGUE RB, SHAW MJ, HOLT PJL (1980). Native type II collagen-induced arthritis in the rat. I. Incidence and humoral response to collage. Ann. Rheum. Dis. 39:285.

- MOSHI K, SHOJI Y, KOBAYASHI K, MIZUSHIMA Y (1981). Clinical significance of IgE rheumatoid factor. Communication, 15th. International Congress of Rheumatology, Paris.
- MOSKOWITH AN, SCHWARTZ HJ, MICHEL B, RATNOFF OD, ASTRUP T (1970). Generation of kinin-like agents by chondroitin sulfate, heparin and human cartilage. Possible pathophysiological implications. J. Clin. Med. 76:790.
- NAGAO S, TANAKA A (1980). Muramyl dipeptide-induced adjuvant arthritis. *Infec. Immunity* 28:624.
- NAGY L, LEE TH, GOETZL EJ, PICKETT WC, KAY AB (1982). Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxigenase products. *Clin. Exp. Immunol.* 47:541.
- NASJLETTI A, MALIK KU (1979). Relationship between the kallikrein-kinin and prostaglandin systems. *Life Sci.* 25:99.
- NAKAMURA M, BAXTER CR, MASTER BJ (1981). Simultaneous demonstration of phagocytosis-connected oxygen consumption and corresponding NAD(P)H oxidase activity: Direct evidence for NADPH as the predominant electron donor to oxygen in phagocytizing neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98:743.
- NARDELLA FA, TELLER DC, MANNIK M (1981). Studies on the antigenic determinants in the self association of IgG rheumatoid factor. *J. Exp. Med.* 154:112.
- NATHAN CF, KARNOVSKY ML, DAVID JR (1971). Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J. Exp. Med.* 133:1356.
- NATHAN CF, REMOLD HG, DAVID JR (1973). Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J. Exp. Med.* 137:275.
- NEAVE HR (1983). *Elementary Statistics Tables*. G Allen & Unwin. London.
- NELSON RA (1953). The immune adherence phenomenon. An immunologically specific reaction between micro-organisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. *Science* 118:733.
- NEMAZEE DA, SATO VL (1983). Induction of rheumatoid antibodies in the mouse. Regulated production of autoantibody in the secondary humoral response. *J. Exp. Med.* 158:529.
- NEMAZEE DA (1985). Immune complexes can trigger specific, T cell-dependent, autoanti-IgG antibody production in mice. *J. Exp. Med.* 161:242.

- NEUMANN C (1982). Mononuclear phagocytes as producers of interferon. *Lymphokynes* 7:165.
- NGO TT, LENHOFF HM (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal. Biochem.* 105:389.
- NIETO A (1982). Determinación fotométrica del punto de equivalencia en el sistema inmunoglobulina-antiinmunoglobulina usando látex sensibilizado. *Inmunología* 1:130.
- NIJKAMP FP (1982). Prostacyclin and the cardiovascular system. *Neth. J. Med.* 25:15.
- NILSSON R, PICK FM, BRAY RC (1969). ESR studies on reduction of oxygen to superoxide by some biochemical systems. *Biochem. Biophys. Acta* 192:145.
- NILSSON R, KEARNS DR (1974). Some useful heterogeneous systems for photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 19:181.
- NINNEMAN JL (1984). Prostaglandin and immunity. *Immunol. Today* 5:170.
- NYDEGGER UE, ZUBLER RH, GABAY (1977). Circulating complement breakdown products in patients with rheumatoid arthritis. Correlation between plasma C3d, circulating immune complexes and clinical activity. *J. Clin. Invest.* 59:862.
- OKUYAMA S, TIHARA H (1984). The mode of action of analgesic drugs in adjuvant arthritic rats an experimental model of chronic inflammatory pain: possible central analgesic action of acidic nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Jpn. J. Pharmacol* 35:95.
- OYANAGUI Y (1981). Steroidal-like anti-inflammatory effect of superoxide dismutase in serotonin-histamine and kinin-induced edemata of mice: existence of vascular permeability regulating proteins. *Biochem. Pharmacol.* 30:1791.
