

AAN991

TESIS
ED 2000
R74



UNIVERSIDAD CATÓLICA "ANDRÉS BELLO"
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA
SOBRE LA INDUCCIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO
DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL EN CONEJOS

Trabajo Especial de Grado para optar al título de
Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas

por

CLAUDIEXI C. RIVERO M.

EVA V. SALAZAR A.

DRA. BEATRIZ E. BRITO DE T.

Tutora

Caracas, Octubre de 2000



**Trabajo Especial de Grado presentado
como requisito para optar al título de
Licenciado en Educación,
Mención Ciencias Biológicas**

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA
SOBRE LA INDUCCIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO
DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL EN CONEJOS**

por

CLAUDIEXI C. RIVERO M.

EVA V. SALAZAR A.

Centro de Estudios Avanzados

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

(I.V.I.C.)

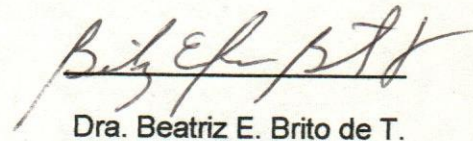
Dra. Beatriz E. Brito de T.

Tutora

Caracas, Octubre 2000

En mi carácter de Tutora del Trabajo Especial de Grado titulado:
**“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA SOBRE
LA INDUCCIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO DE LA ARTRITIS
EXPERIMENTAL EN CONEJOS”** realizado por CLAUDIEXI C. RIVERO M. y
EVA V. SALAZAR A., para optar al título de Licenciado en Educación, Mención
Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos
suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del
Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 11 días del mes de Octubre de 2000.



Dra. Beatriz E. Brito de T.

C.I: V-5.539.290

RESUMEN

La Artritis es un proceso de inflamación crónica caracterizado por la destrucción del cartílago sinovial, con un cuadro morfológico que indica una respuesta inmune local. Numerosas citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-6 y TNF, han sido detectadas en los fluidos sinoviales. Estas citoquinas, que juegan un papel en la iniciación de la destrucción de la articulación, son producidas por las células T locales y macrófagos activados. El objetivo de esta investigación fue estudiar la influencia de la hipercolesterolemia sobre la inducción de la artritis experimental en conejos, luego de inyectar localmente 10 ng de LPS de la cepa 0127:B8 de E.coli, en la cavidad sinovial. El recuento total de células blancas (CBT) se realizó mediante la tinción de Turk, luego de la inyección del LPS a los 30 min, 2 h, 6 h y 24 h, encontrándose una tendencia a una mayor proporción de células blancas en el líquido sinovial de los conejos alimentados con dietas ricas en colesterol (CH), luego de transcurrir 6 h de la inyección local de LPS en comparación con los conejos alimentados con dieta basal (CN), lo cual sugiere que la competencia inmunitaria está asociada con la cantidad y calidad de grasas en la dieta. Se determinó también los niveles de TNF e IL-6 en el líquido sinovial mediante bioensayos utilizando la línea celular WEHI 164 clon 13 y B9 respectivamente, observándose un claro incremento de TNF a las 2 horas y de IL-6 a las 24 horas en los CH después de la inyección

e IL-6 se encontró solamente en la cavidad sinovial estimulada con LPS, ya que en la bolsa sinovial contralateral inyectada con salina estéril libre de pirógeno, no se observó ningún incremento significativo en los CH y los CN.

Todo lo anteriormente expuesto indica que la ingesta de colesterol conduce a un aumento del colesterol plasmático y que conejos alimentados con una hipercolesterolémica son más susceptibles a infecciones experimentales locales con un incremento considerable de la respuesta inflamatoria, tal como una mayor migración celular, así como mayores niveles de las citoquinas pro-inflamatorias en la cavidad sinovial estudiadas en el presente trabajo.

*A todos nuestros familiares,
muy especialmente a nuestros padres.*

AGRADECIMIENTO

A Dios por habernos dado la constancia necesaria para vencer todos los obstáculos.

A la Dra. Beatriz Brito, por ser nuestra guía en el complejo mundo de la ciencia, por su dedicación, comprensión, por sus enseñanzas y por sus palabras alentadoras en todo momento.

A las Hermanas Carmelitas de Madre Candelaria, por su apoyo moral y comprensión para el cumplimiento de nuestra meta.

A nuestros compañeros del Laboratorio de Patología Celular y Molecular: Leslie Baute, Vicente Belisario, Félix Monasterio, Geraldinee Bernal, Luis González, Junedy Marcano, por su constante apoyo y preocupación.

Al Dr. Víctor Tortoricci, por su valiosa colaboración.

A la Dra. Alicia Ponte Sucre por su ayuda desinteresada.

Al Centro de Estudios Avanzados del IVIC, por habernos dado la oportunidad de realizar nuestro Trabajo Especial de Grado.

A todos aquellos que de una u otra forma nos apoyaron y confiaron en nosotras.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	iv
Agradecimiento	vii
Lista de Tabla	xii
Lista de Figuras	xiii
1. Introducción	1
1.1. Artritis	1
1.1.1. Interacciones bioquímicas	3
1.1.2. Efecto del colesterol en la expresión de la respuesta inflamatoria en artritis	5
1.2. Papel de las lipoproteínas en el transporte de lípidos	7
1.3. Aterosclerosis.....	9
1.3.1. Aterosclerosis como error en el metabolismo de lípidos ..	9
1.3.2. Clasificación de las lesiones ateroscleróticas	10
1.3.3. Aterosclerosis como proceso inflamatorio	13
1.4. Lipopolisacáridos como activadores de macrófagos.....	17
1.4.1. Estructura del LPS	18
1.4.2. Estimulación celular inducida por LPS	21
1.5. Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α)	26

1.5.1. Estructura protéica del TNF- α	28
1.5.2. Receptores para TNF- α	30
1.5.3. Mecanismo de acción del TNF- α	32
1.5.4. El papel del TNF- α en modelos de artritis	34
1.6. Interleuquina-6 (IL-6)	36
1.6.1. Estructura y expresión de la IL-6	37
1.6.2. Receptores para IL-6	39
1.6.3. Inducción y producción	42
1.6.4. Mecanismo de acción de la IL-6	44
1.6.5. Papel de la IL-6 en la artritis	45
2. Objetivos	48
3. Materiales y Métodos	50
3.1. Animales	50
3.2. Dietas	50
3.3. Ensayo de Etanol	51
3.4. Obtención de suero	53
3.5. Determinación de niveles de colesterol sérico	53
3.6. Inducción de artritis experimental	55
3.7. Contaje y caracterización del infiltrado celular en la cavidad sinovial	56
3.8. Extracción de la arteria aorta torácica y coloración	56
3.9. Determinación de la concentración de citoquinas	58

3.9.1. Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	58
3.9.2. Interleuquina-6 (IL-6)	60
3.10. Obtención de medio enriquecido en IL-6	61
3.11. Análisis Estadísticos	62
4. Resultados	63
4.1. Niveles de colesterol sérico	63
4.2. Porcentaje de lesiones ateromatosas	65
4.3. Presencia de células blancas totales en el líquido sinovial	68
4.4. Niveles de TNF inducido por LPS en líquido sinovial	70
4.5. Niveles de IL-6 inducido por LPS en líquido sinovial	75
5. Discusión	77
5.1. Niveles de colesterol sérico y lesiones ateromatosas	77
5.2. Presencia de células blancas totales en el líquido sinovial	79
5.3. Niveles de TNF inducido por LPS en líquido sinovial	81
5.4. Niveles de IL-6 inducido por LPS en líquido sinovial	83
6. Conclusiones	85
7. Bibliografía	87

LISTA DE TABLA

TABLA

Página

I	Niveles de TNF inducido por LPS en líquido sinovial	74
---	---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Comparación entre una articulación sana con una articulación inflamada	3
2	Progresión de la Aterosclerosis	16
3	Estructura química del LPS	20
4	Modelo propuesto para la activación de macrófagos por el complejo LPS-LBP	24
5	Modelo del mecanismo de acción del TNF una vez que interactúa con su receptor en la superficie de la célula blanco	33
6	Versión simple de la posible estructura terciaria de la IL-6	40
7	Modelos de la interacción del receptor de IL-6.	47

8	Incremento de los niveles de colesterol sérico a las 0, 2, 4 y 8 semanas de dieta experimental, previa la administración local de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial	64
9	Porcentaje de lesiones ateroscleróticas en la aorta torácica de conejos hipercolesterolémicos y normales, después de 8 semanas de dieta experimental	66
10	Placas ateroscleróticas en las aortas torácicas de los CH y CN	67
11	Número de células blancas totales a las 0.5, 2, 6 y 24 horas después de la inyección de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial	69
12	Niveles de TNF a las a las 0.5, 2, 6 y 24 horas después de la inyección de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial	71
13	Niveles de TNF a las 2 horas después de la inyección de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial	73

14 Niveles de IL-6 a las 24 horas después inyección
de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial

76

INTRODUCCIÓN

1.1. ARTRITIS

La artritis se puede definir como un proceso inflamatorio crónico en donde se observa destrucción de la articulación con la deformidad subsecuente, resultante de la interacción de complejos de células sinoviales con varios elementos celulares (y sus productos solubles) que, infiltrados de la circulación, entran en el revestimiento sinovial de la articulación (Paul WE, 1989).

Es importante destacar el rol de las citoquinas inflamatorias como señales bioquímicas las cuales inducen a la liberación de proteínas degradantes del cartílago a consecuencia de la estimulación de condrocitos. Así tenemos que, proteinasas inhibitorias, citoquinas y receptores interactúan para alterar el sinovio mediante la liberación de anticuerpos, factores de crecimiento y diferenciación de células en respuesta a estas interacciones bioquímicas (Goldring MB, 1999).

En cuanto a interacciones celulares tenemos que pequeños vasos sanguíneos son dañados permitiendo la acumulación de linfocitos y monocitos en el espacio perivascular. Las células T cooperadoras (CD4+) predominan en

la lesión inflamatoria inicial (Idogawa H, 1998), del mismo modo, células fagocíticas del sinovio similares a macrófagos y células dendríticas sinoviales, las cuales proliferan y expresan una abundante cantidad de antígenos clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, característicos de células presentadoras de antígenos (Paul WE, 1989).

Estudios recientes sobre Artritis Experimental inducida por Lipopolisacárido (LPS) han evaluado la destrucción articular mediante la medición macroscópica de la articulación inflamada y por exámenes histopatológicos, encontrando células inflamatorias y folículos linfoides en la lesión sinovial, revelando que la membrana sinovial se encuentran infiltradas por células T cooperadoras (Idogawa H, 1998) tal como se muestra en la figura 1. También se ha observado edema, exudado de fibrina y fibrosis. Estos estudios han permitido evaluar la patogénesis de la Artritis Reumatoide en seres humanos, la cual presenta similitud con la Artritis Experimental inducida por LPS en conejos (Distler O y col, 1999) permitiendo así dilucidar tratamientos para este tipo de enfermedad degenerativa.

Los complejos inmunes activan la cascada del complemento trayendo como consecuencia un incremento de la permeabilidad vascular, infiltrado de células inflamatorias y la afluencia de neutrófilos. Para este momento la articulación se encuentra inflamada, caliente y dolorosa (Paul WE, 1989).

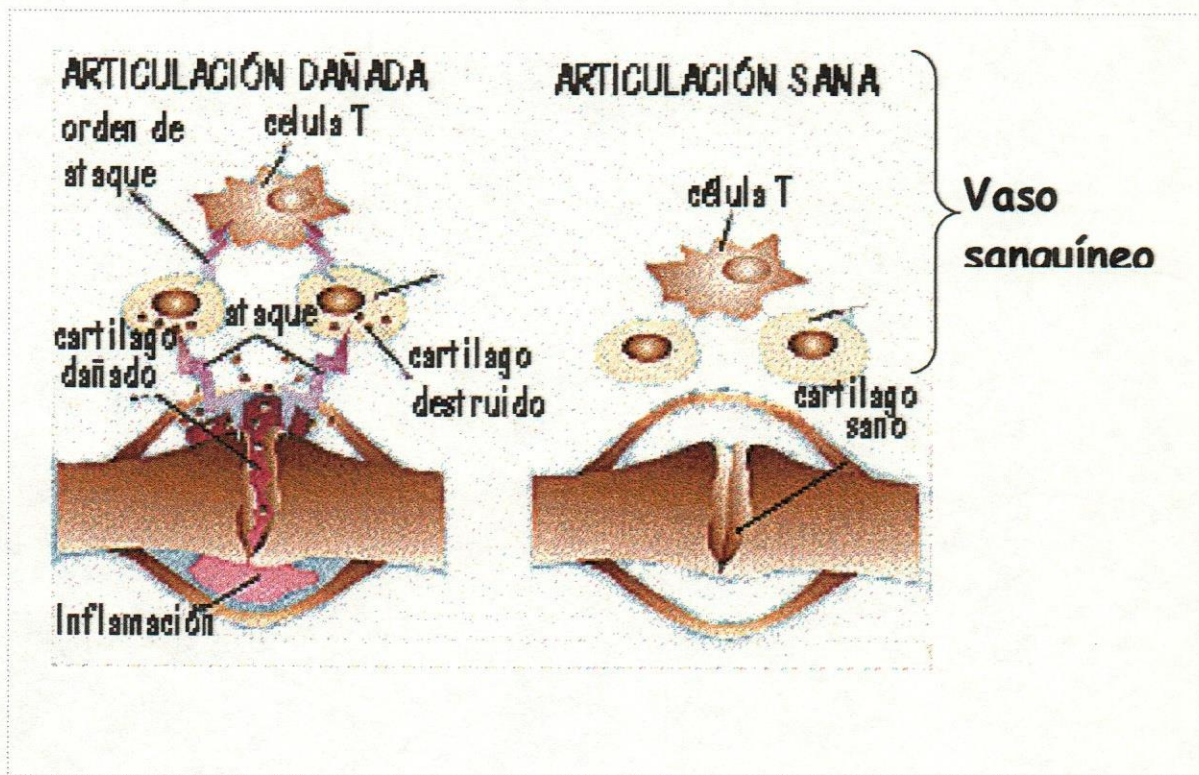


Figura 1.- Comparación entre una articulación sana (derecha) con una articulación inflamada (izquierda). Se puede apreciar la deformidad de la articulación a consecuencia de las interacciones celulares que se suscitan en la localidad.

1.1.1. INTERACCIONES BIOQUÍMICAS

Las interacciones celulares traen como consecuencia la producción de mensajeros tales como las **Citoquinas**, las cuales activan a otras células o

grupos de células. Las citoquinas son proteínas reguladoras de múltiples respuestas a infecciones, respuestas inmunes e inflamaciones. Algunas citoquinas actúan en procesos inflamatorios siendo conocidas como Citoquinas Pro-inflamatorias. Por otra parte, existen otro grupo de citoquinas denominadas Anti-inflamatorias cuyas funciones están destinadas a reducir la inflamación y promover la homeostasis trayendo como consecuencia su mejoramiento (Dinarello CA, 2000).

El papel central de las citoquinas pro-inflamatorias como señales bioquímicas en la artritis como enfermedad degenerativa, implica la estimulación de condrocitos para la liberación de proteinasas que degradan el cartílago. De este modo, inhibidores de proteasas, citoquinas antagonistas, anticuerpos bloqueadores de receptores, factores de crecimiento y diferenciación han sido considerados como agentes terapéuticos contra la Artritis Reumatoide (Goldring MB, 1999).

Una de las primeras citoquinas participantes en el proceso inflamatorio es el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), producido principalmente por monocitos y macrófagos, actuando para producir fiebre, inflamación, destrucción de tejidos y en algunos casos shock y muerte (Dinarello MB, 1999). En modelos animales se ha observado que la inhibición del TNF suprime la respuesta inflamatoria al reducir la producción de proteínas que son nocivas a

la articulación (Moreland LW, 1999), tales como las proteasas, las cuales fragmentan proteoglicanos y colágenos formadores de la matriz de los cartílagos, ligamentos y tendones de la articulación. El infiltrado inicial de la inflamación libera o conduce la proliferación de células sinoviales, formando una lesión granulomatosa crónica que atacan, invaden y erosionan el cartílago y otros componentes de la articulación (Paul WE, 1989).

Otra citoquina liberada durante el proceso inflamatorio de artritis, es la Interleuquina 6 (IL-6), la cual también es producida inicialmente por los monocitos a consecuencia de su estimulación por el TNF, factor de crecimiento derivado de plaquetas, antígenos, mitógenos y endotoxinas bacterianas (LPS). La IL-6 tiene múltiples actividades biológicas en diversas células (Efecto Pleiotrópico). La administración de IL-6 *in vivo* incrementa el conteo de neutrófilos (Terr AI y Sites DP, 1993).

1.1.2. EFECTO DEL COLESTEROL EN LA EXPRESION DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN ARTRITIS

Estudios en donde se aislan lipoproteinas de baja densidad (LDL) del fluido sinovial de la articulación de la rodilla en pacientes con artritis reumatoide, demuestran que las LDL sufren modificaciones oxidativas asociándose este

hallazgo con la respuesta inflamatoria local, de manera similar se ha observado con el proceso de aterogénesis, sugiriendo así que la articulación reumatoide puede ser comparada con procesos de aterosclerosis como proceso inflamatorio en el cual se puede estudiar *in vivo* la oxidación de la LDL (Dai L y col, 2000).

La LDL del fluido sinovial y plasma son similares en lo referente al contenido de colesterol libre, pero la LDL del fluido sinovial tienen un bajo contenido de colesterol esterificado. Los principales efectos de oxidación de la LDL son:

1. Estimulación del reclutamiento de monocitos.
2. Alteraciones en la regulación del colesterol por parte de los macrófagos, resultando así la formación de células espumosas observadas en el revestimiento sinovial de pacientes con artritis reumatoide.
3. Citotoxicidad.
4. Activación de los linfocitos T (James MJ y col, 1998).

Esto permitió comprobar que una alteración en el metabolismo de los lípidos incrementa la producción de factores pro-inflamatorios, exagerando así la respuesta inflamatoria ante la presencia de un antígeno (Brito y col. 1995).

1.2. PAPEL DE LAS LIPOPROTEÍNAS EN EL TRANSPORTE DE LÍPIDOS

El transporte de lípidos desde los tejidos de síntesis y absorción a los de utilización y almacenamiento, requiere su solubilización en el medio acuoso del plasma; para ello, en vertebrados existe un sistema complejo de transportadores de lípidos: las lipoproteínas (Badimon, J. J. y col, 1996).

Gracias a las lipoproteínas, los ácidos grasos, monoacilglicerol, colesterol y fosfolípidos son tomados de la sangre para ser utilizados por los tejidos, las cuales de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas tienen distintas funciones:

- 1) Los quilomicrones, encargados de transportar la grasa ingerida en la dieta diaria, desde los intestinos hacia la circulación general (Soltero, I, 1993).
- 2) Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales transportan triglicéridos sintetizados por el hígado a otros tejidos que lo requieren como combustibles metabólicos.
- 3) Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), encargadas del transporte de ésteres de colesterol del hígado a otros órganos (Camejo, G. y col, 1989).

- 4) Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las cuales transportan el colesterol libre en exceso desde el interior celular al hígado en forma esterificada para luego ser excretado (Soltero, I. y col, 1987).

Actualmente se sabe que el colesterol es una molécula extremadamente antigénica, sobre todo cuando está combinada con transportadores (como el silicone) o adyuvantes (como el lípido A). Un mecanismo inmunológico propuesto por Alving C y Wassef N (1999) para explicar el metabolismo de las lipoproteínas debido a la opsonización por complemento (C) y el traslado de la lipoproteína a través de la sangre. Este consiste en la unión inicial del complejo LDL-Anticuerpo-Complemento, a través de procesos de inmunoadherencia en el Receptor del Complemento 1 (CR1).

Como el receptor de LDL tiene mayor afinidad de enlazarse con esta lipoproteína, más que con la HDL, dicho receptor es responsable de remover aproximadamente 23 moléculas de LDL colesterol circulante (Brown y Goldstein, 1986). La opsonización de la LDL, VLDL o IDL colesterol por la unión natural con anticuerpos de colesterol, resultan de la activación del complemento y la unión de fragmentos de productos de las lipoproteínas (C3b). El complejo inmune Lipoproteína - Anticuerpo Anticolesterol - C3b es tomado de la circulación por células que expresan el receptor C3b, afectando el movimiento y distribución de la LDL colesterol en el plasma. Esto es similar a la

mayoría de los procesos iniciales que ocurren a través del CR1 en eritrocitos y macrófagos, los cuales unen complejos inmunes (por inmunoadherencia) que contienen C3b. En primates, el CR1 remueve complejos inmunes circulantes y regulan la activación del complemento (Birmingham, 1995).

