

# Producción de factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6 por los macrófagos alveolares de pacientes con artritis reumatoide y enfermedad pulmonar intersticial

J. Ancochea, R.M. Girón y M. López-Botet\*

Servicios de Neumología e \*Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los macrófagos alveolares (MA) de pacientes con artritis reumatoide (AR) y enfermedad pulmonar intersticial (EPID) asociada.

Se han incluido en el estudio pacientes con AR (criterios de la ACR) y EPID asociada (documentada en las pruebas de función pulmonar y mediante CT-scan de alta resolución) (n = 8) y voluntarios sanos fumadores (F) (n = 6) y no fumadores (NF) (n = 6).

Se analiza la producción, espontánea e inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS), de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los MA obtenidos mediante lavado broncoalveolar (LBA). Los MA, aislados mediante gradiente de centrifugación Ficoll-Hypaque y adherencia al plástico, fueron cultivados en medio completo (RPMI 1640 + 10% STF) en presencia y ausencia de LPS (100 ng/ml). La producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 fue medida en los sobrenadantes por ELISA.

Tanto la liberación espontánea como la inducida de TNF- $\alpha$  por los MA del grupo AR está significativamente incrementada en relación a controles (p < 0,01). Los MA estimulados con LPS de pacientes con AR y EPID liberan también mayores cantidades de IL-6 que los de controles sanos. Tanto la producción espontánea como la inducida de IL-6 están significativamente reducidas en F en relación a NF.

El estudio de la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el LBA de pacientes con AR y EPID refleja una hiperreactividad de los MA en estos pacientes, quizá presensibilizados como consecuencia del propio proceso inflamatorio pulmonar. Son necesarios nuevos estudios para definir el papel de estos mediadores en la patogenia del proceso.

**Palabras clave:** Artritis reumatoide. Lavado broncoalveolar. TNF- $\alpha$ . IL-6

*Arch Bronconeumol* 1997; 33: 335-340

Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 by alveolar macrophages in patients with rheumatoid arthritis and interstitial lung disease

The aim of this study was to measure the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) by alveolar macrophages in patients with rheumatoid arthritis and interstitial lung disease (ILD).

Rheumatoid arthritis patients diagnosed by ACR criteria (n = 8) with associated ILD documented by pulmonary function tests and high resolution computerized tomography scanning, and 12 healthy volunteers (6 smokers and 6 non-smokers).

We determined the spontaneous and induced production of bacterial lipopolysaccharides (LPS), TNF- $\alpha$  and IL-6 by alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage. The macrophages were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and plastic adherence and cultured in serum-containing medium (low endotoxin) in the presence and absence of LPS (100 ng/ml). TNF- $\alpha$  and IL-6 levels contents were determined in supernatants by ELISA.

In the patient group both spontaneous and induced production of TNF- $\alpha$  were significantly higher than in controls (p < 0.01). Macrophages stimulated with LPS in patients with rheumatoid arthritis and ILD also released greater amounts of IL-6 than did those of the healthy controls. IL-6 spontaneous and induced production was significantly lower in smokers than in nonsmokers.

TNF- $\alpha$  and IL-6 production in patients with rheumatoid arthritis and ILD, studied in bronchoalveolar lavage specimens reveals that alveolar macrophages are hyperreactive in these patients, who are possibly sensitized as a consequence of the inflammatory lung process inherent to the disease. Further study is needed to define the pathogenic role of these mediators.

**Key words:** Rheumatoid arthritis. Bronchoalveolar lavage. TNF- $\alpha$ . IL-6.

## Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria multisistémica de etiología desconocida, esencialmente caracterizada por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales. Actualmente se la considera una enfermedad autoinmu-

Correspondencia: Dr. J. Ancochea.  
Servicio de Neumología. Hospital Universitario de la Princesa.  
Diego de León, 62. 28006 Madrid.

Recibido: 3-9-96; aceptado para su publicación: 7-1-97.

Trabajo financiado parcialmente por la beca FIS 94/0290.

ne en la que participan diferentes tipos celulares, siendo los mejor estudiados los sinoviocitos, macrófagos y linfocitos T<sup>1,2</sup>.