- OYANAGUI Y (1982). Macrophage-generated superoxide radicals-inflammation and tumor cell growth. *En Pathology of Oxygen.* AP Autor. Academic Press, London. Pãg. 99-114.
- OWEN RT (1980). Adjuvant-induced polyarthritis. An overview. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2:199.
- PAGE RC, DAVIES P, ALLISON AC (1978). The macrophage as a secretory cell. *Int. Rev. Cytol.* 52:119.
- PALMER DG (1978). Complement in the pathogenesis of rheumatic disease. *Aust. N. Z. J. Med. suppl.* 1 8:57.

- PANTALONE RM, PAGE RC (1975). Lymphokine-induced production and release of lysosomal enzymes by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2091.
- PANTALONE RM, PAGE RC (1977). Enzyme production and secretion by lymphokine-activated macrophages. J. Reticuloendo. Soc. 21:343.
- PANUSH RS, BIANCO NE, SCHUR PH (1971). Serum and synovial fluid IgG, IgA and IgM antigammaglobulin in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 14:737.
- PASQUALI JL, CARSON DA (1982). Les facteurs rhumatoïdes. Pathol. Biol. 30:719.
- PAWLOTSKY Y, CHALES G, PITTIE P, MEADED J, COUTARD J (1982). Les examens biologiques en rhumatologie. La Nouvelle Presse Medicale 11:2464.
- PEARSON CM (1956). Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91:95.
- PEARSON CM, WOOD FD (1959). Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mucobacterial adjuvant. I. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors. Arthritis Rheum. 2:440.
- PEARSON CM, WAKSMAN BH, SHARP JT (1961). Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. V. Changes affecting the skin and mucous membranes, comparison of the experimental process with human disease. Arthritis Rheum. 4:485.
- PEARSON CM, WOOD FD (1963). Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. VII. Pathologic details of the arthritis and spondylitis. Am. J. Med. 42:73.
- PEÑA J (1982). Inmunología. Ed. Pirámide, Madrid. Pág 46-47.
- PEREZ HD, WEKSLER BB, GOLDSTEIN IM (1980). Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generating system. Inflammation 4:313.
- PERSELLIN RW, KILLINGER GW, KENDAL JW (1972). Adrenal response to experimental arthritis in the rat. Am. J. Physiol. 222:1545.
- PFREUNDSCHUH M, MICHEL H, PARINO G, GRAM N, STOCK C, GAUSE A, HUNSTEIN W (1981). T-lymphocyte subpopulations in rheumatoid arthritis. ii. Definition by monoclonal antibodies. J. Rheumatol. 40:245.

- PAHDKE K, CARROLL J, NANDA S (1982). Effects of various anti-inflammatory drugs on type II collagen-induced arthritis in rats. *Clin. Exp. Immunol.* 47:579.
- PIAFF JF, O'BRIEN PJ (1979). Singlet oxygen formation by a peroxidase, H_2O_2 and halide system. *Eur. J. Biochem.* 93:323.
- PICK E, GRUNSPAN-SWIRSLY A (1977). The mechanism of action of soluble lymphocyte mediator. *Cell. Immunol.* 32:340.
- PICKUP ME, DIXON JS, BIRD HA (1980). On the effects of anti-rheumatic drugs on protein sulphhydryl reactivity in human serum. *J. Pharm. Pharmacol.* 32:301.
- PIERCE CW, PEAVY DL, TADAKUMA T (1975). Suppressor T-cells as regulators of lymphocyte functions. *En Mechanisms of tissue injury with reference to rheumatoid arthritis, vol. 256.* RJ Perper. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Päg. 365-374.
- PINCKARD RN (1982). The "new" chemical mediators of inflammation. *Monogr. Pathol.* 1982 23:38.
- PIRCIO AW, FEDELE CT, BIERWAGEN (1975). A new method for the evaluation of analgesic activity using adjuvant-induced arthritis in the rat. *Eur. J. Pharmac.* 31:207.