1.3. ATEROSCLEROSIS

1.3.1. ATEROSCLEROSIS COMO ERROR EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS

La aterosclerosis es un fenómeno patológico focal caracterizado por el engrosamiento y endurecimiento de las grandes arterias debido a la acumulación de lípidos, síntesis de carbohidratos, tejido fibroso y depósitos de calcio (Badimon, J. J. Y col, 1996). El factor de riesgo más importante en la aterosclerosis es la hiperlipidemia, donde se observan niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), habiéndose demostrado que los lípidos depositados en la lesión aterosclerótica provienen mayoritariamente de las LDL del plasma (Colomé C. y col, 1999).

Como se mencionara anteriormente, la aterosclerosis está relacionada directamente con los trastornos del metabolismo de las lipoproteínas (Camejo,

G. y col, 1989). Existe una teoría multifactorial del origen de la aterosclerosis, la cual atribuye la disfunción del endotelio tanto a la acumulación de lípidos en las paredes arteriales (a consecuencia de un incremento de la transudación de lípidos plasmáticos en la pared), como a la organización de fibrina por los fibroblastos asociada con el enriquecimiento secundario de lípidos (Badimon, J. J., 1996).

Los altos niveles de colesterol sérico implican un incremento de los niveles de LDL circulantes los cuales son ingeridos por la célula fagocítica, induciéndole la muerte a estas, ahora llenas de lípidos (células espumosas), provocando la liberación de su contenido lipídico y la formación de un núcleo lipídico extracelular (Badimon, J.J. y col, 1996).

1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES ATEROSCLERÓTICAS

Las lesiones ateroscleróticas se caracterizan por provocar discontinuidad en las barreras endoteliales, lo cual facilita la entrada de monocitos circulantes y de los lípidos plasmáticos en la pared arterial, así como el depósito de plaquetas en los sitios de denudación endotelial acompañado de liberación de factores mitogénicos, factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGF) y la migración y proliferación de las células musculatura lisa vascular (SMC) (Badimon, J. J. Y col, 1996).

Según Stary, H.C. y col, 1992 y Ross, R. 1999, se pueden clasificar las lesiones ateroscleróticas de la siguiente manera:

LESIÓN	CARACTERÍSTICAS	EVIDENCIAS PATOLÓGICAS	CONSECUENCIAS
TEMPRA-NA	Lesiones ateroscleróticas tienden a desarrollarse en bifurcaciones arteriales, las cuales están sujetas a repetidas fuerzas mecánicas (Stary, H.C. y col, 1992)	Núcleos ricos en lípidos por acumulación de lipoproteínas ligadas a proteínas matrices tales como glicosaminoglicanos, colágeno y fibrinógeno (Guyton, J.R. y col, 1993).	Endotelio intacto pero disfuncional. Incremento de permeabilidad, permitiendo el flujo de LDL y de otras proteínas plasmáticas hacia la íntima (Jhonson-Tidey, R.R. y col, 1994)
PLACAS MADURAS	Combinación inicial de lípidos y de los macrófagos se acompaña por la subsiguiente proliferación, migración y activación de células de la musculatura lisa vascular, seguido de la deposición de una matriz extracelular y acumulación de lípidos (Davies, M.J. y col, 1993)	Plaquetas y los trombos se encuentran frecuentemente adheridos a las áreas del endotelio desnudo pudiendo formar parte de la lesión ateromatosa (Fuster, V. y col, 1992). Estimulación de células lisas adyacentes	Endotelio física y funcionalmente disminuido debido al ingreso de monocitos y macrófagos (Hansson, C.K. y col, 1993)
PLACAS COMPLE-JAS	Varían grandemente su composición y consistencia. Formación de capa fibrosa delgada (Falk, E. y col, 1999)	Infiltración de células espumosas. Núcleo central de la placa rica en lípidos. Depósitos de cristales de colesterol en el ateroma (componente trombogénico de una placa aterosclerótica) (Toschi, V. y col 1995).	Ruptura de la placa en el punto débil (Stary, H.C. y col, 1992)

De esta clasificación se puede deducir que la composición de la placa influye directamente en la inestabilidad de la misma, aunado a fuerzas físicas externas, hemodinámicas y patofisiológicas que actúan sobre el ateroma. Estas propiedades intrínsecas dependen directamente de:

1. *Capa Fibrosa*: Está densamente infiltrada por las células espumosas (Richardson, P. y col, 1989). Es importante destacar que al principio existe un número importante de células musculares lisas vasculares, las cuales disminuyen en cantidad a medida que avanza la lesión, esto como resultado de la apoptosis o muerte celular programada. (Isner, J.M. y col, 1995). Las células T se encuentran en el Casquete fibroso de la lesión aterosclerótica su proporción depende de la localidad de la lesión. El Linfocito T cooperador (CD4+) induce la producción de anticuerpos y regula la respuesta inmune mediados celularmente (Velázquez, A.M. y col, 1993).

2. *Inflamación dependiente de monocitos/macrófagos*: Niveles elevados de LDL inducen al reclutamiento de monocitos por las células endoteliales, esto es llevado a cabo por procesos selectivos en los que intervienen moléculas de adhesión celular, así como sustancias quimiotácticas detectables en el suero (Colomé y Badimon, 1998).

3. *Fatiga de la Capa*: Ocurre una ruptura espontánea de la lesión a consecuencia de la acción de fuerzas continuas y normales (extensión, compresión, torsión, flexión, roce y presión) provenientes del ciclo cardíaco normal (Badimon, J.J. y col, 1996).

4. *Trombosis Arterial*: Cambios en el endotelio estimulan factores hemostáticos, convirtiéndolo en un endotelio procoagulante, favoreciendo a su vez el agregado plaquetario y la posterior formación del trombo.

Los cambios tempranos inducidos por hipercolesterolemia e hipertensión parecen alterar la permeabilidad endotelial junto con la adherencia de leucocitos, permitiendo caracterizar a la aterosclerosis como un proceso inflamatorio (Ross, R., 1993).

1.3.3. ATEROSCLEROSIS COMO PROCESO INFLAMATORIO

Diferentes estudios han propuesto que la formación de estrías grasas involucra la adhesión de monocitos de sangre periférica (Berliner, J.A y col, 1990) y la proliferación de las células vasculares lisas (Colomé y Badimon, 1998); también sugieren que disfunciones ejercidas por las LDL infiltradas en la íntima arterial sobre las células endoteliales se deben a los peróxidos lipídicos (Morel, D. y col, 1984). Por otra parte, las LDL incrementan la unión de monocitos al endotelio por otros mecanismos no dependientes de la oxidación de las LDL (Pritchard, K. J., 1991), es decir, cambios en el metabolismo de lípidos incrementan adhesión de células mononucleares (Colomé y Badimon, 1998).

La aterosclerosis es considerada un proceso inflamatorio crónico, cuyos componentes celulares se asemejan a aquellos encontrados en un proceso de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), pudiendo degenerar en una respuesta clínica aguda, tras la ruptura de la placa de ateroma, y el desencadenamiento de eventos trombóticos (Fuster, V. y col, 1992; Ross, R., 1999).

La actividad de esta reacción inflamatoria favorece la inestabilidad de la placa; varios estudios han demostrado que el incremento de marcadores inflamatorios en sangre, predice la probabilidad de eventos isquémicos (Liuzzo, G. y col, 1994). Del mismo modo se ha comprobado que proteínas quimiotácticas derivadas del endotelio, tales como IL-8, y mediadoras de la inflamación tales como $TNF\alpha$, IL-1 y Factor Estimulador de Colonia en Macrófagos, aparecen incrementadas en lesiones ateroscleróticas tanto en humanos como en animales experimentales (Tunón, J. y col, 2000).

El $TNF\alpha$ induce una respuesta vascular e inflamatoria similar a la IL-1 y a su vez interfiere con procesos metabólicos tales como la actividad lipolítica. El mismo puede causar necrosis celular, formación de nuevos vasos sanguíneos y trombosis; esto permite deducir que el $TNF\alpha$ puede controlar la evolución del ateroma no complicado a un ateroma complejo (Velázquez, A.M. y col, 1993).

Seguidamente, la activación de monocitos por IL-6 en un vaso sanguíneo, contribuye a la deposición de fibrinógeno. Esta reacción de fase aguda está asociada con el incremento de la viscosidad de la sangre, un fuerte factor de riesgo para las enfermedades coronarias. La IL-6 disminuye la actividad de la Lipoprotein Lipasa (LPL) la cual tiene una importante acción enzimática que favorece la fagocitosis y niveles de LPL monoméricos en plasma, los cuales incrementan la ingesta de lípidos por parte de los macrófagos (células espumosas) (Yudkin, J.S. y col, 2000).

Arterial Disease Progression

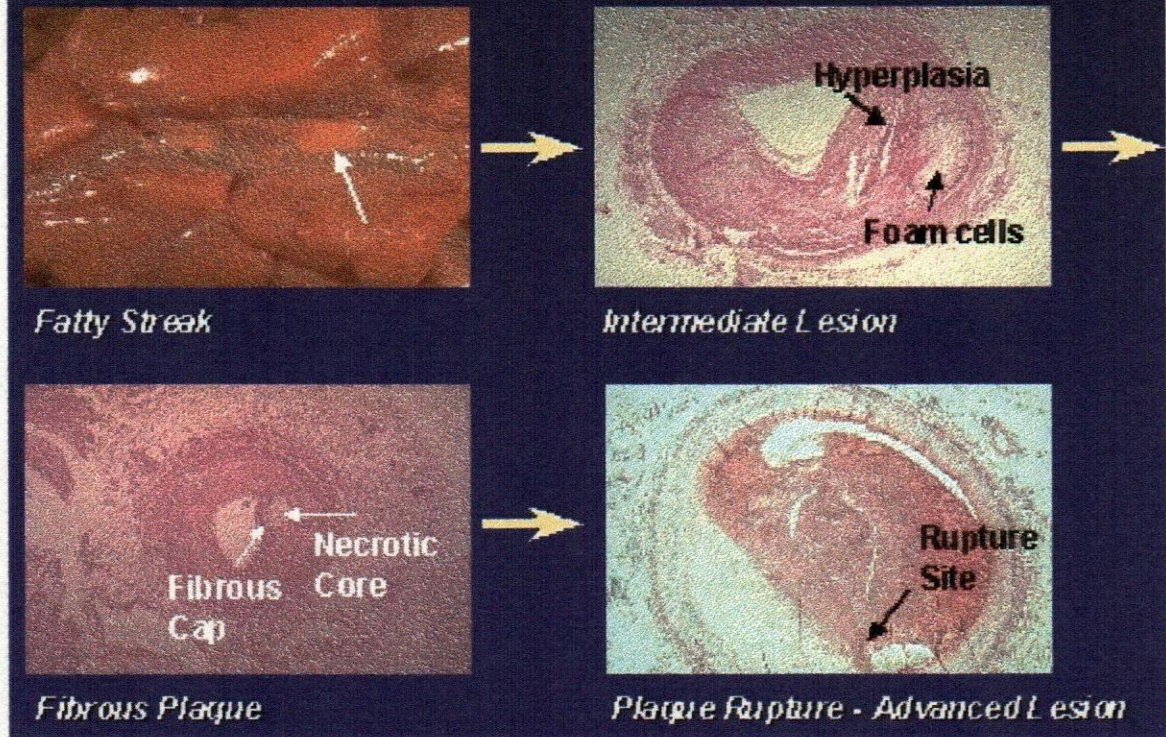


Figura 2. Progresión de la Aterosclerosis. Nótese que a raíz de la aparición de la estría grasa evoluciona paulatinamente hasta que colapsa la estructura, trayendo como consecuencia la ruptura de la placa.

1.4. LIPOPOLISACÁRIDOS COMO ACTIVADORES DE MACRÓFAGOS

El lipopolisacárido (LPS) es un complejo glicolípido que conforma el componente mayoritario de la pared externa de las bacterias Gram negativas, capaz de activar una gran variedad de respuestas inmunitarias, entre ellas la más importante es el desarrollo de la inflamación como mecanismo de defensa del organismo. El LPS estimula directa o indirectamente varios tipos celulares incluyendo las células pre-B, células B, células T, monocitos/macrófagos y fibroblastos, resultando en múltiples respuestas biológicas e inmunitarias (Chaby R y Girard R., 1993). Las potentes propiedades estimuladoras del LPS se deben al lípido A, el dominio más interno y altamente conservado de la molécula (Glauser y col., 1994).

En orden al desencadenamiento de una rápida respuesta contra la invasión de bacterias Gram negativas, los mamíferos han desarrollado mecanismos sensibles para la detección de LPS. Los avances más significativos son el aislamiento y la caracterización de una proteína de unión al lipopolisacárido (LBP), una glicoproteína plasmática de fase aguda de 65 kD, que es miembro de la familia de proteínas que se unen a moléculas anfipáticas y las transportan en el microambiente acuoso (Tobias P y col., 1986; Tobias y col, 1988; Schumann y col 1990). Dentro del espacio vascular, la LBP acelera catalíticamente el movimiento de monómeros de LPS en la bicapa lipídica,

residuo de lípido A (Mathison y col., 1988; Raetz y col., 1988; Rietschel y Brade, 1992). Se ha encontrado que agentes, tales como la polimixina B, es capaz de unirse al lípido A del LPS, e inhibir virtualmente todas las respuestas de los macrófagos dependientes de LPS, incluyendo la síntesis y secreción de citoquinas, generación de actividad procoagulante y citotoxicidad tumoral mediada por macrófagos (Chen y col 1992).

El lípido A se encuentra incrustado en la membrana externa de la célula bacteriana y está constituido fundamentalmente por dos glucosaminas modificadas por fosfato (PO_4) y un número variable de ácidos grasos. El polisacárido, en cambio, se proyecta hacia fuera y consta de dos partes distintas: 1) un núcleo, conformado por un oligosacárido conectado al lípido y 2) una cadena O-específica, la cual es más larga y se proyecta a partir del anterior (Ver figura 3).

La cadena O-específica, que es la porción más externa del LPS, ha resultado ser el segmento más variable y también la parte que precisamente evoca la reacción inmunitaria específica (Rietschel y Brade, 1992).

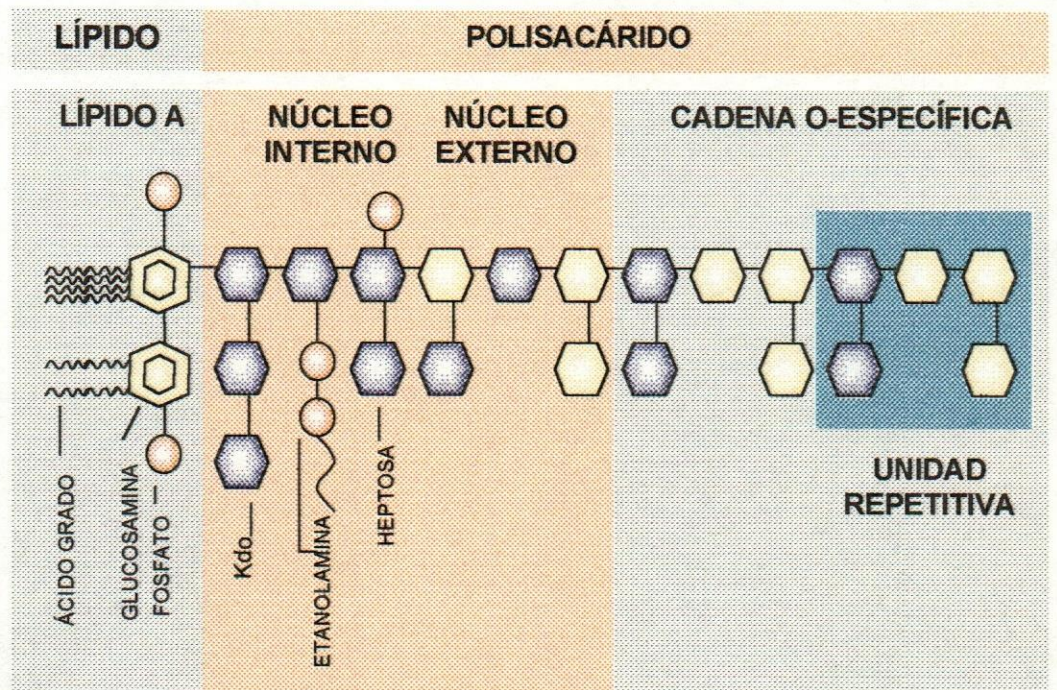


Figura 3. La estructura química del LPS está constituida por un polisacárido, o largas cadenas de azúcares, y el lípido A. El polisacárido, que varía de una especie bacteriana a otra, consta de una cadena O-específica (formada por unidades repetitivas de tres a ocho azúcares) y un núcleo constituido por dos partes. El lípido A abarca dos glucosaminas modificadas por fosfato (PO_4) y un número variable de ácidos grasos. (Rietschel y Brade, 1992)

partículas de lipoproteínas de alta afinidad (HDL) y un sitio de unión sobre una segunda proteína plasmática tanto en su forma estructural como en su forma soluble, el CD14 (Wurfel y col., 1994; Hailman y col., 1994).

1.4.1. ESTRUCTURA DEL LPS

El LPS consiste de un polisacárido variable unido covalentemente a un componente lipídico denominado lípido A. Aunque la porción polisacárida del LPS varía considerablemente, el lípido A es altamente conservado en diferentes bacterias Gram negativas (Lynn y Golenbock, 1992). Preparaciones purificadas y sintéticas del lípido A tienen una potente actividad agonista del LPS; por lo tanto, se ha descrito que la porción del lípido A de la molécula es responsable de la mayoría de los efectos biológicos del LPS (Morrison y Ryan, 1987; Raetz, 1990).

Las investigaciones respecto al principio tóxico de las bacterias gram negativas llevó al descubrimiento de que filtrados de cultivos, extractos de endotoxina (proteína-LPS), LPS purificado y el lípido A, eran capaces de inducir cambios fisiopatológicos característicos del shock séptico cuando eran inyectados en personas voluntarias o en animales experimentales, habiéndose descrito posteriormente, que el principio activo del LPS se encuentra en el

residuo de lípido A (Mathison y col., 1988; Raetz y col., 1988; Rietschel y Brade, 1992). Se ha encontrado que agentes, tales como la polimixina B, es capaz de unirse al lípido A del LPS, e inhibir virtualmente todas las respuestas de los macrófagos dependientes de LPS, incluyendo la síntesis y secreción de citoquinas, generación de actividad procoagulante y citotoxicidad tumoral mediada por macrófagos (Chen y col 1992).

El lípido A se encuentra incrustado en la membrana externa de la célula bacteriana y está constituido fundamentalmente por dos glucosaminas modificadas por fosfato (PO_4) y un número variable de ácidos grasos. El polisacárido, en cambio, se proyecta hacia fuera y consta de dos partes distintas: 1) un núcleo, conformado por un oligosacárido conectado al lípido y 2) una cadena O-específica, la cual es más larga y se proyecta a partir del anterior (Ver figura 3).

La cadena O-específica, que es la porción más externa del LPS, ha resultado ser el segmento más variable y también la parte que precisamente evoca la reacción inmunitaria específica (Rietschel y Brade, 1992).