Una parte importante de la investigación reciente de la patogenia de la AR se ha centrado en el estudio del papel de ciertas citocinas en los fenómenos de amplificación y perpetuación de los cambios inflamatorios articulares<sup>3-5</sup>. De una manera global, las citocinas se consideran en la actualidad mediadoras clave de la inflamación que también condicionan diferentes respuestas fisiológicas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis. Además, esta aproximación tiene un enorme potencial para establecer en un futuro próximo nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso directo de citocinas o de inhibidores específicos de éstas.

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), secretado fundamentalmente por macrófagos activados, es una citocina abundante en la sinovial reumatoide que parece tener un papel relevante en la patogenia de la AR, siendo sus acciones proinflamatorias las que suscitan mayor interés. De la misma manera, varios grupos han detectado interleucina 6 (IL-6) en la membrana sinovial de la AR. De hecho, esta citocina, producida por una gran variedad de células, incluidos macrófagos y fibroblastos, es una de las más abundantes en esta enfermedad, si bien no está claro si la IL-6 (citocina pleiotrópica que posee acciones locales y sistémicas) ejerce un papel global pro o antiinflamatorio<sup>6</sup>.

Dentro de las manifestaciones extraarticulares de la AR, la asociación entre ésta y la enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) está bien establecida. A pesar del incremento de información sobre los acontecimientos celulares y bioquímicos que tienen lugar en el tejido sinovial reumatoide, la patogenia de la neumopatía intersticial en la AR dista de ser conocida. En este contexto, el lavado broncoalveolar (LBA) puede contribuir al estudio y comprensión de los cambios fisiopatológicos que tienen lugar en el espacio alveolointersticial en estos pacientes, cambios en los que la implicación de ciertas citocinas parece relevante.

Un estudio reciente señala que los macrófagos alveolares (MA) obtenidos por LBA en enfermos con AR con y sin EPID detectable liberan espontáneamente amplias cantidades de TNF- $\alpha$ ; por el contrario, no se detectaron cantidades significativas de interleucina-1 (IL-1) en los sobrenadantes<sup>7</sup>.

Para profundizar en la posible implicación del TNF- $\alpha$  y la IL-6 en el desarrollo de neumopatía intersticial asociada a AR, nos propusimos estudiar la secreción de estas citocinas por los MA obtenidos mediante LBA en un grupo de pacientes con AR y EPID asociada, y controles sanos.

## Métodos

### *Pacientes y controles*

El estudio se llevó a cabo prospectivamente en 8 pacientes, 6 mujeres y 2 varones, con AR (criterios de la ACR<sup>8</sup>) y EPID asociada, todos ellos seropositivos.

Siete pacientes eran no fumadores y uno ex fumador, siendo su edad media de 59,3 años (rango = 48-69). Cuatro presentaban nódulos subcutáneos y dos síndrome de Sjögren aso-

ciado. Todos estaban siendo tratados con distintos esquemas terapéuticos que incluían la utilización de antiinflamatorios no esteroides, sales de oro en 4 casos, penicilamina en uno, metotrexato en dos y esteroides a dosis bajas en dos.

La valoración clínica se completó en todos los casos con la determinación de parámetros analíticos, radiografía de tórax en dos proyecciones, TAC torácica con cortes de alta resolución (HR-TAC) (Toshiba. TCT-600 HQ), pruebas funcionales respiratorias y LBA. Ningún paciente fue estudiado dentro de las 6 semanas siguientes a un episodio de infección respiratoria aguda, y se excluyeron del estudio aquellos enfermos con AR y antecedentes de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección respiratoria recurrente, exposición profesional a polvos orgánicos o minerales, o sospecha de patología pulmonar atribuible a fármacos.

Se definió la existencia de EPID por la presencia de alteraciones compatibles con patología intersticial en HR-TAC y un patrón restrictivo en los tests de función pulmonar. La definición funcional de EPID incluyó una relación FEV<sub>1</sub>/FVC normal y la reducción (menos del 80% de los valores teóricos) de al menos dos de los siguientes parámetros: TLC, FVC y DLCO. Los enfermos con AR estudiados mostraron ( $\bar{X} \pm DE$ ) (tanto por ciento del valor teórico) un %FVC del  $67,9 \pm 10,1$ ; %TLC  $74,7 \pm 8,8$ , y % DLCO  $60,9 \pm 8,1$ .