- PLAUT M (1979). Histamine, H1 and H2 antihistamines and immediate hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63:371.
- PODACK ER, BIESECKER G, MÜLLER-EBERHARD HJ (1979). Membrane attack complex of complement: generation of high-affinity phospholipid binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:897.
- POPE RM, TELLER DC, MANNIK M (1974). The molecular basis of self-association of antibodies to IgG (rheumatoid factors) in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 517.
- POPE RM, McDUFFY SJ (1979). IgG rheumatoid factor: relationship to seropositive rheumatoid arthritis and absence in seronegative disorders. *Arthritis Rheum.* 22:988.
- POPE RM, YOSHINOYA S, McDUFFY SJ (1981). Detection of immune complexes and their relationship to rheumatoid factor in a variety of autoimmune disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 46:259.
- PORTER RR (1984). Introduction to the complement system. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 306:279.
- PRINCEN JMG, NIEUWENHUIZEN W, MOL-BACKX GPBM, YAP SH (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:717.

- QUERALT J, MYLONAKIS N, FONT T, TORRALBA A (1982). Effects of copper and reducing agents on gamma globulin thermal denaturation. *Arch. Pharmacol. Toxicol.* 8:93.
- RABELLINO EM, ROSS GD, POLLEY MJ (1978). Membrane receptors of mouse leukocytes. I. Two types of complement receptors for different regions of C3. *J. Immunol.* 120:871.
- RACKHAM A, FORD-HUTCHINSON AW (1983). Inflammation and pain sensitivity: Effects of leukotrienes D₄, B₄ and prostaglandin E₁ in the rat paw. *Prostaglandins* 25:193.
- RAEMAN F, DE COCK W, DE BENKELAAR T, LEEMPOELS J, DE CREE J, VERHAGEN H (1982). Enumeration of T-lymphocytes and T-lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin. Rheumatol.* 1:194.
- RAULET DH, BEVAN MJ (1982). A differentiation factor required for the expression of cytotoxic T-cell function. *Nature* 296:754.
- REITE M, SEILER C, CROWLEY T, HYDINGER-MACDONALD M, SHORT R (1982). Circadian rhythm changes following maternal separation. *Cronobiol.* 9:1.
- REMOLD HG (1973). Requirement for α -L-fucose on the macrophage membrane receptor for MIF. *J. Exp. Med.* 138:1065.
- REMOLD HG, MEDNIS A (1975). Decrease of three lysosomal enzymes in guinea pig macrophages activated by lymphocyte mediators. *Inflammation* 1:175.
- REMOLD HG, MEDNIS A (1977). Two migration inhibitory factors with different chromatographic behaviour and isoelectric points. *J. Immunol.* 118:2015.
- REPINE JE, EATON JW, ANDERS MW, HOIDAL JR, FOX RB (1979). Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro detection with the anti-inflammatory agent, dimethyl sulfoxide. *J. Clin. Invest.* 64:1642.
- RICKARD KA, MORLEY A, HOWARD D, GARRITY M, STOHLMAN F jr. (1971). Stem cell stimulatory properties in vitro of an agar colony-stimulating factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136:308.
- RIVKIN I, ROSENBLATT J, BECKER EL (1975). The role of cyclic AMP in the chemotactic responsiveness and spontaneous motility of rabbit peritoneal neutrophils: The inhibition of neutrophil movement and the elevation of cyclic AMP levels by catecholamines, prostaglandins, theophylline and cholera toxin. *J. Immunol.* 115:1126.

- ROBERTS-THOMSON PJ, NEOH SH, BRADLEY J, MILAZZO SC (1980). Circulating and intra-articular immune complexes in rheumatoid arthritis: a comparative study of the C1q binding and monoclonal rheumatoid factor assays. *Ann. Rheum. Dis.* 39: 438.
- ROBINS SL, COTRAN RS (1979). Inflammation and repair. En *Pathologic Basis of Disease*, 2.^a edici6. Ed. Philadelphia, WB Saunders Co. Pãg 55-106.