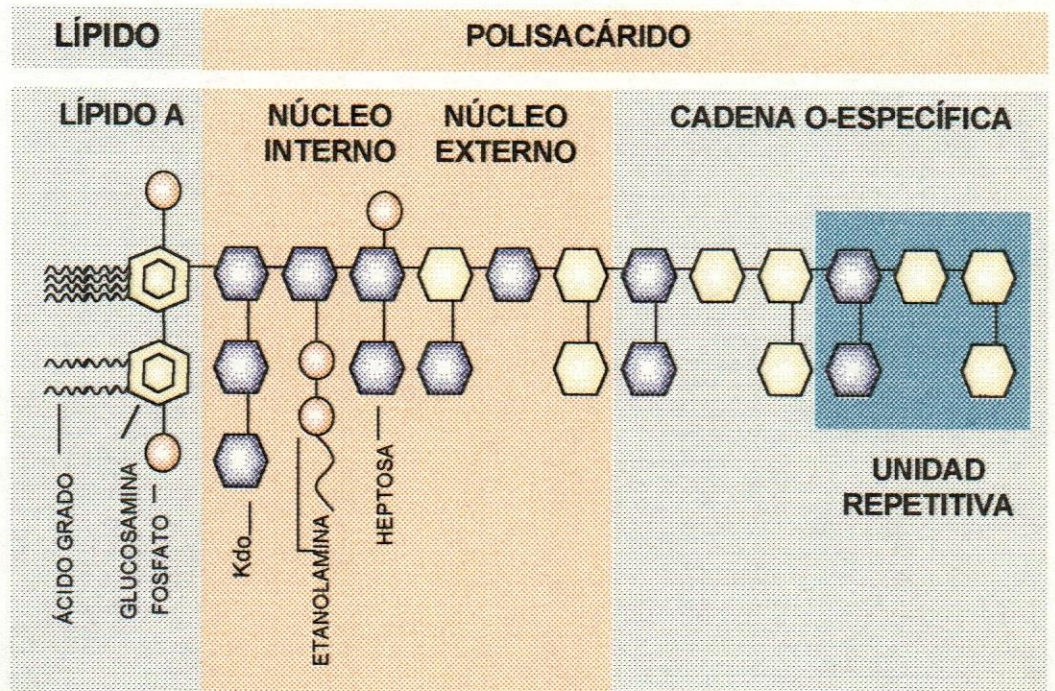


Figura 3. La estructura química del LPS está constituida por un polisacárido, o largas cadenas de azúcares, y el lípido A. El polisacárido, que varía de una especie bacteriana a otra, consta de una cadena O-específica (formada por unidades repetitivas de tres a ocho azúcares) y un núcleo constituido por dos partes. El lípido A abarca dos glucosaminas modificadas por fosfato (PO_4) y un número variable de ácidos grasos. (Rietschel y Brade, 1992)

1.4.2. ESTIMULACIÓN CELULAR INDUCIDA POR LPS

Los macrófagos llevan a cabo un importante mecanismo de defensa en el organismo. Estas células pueden ser activadas *in vitro* por una variedad de estímulos incluyendo al LPS (Mathison y col., 1988; Carswell y col., 1975). Este último estimula a los macrófagos a sintetizar y secretar citoquinas importantes, tales como el TNF-alfa (Old, 1985; Beutler y Cemari, 1989), IL-6 (Kimura y col., 2000) e IL-1 (Matsukawa y col., 1993).

En sangre, el LPS se une a la proteína ligadora de LPS (LBP), una molécula circulante con alta afinidad al LPS (Tobias y col., 1986; Schumann y col., 1990; Martin y col., 1992).

La activación de la célula huésped inducida por LPS, es mediada en gran extensión por el CD14, un antígeno de diferenciación expresado como una glicoproteína de membrana ($_m$ CD14) de 55 kD, unida a un glicosilfosfatidilinositol en las células mieloides, o como una forma soluble ($_s$ CD14) en suero (Ziegler y Ulevitch, 1993). Se ha descrito que el CD14 se encuentra presente, además, en los neutrófilos y al unirse al complejo LPS-LBP induce estados de adhesividad hacia células endoteliales (Worthen y col., 1992).

El complejo LPS-LBP derivado de micelas en circulación, es trasladado catalíticamente por el CD14, tanto sobre la membrana plasmática de la célula huésped como en el suero. El complejo LPS-LBP_mCD14 entonces, induce la activación celular, resultando en una respuesta inflamatoria sistémica.

Actualmente se ha descrito unos receptores llamados Toll (TLR), que median la señalización celular inducida por LPS. (Ulevitch, R., 1999; Kirschning y col., 1998). Los TLR, originalmente identificados en *Drosophila*, son proteínas transmembrana tipo I (TLR1). El TLR1 juega un papel importante en la activación de genes a través de la inducción del NF-kB (Baeuerle y Heukel, 1994). Yang y col., 1998 y Kirschning y col., 1998, descubrieron que el Toll tipo 2 (TLR2) es un receptor de señalización que es activado por LPS en una respuesta que depende de la LBP y es aumentado por la interacción con el CD14. Así, después de la interacción del LPS con la célula, la información es transmitida a través de la membrana plasmática vía TLR2, resultando en la activación del NF-kB y la regulación de genes sensibles. Sin embargo, dada la dependencia de este mecanismo de señalización de la LBP y CD14, es improbable que estos sistemas jueguen un papel en la hiposensibilidad de ratones C3H/HeJ. A pesar de que el CD14 y la LBP están presentes en ratones C3H/HeJ, estas células no son activadas por el LPS. Por otra parte, se ha reportado recientemente otro receptor Toll, el TLR4, que puede tener una relación directa con el locus del gen de LPS y el defecto de C3H/HeJ. Se ha

demostrado que ratones que no expresan TLR4 en sus macrófagos, muestran una alteración en la capacidad de producir TNF- α en respuesta al LPS (Hoshino y col., 1999). Muller ha propuesto un posible mecanismo explicando el papel de diferentes estructuras de unión al LPS (tales como LBP, CD14 y TLR4) en macrófagos y linfocitos B. En el caso de los macrófagos, el complejo LPS-LBP activa estas células por interacción con los receptores CD14-TLR4 (Ver figura 4).

Además, otros elementos en el sistema de transducción de señal deben ser considerados, incluyendo el hecho de que el LPS es rápidamente internalizado y transportado en el aparato de Golgi. Posiblemente los componentes de LPS en el citoplasma pueden reaccionar con otras moléculas, tales como las pequeñas proteínas-G de la familia Ran, las cuales están involucradas en el transporte nuclear. (Wright, 1999). Ran es una pequeña proteína que se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma de células mamíferas (Moore y Blobel, 1994). Muchas funciones biológicas han sido atribuidas a las Ran, la más común es el transporte nuclear. El transporte de pequeñas moléculas dentro y fuera del núcleo es activado vía difusión a través del complejo poro nuclear (NPC). Recientes descubrimientos muestran que las Ran GTPasa también juegan un papel importante durante la mitosis (Ohba T y col., 1999).

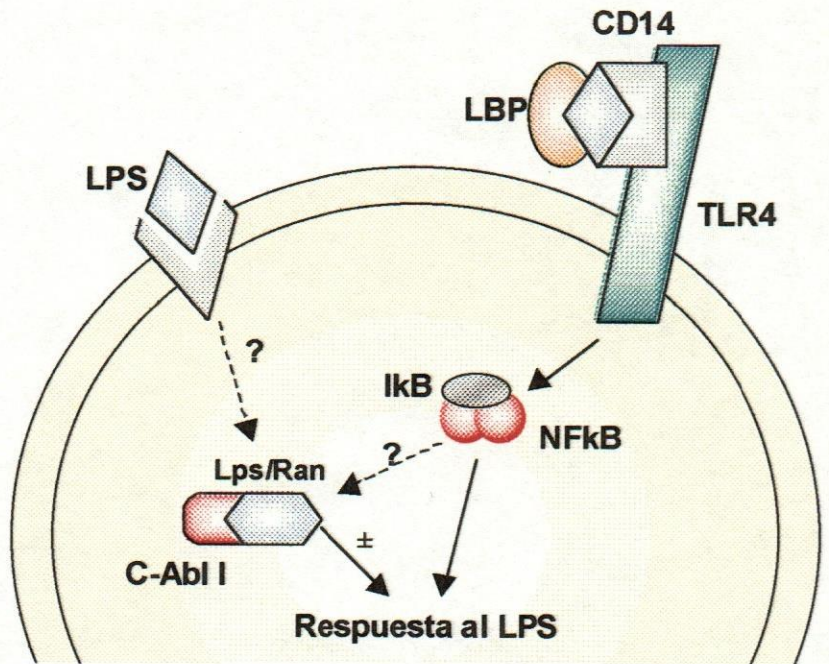


Figura 4. Modelo propuesto para la activación de macrófagos por LPS unido a la LBP, mostrando la interacción del complejo LPS-LBP con sus ligandos en la superficie celular, CD14-TLR4. La flecha de línea sólida indica la asociación entre TLR4 y NFκB; las flechas de líneas punteadas muestran eventos ya postulados; y las flechas de líneas semisólidas con signo de interrogación sugieren posibles vías de conexión Lps/Ran. Un receptor putativo de LPS, que puede ser transmembrana o intercelular, es propuesto en una vía desconocida para la conexión del Lps/Ran independiente del CD14. El signo ± significa la alta o baja modulación en la regulación de la expresión de genes en respuesta al LPS (Wong y col., 2000).

Recientemente se ha encontrado que el c-Abl tipo I está involucrado en la diferenciación y activación de macrófagos en células B, inducidos por LPS y que esta el c-Abl tipo I está asociado con el Lps/Ran. (Daniel y col., 1996; Li y col., 1998). Alternativamente, el Lps/Ran puede transportar físicamente al c-Abl tipo I dentro del núcleo, donde puede activar transcripcionalmente ciertos grupos de genes asociados con la respuesta mediada por el LPS y en particular etapas del ciclo celular o durante la mitosis (Wong y col., 2000).

La activación celular por LPS, induce la liberación de un número de productos que determinan la respuesta del huésped durante una sepsis por bacterias Gram negativas, siendo de gran importancia el TNF y la IL-6, entre otras citoquinas pro-inflamatorias.

1.5. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-alfa (TNF- α)

Los monocitos/macrófagos junto con los granulocitos sanguíneos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) representan la inmunidad no específica. Los macrófagos pueden ingerir y destruir microorganismos por fagocitosis o, en un camino similar a los granulocitos, por secreción de compuestos citotóxicos de gránulos intracelulares cuando estos encuentran microorganismos en su microambiente local. Los macrófagos pueden actuar más específicamente en colaboración con los linfocitos y citoquinas. Una reacción de defensa del organismo, la inflamación, que resulta del esfuerzo cooperativo y coordinado de esta primera línea de defensa está dirigida a localizar y restringir la diseminación de la infección o de transformación de células, pero cuando se prolonga inadecuadamente o se localiza en importantes órganos vitales, puede causar daños morfológicos y funcionales, principalmente insuficiencia en los órganos y finalmente la muerte.

La línea celular de monocitos/macrófagos juega un papel central en la producción de citoquinas inflamatorias, siendo el producto más abundante de macrófagos activados la Caquetina o Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Inicialmente el TNF fue caracterizado como un factor capaz de producir necrosis hemorrágica del tumor (Beutler y Cerami, 1986 y 1989), ahora se cree que el TNF es una de las principales citoquinas proinflamatorias que juegan un

papel central en la iniciación y regulación de la cascada de citoquinas durante una respuesta inflamatoria; y está involucrado en eventos locales y sistémicos presentes en una inflamación. Estudios con ratones deficientes de TNF (Marino, M. y col, 1997) han demostrado que éste además juega un rol en el proceso inflamatorio, esencial limitando la extensión y duración del mismo, y promoviendo la reparación y recuperación de daños causados por agentes infecciosos y tóxicos. Ratones deficientes de TNF han mostrado poca o ninguna respuesta inflamatoria inicial, pudiendo desarrollar, posteriormente, una vigorosa y desorganizada respuesta inflamatoria que lleva a la muerte. Esto último indica la participación de otros factores pro-inflamatorios en la respuesta observada.

El TNF es una citoquina multifuncional producida principalmente por macrófagos activados, células T, mastocitos y algunas células tumorales epiteliales (Decker, T. y col, 1987; Turner, M. y col, 1987; Spriggs, D. y col, 1988). La amplia gama de efectos biológicos producidos por el TNF incluye necrosis de tumores transplantados con zonas hemorráicas, aumento de la proliferación de células normales, citotoxicidad y respuestas inflamatorias, inmunorreguladoras y antivirales; y un papel importante en el shock endotóxico (Carswell, E. y col, 1975; Sugarman, B. y col, 1985; Goeddel, D., 1986; Beutler y Cerami, 1988; Old, 1988).

1.5.1. ESTRUCTURA PROTEICA DEL TNF- α

El TNF- α es una hormona polipeptídica no glicosilada compuesta de subunidades de 17 kD y un punto isoelectrico de 5.3. Cada subunidad consiste de una estructura de hoja beta plegada arreglada no covalentemente en un trímero compacto y estable en forma de campana (Beutler y Cerami, 1986 y 1989; Eck y Sprang, 1989). Los monómeros están compuestos de diez hebras, de las cuales cinco son internas involucradas en la interacción del trímero y cinco en una hoja externa. La hoja interna frente al axis del trímero es esencialmente llana, mientras que la hoja externa es altamente curvada (Eck y Sprang, 1989). Los monómeros están fuertemente empacados dentro de un complejo trímero por residuos hidrofóbicos. La hormona madura contiene 157 aminoácidos, pero inicialmente, ésta es sintetizada como una pro-hormona y contiene 76 aminoácidos adicionales unidos al N-terminal de la molécula. Los aminoácidos adicionales constituyen un N-terminal hidrofóbico que ancla la molécula en la superficie celular. La forma madura o secretada de la hormona es generada por la ruptura proteolítica de la porción transmembrana de la molécula. Estudios sobre mutantes resistentes al procesamiento proteolítico del TNF mostraron que la forma de unión de la membrana, parecida a la proteína secretada, puede inducir la función citotóxica (Ware, C. y col, 1992; Pérez, C. y col, 1990).

El TNF está estructural y funcionalmente relacionado con la linfoxina, LT (Pennica, D. y col, 1984), una proteína típicamente producida por linfocitos activados. Es muy probable que el TNF y la LT evolucionaron de un gen ancestral común. A la LT se le ha designado como TNF- β y al TNF "original" como TNF- α (Nedwin, G. y col, 1985). Es probable que muchas de las actividades asociadas con el TNF también pueden ser compartidas por la LT, estas dos moléculas pudieran mostrar células blanco con especificidades diferentes y actividades específicas en la mediación de estas funciones.

La estructura primaria del TNF- α ha sido determinada en varios mamíferos (hombre, ratón, conejo y vaca) (Goeddel y col, 1986), pudiéndose observar variaciones en la longitud de la cadena polipeptídica. Tanto las proteínas de ratón, humana y también la de conejo, se derivan de un precursor o propolipéptido compuesto por 79 aminoácidos en el ratón, 76 aminoácidos en el hombre y 80 aminoácidos en el conejo. Se ha observado que el precursor posee un grado de conservación de un 86 % al compararse entre especies diferentes, a diferencia de la hormona madura con un 79 % de homología interespecífica, esto sugiere que el primero pueda cumplir una función aparte.

1.5.2. RECEPTORES PARA TNF- α

La unión de citoquinas a receptores específicos de la superficie celular es el primer paso en la iniciación de la acción de la citoquina sobre las células blanco. La actividad biológica del TNF- α es mediada por la unión a receptores específicos sobre la superficie de múltiples células, incluyendo monocitos/macrófagos, linfocitos T, neutrófilos y células endoteliales (Vassalli, P, 1992). Dos receptores distintos pero relacionados, una proteína de 55-60 kDa (TNF-R1) y otra de 75-80 kDa (TNF-R2), han sido molecularmente clonadas y expresadas (Schall, T. y col, 1990; Gray, P. y col, 1990). Muchas células muestran los dos tipos de receptores de TNF simultáneamente, usualmente con predominancia tejido-específica de uno de estos (Brockhaus, M. y col, 1990; Lewis, M. y col, 1991). La síntesis de los dos tipos de receptores puede ser regulada independientemente durante la activación o diferenciación celular (Thoma, B. y col, 1990; Dembic, Z. Y col, 1990). Estudios previos sugieren que la mayoría de las respuestas celulares del TNF- α pueden ser atribuidas a la activación del TNF-R1, el cual inicia señales para citotoxicidad, proliferación de fibroblastos, adhesión celular del endotelio e inducción de varios genes (Thoma, B. y col, 1990; Grell, M. y col, 1994; Tartaglia, L. y col, 1991).

El TNF-R2 comparte algunas actividades con el TNF-R1 y específicamente participa en la regulación de la proliferación y secreción de citoquinas en las células T (Tartaglia, L. y col, 1991; Vandenabeele, P. y col, 1992; Tartaglia, L. y col, 1993). Además, el TNF-R2 puede jugar un papel en lo que es llamado pase de unión del TNF- α al TNF-R1, aumentando así la señalización de este último (Tartaglia, L. y col, 1993). Sin embargo, la activación del TNF-R2 puede inducir directamente las respuestas celulares independientemente de la estimulación del TNF-R1 (Vandenabeele, P. y col, 1992; Tartaglia, L. y col, 1993; Grell, M. y col, 1993).

El TNF- α transmembrana es más efectivo que el TNF- α soluble en la activación del TNF-R2 en varios sistemas celulares, tales como células T y activación celular endotelial (Grell, M. y col, 1995). Esta sensibilidad diferencial del TNF-R2 para las dos formas de TNF- α (soluble/transmembrana) puede explicar parcialmente la diversidad de efectos del TNF- α ; puede además jugar un importante papel patofisiológico en las respuestas inflamatorias locales, incluyendo aquellas en la membrana sinovial reumatoide, como se señalará posteriormente en este trabajo.

1.5.3. MECANISMO DE ACCIÓN DEL TNF- α

Una vez que el TNF interacciona con su receptor en la superficie de la célula blanco, se produce la unión de un trímero de TNF con el receptor (TNF-R1) y luego la internalización del complejo. El receptor para TNF puede ser regulado negativamente por la proteín-quinasa C (PKC) y positivamente por la proteín-quinasa A2 (PKA), pudiendo ser mediada por una proteína G (G). Como resultado de la acción de la fosfolipasa (FL), se libera ácido araquidónico (AA), siendo convertida en algunas células en prostaglandinas, protaciclina, etc. Una señal es transmitida a la mitocondria (M) donde se activa el sistema de transporte de electrones, comenzando a formarse radicales libres, los cuales eventualmente pueden conducir a la muerte celular, ya sea por oxidación de enzimas, lípidos y degradación del ADN. Otra señal conlleva a la rápida activación del factor regulador de la transcripción NF-KB. La activación de la transcripción de algunos genes en el núcleo (N) dependen del NF-KB nuclear activo. También podemos observar la inducción de proteínas protectoras, que previenen la formación de productos tóxicos tales como la MnSOD (Fiers, 1991). Ver figura 5.

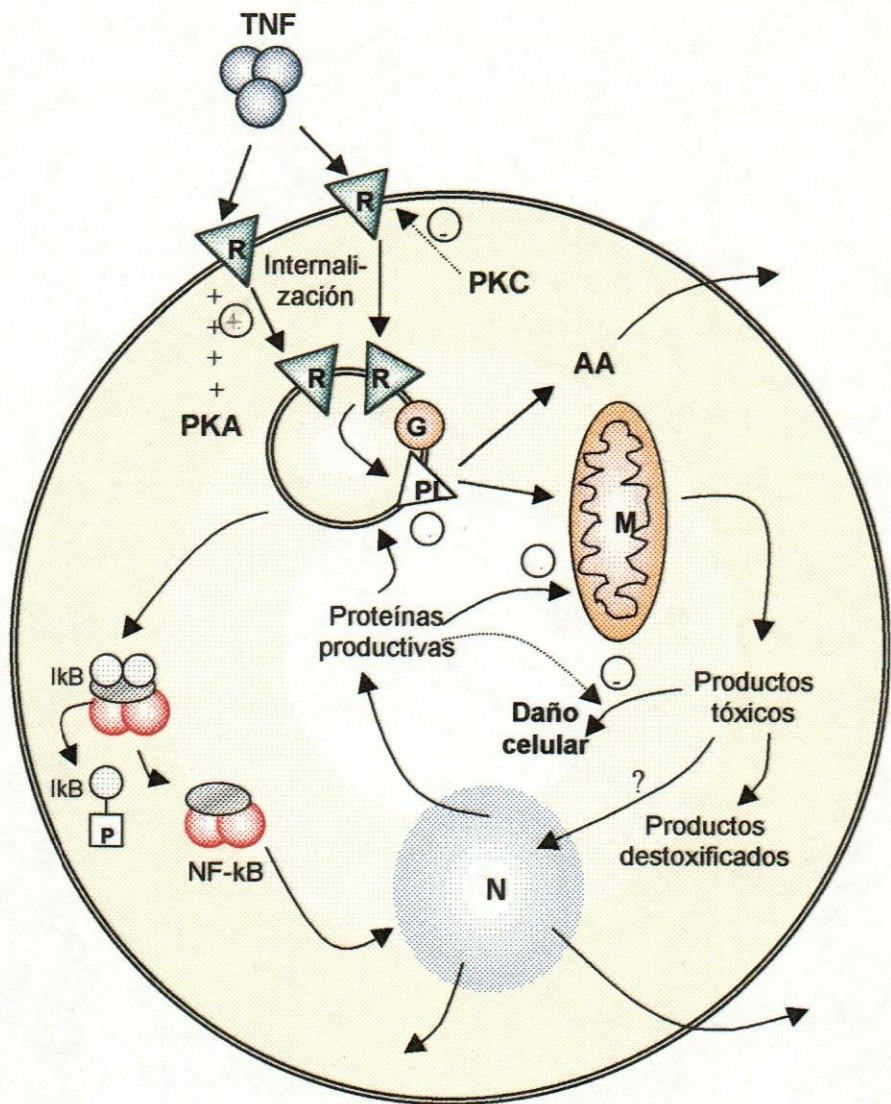


Figura 5. Modelo del mecanismo de acción del TNF (Fiers, 1991)

1.5.4. EL PAPEL DEL TNF- α EN MODELOS DE ARTRITIS

El TNF- α como citoquina pro-inflamatoria juega un papel importante en la patogénesis de la inflamación crónica en enfermedades articulares (Maini, R. y col, 1993).