El grupo control estaba constituido por 12 voluntarios sanos (estudiantes, enfermeras y médicos del Hospital Universitario de la Princesa) e incluyó 6 no fumadores (NF) y 6 fumadores (F), que aceptaron por escrito su participación en el estudio. Los voluntarios del grupo F fumaban cigarrillos regularmente al ser incluidos en el mismo, con una media de  $1,3 \pm 0,2$  paquetes/día, llevaban fumando  $9,3 \pm 2,1$  años y consumidos una media de  $12,2 \pm 2,8$  paquetes/año.

La edad media de los controles NF (4 mujeres y 2 varones) fue de 25,1 (rango = 21-35) y la de los voluntarios F (4 varones y 2 mujeres) de 29,1 años (rango = 22-36).

### *Lavado broncoalveolar*

El LBA fue realizado siempre por el mismo broncoscopista, salvo en el caso en que éste fue sometido a la prueba como integrante del grupo control. Tras premedicación con atropina s.c. y anestesia tópica de hipofaringe y laringe con lidocaína 1%, el fibrobroncoscopio (FB) (Olympus BF-B3R) fue introducido en el árbol traqueobronquial. Se administró oxígeno suplementario con sonda nasal a 4 l/min a todos los sujetos y se utilizó un máximo de 8 ml de lidocaína como anestesia local durante el procedimiento. Tras la exploración rutinaria de ambos árboles bronquiales, el FB se enclavó en uno de los subsegmentarios del lóbulo medio, instilándose alcuotas de 50 ml de solución salina isotónica y aspirándose posteriormente manual y suavemente. En todos los casos, el porcentaje global de líquido recuperado fue superior al 45%. El fluido obtenido fue filtrado a través de gasa estéril, mezclado y llevado inmediatamente al laboratorio para su análisis. Se desechó el líquido obtenido en la primera alcuota, tras ser cuantificado. El conteo celular total se realizó utilizando un hemocitómetro (Coulter S plus IV/IVD), anotándose la media de dos determinaciones. La viabilidad celular fue evaluada mediante el test de azul trypan. El estudio de las diferentes poblaciones celulares y sus porcentajes respectivos se estableció por m.o. tras coloración de May-Grünwald-Giemsa.

### *Aislamiento y cultivo de los macrófagos alveolares*

En el procesamiento posterior del líquido del LBA se siguieron los siguientes pasos: a) concentración celular mediante centrifugación (10 min a 300 g), resuspensión en RPMI-1.640 y centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-

Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia); b) adherencia al plástico de  $10^6$  células viables/pocillo en 1 ml de medio completo (RPMI 1.640+10% de suero de ternera fetal), durante una hora a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ; c) recogida del sobrenadante y comprobación de la homogeneidad de la adherencia; d) incubación por duplicado con medio completo, en presencia y ausencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (100 ng/ml) durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , y e) recogida del sobrenadante a las 24 h, centrifugación y congelación a  $-80^\circ\text{C}$ .

La producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 fue medida en los sobrenadantes por ELISA.

#### Ensayo de TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  se analizó por una técnica de ELISA puesta a punto en el laboratorio de inmunología de nuestro centro, utilizando dos anticuerpos monoclonales (AcM) específicos, tal como se ha descrito previamente<sup>9</sup>.

A continuación se resume el desarrollo de la técnica: el AcM 9/17 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) diluido en PBS (*phosphate-buffered saline solution*) se absorbe en placas de 96 micropocillos de fondo plano (Costar) (50  $\mu\text{l/pocillo}$ ), incubando a  $4^\circ\text{C}$  durante 12-18 horas. Se lava (3x) con PBS y se incuba 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con leche en polvo desnatada diluida al 1% en PBS. Después de tres lavados con PBS y leche en polvo al 0,05%, se incuban por duplicado durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  cada una de las muestras (50  $\mu\text{l/pocillo}$ ) y las diluciones seriadas de una preparación de TNF recombinante purificada como patrón, dejando varios pocillos como control negativo (blanco).

Las placas se lavan (3x) con 200  $\mu\text{l/pocillo}$  de PBS y Tween-20 (Sigma) al 0,05% (V/V). Se incuba 1 h a temperatura ambiente con el AcM 10/18, previamente marcado con biotina (Pierce) (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{l/pocillo}$ ) y diluido en PBS-Tween.

Se lava (4x) con PBS-Tween y se incuba 1 h con avidina marcada con peroxidasa (Pierce) (dilución 1/1.000 en PBS-Tween). Tras lavar (5x) con PBS-Tween, se añaden 50  $\mu\text{l/pocillo}$  de una solución tampón citrato-fosfato (pH = 5) suplementada con ortofenil diamina (OPD, Sigma) (0,4 mg/ml) y 4  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 vol). Se incuba durante 20 min y se para la reacción con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N (50  $\mu\text{l/pocillo}$ ).