- ROBINSON DR, McGUIRE MB, LEVINE L (1975). Prostaglandins in the rheumatic diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 256:318.
- ROCHA E SILVA M (1978). Histamine H₂ and antihistaminases. En *Handbook Experimental Pharmacology*, vol. 18 (2). Springer-Verlag, Berlin.
- ROCKLIN RE, URBANO AM (1978). Human leukocyte inhibitor factor (LIF): use of benzoyl-L-arginine ethyl ester to detect LIF activity. *J. Immunol.* 120:1409.
- ROCKLIN RE, GREINER DK, MELMON KL (1979). Histamine-induced suppressor factor (HSF): further studies on the nature of the stimulus and the cell which produces it. *Cell. Immunol.* 44:405.
- ROCKLIN RE, BENDTZEN K, GREINER DK (1980). En *Advances in Immunology*. HG Kunkel i F Dixon. Academic Press, New York. Pãg. 56.
- ROCKLIN RE (1984). Lymphokines that mediate inflammation. En *Proceedings of IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology*. W Paton, J Mitchell i P Turner. London. Pãg. 311-321.
- ROE RL (1977). Drug therapy in rheumatic diseases. *Med. Clin. N. Am.* 61:405.
- ROMEO D, ZABUCCHI G, JUG M, MIANI N, SORANZO MR (1975). Concanavalin A as a probe for the study of the mechanism of metabolic stimulation of leukocytes. En *Concanavalin A*. TK Chowdhury i AK Weiss. Plenum Press, New York-London. Pãg 273.
- ROSE HM, RAGAN C, PEARCE E, LIPMAN MO (1948). Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (NY)* 68:1.
- ROSEN H, KLEBANOFF SJ (1977). Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* 252:4803.

- ROSEN H, KLEBANOFF SJ (1979). Hydroxyl radical generation by polymorphonuclear leukocytes measured by electron spin resonance. *J. Clin. Invest.* 64:1725.
- ROSENBAUM JT, MANDELL RB (1983). The effect of endotoxin and endotoxin tolerance on inflammation induced by mycobacterial adjuvant. *Yale J. Biol. Med.* 56:293.
- ROSENSTREICH DL (1981). The macrophage. En Cellular functions in immunity and inflammation. JJ Oppenheim, DL Rosenstreich i M Potter. Elsevier North Holland, New York. Pàg. 127-159.
- ROSENTHALE ME (1970). A comparative study of the Lewis and Sprague-Dawley rat in adjuvant arthritis. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 188:14.
- ROSENTHALE ME, CAPETOLA R (1982). Adjuvant arthritis: immunopathological and hyperalgesic features. *Fed. Proc.* 41: 2577.
- ROSENWASSER LJ (1984). Interleukin-1: an overview. *Proc. IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology* 3:301.
- ROSSI F, ROMEO D, PATRIARCA P (1975). Metabolic perturbation of the inflammatory cells. En *Future Trends in Inflammation II*. JP Giroud, DA Willoughby i GP Velo. Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart. Pàg. 50.
- ROSSI F (1980). Etapas celulares de la inflamación: aspectos bioquímicos de la fagocitosis. En *Inflamación*. Ed Farmaitalia, Carlo Erba SA, Barcelona. Pàg. 5-22.
- ROUBUL WT, TAPPEL AL (1966). Damage to protein, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 113:5.
- ROUBUL WT, TAPPEL AL (1966). Polymerization of protein induced by free radical lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 113:150.
- RUDDY S, AUSTEN KF, GOETZL EJ (1975). Chemotactic activity derived from interaction of factors D and B of the properdin pathway with cobra venom factor or C3b. *J. Clin. Invest.* 55:587.
- SAMUELSSON B (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220: 568.
- SANCHEZ GARCIA MC, BORRACHERO DEL CAMPO (1982). Los mediadores bioquímicos de la inflamación. *Rheuma, no extra*, maig: 23.