La actividad artritogénica del TNF- α y sus receptores están bien documentados en modelos animales experimentales con artritis y en ratones transgénicos (Cooper, W. y col, 1991). Datos experimentales sugieren que el TNF- α ocupa una posición dominante dentro de la jerarquía de citoquinas y es, por lo tanto, un blanco primario de inmunoterapia selectiva en artritis (Elliott, M. y col, 1993). La administración de un anticuerpo monoclonal (MoAbs) anti-TNF- α humano y una proteína de fusión anti-TNF- α (p75)-Fc ha mostrado ser efectiva en modelos animales de artritis y artritis reumatoide (Williams R y col., 1992; Moreland L. y col., 1997). Bajo estas circunstancias se ha encontrado que el número de células positivas para el TNF- α es mucho mayor que el número de células para los TNF-R y que el TNF- α es expresado preferentemente en la vecindad de estos receptores (Alsalameh S y col., 1999).

Estudios previos han revelado que una fuerte expresión del TNF- α inducido por estímulo artritogénico en la región de los nódulos linfoides pueden también ser importante para la inducción de artritis (Mussener, A. y col, 1995).

Además, los niveles de TNF- α en el fluido sinovial de pacientes con artritis están correlacionados con el grado de destrucción del hueso y la articulación inflamada (Neidel, J. y col, 1995).

Pacientes con artritis desarrollan sinovitis con erosión del cartílago y hueso, asociado con inflamación e hiperplasia de la membrana sinovial, procesos eventualmente importantes en la destrucción de las estructuras articulares. La cascada inflamatoria es modulada por múltiples citoquinas y factores de crecimiento secretados por infiltración de células inmunes, tales como monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos y otras células (Alsalameh, S. y col, 1999). En particular, el rol principal del TNF- α en el sitio de inflamación en la artritis ha sido claramente demostrado (Maini, R. y col, 1993; Elliott, M. y col, 1993). La presencia de un número substancial de células positivas de TNF-R, además de la expresión del TNF- α y TNF-R vecinos a la membrana sinovial, sugiere que el TNF- α producido localmente (bien soluble o de membrana) puede estimular efectivamente diferentes tipos de células, incluyendo macrófagos, en la misma área. Esto resulta en una secreción amplificada de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios por las células estimuladas, lo cual explica el potente efecto pro-inflamatorio del TNF- α en la articulación con artritis. Investigaciones previas *in vitro* han mostrado que el TNF- α sobrerregula la expresión del TNF-R sobre diferentes tipos celulares, incluyendo la línea celular epitelial humana, fibroblastos, linfocitos y condrocitos.

Esto también es aplicable en una situación de artritis *in vivo*, en la cual la expresión del TNF-R puede ser sobrerregulado por el TNF- α , proporcionando las bases para la activación aumentada de células sinoviales y células del cartílago vecino. En suma, la presencia de un alto porcentaje de células transportadoras de los receptores R₁ y R₂ puede representar un blanco local sistémicamente disponible para el TNF- α (Mussener A. y col., 1995; Tetta C., 1990).

1.6. INTERLEUQUINA-6 (IL-6)

La IL-6 es una citoquina con actividades pleiotrópicas que juega un papel central en la defensa del organismo. La IL-6 puede inducir e inhibir el crecimiento celular y estimular actividades de diferenciación, dependiendo de la célula sobre la cual actúe. Estas actividades incluyen: 1) diferenciación terminal (secreción de inmunoglobulinas) en células B, 2) promoción del crecimiento en varias células B (células de mieloma/plasmacitoma/hibridoma), 3) sostener la formación de colonias multipotenciales por células hematopoyéticas, 4) activación de la respuesta hepática de fase aguda, 5) diferenciación y/o activación de células T y macrófagos, y 6) diferenciación neural. En estudios previos esta molécula fue descrita con varias designaciones tales como factor estimulador de células B-2 (BSF-2), interferón- β_2 (IFN- β_2), factor de crecimiento

de hibridoma (HGF) y factor de estimulación de hepatocitos (HSF). El nombre de IL-6 fue propuesto porque las secuencias de nucleótidos de todas estas proteínas eran idénticas. La IL-6 ha sido implicada en la patología de muchas enfermedades incluyendo mieloma múltiple, glomerulonefritis proliferativa mesangial, artritis reumatoide y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La inhibición selectiva de la síntesis o de la acción de la IL-6 puede tener beneficios terapéuticos contra enfermedades asociadas a la IL-6. Por otro lado, la IL-6 tiene una potente actividad antitumoral contra ciertos tipos de tumores. La aplicación de IL-6 en tratamientos de cáncer es prometedor, además en el tratamiento de radiación o quimioterapia-mielosupresión inducida (Shizuo y col., 1993).

1.6.1. ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN DE LA IL-6

La IL-6 es una glicoproteína con una masa molecular en el rango de 20 a 30 kD, dependiendo de la fuente celular y de la preparación. La heterogeneidad del peso molecular de la IL-6 resulta de las modificaciones post-traslacionales en N y O unido por glicosilación y fosforilación (May y col, 1988); sin embargo, estas diferencias en el tamaño molecular no parecen jugar un papel importante en las actividades biológicas de la IL-6.

La IL-6 humana (Hirano y col, 1986) consiste de 212 aminoácidos incluyendo 28 aminoácidos péptido señal, mientras que en ratones (Van Snick y col, 1988) y ratas (Northemann y col, 1989) la IL-6 consta de 211 aminoácidos con unos 24 aminoácidos secuencia señal. Comparaciones de la secuencia del cDNA de IL-6 de ratón con la de la IL-6 humana muestra una homología de 65% de DNA y 42% de aminoácidos, aunque en muridos y ratas las secuencias de proteínas son idénticas en un 93%. A pesar de la baja homología de aminoácidos entre la IL-6 humana y la de muridos, el mecanismo de la IL-6 humana sobre células de muridos tienen la misma actividad biológica que la IL-6 de ratón, pero no viceversa.

De manera similar, cuatro cisteínas son también la base en el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), al igual que en el factor de crecimiento de melanocitos (MGF) en pollos, sugiriendo una relación evolutiva entre estas moléculas (Leutz y col, 1989).

La IL-6 es pronosticada como una estructura terciaria común de cuatro hélices α (A, B, C y D) y tres enlaces: dos largos (A-B y C-D) y uno corto (B-C). La relación evolutiva entre G-CSF y la IL-6 está cimentada por un patrón común de exones e intrones en sus genes respectivos. Otras citoquinas incluyendo G-CSF, MGF, prolactina (PRL) y eritropoyetina (EPO) adoptan una topología similar de enlace y de plegamiento de hélice. La región de gran similitud entre estas moléculas es la C-terminal (hélice D) del alineamiento de las cadenas de

proteínas. Estudios de mutagénesis, delección y neutralización con anticuerpos anti-PRL, EPO, IL-6 y G-CSF sugieren que la superficie de la predicha hélice D es el receptor primario de la estructura de unión (Ver figura 6). Residuos importantes para la interacción con el IL-6R α son localizados en las hélices A y D y en el enlace entre las hélices A y B (Ehlers y col, 1994; Brakenhoff y col, 1994).

1.6.2. RECEPTORES PARA IL-6 (IL-6R)

El IL-6R humano (IL-6Rh) consiste de una región extracelular de 339 aminoácidos, una región intramembrana de 28 aminoácidos y una región citoplasmática de 82 aminoácidos. El IL-6Rh, así como el de ratón y su homólogo en ratas clonados por hibridación cruzada, tiene un dominio de aproximadamente 90 aminoácidos en la porción amino-terminal de la región extracelular, lo cual cumple con el criterio para el grupo constante 2 (C2) de la familia de supergenes de inmunoglobulinas (Yamasaki y col., 1988; Sugita y col., 1990; Baumann y col., 1990). El resto de la región extracelular del IL-6R tiene una parte estructural similar a la de varios receptores clonados subsecuentemente, específicamente citoquinas hematopoyéticas (Bazan, 1990). Este hallazgo tiene definida una familia de receptores de citoquinas hematopoyéticas incluyendo a IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R,

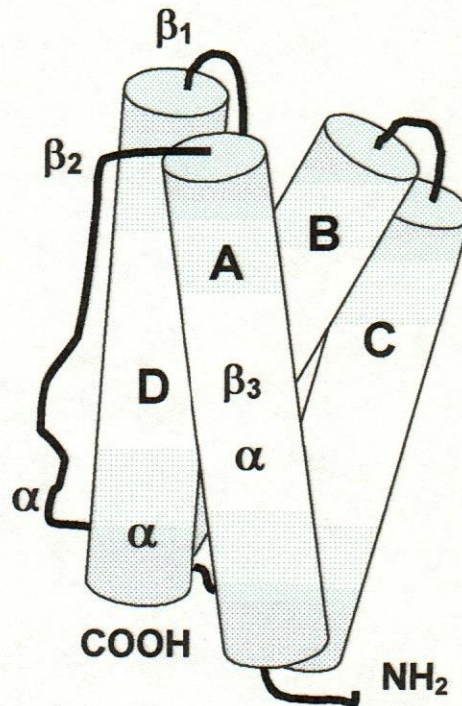


Figura 6. Versión simple de la posible estructura terciaria de la IL-6. Muestra las cuatro hélices α (A, B, C y D) con sus respectivos enlaces y una pequeña hélice- α en el enlace A-B. Las α indican las regiones importantes para la interacción con el IL-6R α . β 1-3 indican las regiones importantes para la interacción con el gp 130(cadena- α dependiente) (Brakenhoff y col, 1995)

entre otros (Bazan, 1990; Taga y Kishimoto, 1992). En esta región extracelular se conserva la capacidad de unión de la IL-6.

La región citoplasmática del IL-6R es relativamente corta y sin dominio catalítico evidente. La delección de esta región no afecta la actividad de la IL-6. Esto ha sugerido la existencia de un componente que está asociado con el IL-6R y es responsable de la señal de transducción. Tal molécula, ahora llamada gp 130 por ser una glicoprotína de 130 kD, ha sido descubierta por inmunoprecipitación de la proteína del IL-6R (Taga y col., 1989).

La gp 130 consiste de una región extracelular de 597 aminoácidos, una región intramembrana de 22 aminoácidos y una región citoplasmática de 277 aminoácidos (Hibi y col., 1990). Se ha demostrado que a pesar de la falta de la propiedad de unión a la IL-6, la gp 130 está involucrada en la formación de sitios de unión de alta afinidad y es crítico para la señal de transducción de la IL-6 (Hibi y col., 1990; Taga y Kishimoto, 1992): 1) El cDNA expresado del IL-6R presenta una propiedad de unión a la IL-6 sólo de baja afinidad, pero la coexpresión del IL-6R con la gp 130 confiere, a la vez, sitios de unión de alta y baja afinidad. 2) El anticuerpo monoclonal anti-gp 130 bloquea la formación de sitios de unión a la IL-6 de alta afinidad, pero no de baja afinidad; y también inhibe las respuestas biológicas de la IL-6 inducida. 3) El complejo IL-6/IL-6R induce la síntesis de DNA en la expresión de células transfectadas con gp 130,

pero no en la línea celular pro-B parental. En conclusión, el complejo del IL-6R comprende dos proteínas de membrana funcionalmente diferentes: una cadena de unión al ligando (del IL-6R de 80 Kd) y una cadena de señal de transducción (gp 130). Cuando el IL-6R es ocupado por la IL-6, sus dos cadenas asociadas extracelularmente forman un receptor funcional de alta afinidad.

1.6.3. INDUCCIÓN Y PRODUCCIÓN

La IL-6 es producida por muchos tipos de células incluyendo monocitos/macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células de musculatura lisa, células T, células B, granulocitos, mastocitos y ciertos tumores. La producción constitutiva de IL-6 es reportada en un número de líneas celulares tumorales tales como mixoma cardíaca, carcinoma cervical, carcinoma renal y carcinoma de células de la vejiga. Con excepción de células tumorales que producen IL-6 constitutivamente, las células normales no producen IL-6 a menos que sean estimuladas apropiadamente. La producción de IL-6 es regulada positiva y negativamente por una variedad de estímulos. Tal regulación positiva y negativa de la producción de esta citoquina varía dependiendo del tipo de célula. El LPS aumenta la producción de IL-6 en monocitos y fibroblastos (Helfgott col, 1987). Varios virus inducen la producción de IL-6 en fibroblastos (Sehgal y col, 1988). Una variedad de factores

peptídicos, tales como IL-1, TNF y PDGF aumentan la producción de IL-6 en fibroblastos y ciertas líneas celulares tumorales (Kohase y col, 1986; Walther y col, 1988; Van Damme y col, 1987). El Interferón- γ (IFN- γ) induce la producción de IL-6 por macrófagos y células endoteliales (Leeuwenberg y col, 1990; Sanceau y col, 1989). La IL-6 no induce a la IL-1 o al TNF. Mejor dicho, suprime la producción de IL-1 y TNF inducidos por endotoxinas (Aderka y col, 1989; Schindler y col, 1990). Además, en ciertas condiciones la IL-6 es capaz de inducir su propia producción (Shabo y col, 1989; Miyaura y col, 1989). La IL-4 es un potente inductor de la producción de IL-6 en células B normales, queratinocitos, células endoteliales (Smeland y col, 1989; Howells y col, 1991; Colotta y col, 1991), mientras que la IL-4 inhibe la producción de IL-6 en monocitos, fibroblastos y sinoviocitos (Te Velde y col, 1990; Gibbons y col, 1990; Cheung y col, 1990; Lee y col, 1990; Miossec y col, 1992). El factor transformador de crecimiento β (TGF β) regula disminuyendo la producción de IL-6 por monocitos humanos (Musso y col, 1990), pero aumenta la producción de IL-6 por las células epiteliales intestinales (McGee y col, 1992). La IL-10 inhibe la producción de IL-6 por los macrófagos (Fiorentino y col, 1991; De Waal Malefyt col, 1991). Entonces, las múltiples interacciones entre citoquinas (red de citoquinas) regulan la producción de IL-6 y otras citoquinas. Segundos mensajeros agonistas tales como diacilglicerol, forbol éster e ionóforos de calcio A-23187, también estimulan la expresión de IL-6 (Sehgal y col, 1987; Zhang y col, 1988).

Al menos dos vías de señal son involucradas en la inducción de IL-6 por la IL-1 o por el TNF, uno requiere la activación de la proteína-quinasa C (PKC) (Sehgal y col, 1987) y otros involucran la adenilato ciclasa (Zhang y col, 1988).

La producción de IL-6 puede ser superinducida por tratamiento con ciclohexamida, sugiriendo que la regulación de la producción de estas citoquinas es de acuerdo al control de proteínas represoras lábiles. La dexametasona y otros glucocorticoides pueden suprimir marcadamente la producción de IL-6 (Helfgott y col, 1987).

1.6.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA IL-6

La IL-6 ejerce su actividad a través del desencadenamiento de un receptor transmembrana presente en todas las células blanco. Actualmente sólo se sabe que el paso específico en la cascada de señalización de la IL-6 es la unión de la IL-6 a una cadena- α de baja afinidad de 80 kD (CD126). El complejo de IL-6 y la cadena- α posteriormente se unen con alta afinidad a la cadena- β (no específica), gp 130. Ambas cadenas pertenecen a la familia clase I de la superfamilia de receptores de citoquinas (Bazan, J. y col., 1990). La asociación del complejo IL-6/cadena- α dirige la homodimerización y

fosforilación de la tirosina de la gp 130 y la señal de transducción (Murakami, M., 1993). La estequiometría de la actividad del complejo receptor no está enteramente clara. Estudios previos sugieren que la formación del complejo activo receptor de IL-6 puede consistir de dos moléculas de cada IL-6, cadena- α y cadena- β (Ward, L. y col., 1994). Ver figura 7.

La activación de la gp 130 por IL-6 resulta en la activación de varios caminos de señal-transducción, lo cual puede además ser desencadenado por otras citoquinas (Kishimoto, T y col., 1992; Hirano, T. y col., 1994)

1.6.5. PAPEL DE LA IL-6 EN LA ARTRITIS

Pacientes con artritis característicamente muestran plasmacitosis policlonal, presencia de autoanticuerpos e incremento en proteínas de fase aguda y plaquetas en el líquido sinovial. Estos síntomas pueden ser explicados por la sobreproducción de IL-6. En realidad, niveles elevados de IL-6 pueden ser detectados en el fluido sinovial de articulaciones afectadas y suero de pacientes con artritis activa (Hirano y col, 1988; Houssiau y col, 1988; Bhardwaj y col, 1989; Guerne y col, 1989). Existen también correlaciones significativas entre la concentración de IL-6 e IgG sinovial, así como entre la actividad de la IL-6 en suero y los niveles de una variedad de proteínas de fase aguda tal como

la CRP (Houssiau y col, 1988; Hermann y col, 1989). Células T, células B, sinoviocitos y condrocitos, han sido identificados como fuentes de IL-6. Otras citoquinas, como IL-1 y TNF, las cuales están también presentes en el fluido sinovial, son potentes inductores de IL-6. La IL-6 puede contribuir a la proliferación celular en la cubierta sinovial, lo cual resulta en un marcado acúmulo de tejido inflamatorio (pannus) en la articulación de pacientes con artritis (Firestein y col, 1990). Citoquinas inflamatorias y la red de otras interacciones pueden, por lo tanto, estar involucradas en la artritis.

Entre los modelos experimentales tenemos: a) la artritis inducida por colágeno tipo II, la cual conlleva a la producción de auto-anticuerpos que posteriormente afectarán irreversiblemente el cartílago sinovial (Takai y col, 1989 y b) la artritis inducida por LPS, la cual promueve una activación de tipo agudo, con componentes inflamatorios que causan el daño local (Matsukawa y col., 1993)

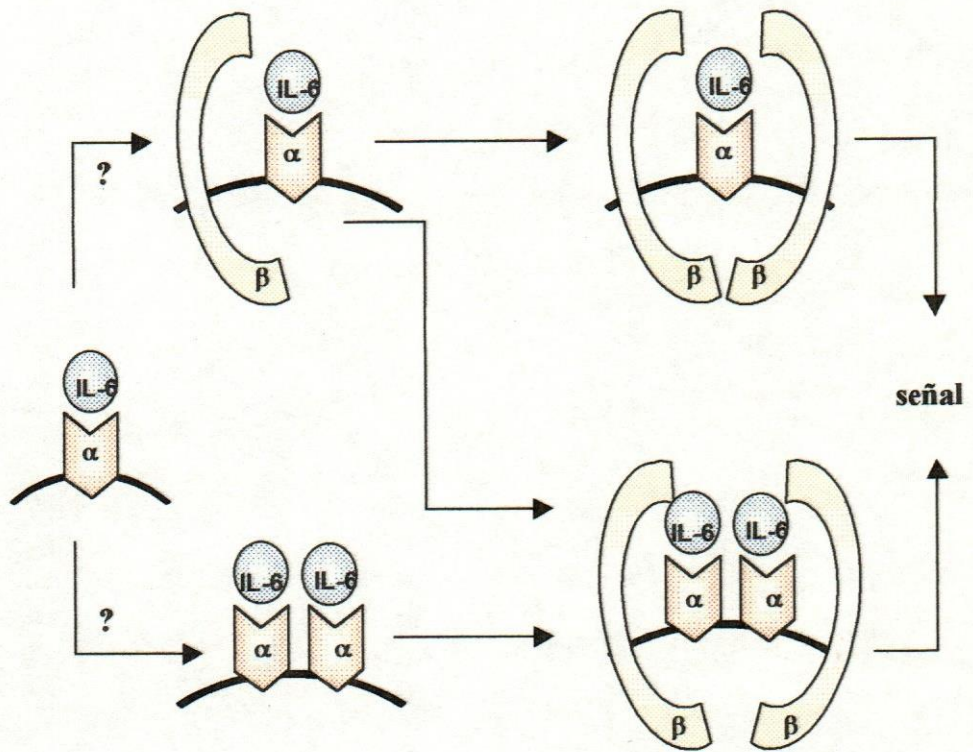


Figura 7. Modelos de la interacción del receptor de IL-6. La IL-6 se une a una cadena- α de baja afinidad (CD126) y posteriormente este complejo se une con alta afinidad a la cadena- β (gp 130)

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la influencia de la hipercolesterolemia sobre la inducción con lipopolisacárido (E.coli 0127:B8) de la artritis experimental en conejos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinación de los niveles de colesterol sérico en conejos sometidos a:
a) dieta suplementada con 0,5 % de colesterol disuelto en alcohol etílico libre de impurezas (conejos hipercolesterolémicos); b) dieta control (conejos normales).
2. Determinación del número de células blancas totales en el líquido sinovial de conejos sometidos a los dos tipos de dieta.
3. Evaluación de los niveles de TNF en el líquido sinovial de conejos alimentados con la dieta hipercolesterolémica en comparación con los controles.
4. Evaluación de los niveles de IL-6 en el líquido sinovial de conejos hipercolesterolémicos y controles.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

5. Determinar las correlaciones entre los resultados obtenidos, los niveles de colesterol y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

5.1. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el marco del curso de la asignatura de Fisiología, en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se mantuvo un alto nivel de integridad y honestidad en el desarrollo de la misma y se respetó la privacidad de los datos.