La densidad óptica (DO) se lee (LP400. Diagnostics Pasteur) aplicando un filtro de 492 nm. La curva patrón se representa en función de la DO obtenida para cada una de las concentraciones conocidas de la dilución de TNF- $\alpha$ , y las concentraciones de cada muestra problema se estiman interpolando la DO correspondiente en la zona lineal de la curva. El límite inferior de sensibilidad de esta técnica es de 50 pg/ml. En aquellos casos en los que la elevada concentración no permitió una interpolación fiable, se procedió a repetir la determinación diluyendo la muestra (1/10).

#### Ensayo para IL-6

La detección de IL-6 se realizó en colaboración con el Dr. Gijs Jochems, adscrito a la Unidad de Biología Molecular de nuestro hospital, empleando la técnica de ELISA descrita por Jochems et al<sup>10</sup>. Se describe a continuación el protocolo aplicado, resaltándose las diferencias con el ensayo anteriormente descrito para el TNF- $\alpha$ .

Las placas de ELISA se trataron absorbiendo el AcM anti-IL-6 (AcM 16) a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  en PBS. La solución de lavado utilizada fue PBS-Tween 0,02%. La saturación se realizó incubando con PBS-Tween suplementado con gelatina al 0,2% (PTG) y añadiendo las muestras (100  $\mu\text{l/pocillo}$ ) o las diluciones de la IL-6 recombinante, durante 12 h a  $4^\circ\text{C}$ .

Tras lavar (5x) con PBS-Tween se incubó durante 1 h a

temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal anti-IL-6 marcado con biotina y diluido en PTG. Después de lavar (5x) se incubó durante 30 min con estreptavidina marcada con peroxidasa (Dakopatts) diluida al 1/1.000 con PTG. Para amplificar, se incubó sucesivamente con una solución de biotina-tiramina (Sigma) en tampón fosfato 50 mM (pH = 8) y con estreptavidina-peroxidasa (1/1.000), intercalando los correspondientes lavados (5x).

Finalmente, se añadió la solución sustrato preparada en tampón acetato sódico 0,11 M (pH = 5,5), 0,1 mg/ml de TMB (Merck) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%, parando la reacción con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N y leyendo a 450 nm (LP400. Diagnostics Pasteur).

#### Análisis estadístico

La celularidad, porcentaje de líquido recuperado y recuento diferencial celular del LBA, así como la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los MA de pacientes con AR y controles sanos F y NF se llevaron a cabo, previo análisis global entre los datos de los grupos por ANOVA que justificó comparaciones múltiples, mediante el test de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni. Un valor de p corregido  $< 0,05$  fue considerado significativo.

#### Resultados

El análisis del número de células/ml  $\times 10^4$  en pacientes y controles mostró una gran dispersión en los datos obtenidos. Los controles NF presentaban una menor celularidad ( $21,6 \pm 6,9 \times 10^4/\text{ml}$ ) que era estadísticamente significativa en relación al grupo de enfermos con AR y EPID asociada y a los controles F. En los pacientes con AR y EPID se evidenció una mayor concentración celular ( $46,3 \pm 14,1 \times 10^4/\text{ml}$ ) que mostró significación estadística al compararla con los controles NF ( $p < 0,05$ ), pero no al hacerlo con los voluntarios F ( $39,8 \pm 15,2 \times 10^4/\text{ml}$ ). El porcentaje del fluido recuperado en el grupo de pacientes con AR ( $53,8 \pm 6,9\%$ ) fue menor que en los controles ( $p < 0,05$ ).

En el recuento diferencial celular, los pacientes con AR y EPID mostraron un mayor porcentaje de neutrófilos ( $9,3 \pm 4,9\%$ ) que los controles F ( $1,4 \pm 1,3\%$ ) y NF ( $0,8 \pm 0,9\%$ ). Los controles NF presentaron un recuento linfocitario ( $9,0 \pm 2,6\%$ ) similar al de los pacientes con AR y EPID ( $8,7 \pm 6,1\%$ ), pero estadísticamente mayor que el de los controles F ( $2,7 \pm 1,3\%$ ).