- SANDBERG AL, WAHL SM, MERGENHAGEN SE (1975). Lymphokine pro-

- duction by C3b-stimulated B cells. *J. Immunol.* 115:139.
- SANDBERG AL (1981). Complement. En Cellular functions in immunity and inflammation. JJ Oppenheim, DL Rosenstreich i M Potter. Elsevier North Holland, London-New York. Pàg. 373-395.
- SANDY JD, LOWTHER DA, BROWN HL (1980). Antigen-induced arthritis: studies on the inhibition of proteoglycan synthesis observed in articular cartilage during short-term joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 23:433.
- SCHIMIDT JA, MIZEL SB, COHEN D, GREEN I (1982). Interleukin 1 a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* 128:2177.
- SCHORLEMMER HV, ALLISON AC (1976). Effects of activated complement on enzyme secretion by macrophages. *Immunology* 31:781.
- SCHORLEMMER HV, BITTER-SUERMAN D, ALLISON AC (1977). Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. *Immunology* 32:929.
- SCHREIBER G, HOWLETT G, NAGASHIMA M, MILLERSHIP A, MARTIN H, URBAN J, KOTLER L (1982). *J. Biol. Chem.* 257:10271.
- SCHUR PH (1983). Complement studies of sera and other biologic fluids. *Human Pathol.* 14:338.
- SELYE H (1965). *The Mast Cell.* DC Washington, Butterwoth. Pàg. 1.
- SERHAN CN, FRIDOVICH J, GOETZL EJ, DUNHAM PB, WEISSAMN G (1982). Leukotriene B₄ and phosphatidic acid are calcium ionophores. Studies employing arzenazo III in liposomes. *J. Biol. Chem.* 257:4746.
- SHIOZAWA S, WILLIAMS RC, ZIFF M (1982). Immunoelectron microscopic demonstration of prostaglandin E in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 25:685.
- SHUBERT RD, WONG J, DAVID JR (1980). Stimulation fo pinocytosis in the macrophage by lymphocyte mediators. II. Evidence that the stimulating factor is MAF, and studies on the cellular requirements for response to the mediator. *Cell. Immunol.* 55:155.
- SIEGEL MI, McCONNELL RT, CUATRECASAS P (1979). Aspirin-like drugs interference with arachidonate metabolism by inhibition of the 12-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid peroxidase activity of the lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3774.

- SIMON LS, MILLS JA (1980). Drug therapy: nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *I. N. Engl. J. Med.* 302:1179.
- SIPE JD, VOGEL SN, RYAN JL, McADAM KP, ROSENSTREICH DL (1979). Detection of a mediator derived from the endotoxin-stimulated macrophages that induces the acute phase serum amyloid A response in mice. *J. Exp. Med.* 150:587.
- SITTON NG, TAGGART AJ, DIXON JS, SURRALL KE, BIRD HA (1984). Circadian variation in biochemical assessments used to monitor rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 43:444.
- SLAUGHTER L, CARSON DA, JENSEN FC, HOLBROOK TL, VAUGHAN JH (1978). In vitro effects of Epstein-Barr virus on peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. *J. Exp. Med.* 148:1429.
- SMITH MJH, FORD-HUTCHINSON AW, BRAY MA (1980). Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 32:517.
- SMITH WL, DEWITT DL, DAY JS (1983). Purification, quantification, and localization of PGI₂ synthase using monoclonal antibodies. *Adv. Prostagl. Thrombox. Leukotr. Res.* 11:87.
- SNYDERMAN R, SHIN HS, DANNENBERG AM (1972). Macrophage proteinase and inflammation: the production of chemotactic activity from the fifth component of complement by macrophage proteinase. *J. Immunol.* 109:896.
- SNYDERMAN R, MEADOWS L, AMOS DB (1977). Characterization of human chemotactic lymphokine and mixed leukocyte reactions using a new microassay. *Cell. Immunol.* 30:225.
- SNYDERMAN R, GOETZL EJ (1981). Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 213:830.