5.2. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el marco del curso de la asignatura de Fisiología, en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se mantuvo un alto nivel de integridad y honestidad en el desarrollo de la misma y se respetó la privacidad de los datos.

El presente trabajo de investigación se realizó en el marco del curso de la asignatura de Fisiología, en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se mantuvo un alto nivel de integridad y honestidad en el desarrollo de la misma y se respetó la privacidad de los datos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelandia, machos, con un peso de 3.0 Kg, los cuales se obtuvieron del Bioterio Central del IVIC. Se mantuvieron en jaulas metálicas a temperatura ambiente y luz controlada. La comida y el agua se les permitió "ad libitum".

3.2. DIETAS

Los animales se alimentaron con conejarina (Alimentos Protinal C.A., Valencia, Edo. Carabobo) por un período inicial de una semana con el fin de lograr condiciones uniformes, constituyendo ésta la dieta basal durante el tiempo de observación. Posteriormente se separaron en dos grupos con las siguientes dietas:

- a) Dieta rica en colesterol: consistió en conejarina a la que se le adicionó colesterol (Lote 81HO793 Sigma. S-Cholesten-3/3-ol Equivalent to USP/NF Approx 95% by 6C C₂₇H₄₆O C-8503 St Louis, MO-USA) 0.5 % p/p. El

colesterol se disolvió en alcohol etílico libre de impurezas (Planta de Plasma y derivados sanguíneos, C.A.), apto para el consumo humano, a 60 °C, en una proporción de 1 gr colesterol/50 cc de etanol siendo luego mezclado con la conejarina de forma homogénea. Posteriormente, con el objeto de lograr la evaporación total del etanol, se colocó la mezcla a 120 °C durante 2 horas. La presencia de etanol se cuantificó con un kit enzimático para determinación de alcohol comercial (Sigma diagnostics, St. Louis, MO-USA)

b) Dieta control: Esta consistió en la conejarina, sin colesterol.

Los conejos fueron alimentados con las distintas dietas durante un período experimental de 8 semanas, lapso en el cual se realizaron las distintas experiencias.

3.3. ENSAYO DE ETANOL

Se demostró la ausencia de etanol residual en la dieta experimental mediante un método enzimático colorimétrico que permite la detección de la presencia de alcohol, gracias a la reducción de NAD^+ por la alcohol deshidrogenasa (Sigma Diagnostic, St Louis, MO-USA). De esta forma, 1 gramo de la dieta se suspendió en 10 ml de agua destilada y luego de 2 horas

de rotación constante se dejó reposar durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos (Centrífuga MSD, modelo Coolspin PL-352). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se tomaron 10 μ l y se le agregaron 3 ml de la solución reactiva al alcohol, realizándose lo mismo para el blanco, en cuyo caso se utilizaron 10 μ l de agua desionizada. Se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. Finalmente se leyó la absorbancia a 340 nm y se determinó la concentración de alcohol mediante el producto de un factor constante (223) y la diferencia de absorbancias entra la muestra y el blanco, distribuidos de la siguiente forma:

Tubo 1: 10 μ l de dieta experimental (muestra)

Tubo 2: 10 μ l de H₂O desionizada (blanco)

Tubo 3: 10 μ l de solución estándar (estándar)

El cálculo de la concentración de etanol se hizo de la siguiente forma:

Concentración de alcohol = $(T_1 - T_2)223$ mg/dl

Concentración de alcohol = $(T_3 - T_2)223$ mg/dl

Se considera el ensayo como etanol negativo cuando la concentración de etanol en la muestra de la dieta experimental es menor o igual a 10 mg/dl.

3.4. OBTENCIÓN DE SUERO

La sangre obtenida de la arteria central de la oreja de los conejos, se colocó en tubos de ensayo, los cuales se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas para permitir la formación y retracción del coágulo. Luego se centrifugaron las muestras a 2500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se colectaron los sueros y se guardaron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la determinación de los niveles de colesterol, o de los niveles de citoquinas (TNF e IL-6).

3.5. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE COLESTEROL SÉRICO

La concentración de colesterol sérico fue determinada por un ensayo colorimétrico mediante la técnica reportada por Bowman y Wolf (1962), haciéndose una reducción de las proporciones en 2,5 veces con respecto al método original. El procedimiento fue el siguiente:

Muestras de 20 μl de suero de conejo fueron colocadas en tubos cónicos de centrífuga de 15 ml (corning), por duplicado. Se agregó 1 ml de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania Occidental) a la vez que se agitaba en un vortex (Fisher Genie 2) durante 12 segundos aproximadamente y se

centrifugó a 650 g durante 5 minutos en una centrífuga MSD, modelo Coolspin PM-352, con el fin de separar la capa etanólica del precipitado de proteínas. Seguidamente se tomaron 500 µl del extracto etanólico y se colocaron en tubos plásticos a los cuales se les añadió cuidadosamente, dejando caer por las paredes, 500 µl del reactivo de color (8 ml de una solución 2,5% de cloruro férrico, FeCl₃ (Merck, Darmstadt), en ácido fosfórico al 87%, H₃PO₄ (Merck, Darmstadt), completando hasta 100 ml con ácido sulfúrico concentrado, H₂SO₄ (Merck, Darmstadt). Seguidamente se mezcló el contenido de los tubos por 12 segundos aproximadamente y se dejó enfriar la mezcla por 20 minutos, después de lo cual se leyó la absorbancia de las muestras a 550 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21 D L&B). En cada determinación se incluyeron patrones de colesterol de 5, 10 y 20 µg/ml, preparados a partir de una solución madre de colesterol (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) de 1 mg/ml en etanol absoluto. También se incluyó un blanco que consistió en 500 µl de etanol absoluto más 500 µl de reactivo de color.

El cálculo de la concentración de colesterol se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{mg colesterol/100 ml de suero} = \frac{\text{As} \times 10}{\text{Ast} \times \text{S} \times 2,5}$$

Donde:

As = absorbancia de la muestra

Ast = absorbancia promedio del patrón de colesterol de 20 $\mu\text{g/ml}$

S = ml de la muestra de suero sometida a extracción etanólica

10 = factor de conversión a mg/100 ml

2,5 = normalización de la fórmula de Bowman y Wolf a los valores reales.

3.6. INDUCCIÓN DE ARTRITIS

Se realizó por la inyección local de 10 ng de LPS de la cepa 0127:B8 de E. coli contenidos en un volumen de 500 μl en una de las rodillas del conejo y en la rodilla contralateral se inyectó solución salina al 0,89 % libre de pirógeno como control. Luego se extrajo líquido sinovial por lavado de la cavidad mediante la inyección de 1 ml de solución salina al 0,89 % a los 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas.

3.7 CONTAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO CELULAR EN LA CAVIDAD SINOVIAL

El conteo de las células inflamatorias infiltradas se realizó con la utilización del reactivo de Turk para coloración de glóbulos blancos (3 cc ácido acético, 1 cc solución de violeta genciana, agua destilada csp 100 cc), en una dilución 1:20. Se colocaron 95 μ l del colorante de Turk en tubos de vidrio de 6 ml y luego se le añadió 5 μ l de muestra. Seguidamente se tomó una pequeña muestra de la dilución se colocó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio para contar el número de células. Al finalizar el conteo, se centrifugaron las muestras a 650 g en una centrífuga (Marathon Fisher Scientific. 13K/M) durante 2 minutos. Las muestras se congelaron a -70°C

3.8. EXTRACCIÓN DE LA ARTERIA AORTA TORÁXICA Y COLORACIÓN

Se procedió a extraer la arteria aorta torácica con el fin de determinar la presencia de placas ateromatosas. Se determinó el área de lesión total en las aortas provenientes de los distintos grupos de animales mediante el método de planimetría por pesada, el cual consiste en la tinción de las aortas mediante una solución que contiene sudan black B (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO-USA) al 0,2 % v/v. en etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Merck, Darmstadt) al 60 % v/v y 125

μ l/100cc de una solución de hidróxido de sodio (NaOH, Merck, Darmstadt) 10 M, durante 40 minutos (Moldovan, N. y col., 1994).

Luego se decoloraron con etanol al 60% en tres pasos sucesivos: 1 hora, 2 horas y 12 horas. De esta forma se logra un contraste nítido del área cubierta de lesiones ateroscleróticas (color azul negruzco) del área sin alteraciones macroscópicas (color gris). Posteriormente se colocaron sobre placas de plástico traslúcidas, exponiéndose la cara luminal y se tomaron fotografías en blanco y negro. A partir de los negativos se realizaron diapositivas que, proyectadas luego sobre papel blanco traslúcido de consistencia homogénea, en una ampliación de 9-13 veces el tamaño original, pudieron ser colocadas con el mayor grado de fidelidad posible en cuanto a la reproducción de las áreas lesionadas.

Seguidamente se pesaron las plantillas completas en una balanza: se retocaron las áreas lesionadas, se pesaron y se estableció la proporción entre ambas, expresándose luego en términos de porcentaje del área lesionada.

3.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOQUINAS:

3.9.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

Los niveles de TNF se midieron por un bioensayo con la utilización de la línea celular WEHI 164 - clon 13 sensible a TNF, tratada con 1 µg/ml de actinomicina D (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO). El ensayo se realizó según el protocolo de Espevik, T. y Nissen-Meyer, J. (1986) con ciertas modificaciones (Meager y col., 1989). Cultivos semiconfluentes de las células WEHI 164 clon 13 mantenidas en RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (Flow Lab., Inc.), 1 mM L-glutamina (Gibco) y 50 U/ml penicilina/estreptomicina (Gibco), fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, conteniendo 0,05% EDTA (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO) con el fin de despegar las células, golpeando suavemente el frasco de cultivo contra la palma de la mano y posteriormente con pipeteo de 5 ml de medio de cultivo. Se resuspendieron en medio fresco y se sembraron en platos de 96 pozos (Falcon) a una concentración de $2 \cdot 10^4$ células/pozo y un volumen final de 100 µl/pozo.

Luego de 24 horas, el medio fue cambiado por medio fresco conteniendo actinomicina-D (1 µg/ml; Sigma Chemical Co). Al cabo de tres horas en cultivo, se retiró el medio con actinomicina-D y se colocaron las muestras diluidas en un

volumen final de 100 μ l/pozo de medio fresco, los platos fueron incubados durante 18 horas aproximadamente (5% CO₂, 37 °C). Luego de la evaluación en el microscopio invertido (Zeiss), se añadieron 25 μ l/pozo de una solución de MTS 2 mg/ml (Promega. Cell Titer 96 ®) en PMS 1 mg/ml (phenazine methosulfate) a una concentración de 20 mg/ml en una relación 20:1. Se incubó durante tres horas (5% CO₂, 37 °C) y, transcurrido el tiempo, los platos fueron leídos en un lector para microplacas (Bio-Tek instruments, modelo EL-312 e), a una longitud de onda de 490 nm.

El fundamento teórico de este método consiste en que el TNF produce daños irreversibles en las células que la conducen a su muerte. Las células vivas remanentes son detectadas por el metabolismo del MTS, el cual es reducido por estas células a formazán acuoso que se disuelve directamente en el medio de cultivo. La conversión de MTS en cristales de formazán está mediada por enzimas deshidrogenasas provenientes de la actividad metabólica celular. La cantidad de producto de formazán medida a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas remanentes.

Los resultados del ensayo fueron expresados en picogramos por ml (pg/ml) de TNF, definiendo una unidad como la cantidad de TNF que provoca la lisis del 50% de las células blanco. Cada ensayo incluyó un estándar de TNF-alfa recombinante humano (rhTNF-alfa, actividad específica de $4,03 \cdot 10^7$ U/mg.

Genentech, South San Francisco, CA) y un control positivo donde las células fueron sometidas a lisis con un agente químico, SDS (Sigma) al 0,5%, con la finalidad de provocar un 100% de muerte celular. Los controles negativos consisten en pozos en los cuales las células permanecen sin ningún tratamiento durante el ensayo. Dichos controles fueron incluidos en cada plato de cultivo.

Todos los procedimientos que requirieron condiciones de esterilidad fueron realizados en campana de flujo laminar.

3.9.2. INTERLEUQUINA-6 (IL-6)

Se determinó por un bioensayo con utilización de la línea celular B9 dependiente de IL-6 (Aarden, L.A. y col., 1987). Se sembraron 5000 cel/pozo en placas de cultivo de 96 pozos (Falcon) en un volumen de 50 μ l de medio de cultivo RPMI 1640 más 10% SFB, 1% Ab y 1%Gln sin el factor de crecimiento, se les añadieron 50 μ l de muestra y se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas. Después de la incubación se añadieron 25 μ l/pozo de una solución de MTS 2mg/ml (Promega. Cell Titer 96 ®) más PMS 1 mg/ml (phenazine methosulfate) a una concentración de 20 mg/ml en una relación 20:1. Se incubó durante 5 horas (5% CO₂, 37 °C) y, transcurrido el tiempo, los platos fueron leídos en un

lector para microplacas (Bio-Tek instruments, modelo EL-312 e), a una longitud de onda de 490 nm.

Cada ensayo incluyó un estándar de IL-6 recombinante humano (IL-6rh, con una actividad específica de 4×10^7 U/mg. Gemzyme) y un control positivo consistente de células en medio RPMI 1640 más 10% SFB, 1% Ab, 1%Gln y 1% sobrenadante rico en IL-6. Los controles negativos consisten en pozos en los cuales se incluyeron las células en medio de cultivo sin presencia de IL-6. Dichos controles fueron incluidos en cada plato de cultivo.

Todos los procedimientos que requirieron condiciones de esterilidad fueron realizados en campana de flujo laminar.

3.10. OBTENCIÓN DE MEDIO ENRIQUECIDO EN IL-6

Para la obtención de medio enriquecido en IL-6 necesario para el mantenimiento de la línea celular B9, se hicieron crecer las células de la línea P388 en frascos de 75 cm³ y luego se pasaron a frascos de 150 cm³ hasta formar una monocapa cerrada. Seguidamente se extrajo el medio de cultivo completo y se colocó RPMI solo. El cultivo se mantuvo en estas condiciones críticas por 5 días (hasta que las células se despegaran); se tomó el

sobrenadante y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se dividió en alícuotas y se congeló a -4°C .

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de la significancia estadística fue realizado por el método No Paramétrico de Mann-Whitney. Los resultados fueron expresados como la mediana de la muestra, incluyendo percentiles 10, 25, 75 y 90. En algunos casos los resultados aparecen expresados como la media \pm SE.

RESULTADOS

4.1 NIVELES DE COLESTEROL SÉRICO

En la figura 8 se muestran los niveles de colesterol sérico determinados, por el método antes descrito, a las 0, 2, 4 y 8 semanas de dieta experimental y previa a la administración local de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial a los dos grupos de conejos (CH y CN). Los datos se representan como la media \pm SEM en mg de colesterol/dl de suero.

Se puede observar el claro incremento de los niveles de colesterol sérico en los conejos alimentados con la dieta rica en colesterol (57.557 \pm 6.78, n=12; 516.181 \pm 83.06, n=11; 1468.857 \pm 82.29, n=7; 1148.988 \pm 76.70, n=9 mg/dl) a las 0, 2, 4 y 8 semanas de dieta experimental respectivamente, alcanzando valores máximos a las cuatro semanas (1468.857 \pm 82.29 mg/dl). Estos valores mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p\leq 0.0005$) con respecto a los obtenidos a partir de los CN (50.183 \pm 5.93, n=10; 74.25 \pm 12.18, n=8; 81.142 \pm 9.44, n=7; 90.311 \pm 13.14, n=7 mg/dl).

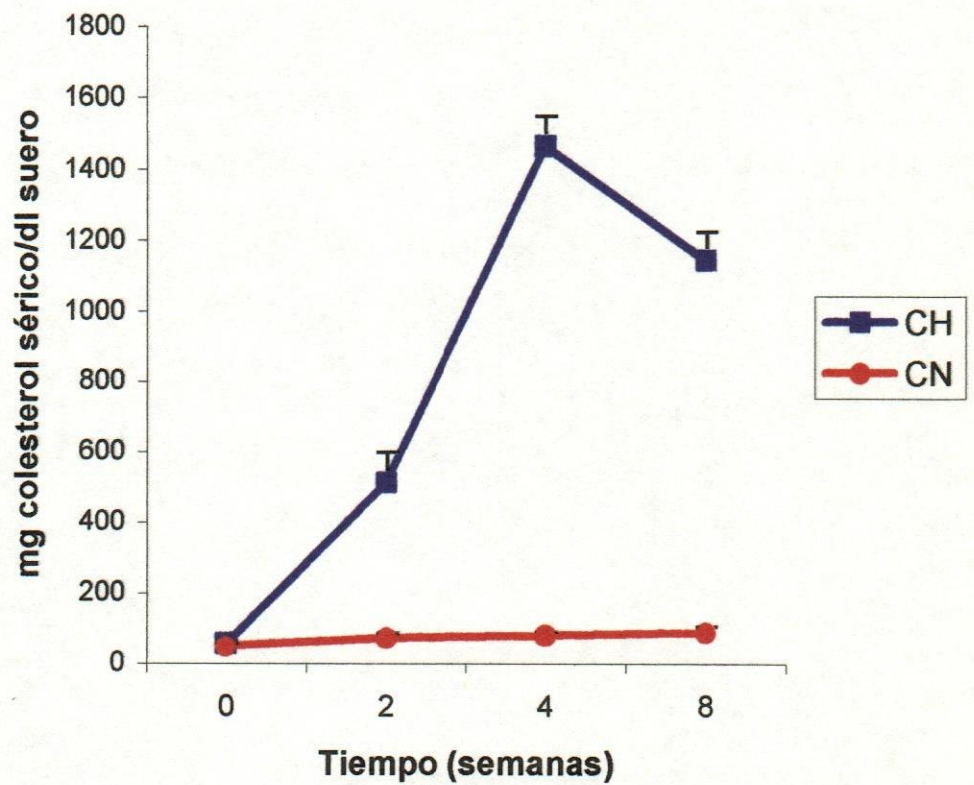


Figura 8. Incremento de los niveles de colesterol sérico a las 0, 2, 4 y 8 semanas de dieta experimental previa la administración local de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial. Se puede observar el claro incremento de los niveles de colesterol en los conejos alimentados con una dieta rica en 0.5% colesterol, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con respecto a los CN.

4.2. PORCENTAJE DE LESIONES ATEROMATOSAS

A las ocho semanas de dieta experimental, fueron extraídas las aortas torácicas de los CH y CN, determinándose el área de lesiones ateroscleróticas teñidas con Sudán Black, mediante el método de planimetría por pesada usando la tinción de, como se indica en protocolo de materiales y métodos. Los datos se representan como la media \pm SEM en %.