El análisis de la producción, espontánea e inducida por LPS (100 ng/ml) de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los MA de pacientes y controles, se realizó mediante las técnicas de ELISA anteriormente descritas. Los resultados obtenidos se reflejan en las figuras 1 y 2.

Tanto la liberación espontánea como la inducida de TNF- $\alpha$  por los MA del grupo AR estaba incrementada en relación a los controles F y NF ( $p < 0,01$ ) (fig. 1). Al comparar los datos de controles sanos F y NF se observó una clara tendencia a una mayor producción de TNF- $\alpha$  en las muestras incubadas con LPS en el grupo NF ( $41,9 \pm 10,9$  ng/ml), aunque no alcanzó significación estadística en relación a F ( $23,0 \pm 6,8$  ng/ml).

Los MA estimulados con LPS de los pacientes con AR y EPID asociada liberaron también cantidades incrementadas de IL-6 en relación a controles F ( $p < 0,01$ ) y NF ( $p < 0,05$ ). Es reseñable, por último, que

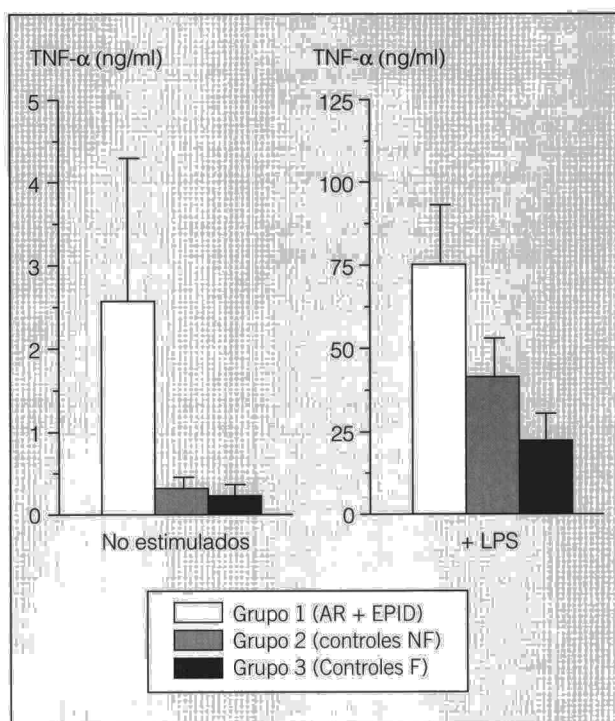


Fig. 1. Producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por los macrófagos alveolares. Los datos se expresan como  $X \pm DE$ . Nivel de significación: valor de  $p$  corregido  $< 0,05$  (Mann-Whitney U test con corrección de Bonferroni). \* $p < 0,01$  en relación a los grupos 2 y 3; AR + EPID: artritis reumatoide con enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada; NF: no fumadores; F: fumadores; LPS: lipopolisacárido bacteriano.