- SPECTOR WG, WILLOUGHBY DA (1968). *The pharmacology of inflammation.* English University Press.
- SPIILBERG I, MEHTA J (1979). Demonstration of a specific neutrophil receptor for a cell-derived chemotactic factor. *J. Clin. Invest.* 63:85.
- STANKAITIENE DJ, MATULIS AA, GUOBYS H, JUSENAITE (1978). Serum antiimmunoglobulins reactive with human and rabbit IgG in rheumatoid arthritis and other conditions. *Arthritis Rheum.* 21:120.
- STASSIN V, COULIE PG, BIRSHTEII BK, SECHER DS, VAN SNICK J (1983). Determinants recognized by murine rheumatoid factors. Molecular localization using a panel of mouse myeloma variant immunoglobulins. *J. Exp. Med.* 158:17637.

- STEFFEN C (1983). Autoantibodies in autoimmune arthritis. Proc. XII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Pãg 337.
- STEINITZ, KOIDE N, SPIRA G, TAMIR S, KLEIN G (1982). In vitro produced monoclonal rheumatoid factor: purification, radio label, and possible applications. Cell. Immunol. 69:205.
- STEINMAN RM, COHN ZA (1974). The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. En The inflammatory process. BW Zweifach, L Grant i RT McCluskey. Academic Press, New York. 2.^a edici6. Pãg 1:449-510.
- STEFFEN C, TIMPL R (1963) Antigenicity of collagen and its application in the serological investigation of rheumatoid arthritis sera. Int. Arch, Allergy Appl. Immunol. 22:333.
- STEFFEN C (1980). En Studies in JOint Diseases I. A. Moroudas i J Holborow. Pitman Med. Ltd. Pãg 201.
- STENSON WF, PARKER CW (1982). En Prostaglandins. JB Lee. Elsevier, New York. Pãg. 39-89.
- STEVENS JE, WILLOUGHBY DA (1969). The anti-inflammatory effect od some immunosuppressive agents. J. Pathol. 97:367.
- STEWART-TULL DES (1980). The immunological activies of bacterial paptidoglicans. Ann. Rev. Microbiol. 34:311.
- STOCHLA K, MASLINSKI S (1982). Carrageenan-induced oedema in the rat paw histamine participation. Agent Action 12:201.
- STOERK HD, BIELINSKI TC, BUDZELOVICH T (1954). Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants. Am. J. Pathol. 30:616.
- STOSSEL TP (1974). Phagocytosis. N. Engl. J. Med. 290:717, 774, 833.
- STOSSEL TP (1981). Actin filaments and secretion: the macrophage model. Meth. Cell. Biol. 23:315.
- STUART JM, CREMER MA, KANG AH, TOWNES AS (1979). Collagen-induced arthritis in rats. Evaluation of early immunologic events. Arthritis Rheum. 22:1344.
- SUNG SST, NELSON RS, SILVERSTEIN (1983). Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. J. Cell. Biol. 95:160.
- TADOKORO K, STADLER B, de WECK AL (1983). Factor-dependent in vivo growth of human normal bone marrow-derived basophil-like cells. J. Exp. Med. 158:857.

- TANNENBAUM S, OERTEL H, HENDERSON W, KALINER M (1980). The biologic activity of mast cell granules. I. Elicitation of inflammatory responses in rat skin. *J. Immunol.* 125:325.
- TARKOWSKI A, CZERKINSKY C, NILSSON LA (1984). Detection of IgG rheumatoid factor secreting cells in autoimmune MRL/1 mice: a kinetic study. *Clin. Exp. Immunol.* 58:7.
- TAUROG JD, SANDBERG GP, MAHOWALD ML (1983). The cellular basis of adjuvant arthritis. II. Characterization of the cells mediating passive transfer. *Cell. Immunol.* 80:198.
- THOMPSON RA (1983). Complement. *En Immunology in Medicine*, 2.^a edici6. EJ Holborow i WG Reeves. Academic Press, London-New York. Pàg. 95-119.