Se observó un alto porcentaje de áreas lesionadas en las aortas torácicas de los CH (67,74 \pm 2.91%, n=6) con respecto a los CN, los cuales no presentaron lesiones ateroscleróticas (0%, n=8) (Ver figura 9), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p=0.0003). Se observaron placas ateroscleróticas en las aortas torácicas de los CH a diferencia de los CN, quienes no presentaron lesiones. (Ver figura 10).

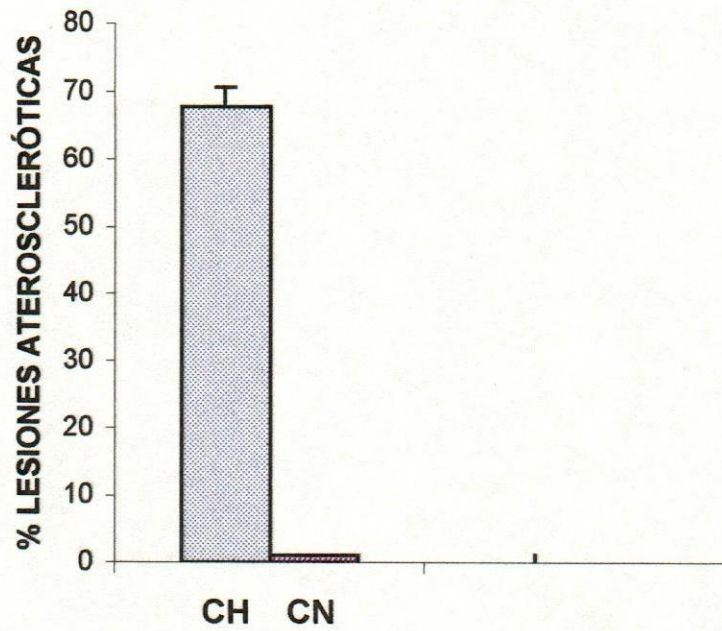
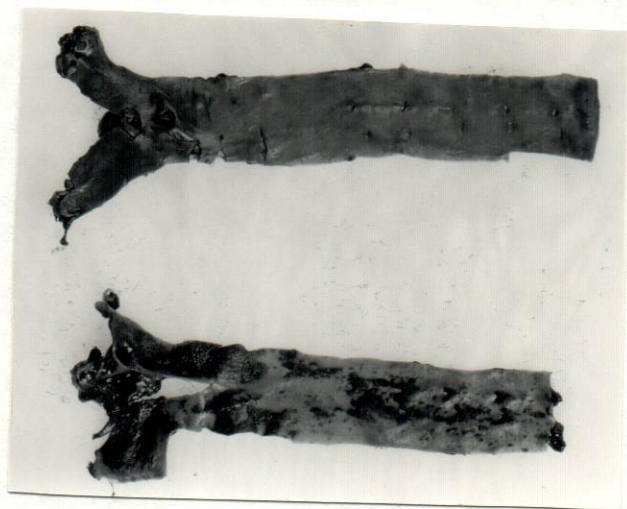


Figura 9. Porcentaje de lesiones ateroscleróticas en la aorta torácica de conejos hipercolesterolémicos y normales, después de 8 semanas de dieta experimental



CN

CH

Figura 10. Placas ateroscleróticas en la aorta torácica de un CH luego de su tinción con Sudán Black. Nótese la afectación casi total de su cayao aórtico y el gran número de placas ateromatosas a lo largo de su aorta descendente, en comparación con la del CN que no presenta ninguna lesión.

4.3. PRESENCIA DE CÉLULAS BLANCAS TOTALES EN EL LÍQUIDO SINOVIAL

En la figura 11 se representa el número de células blancas totales en el líquido sinovial de los CH y CN determinados a los 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas después de la administración local de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial. Los datos se representan como la media $\times 10^5 \pm \text{SEM}$ cel/ml.

Se puede observar que a los 30 minutos de la inyección de LPS en el sinovio el número de CBT es de 0.375 ± 0.12 , $n=4$ y 0.285 ± 0.18 , $n=7$ cel/ml para CH y CN respectivamente, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.64$). A las 2 horas tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.93$), siendo el número de células infiltradas de 0.50 ± 0.38 , $n=4$ y 0.75 ± 0.61 , $n=8$ cel/ml. A las 6 horas de la inyección de LPS local se observó un incremento considerable del número de células infiltradas, 30.44 ± 12.32 , $n=9$ y 16.80 ± 5.00 , $n=12$ cel/ml para CH y CN respectivamente. A pesar del incremento de CBT no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.33$). A las 24 horas, el número de CBT para CH y CN es de 1.70 ± 1.57 , $n=5$ y 4.81 ± 1.92 , $n=8$ cel/ml respectivamente.

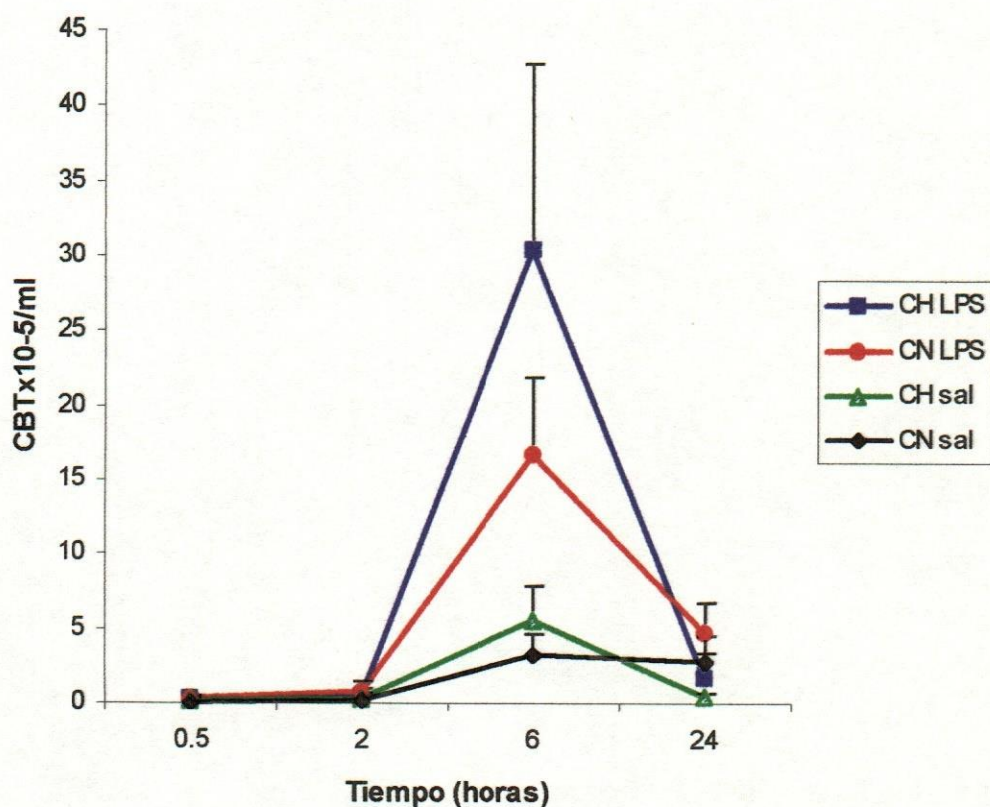


Figura 11. Número de células blancas totales a las 0.5, 2, 6 y 24 horas después de la inyección de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial. Se puede observar el claro incremento de CBT a las 6 horas en los conejos alimentados con una dieta rica en 0.5% colesterol, siendo estas diferencias estadísticamente no significativas con respecto a los CN. Además se puede observa bajos niveles de CBT en los grupos controles (CH y CN salina).

El número de leucocitos para los grupos controles (inyectados con 500 μ l de solución salina al 0,89%) a los diferentes tiempos fue de 0.125 ± 0.125 , n=4; 0.375 ± 0.239 , n=4; 5.611 ± 2.146 , n=9; 0.40 ± 0.29 , n=5 cel/ml para CH y 0, n=7; 0.142 ± 0.142 , n=7; 3.23 ± 1.36 , n=13; 2.66 ± 1.81 , n=8 cel/ml para CN; siendo estas diferencias estadísticamente no significativas entre los dos grupos ($p \geq 0.05$).

4.4. NIVELES DE TNF INDUCIDO POR LPS EN LÍQUIDO SINOVIAL

En la figura 12 se muestran los niveles de TNF en el líquido sinovial de los CH y CN luego de ser inyectados con 10 ng de LPS, el cual se administró como un bolo único de un volumen de 0.5 ml, en la cavidad sinovial, tomándose luego las muestras de líquido sinovial a los 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas. Los datos se representan como la media \pm SE en pg/ml.

Se puede observar (Figura 12) que al administrarse LPS en la cavidad sinovial de los CH, éstos producen niveles más altos de TNF en referencia a los CN. A los 30 min, después de la inyección local de LPS, los niveles de TNF de los CH y CN son de 4.436 ± 1.84 , n=6 y 0.387 ± 0.38 , n=4 pg/ml respectivamente. A las 2 horas, los niveles de TNF en los CH son de 109.551 ± 54.0 , n=3 pg/ml y en los CN de 1.688 ± 1.57 , n=5 pg/ml, encontrándose diferencias

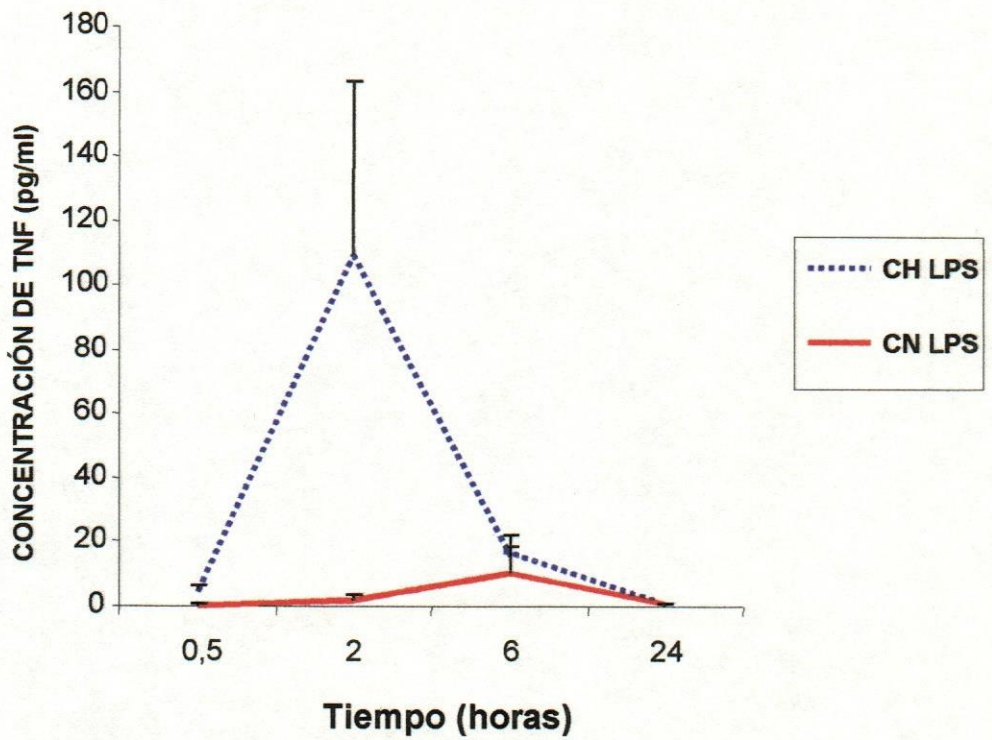


Figura 12. Niveles de TNF a las 0,5, 2, 6 y 24 horas después de la inyección de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial. Se puede observar el claro incremento de TNF a las 2 horas en los conejos alimentados con una dieta rica en 0,5% colesterol, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con respecto a los CN.

estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.03$). A las 6 horas, 15.609 ± 6.70 , $n=6$ y 10.163 ± 8.50 , $n=3$ pg/ml para CH y CN respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.27$). A las 24 horas tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0.27$), siendo los niveles de TNF en los CH de 0.420 ± 0.42 , $n=5$ pg/ml y en los CN de 0.541 ± 0.33 , $n=8$ pg/ml.

En la Figura 13 se puede observar que los niveles críticos de TNF en los CH se encuentran a las 2 horas, después de la administración de 10 ng de LPS local (109.551 ± 54.0 pg/ml). Los datos se representan como la mediana en pg/ml.

En la Tabla I se muestran los valores de TNF de los grupos controles (inyectados con 500 μ l de solución salina al 0,89%). Los valores de TNF que se observan en estos animales, posiblemente se debieron a que la solución salina estaba contaminada. Sin embargo estos valores no llegan a ser significativos respecto a los observados en los animales inyectados con LPS.

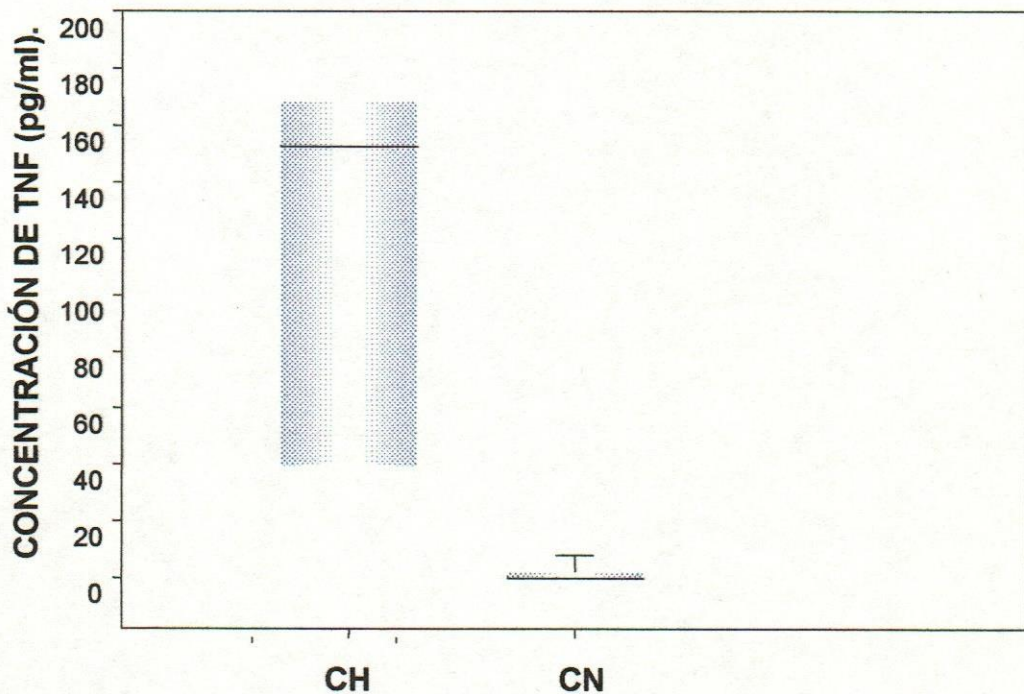


Figura 13. Niveles de TNF a las 2 horas después de la inyección de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial. Se puede observar el claro incremento de TNF en los conejos alimentados con una dieta rica en 0.5% colesterol, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con respecto a los CN. La línea dentro de la caja indica el valor de la mediana, los bordes de la caja señalan los percentiles 25 y 75 y los bigotes por encima y por debajo de la caja indican los percentiles 10 y 90.

TABLA I

NIVELES DE TNF INDUCIDO POR LPS EN LÍQUIDO SINOVIAL

Tiempo (horas)	CH salina	CN salina
0,5	0.622±0.62, n=4	2.814±9.32, n=4
2	0, n=4	0.33±0.33, n=8
6	32.12±22.48, n=4	1.265±0.77, n=3
24	0.306±0.30, n=4	1.878±0.83, n=8

4.5. NIVELES DE IL-6 INDUCIDO POR LPS EN LÍQUIDO SINOVIAL

En la figura 14 se muestran los niveles de IL-6 en el líquido sinovial de los CH y CN luego de ser inyectados con 10 ng de LPS en la cavidad sinovial, tomándose luego las muestras a las 24 horas. Los datos se representan como el valor de la mediana en pg/ml, utilizando un n=3 para CH y n=7 para CN.

Se puede observar (Figura 14) que a las 24h los niveles de IL-6 en los CH y CN son de 7 ± 1.64 pg/ml y 0.45 ± 0.73 pg/ml respectivamente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.03$)

También se puede observar que los valores de IL-6 de los grupos controles (inyectados con 500 μ l de solución salina al 0,89%), 0.322 ± 0.30 y 0.393 ± 0.29 para CH y CN respectivamente, no fueron significativos respecto a los observados en los animales inyectados con LPS

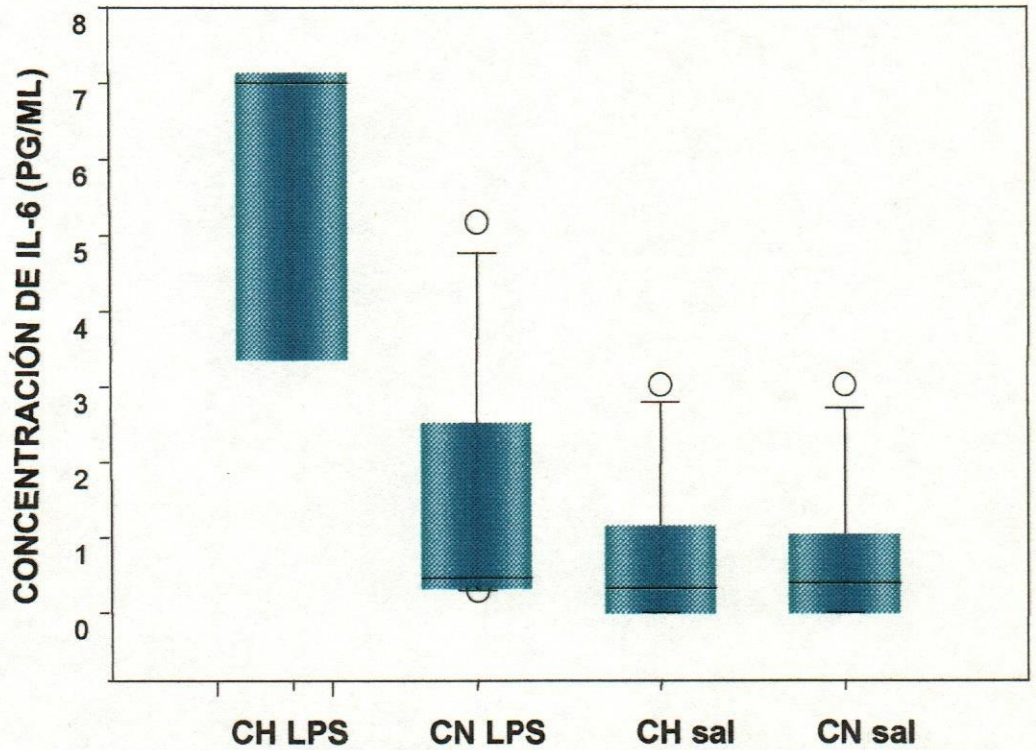


Figura 14. Niveles de IL-6 a las 24 horas después de la inyección local de 10 ng de LPS en la cavidad sinovial. Se puede observar un marcado incremento de IL-6 en los conejos alimentados con una dieta rica en 0.5% colesterol, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con respecto a los CN. También se pueden observar los niveles de TNF en los CH y CN controles (inyectados con 500 μ l de solución salina al 0,89%).

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que en condiciones experimentales de hipercolesterolemia se suscita un incremento en la susceptibilidad a infecciones (Brito y col. 1995) pudiendo así aumentar el índice de mortalidad en animales experimentales.

5.1. NIVELES DE COLESTEROL SÉRICO Y PORCENTAJE DE LESIONES ATEROMATOSAS

La ingesta de colesterol conlleva a un incremento de los niveles del mismo en el plasma sanguíneo (Camejo y col. 1971). Es por ello que, partiendo de valores diferenciales estadísticamente no significativos ($p = 0.3833$), una vez iniciada la dieta hipercolesterolémica, los niveles de colesterol en los CH llegan a un valor máximo a las 4 semanas ($1468,857 \pm 82.29$ mg colesterol sérico/dl suero); siendo considerados los valores normales de 20 a 100 mg colesterol sérico/ dl suero (Prior y col. 1961). A partir de las 4 semanas se mantienen los niveles de colesterol con ligeras fluctuaciones. Diferentes reportes señalan que esto depende de la infiltración del colesterol a los tejidos y órganos, esto como mecanismo complementario para mantener los niveles estables en sangre.

Este "cuadro hipercolesterolémico" provoca alteraciones fisiológicas en los órganos que incorporen exceso de colesterol. Es por esto, que el tiempo seleccionado para trabajar a los animales fue 8 semanas después de comenzada la dieta; ya que durante este tiempo sólo se observa infiltración de colesterol hacia los tejidos sin que se observe daño permanente en los diferentes órganos (Prior y col., 1961).

Liao y col, 1993, han descrito que dietas ricas en colesterol inducen niveles considerablemente mayores en ciertos tejidos tales como hígado y arterias. Hemos observado en la aorta de los CH la presencia de un alto porcentaje de lesiones ateromatosas (67.74%), evidenciándose la deposición de lípidos luego de teñir con el colorante Sudán Black, en comparación con los CN (0%), notándose un mayor índice de lesiones en áreas de bifurcación o reflujo en la arteria aorta torácica, específicamente a nivel del cayao aórtico.

Estos resultados constatan que las alteraciones químicas y físico-químicas en el metabolismo de los lípidos séricos son agentes causales de la patogénesis de la aterosclerosis.

5.2. PRESENCIA DE CÉLULAS BLANCAS TOTALES EN EL LÍQUIDO SINOVIAL

Estudios previos han demostrado que la inyección local de 10 ng. de LPS extraído de E.coli en la cavidad sinovial de animales experimentales induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la migración de células al sinovio (Brito y col, 1995; Matsukawa y col, 1997). Es por ello que para este estudio se utilizó la misma cantidad de LPS para la inducción de la artritis experimental.

Resultados obtenidos hasta el momento indican que la inyección local de LPS en la articulación sinovial de animales experimentales provoca la migración de células del sistema inmune, iniciando así el proceso inflamatorio (Brito y col. 1995). Esta migración responde a la interacción de citoquinas que afectan el desenvolvimiento de la patogénesis de las respuestas inflamatorias. Se ha demostrado que los macrófagos tienen receptores importantes de LPS, el cual estimula la síntesis y secreción de citoquinas inmunitarias importantes tales como IL-1 y $TNF\alpha$ (Henderson y Wilson, 1995; Dinerello, 1992). Estas citoquinas inducen la liberación de factores quimiotácticos que inducen la infiltración leucocitaria hacia los tejidos.

Investigaciones sobre artritis experimental inducida por LPS señalan que las concentraciones basales de $TNF\alpha$ y la IL-8 en fluido sinovial son similares

tanto en conejos normales como en conejos estimulados con dicha endotoxina, sugiriendo así que la fuente de $\text{TNF}\alpha$ e IL-8 son células residentes de la cavidad sinovial (Matsukawa y col, 1997). En los modelo de artritis (inducida por colágeno, por adyuvantes o por endotoxina), estas dos citoquinas parecen ser producidas independientemente, por ejemplo, la producción *in vitro* de IL-8 a consecuencia de la estimulación de LPS está mediado por la estimulación tanto directa como indirecta del $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 (Cassatella y col, 1993).

Como pudimos observar en la figura 11, a las 6 horas de la inyección local de LPS se observó en todos los grupos la tendencia a un incremento en el número de células en la cavidad sinovial evidenciándose un mayor número de células blancas totales en los conejos hipercolesterolémicos. Siendo interesante para futuros estudios el análisis inmunohistoquímico de la cavidad sinovial en condiciones de hipercolesterolemia, ya que hasta ahora no existen reportes al respecto. En nuestros resultados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por lo que este fenómeno pareció ser independiente de la alteración que ocurre en el endotelio de los vasos en CH como causa de la formación de las placas ateromatosas, la cual se ha descrito que provoca un incremento en la permeabilidad vascular a macromoléculas e incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, entre otras consecuencias (Strohchneider y Betz, 1989).

5.3. NIVELES DE TNF INDUCIDO POR LPS EN EL LÍQUIDO SINOVIAL

El TNF- α es la primera citoquina en la cascada de citoquinas proinflamatorias (Matsukawa y col. 1997), es por ello Beutler y col (1985) consideraron por primera vez que el TNF- α es un mediador del daño inducido por endotoxina, jugando un papel importante en la patogénesis de la inflamación crónica en enfermedades articulares (Maini y col, 1993).

En este estudio se demostró que la inyección local de 10 ng de LPS extraído de la cepa 0127:B8 de E. coli en animales experimentales induce la secreción de TNF y la cantidad del mismo depende de los niveles plasmáticos de colesterol, así encontramos que a las 2 horas los CH secretan mayores niveles de TNF (4.436 ± 1.84) con respecto a los CN (1.688 ± 1.57). Los niveles máximos de TNF en el fluido sinovial de CH se alcanzan mucho más rápido en este tiempo, mientras que en los CN se alcanzan a las 6 horas. Estos resultados sugieren que la respuesta inmunitaria de los CH se desarrolla más rápidamente y de forma exagerada, dándole así soporte a la hipótesis de que la homeostasis de las citoquinas determina el curso de la respuesta inflamatoria (Engelberts y col. 1993).

Se ha reportado que el TNF- α producido localmente puede estimular efectivamente diferentes tipos de células, incluyendo macrófagos, trayendo

como consecuencia la activación de la cascada de citoquinas pro-inflamatorias de manera amplificada por las células estimuladas, explicándose así el potente efecto pro-inflamatorio del TNF- α en la articulación con artritis (Mussener y col, 1995; Tetta C, 1990).

Por otra parte, se ha descrito la activación del factor de transcripción NF- κ B el cual se conoce como uno de los reguladores en la expresión del gen que codifica el TNF α durante la hipercolesterolemia (Liao y col. 1993). Se ha reportado que en condiciones de inflamación crónica los niveles de proteínas de fase aguda se encuentran incrementados con respecto a los controles, esto indica que existe un cierto grado de actividad inflamatoria permanente. Es por ello que la expresión de genes cuyo producto forma parte de la "respuesta inflamatoria" y "stress" oxidativo podrían explicar el por qué se produce un incremento en los niveles de TNF en los CH. Sin embargo se ha observado un incremento de los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda en conejos hipercolesterolémicos lo que le atribuye en gran parte la susceptibilidad a infecciones en estos animales experimentales.

5.4. NIVELES DE IL-6 INDUCIDO POR LPS EN EL LÍQUIDO SINOVIAL

La IL-6 juega un papel central en la defensa del organismo; puede inducir e inhibir el crecimiento celular y estimular actividades de diferenciación, dependiendo de la célula sobre la cual actúe. Por otra parte, ha sido implicada en la patología de muchas enfermedades incluyendo artritis reumatoide (Shizuo y col., 1993), en donde niveles elevados de IL-6 pueden ser detectados en el fluido sinovial de articulaciones afectadas y suero de pacientes con artritis activa (Hirano y col, 1988; Houssiau y col, 1988; Bhardwaj y col, 1989; Guerne y col, 1989).

Debido a que resultados preliminares muestran que los niveles de IL-6 aumentan en 7,2 veces en CH con respecto a los CN, luego de 26 horas de inyección local de LPS (Brito y col. 1995), se decidió estudiar las diferencias entre concentraciones de IL-6 a las 24 horas. Se encontró que los niveles de IL-6 en los CH se incrementaron de manera significativa ($7,0 \pm 1.64$ pg/ml) con respecto a los conejos normales (0.45 ± 0.73 pg/ml) para una $p = 0.03$.

Nuestros resultados muestran que en conejos hipercolesterolémicos existe un marcado incremento de los niveles de IL-6 en el fluido sinovial, inducido por la inyección local de 10 ng de LPS, en comparación con los conejos normales. Apoyando también la hipótesis de que la hipercolesterolemia

y el consecuente desarrollo de aterosclerosis, provocan un incremento exagerado de la respuesta inflamatoria.

Diferentes trabajos han reportado que la IL-6 suprime la producción de TNF inducido por endotoxinas (Aderka y col, 1989; Schindler y col, 1990), lo cual se evidencia en el presente trabajo al determinar las concentraciones de TNF e IL-6 a las 24 horas después de la inyección local de LPS en los CH y CN, donde se observan niveles críticos de IL-6, pero una clara disminución de los niveles de TNF.

Como la artritis en el humano es una enfermedad incapacitante, ha sido significativo el estudio del proceso de dicha enfermedad durante estados de hipercolesterolemia, encontrándose que, además de que un individuo con niveles altos de colesterol circulante en la sangre desarrolla un proceso inflamatorio exagerado (Brito y col., 1995), la hipercolesterolemia influye en el desarrollo de un proceso inflamatorio local que hay que tomar en cuenta en pacientes que desarrollen artritis.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

1. Los conejos sometidos a dieta rica en 0.5% colesterol presentan niveles séricos de colesterol estadísticamente más altos que los conejos normales, siendo la tasa de incremento en colesterol más pronunciada a las 4 semanas de dieta (1468.857 ± 82.29 mg/dl).
2. La cantidad de colesterol plasmático influye en la aparición de lesiones ateromatosas.
3. La inyección local de 10 ng de LPS E.coli 0127:B8 en la cavidad sinovial provoca la migración de leucocitos inflamatorios al sinovio.
4. Los conejos hipercolesterolémicos presentan un incremento considerable de la respuesta inflamatoria, con una migración celular de 64% mayor respecto a los conejos normales.

5. Los niveles de TNF en los conejos hipercolesterolémicos, después de la administración de LPS en la cavidad sinovial, son estadísticamente más altos que en los conejos normales en un 98%.

6. Los niveles de IL-6 en los conejos hipercolesterolémicos, después de la administración de LPS en la cavidad sinovial, son estadísticamente más elevadas que en los conejos normales en un 94%.

7. La cantidad de colesterol plasmático influye en el desarrollo de un proceso inflamatorio local inducido por LPS en la cavidad sinovial incrementado en comparación con los conejos normocolesterolémicos.

BIBLIOGRAFÍA

- AARDEN L, DE GOOT E, SCHAAP O, LANSDOR P. **Production of an hybridoma growth factor by human monocytes.** Eur J. Immunol. 1987; 17: 1411-1416.
- ADERKA D, LE JM, VILCEK J. **IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice.** J Immunol. 1989; 143:3517-23.
- ALSALAMEH, S.; WINTER, K.; AL-WARD, R.; WENDLER, J.; KALDEN, J.; KINNE, R. **Distribution of TNF- α , TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF- α is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers.** Scand.J.Immunol. 1999, 49: 278-285.
- ALVING CR, WASSEF NM. **Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism.** Immunol Today. 1999 Aug;20(8):362-6.

BADIMON JJ, GALLO R, BADIMON L, CHESEBRO J, FUSTER V, **Ruptura de la placa aterosclerótica, trombosis y la enfermedad coronaria.** *Atherosclerosis.* 1996; 17-40.

BAEUERLE PA, HEUKEL T. **Funtion and activation of NF-kB in the immune system.** *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:141-79.

BAUMANN M, BAUMANN H, FEY GH. **Molecular cloning, characterization and functional expression of the rat liver interleukin 6 receptor.** *J Biol Chem.* 1990; 265:19853-62.

BAZAN JF. **Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:6934-8.

BEUTLER B, CERAMI A. **The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response.** *Ann. Rev. Immunol.* 1989; 7:625.

BEUTLER B, CERAMI A. **Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator.** *Ann.Rev.Biochem.* 1988, 57: 505-518.

BEUTLER B, CERAMI A. **Cachetin and tumor necrosis factor as two**

sides of the same biological coin. Nature. 1986, 320: 584.

BEUTLER BA, MILSARK IW, CERAMI A. **Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo.** J Immunol. 1985;135(6):3972-7.

BERLINER JA, TERRITO MC, SEVANIAN A, RAMIN S, KIM JA, BAMSHAD B, ESTERSON M, FOGELMAN AM. **Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions.** J Clin Invest. 1990;85(4):1260-6.

BHARDWAJ N, SANTHANAM U, LAU LL, TATTER SB, GHAYEB J, RIVELIS M, STEINMAN RM, SEHGAL PB, MAY L. **IL-6/IFN-beta 2 in synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. Identification of several isoforms and studies of cellular sources.** J Immunol. 1989 Oct 1;143(7):2153-9.

BIRMINGHAM DJ. **Erythrocyte complement receptors.** Crit Rev Immunol. 1995;15:133-54.

BOWMAN RE, WOLF RC. **A rapid and especific ultramicromethod for total serum cholesterol.** Clin.Chem. 1962; 8:302-309.

BRAKENHOFF JP, DE HON FD, FONTAINE V, TEN BOEKEL E, SCHOOLTINK H, ROSE-JOHN S, HEINRICH PC, CONTENT J, AARDEN LA. **Development of a human interleukin-6 receptor antagonist.** J Biol Chem. 1994; 269:86-93.

BRITO B, ROMANO E. **Alteraciones en la capacidad de migración de leucocitos en la producción de TNF e IL-6 en artritis experimental en conejos hipercolesterolémicos.** Acta Científica Venezolana. 1995; 46: 105-106. XLV Convención Anual AsoVAC.

BROCKHAUS, M.; SCHOENFELD, H.; SCHLAEGER, E.; HUNZIKER, W; LESSLAUER, W.; LOETSCHER, H. **Identification of two types of Tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies.** Proc.Natl.Acad.Sci. 1990, 87: 3127-31.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.** Science. 1986;232:34-47.

CAMEJO G, CARDONA R. **Lipoproteínas y Aterosclerosis.** Atherosclerosis. 1989; 63-74.

- CAMEJO, G., BOSH, V., ARREAZA, C., HALINA, C., MÉNDEZ, C. **Early Changes in plasma lipoprotein structure and biosynthesis in cholesterol-fed rabbits.** J. Lipid. Res. 1971 14:61.
- CARSWELL EA, OLD L.J, KASSEL RL., GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. **A endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophages).** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975; 72:3666.
- CHABY R, GIRARD R. **Interaction of lipopolysaccharides with cells of immunological interest.** Eur Cytokine Netw. 1993 Nov-Dec;4(6):399-414.
- CHEN T-Y, LEI M-G, SUZUKI T, MORRISON DC. **Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1992; 181:169.
- CHEUNG D L, HART P H, VITTI GF, WHITTY GA, HAMILTON J A. **Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes.** Immunology. 1990; 71:70-5.

COLOME C, BADIMON L. **Efecto de la hipercolesterolemia en la expresión de mediadores de la inflamación.** Invest. Cardiovascular 1999; 2: 144-160.

COLOTTA F, SIRONI M, BORRE A, LUINI W, MADDALENA F, MANTOVANI A. **Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells.** Cytokine. 1992;4:24-8

COOPER, W.; FAVA, R.; GATES, C.; CREMER, M.; TOWNES, A. **Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumor necrosis factor or transforming growth factor-beta.** Clin.Exp.Immunol. 1992, 89: 244-50.

DAI L, LAMB DJ, LEAKE DS, KUS ML, JONES HW, MORRIS CJ, WINYARD PG. Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. Free Radic Res. 2000;32:479-486.

DANIEL R, CHUNG SW, WONG PM. **Isoform specific c-Abl functions: Type I Permissive for differentiation and tipo IV is inhibitory to apoptosis.** Cell Growth Differ. 1996; 7:1141-8.

DAVIES MJ, WOOLF N. **Atherosclerosis: what is it and why does it occur?**

Br Heart J. 1993 Jan;69:S3-11.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.; GIFFORD, G. **Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages.** J Immunol. 1987, 138(3): 957-62.

DEMBIC, Z.; LOETSCHER, M.; GUBLER, U. **Two human TNF receptors have Similar extracellular, but distinct intracellular domain sequences.** Cytokine. 1990, 2: 231-37.

DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, DE VRIES JE. **Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** J Exp Med. 1991; 174:1209-20.

DINARELLO CA. **The role of interleukin-1 in host responses to infectious diseases.** Infect Agents Dis. 1992 Oct;1(5):227-36.

DINARELLO CA. **The role of the interleukin-1-receptor antagonist in Blocking inflammation mediated by interleukin-1.** N Engl J Med. 2000 Sep 7;343(10):732-4.

- DISTLER O, MULLER-LADNER U, SCHOLMERICH J, GAY RE, GAY S.
Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects. Med Klin.
1999 Dec 15;94(12):673-80.
- ECK, M.; SPRANG, S. **The structure of tumor necrosis factor- α at 2,6 Å resolution: implication for receptor binding.** J.Biol.Chem. 1989, 264:
17595.
- EHLERS M, GROTZINGER J, DEHON FD, MULLBERG J, BRAKENHOFF JP,
LIU J, WOLLMER A, ROSE-JOHN S. **Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction.** J Immunol. 1994; 153:1744-53.
- ELLIOTT, M.; MAINI, R.; FELDMANN, M. **Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α .** Arthritis Rheum. 1993, 36:1681-90.
- ENGELBERTS I, SUNDRAM K, VAN HOUWELINGEN AC, HORNSTRA G,
KESTER AD, CESKA M, FRANCO GJ, VAN DER LINDEN CJ,
BUURMAN WA. **The effect of replacement of dietary fat by palm oil on in vitro cytokine release.** Br J Nutr. 1993;69:159-67.

ESPEVIK T, NISSEN-MEYER J. **A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes.** J. Immunol. Methods. 1986; 95: 99-105.

FALK E, SHAH PK, FUSTER V. **Coronary plaque disruption.** Circulation. 1999; 92:657-71.

FIERS, W. **Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level.** FEBS. 1991; 285: 199.

FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, O'GARRA A. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** J Immunol. 1991; 147:3815-22.

FIRESTEIN GS, ALVARO-GRACIA JM, MAKI R, ALVARO-GARCIA JM **Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis.** J Immunol. 1990; 144:3347-53.

FUSTER V, BADIMON L, BADIMON JJ, CHESEBRO JH. **The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes.** N Engl J Med. 1992; 326:310-318.

GIBBONS R, MARTINEZ O, MATLI M, HEINZEL F, BERNSTEIN M, WARREN R. **Recombinant IL-4 inhibits IL-6 synthesis by adherent peripheral blood cells in vitro.** Lymphokine Res. 1990; 9:283-93.

GLAUSER MP, HEUMANN D, BAUMGARTNER JD, COHEN J. **Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update.** Clin Infect Dis. 1994 Feb;18 Suppl 2:S205-16.

GOEDDEL D, AGGAARWAL B, GRAY P, LEUNG D, NEDWIN G, PALLADINO M, PATTON J, PENNICA D, SHEPARD H, SUGARMAN B, WONG G. **Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities.** Cold. Spring Harbor Symp Quant. Biol. 1986, 51: 597-609.

GOLDRING MB. **The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models.** Connect Tissue Res. 1999;40:1-11.

GRAY P, BARRETT K, CHANTRY D, TURNER M, FELDMANN M. **Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein.** Proc.Natl.

Acad.Sci. 1990, 87: 7380-84.

GRELL M, DOUNI E, WAJANT H. **The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kD tumor necrosis factor receptor.** Cell. 1995, 83: 793-802.

GRELL M, ZIMMERMANN G, HULSER D, PFIZENMAIER K, SCHEURICH, P. **TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways.** J.Immunol. 1994; 153: 1963-72.

GRELL M, SCHEURICH P, MEAGER A, PFIZENMAIER K. **TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytotoxicity.** Lymphokine Cytokine Res. 1993, 12: 143-48.

GUERNE PA, ZURAW BL, VAUGHAN JH, CARSON DA, LOTZ M. **Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis.** J Clin Invest. 1989; 83:585-92.

GUYTON JR, KLEMP KF. **Development of the atherosclerotic core region. Chemical and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta.** Arterioscler Thromb. 1994;14:1305-14.

HAILMAN E, LICHENSTEIN HS, WURFEL MM, MILLER DS, JOHNSON DA,
KELLEY M, BUSSE LA, ZUKOWSKI MM, WRIGHT SD.
**Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of
LPS to CD14.** J Exp Med. 1994 Jan 1;179(1):269-77.

HANSSON GK. **Immune and inflammatory mechanisms of monocyte
recruitment and accumulation.** Br. Heart J. 1993. 69: 9-529.

HELFGOTT DC, MAY LT, STHOEGER Z, TAMMI I, SEHGAL PB.
**Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and
secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts.** J Exp Med.
1987; 166:1300-9.

HENDERSON B, WILSON M. **Modulins: a new class of cytokine-inducing,
pro-inflammatory bacterial virulence factor.** Inflamm Res.
1995;44:187-97.

HERMANN E, FLEISCHER B, MAYET WJ, PORALLA T, MEYER
ZUM BUSCHENFELDE KH. **Correlation of synovial fluid
interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with
inflammatory joint disease and osteoarthritis.** Clin Exp Rheumatol.
1989;7:411-4.