- TILL G, KOWNATZKI E, SEITZ M, GEMSA D (1979). Chemokinetic and chemotactic activity of various prostaglandins for neutrophil granulocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 12:111.
- TOIVONEN ML, TOKOLA O, VAPAATALO H (1982). Rat adjuvant arthritis as a model to test potential antirheumatic agents. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 4:359.
- TORRIGIANI G, ROITT IM (1967). Antiglobulin factors in sera from patients with rheumaotid arthritis and normal subjects. *Ann. Rheum. Dis.* 26:334.
- TRENTHAM DE, TOWNES AS, KANG AH (1977). Autoimmunity to type ii collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* 146:857.
- TRENTHAM DE, McCUNE J, SUSMAN P (1980). Autoimmunity to collagen in adjuvant arthritis of rats. *J. Clin. Invest.* 66:1109.
- TUBERGEN DG, FELDMAN JD , POLLOCK EM, LERNER RA (1972). Production of macrophage migration inhibition factor by continuous cell lines. *J. Exp. Med.* 135:255.
- TURNER RA (1984). Arthritis update. Current concepts and future trends in medical therapy. *Drug Today* 20:639.
- UNANUE ER (1976). Secretory function of mononuclear phagocytes A review. *Am. J. Pathol.* 83:395.
- VAN DE STADT KD (1982). Prostaglandins and leukotrienes in inflammation and allergy. *Neth. J. Med.* 25:22.
- VAN SNICK JL, MASON PL (1979). Age-dependent production of IgA and IgM autoantibodies against IgG2a in a colony of 129/sv mice. *J. Exp. Med.* 149:1519.

- VAN SNICK JL (1981). The production of anti-IgG2a autoantibody in the 129/Sv mouse: onset in the lymph nodes draining the intestinal tract and prevention by neonatal thymectomy. *J. Immunol.* 126:815.
- VAN SNICK JL, SATASSIN V, de LESTRE B (1983). Isotypic and allotypic specificity of mouse rheumatoid factors. *J. Exp. Med.* 157:1006.
- VENGE P, OLSSON I (1975). Cationic proteins of human granulocytes. VI. Effects on the complement system and mediation of chemotactic activity. *J. Immunol.* 115:1505.
- VEYS EM, HERMANS P, GOLDSTEIN G, KUNG P, SCHINDLER J, VAN WANWE J (1981). Determination of T-lymphocyte subpopulation by monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis. Influence of immunomodulating agents. *Int. J. Immunopharmacol.* 3: 313.
- VISCHER TL (1982). Diagnostic immunologique des maladies articulaires. *Schweiz. Med. Wschr.* 112:905.
- VISENTIN F (1980). Versatilidad funcional de los fagocitos mononucleares. En *Inflamación*. Ed. Familialia, Carlo Erba SA, Barcelona. Pàg 41-64.
- VOLLER D, BIDWELL D, BARLETT A (1977). The enzyme-immunosorbent assay (ELISA). En A review with a bibliography of microplate applications. *Howline Publ., Quemsey.*
- WAALER E (1940). On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 17:172.
- WAGNER O, TEPPPO AM (1978). Binding affinity of human autoantibodies: studies of cryoglobulin IgM factors and IgG autoantibodies to albumin. *Scand. J. Immunol.* 7:503.
- WAKSMAN BH, PEARSON CM, SHARP JT (1960). Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. II. Evidence that the disease is a disseminated immunologic response to exogenous antigen. *J. Exp. Med.* 85:403.
- WALKER JR, DAWSON W (1979). Inhibition of rabbit PMN lipoxigenase activity by benoxaprofen. *J. Pharm. Pharmacol.* 31:778.
- WALKER JR, BOOT JR, COX B, DAWSON W (1980). Inhibition of the release of slow-reacting substance of anaphylaxis by inhibitors of lipoxigenase activity, communications. *J. Pharm. Pharmacol.* 32:866.