HIBI M, MURAKAMI M, SAITO M, HIRANO T, TAGA T, KISHIMOTO
T. **Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer,
gp130.** Cell. 1990; 63:1149-57.

HIRANO T, MATSUDA T, TURNER M, MIYASAKA N, BUCHAN G, TANG
B, SATO K, SHIMIZU M, MAINI R, FELDMANN M.
**Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in
rheumatoid arthritis.** Eur J Immunol. 1988; 18:1797-801.

HIRANO T, MATSUDA T, NAKAJIMA K. **Signal transduction through
gp130 that is shared among the receptors for the
interleukin 6 related cytokine subfamily.** Stem Cells. 1994; 12:262-
77.

HOSHINO K, TAKEUCHI O, KAFF T. **Cutting edge: Toll-like receptor 4**

(TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol. 1999; 162:3749-52.

HOUSSIAU FA, DEVOGELAER JP, VAN DAMME J, DE DEUXCHAISNES CN, VAN SNICK J. **Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** Arthritis Rheum. 1988;31:784-8.

HOWELLS G, PHAM P, TAYLOR D, FOXWELL B, FELDMANN M. **Interleukin 4 Induces interleukin 6 production by endothelial cells: synergy with interferon-gamma.** Eur J Immunol. 1991;21:97-101.

IDOGAWA H, IMAMURA A, MATSUO K, YOSHITAKE K, UMEMURA T, OHASHI M. **A monoarthritis model in rabbits induced by repeated intra-articular injections of lipopolysaccharide.** Int J Exp Pathol. 1998 Apr;79(2):93-104.

ISNER JM, KEARNEY M, BORTMAN S, PASSERI J. **Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis.** Circulation. 1995;91:2703-11.

JAMES MJ, VAN REYK D, RYE KA, DEAN RT, CLELAND LG, BARTER PJ, JESSUP W. **Low density lipoprotein of synovial fluid in Inflammatory joint disease is mildly oxidized.** *Lipids.* 1998 Nov;33(11):1115-21.

JOHNSON-TIDEY RR, MCGREGOR JL, TAYLOR PR, POSTON RN. **Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1.** *Am J Pathol.* 1994 May;144(5):952-61.

KIMURA S, TAMAMURA T, NAKAGAWA I, KOGA T, FUJIWARA T, HAMADA S. **CD14-dependent and independent pathways in lipopolysaccharide-induced activation of a murine B-cell line, CH12. LX.** *Scand J Immunol.* 2000 Apr;51(4):392-9.

KISHIMOTO T, AKIRA S, TAGA T. **Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines.** *Science.* 1992; 258:593-7.

KIRSCHNING CJ, WESCHE H, AYRES TM, TOTTIE M. **Human Toll-like receptor-2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide.** *J Exp Med.* 1998; 188:2091-7.

KOHASE M, HENRIKSEN-DESTEFANO D, MAY LT, VILCEK J, SEHGAL PB. Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. Cell. 1986; 45:659-66.

LEE JD, SWISHER SG, MINEHART EH, MCBRIDE WH, ECONOMOU JS. Interleukin-4 downregulates interleukin-6 production in human peripheral blood mononuclear cells. J Leukoc Biol. 1990; 47:475-9.

LEEUWENBERG JF, VON ASMUTH EJ, JEUNHOMME TM, BUURMAN WA. IFN-gamma regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. Immunol. 1990; 145:2110-4.

LEUTZ A, DAMM K, STERNECK E, KOWENZ E, NESS S, FRANK R, GAUSEPOHL H, PAN YC, SMART J, HAYMAN M, Molecular cloning of the chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) reveals relationship to interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor. EMBO J. 1989; 8:175-81.

LEWIS, M.; TARTAGLIA, L.; LEE, A. Cloning and expression of cDNAs for

two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. Proc.Natl.Acad.Sci. 1991, 88: 2830-34.

LI Q, DANIEL R, CHUNG SW. **Involment of c-Abl tyrosine kinase in lipopolysaccharide induced macrophage activation.** J Immunol. 1998; 160:3330-6.

LIAO F, ANDALIBI A, DEBEER FC, FOGELMAN AM, LUSIS AJ. **Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B-like transcription factor activation response to an atherogenic diet in mice.** J. Clin. Inves. 1993; 91: 2572.

LIUZZO G, BIASUCCI LM, GALLIMORE JR, GRILLO RL, REBUZZI AG, PEPYS MB, MASERI A. **The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina.** N Engl J Med. 1994;331:417-24.

LYNN WA, GOLENBOCK DT. **Lipopolysaccharide antagonists.** Immunol Today. 1992 Jul;13(7):271-6.

MAINI, R.; BRENNAN, F.; WILLIAMS, R. **TNF- α in rheumatoid arthritis and Prospects of anti-TNF therapy.** Clin.Exp.Rheumatol. 1993, 88: 173-

175.

MARINO, M.; DUNN, A.; GRARL, D.; INGLESE, M.; NOGUCHI, Y.; RICHARDS, L.; JUNGBLOTH, A.; WADA, H.; MOORE, M.; WILLIAMSON, B.; BASU, U.; OLD, L. **Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice.** Proc.Natl.Acad.Sci. 1997: 94; 8093.

MARTIN, T.R., MATHISON, J.C., TOBIAS, P.S., LETURCQ, D.J., MORIARTY AM, MAUNDER RJ, ULEVITCH RJ. **Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide: Implications for cytokine production in normal and injured lung.** J. Clin. Invest. 1992; 90:2209.

MATHISON JC, WOLFSON E, ULEVITCH RJ. **Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits.** J. Clin. Invest. 1988; 81:1925.

MATSUKAWA A, OHKAWARA S, MAEDA T, TAKAGI K, YOSHINAGA M. **Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits.** Clin Exp Immunol. 1993; 93:206-11.

MAY LT, GHAYEB J, SANTHANAM U, TATTER SB, STHOEGER Z, HELFGOTT DC, CHIORAZZI N, GRIENINGER G, SEHGAL PB. **Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes.** J Biol Chem. 1988; 263:7760-6.

MCGEE DW, BEAGLEY KW, AICHER WK, MCGHEE JR. **Transforming growth factor-beta enhances interleukin-6 secretion by intestinal epithelial cells.** Immunology. 1992; 77:7-12.

MIOSSEC P, BRIOLAY J, DECHANET J, WIJDENES J, MARTINEZ-VALDEZ H, BANCHEREAU J. **Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis.** Arthritis Rheum. 1992; 35:874-83

MEAGER A, LEUNG H, WOOLLEY J. **Assays for tumor necrosis factor**

and related cytokines. J. Immunol. Meth. 1989; 116:1.

MIYAURA C, JIN CH, YAMAGUCHI Y, TOMIDA M, HOZUMI M, MATSUDA T, HIRANO T, KISHIMOTO T, SUDA T. **Production of interleukin 6 and its relation to the macrophage differentiation of mouse leukemia cells (M1) treated with differentiation-inducing factor and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3.** Biochem Biophys Res Commun. 1989; 158:660-6.

MOLDOVAN, N, MOLDOVAN L., SIMIONESA N. **Binding of vascular anticoagulant alpha (annexin V to the Aortic intima of the hypercholesterolemic rabbit. An autoradiographic study.** Blood Coagul. Fibrinolysis. 1994; 5: 921-928.

MOORE MS, BLOBEL G. **A G protein involved in nucleocytoplasmatic transport: The rol of Ran.** TIBS. 1994; 19:211-6

MOREL DW, DICORLETO PE, CHISOLM GM. **Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.** Arteriosclerosis. 1984; 4:357-64.

MORELAND LW. **Inhibitors of tumor necrosis factor: new treatment options**

for rheumatoid arthritis. *Cleve Clin J Med.* 1999; 66:367-374.

MORELAND LW, BAUMGARTNER S, SCHIFF M. **Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein.** *N Engl J Med.* 1997; 337:141-7.

MORRISON DC, RYAN JL. **Endotoxins and disease mechanisms.** *Annu Rev Med.* 1987;38:417-32.

MURAKAMI M, HIBI M, NAKAGAWA N, NAKAGAWA T, YASUKAWA K, YAMANISHI K, TAGA T, KISHIMOTO T. **IL-6-induced homodimerization of gp 130 and associated activation of a tyrosine kinase.** *Science.* 1993; 260:1808-10.

MUSSENER, A.; KLARRESKOG, L.; LORENTZEN, J.; KLEINAU, S. **TNF-alpha dominates cytokine mRNA expression in lymphoid tissues of rats developing collagen-and- oil-induced arthritis.** *Scand.J.Immunol.* 1995; 42: 128-34.

MUSSO T, ESPINOZA -DELGADO , PULKKI K, GUSELLA GL, LONGO

DL, VARESIO L. Transforming growth factor beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. *Blood*. 1990; 76:2466-9.

NEDWIN, G.; SVEDERSKY, T.; BRINGMAN, T.; PALLADINO, M.; GOEDDEL, D. Effect of interleukin 2, interferon- λ and mitogens on the production of tumor necrosis factor α and β . *Immunol*. 1985; 135: 2492.

NEIDEL J, SCHULZE M, LINDSCHAU J. Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*. 1995; 44:217-21.

NORTHEMANN W, BRACIAK TA, HATTORI M, LEE F, FEY GH. Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J Biol Chem*. 1989; 264:16072-82.

OHBA T, NAKAMURA M., NISHITANI H, NISHIMOTO T. Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science*. 1999; 284:1359-62.

OLD LJ. **Tumor necrosis factor**. Sci Am. 1988; 258:59-60, 69-75.

OLD, L.J. **Tumor necrosis factor (TNF)**. Science. 1985; 120:630.

PAUL WE. **Fundamental Immunology**. 2^a. Ed. New York, 1989; 1123p.

PEREZ C, ALBERT I, DEFAY K, ZACHARIADES N, GOODING L, KRIEGLER M. **A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact**. Cell. 1990; 63:251-8.

PENNICA D, NEDWIN GE, HAYFLICK JS, SEEBURG PH, DERYNCK R, PALLADINO MA, KOHR WJ, AGGARWAL BB, GOEDEL DV. **Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin**. Nature. 1984; 312:724-9.

PRITCHARD KJ, TOTA R, LIN J H-C, DANISHEFSKY K, HURILLA B, HOLLAND J, STEMERMAN M. **Native low density lipoprotein endothelial cell recruitment of mononuclear cells**. Arterioscler. Thromb. 1991; 11: 1175-1181.

PRIOR J KURTZ DM, ZIEGLER DD, **The hipercholesterolemic rabbit**. Arch Pathol. 1961; 71: 82.

RAETZ, CRH. **Biochemistry of endotoxins.** Annu Rev. Biochem. 1990; 59:
129-170

RAEZT, C.R.H., BROZEK, K.A., CLEMENTZ, T., COLEMAN, J.D.,
GALLOWAY, S.M., GOLENBOCK, D.T., HAMPTON, R.Y. **Gram-**
negative endotoxin: a biologically active lipid in: Cold Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. Cold Spring Harbor, New York. 1998; LIII:
973.

RICHARDSON PD, DAVIES MJ, BORN GV **Influence of plaque**
configuration and stress distribution on fissuring of coronary
atherosclerotic plaques. Lancet. 1989 Oct 21;2(8669):941-4.

RIETSCHER, E.T., BRADE, H. **Bacterial endotoxin.** Sci. Amer. 1992:54.

ROSS R. **Atherosclerosis is an inflammatory disease.** Am Heart J. 1999
Nov;138(5 Pt 2):S419-20.

ROSS R. **The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.**
Nature. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

SANCEAU J, BERANGER F, GAUDELET C, WIETZERBIN J. **IFN-gamma is an essential cosignal for triggering IFN-beta 2/BSF-2/IL-6 gene expression in human monocytic cell lines.** Ann N Y Acad Sci. 1989;557:130-41

SCHALL TJ, LEWIS M, KOLLER KJ, LEE A, RICE GC, WONG GH, GATANAGA T, GRANGER GA, LENTZ R, RAAB H. **Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor.** Cell. 1990;61:361-70.

SCHINDLER R, MANCILLA J, ENDRES S, GHORBANI R, CLARK SC, DINARELLO CA. **Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF.** Blood. 1990;75:40-7.

SCHUMANN RR, LEONG SR, FLGGS GW, GRAY PW, WRIGHT SD, MATHISON, J.C., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J. **Structure and function of lipopolysaccharide binding protein.** Science 1990; 249:1429.

SEHGAL PB, WALTHER Z, TAMMI I. **Rapid enhancement of beta 2-**

interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84:3663-7.

SEHGAL PB, HELFGOTT DC, SANTHANAM U, TATTER SB, CLARICK RH, GHAYEB J, MAY LT. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2- interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus- infected human fibroblasts. J Exp Med. 1988; 167:1951-6.

SHABO Y, LOTEM J, SACHS L. Autoregulation of interleukin 6 and granulocyte - macrophage colony - stimulating factor in the differentiation of myeloid leukemic cells. Mol Cell Biol. 1989; 9:4109-12.

SHIZUO A., TETSUYA T., TADAMITSU K. Interleukin-6 in Biology and Medicine. Advances in Immunology. 1993; 54: 1-52.

SMELAND EB, BLOMHOFF HK, FUNDERUD S, SHALABY MR, ESPEVIK T.

Interleukin 4 induces selective production of interleukin 6 from normal human B lymphocytes. J Exp Med. 1989;170:1463-8.

SOLTERO I. Interacción de lípidos y lipoproteínas. Modificación Oxidativa de la LDL. Atherosclerosis. 1993; 2: 34-42

SOLTERO I. El factor HDL y la Aterosclerosis. Función mediadora – Función protectora. Atherosclerosis. 1987; 2: 50-61.

SPRIGGS, DR; IMAMURA, K.; RODRIGUEZ, C.; SARIBAN, E.; KUFU DW. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. J Clin Invest. 1988; 81(2):455-60.

STARY HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. Virchows. Arch A Pathol Anat Histopathol. 1992;421:277-90.

STARY HC, BLANKENHORN DH, CHANDLER AB, GLAGOV S, INSULL W JR, RICHARDSON M, ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, ET AL. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb. 1992;12:120-34.

SUGARMAN, B.J.; AGGARWAL, B.B.; HASS, P.E.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, MA JR.; SHEPA, H.M. **Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.** Science. 1985; 230(4728):943-5.

SUGITA T, TOTSUKA T, SAITO M, YAMASAKI K, TAGA T, HIRANO T, KISHIMOTO T. **Functional murine interleukin 6 receptor with the intracisternal A particle gene product at its cytoplasmic domain. Its possible role in plasmacytomagenesis.** J Exp Med. 1990; 171:2001-9.

TAGA T, KISHIMOTO T. **Cytokine receptors and signal transduction.** FASEB J. 1992;6:3387-96. Review.

TAGA T, HIBI M, HIRATA Y, YAMASAKI K, YASUKAWA K, MATSUDA T, HIRANO T, KISHIMOTO T. **Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.** Cell. 1989; 58: 573-81.

TAKAI Y, SEKI N, SENOH H, YOKOTA T, LEE F, HAMAOKA T, FUJIWARA

H. **Enhanced production of interleukin-6 in mice with type II collagen- induced arthritis.** Arthritis Rheum. 1989;32:594-600.

TARTAGLIA LA, GOEDEL DV, REYNOLDS C, FIGARI IS, WEBER RF, FENDLY BM, PALLADINO MA JR. **Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor.** J Immunol. 1993; 151:4637-41.

TARTAGLIA LA, PENNICA D, GOEDEL DV. **Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor.** J Biol Chem. 1993; 268:18542-8.

TARTAGLIA LA, WEBER RF, FIGARI IS, REYNOLDS C, PALLADINO MA JR, GOEDEL DV. **The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88:9292-6.

TERR AI, STITES DP. **Inmunología Básica y Clínica.** 7^a. Ed. México, 1993; 1055p.

TETTA C, CAMUSSI G, MODENA V, DI VITTORIO C, BAGLIONI C. **Tumours necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active**

and severe rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1990; 49: 665-7.

TE VELDE AA, HUIJBENS RJ, HEIJE K, DE VRIES JE, FIGDOR CG. **Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes.** Blood. 1990; 76:1392-7.

THOMA B, GRELL M, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. **Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses.** J Exp Med. 1990; 172:1019-23.

TOBIAS PS, MATHISON JC, ULEVITCH RJ. **A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis.** J Biol Chem. 1988 Sep 25; 263(27):13479-81.

TOBIAS PS, SOLDAU K, ULEVITCH RJ. **Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum.** J. Expe. Med. 1986; 164:777.

TOSCHI V, GALLO R, LEYYINO M, FALLON T, FERNANDEZ-ORTIZ A,

BADIMON L, CHESEBRO JH, NEMERSON Y, FUSTER V, BADIMON JJ. **Tissue Factor Predicts the Trombogenicity of Human atherosclerotic Plaque Components.** *Circulation.* 1995; 1:112.

TURNER, M.; LONDEI, M.; FELDMANN, M. **Human T cells from autoimmune and normal individuals can produce tumor necrosis factor.** *Eur J Immunol.* 1987; 17:1807-14.

TUNON J, BUSTOS C, HERNANDEZ-PRESA MA, ORTEGO M, TARIN N, EGIDO J. **Inflamación y estabilidad de la placa aterosclerótica.** *Aterosclerosis al día IV.* 2000; 103-113.

ULEVITCH RJ. **Toll gates for pathogen selection.** *Nature.* 1999 Oct 21;401(6755):755-6.

VAN DAMME J, OPDENAKKER G, SIMPSON RJ, RUBIRA MR, CAYPHAS S, VINK A, BILLIAU A, VAN SNICK J. **Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/ plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor.** *J Exp Med.* 1987; 165:914-9.

VANDENABEELE P, DECLERCQ W, VERCAMMEN D, VAN DE CRAEN M, GROOTEN J, LOETSCHER H, BROCKHAUS M, LESSLAUER W, FIERS W. **Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma** J Exp Med. 1992;176:1015-24.

VAN SNICK J, CAYPHAS S, SZIKORA JP, RENAULD JC, VAN ROOST E, BOON T, SIMPSON RJ. **cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6** Eur J Immunol. 1988; 18:193-7.

VASSALLI P. **The pathophysiology of tumor necrosis factors.** Annu Rev Immunol. 1992; 10:411-52.

VELÁZQUEZ, AM. **Mecanismos inmunológicos en aterosclerosis. Estado actual.** Aterosclerosis al día II. Venezuela. 1993; 43-65.

WALTHER Z, MAY LT, SEHGAL PB. **Transcriptional regulation of the interferon-beta 2/B cell differentiation factor BSF-2/hepatocyte-stimulating factor gene in human fibroblasts by other cytokines.** J Immunol. 1988; 140:974-7.

WARD LD, HOWLETT GJ, DISCOLO G, YASUKAWA K, HAMMACHER A,

MORITZ RL, SIMPSON RJ. **High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130.** J Biol Chem. 1994; 269:23286-9.

WARE CF, CROWE PD, GRAYSON MH, ANDROLEWICZ MJ, BROWNING JL. **Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells.** J Immunol. 1992; 149:3881-8.

WILLIAMS R, FELDMANN M, MAINI R. **Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis.** Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 9784-8.

WONG PM, CHUNG S-W, SULTZER BM. **Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin.** Scand J Immunol. 2000; 51:123-127.

WORTHEN GS, AVDI N, VUKAJLOVICH S, TOBIAS PS. **Neutrophil Adherence induced by lipopolysaccharide in vitro.** J. Clin Invest. 1992; 90:2526.

WRIGHT SD, RAMOS RA, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ, MATHINSON JC.

CD14, a receptor por complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 1999; 249:1431.

WURFEL MM, KUNITAKE ST, LICHENSTEIN H, KANE JP, WRIGHT SD.
Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. J Exp Med. 1994 Sep 1;180(3):1025-35.

YAMASAKI K, TAGA T, HIRATA Y, YAWATA H, KAWANISHI Y, SEED B, TANIGUCHI T, HIRANO T, KISHIMOTO T. **Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor.** Science. 1988; 241:825-8.

YANG RB, MACK MR, GREY A. **Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling.** Nature.1998; 395: 284-8

YUDKIN JS, KUMARI M, HUMPHRIES SE, MOHAMED-ALI V. **Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?** Atherosclerosis. 2000;148: 209-14.

ZHANG YY, DENNIS EA. **Purification and characterization of a**

lysophospholipase from a macrophage-like cell line P388D1. J
Biol Chem. 1988; 263:9965-72.

ZIEGLER-HEITBROCK HW, ULEVITCH RJ. CD14: cell surface receptor and
differentiation marker. Immunol Today. 1993; 14:121-5.