- WARD PA, REMOLD HG, DAVID JR (1969). Leukotactic factor produced by sensitized lymphocytes. *Science* 163:1079.

- WARD PA, DVORAK HF, COHEN S, YOSHIDA T, DATA R, SELVAGGIO SS (1975). Chemotaxis of basophils by lymphocyte-dependent and lymphocyte-independent mechanisms. *J. Immunol.* 114: 1523.
- WASSERMAN SI (1983). Mast cell dependent chemotactic factors in human disease. En *Proc. XI Congress of Allergology and Clinical Immunology*. JW Kerr i MA Genderton, London. Pàg. 29-32.
- WEHR TA, WIRZ-JUSTICE A, DUNCAN W, GILLIN JC, GOODWIN FK (1979). Phase advance of the circadian sleep-wake cycle as an antidepressant. *Science* 206:710.
- WEINSTEIN A, PETERS F, BROWN D, BLUESTONE R (1972). Metabolism of the third component of complement (C3) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 15:49.
- WEISSMAN G (1980). *Current Concepts: Prostaglandins in Acute Inflammation*. Upjohn Co., Kalamazoo. Pàg. 1-14.
- WEISSMAN G (1980 a). *The Cell Biology of Inflammation*. Elsevier North Holland, Amsterdam.
- WEISSMAN G (1980 b). Lisosomas e inflamaci3n. En *Inflamaci3n II*. Ed. Farmitalia, Carlo Erba SA, Barcelona. Pàg 23-40.
- WEISSMAN G (1982). Activation of neutrophil and the lesions of rheumatoid arthritis. *J. Lab. Clin. Med.* 100:322.
- WERB Z, GORDON S (1975a). Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* 142:346.
- WERB Z, GORDON S (1975 b). Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J. Exp. Med.* 142:361.
- WERB Z, BANDA MJ, JONES PA (1980). Degradation of connective tissue matrices by macrophages: 1. Proteolysis of elastin glycoproteins and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J. Exp. Med.* 152:1340.
- WILKINSON PC, MCKAY JC (1974). Recognition in leukocyte chemotaxis. Studies with structurally modified proteins. *Antibiot. Chemother.* 19:421.
- WILKINSON PC (1983). Mononuclear phagocytes and granulocytes. En *Immunology in Medicine*, 2.^a edici3. EJ Holborow i WG Reeves. Academic Press, London-New York. Pàg. 59-78.
- WILLIAMS TJ, PECK J (1977). Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. *Nature* 270:530.

- WILLIAMS LT, SNYDERMAN R, PIKE MC, LEFKOWITZ RJ (1977). Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:1204.
- WINCHESTER RJ, AGNELLO V, KUNKEL HG (1970). Gamma globulin complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Partial characterization and relationship to lowered complement levels. Clin. Exp. Immunol. 6:689.
- WRIGHT DG, GALLIN JI (1975). Modulation of the inflammatory response by products released from human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. Inflammation 1:23.
- WRIGHT DG, GALLIN JI (1977). Functional differentiation of human neutrophil granules: generation of C5a by a specific granule product and inactivation of C5a by azurophil granule products. J. Immunol. 119:1068.
- YOULTEN LJF (1978). Inflammatory mediators and vascular events. En Handbook experimental pharmacology, vol 50 (1). JR Vane i SH Ferreira. Springer-Verlag, Berlin. Pãg 571.
- ZEIGER RS, COLTEN HR (1977). Histaminase release from human eosinophils. J. Immunol. 118:540.
- ZIFF M (1980). En Inflammation: mechanisms and treatment. Da Willoughby i JP Giroud. MT Press Lancaster GB. Pãg. 43-53.
- ZURIER RB, QUAGLIATA F (1971). Effects of prostaglandin E₁ on adjuvant arthritis. Nature 234:304.
- ZURIER RB, DAMJANOV I, SAYADOFF DM, ROTHFIELD N (1977). Prostaglandin E₁ treatment of NZB1NZWF₁ mice. 11. Prevention of glomerulonephritis. Arthritis Rheum. 20:1449.