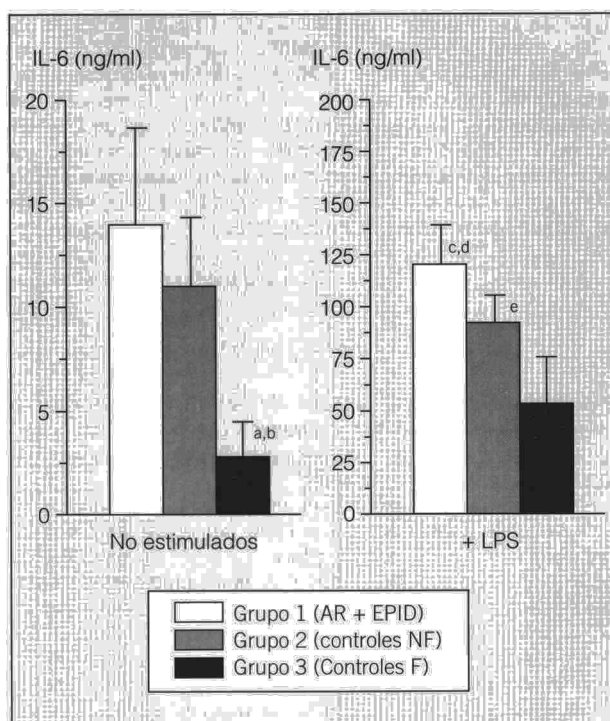


Fig. 2. Producción de interleucina 6 (IL-6) por los macrófagos alveolares. Los datos se expresan como  $X \pm DE$ . Nivel de significación: valor de  $p$  corregido  $< 0,05$  (Mann-Whitney U test con corrección de Bonferroni). \* $p < 0,01$  en relación al grupo 1; <sup>b</sup> $p < 0,05$  en relación al grupo 2; <sup>c</sup> $p < 0,01$  en relación al grupo 3; <sup>d</sup> $p < 0,05$  en relación al grupo 2; <sup>e</sup> $p < 0,05$  entre los grupos 2 y 3. AR + EPID: artritis reumatoide con enfermedad pulmonar intersticial difusa asociada; NF: no fumadores; F: fumadores; LPS: lipopolisacárido bacteriano.

tanto la producción espontánea como la inducida de IL-6 estaban reducidas en el grupo de controles F, no sólo al comparar las muestras con las del grupo AR ( $p < 0,01$ ) sino también al hacerlo con las de sujetos sanos NF ( $p < 0,05$ ) (fig. 2).

Las correlaciones entre la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el grupo AR, tanto en condiciones basales como tras estimulación, no fueron en ningún caso significativas (coeficientes de correlación entre 0,02 y 0,4), si bien debe señalarse que el número de casos estudiados es limitado.

### Discusión

Durante los últimos años, diversos investigadores han contribuido a definir el patrón de expresión de citocinas en la membrana sinovial de la AR<sup>3-6</sup>, demostrándose un importante incremento de los niveles de citocinas secretadas primariamente por macrófagos como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 y factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF). En contrapartida, sólo se detectan pequeñas cantidades de productos de secreción de células T, como la IL-2 y el IFN- $\gamma$ . No obstante, hoy día resulta evidente la importante contribución de la predisposición inmunogenética en la aparición de la artritis y el papel central de las células T en su mantenimiento<sup>11</sup>. Los linfocitos T en el infiltrado inflamatorio sinovial de la AR presentan una serie de características

de interés: *a*) son en su mayoría CD4+; *b*) son mayoritariamente células de memoria (CD45RO+); *c*) presentan en su superficie moléculas relacionadas con activación celular, y *d*) expresan receptores de adhesión. La población de células T de memoria maduras, tal vez en un estado disfuncional o con una regulación negativa, explicaría la pobreza de citocinas de células T en la articular reumatoide<sup>11</sup>.

En todo caso, y según la información acumulada, parece indiscutible que diversas citocinas tienen un papel esencial en la patogenia de la AR. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la implicación de estos polipéptidos en el desarrollo de la EPID asociada a AR. En este contexto, parece incuestionable la utilidad del LBA como medio de investigación para precisar las claves de la patogenia de distintas neumopatías intersticiales<sup>12</sup>.

El TNF- $\alpha$  y la IL-6 son citocinas proinflamatorias presumiblemente implicadas en la respuesta inflamatoria e inmune que se produce a nivel pulmonar en la EPID asociada a AR.

El TNF- $\alpha$  es producido abundantemente por los macrófagos activados de la sinovial reumatoide, participando en los fenómenos de destrucción de la matriz extracelular, cartílago y hueso, en el reclutamiento de leucocitos, la hiperplasia de sinoviocitos, la neovascularización, efectos sistémicos y producción de otras citocinas<sup>3-6</sup>. Tras la generación de ratones transgénicos que expresan constitutivamente el gen del TNF- $\alpha$  humano, se conoce mejor

su papel en la patogenia de la AR. Estos ratones desarrollan una enfermedad inflamatoria articular muy similar a la AR que podría ser evitada con la administración de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  desde el nacimiento<sup>13</sup>.

La IL-6 es una glucoproteína producida por una gran variedad de células que induce la proliferación celular T y es un factor estimulador del crecimiento y diferenciación de células B y de la producción de inmunoglobulinas. Por otra parte, y al igual que la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , que a su vez son potentes estimuladores de su producción y acción, la IL-6 ejerce efectos endocrinos como la inducción de fiebre y síntesis de reactantes de fase aguda por los hepatocitos<sup>3-6</sup>. Varios grupos han detectado IL-6 en la membrana sinovial de la AR. De hecho esta citocina es una de las más abundantes en esta enfermedad. Sin embargo no está claro si la IL-6 ejerce un papel global pro o antiinflamatorio<sup>6</sup>. Por una parte, la capacidad activadora de linfocitos B puede ser un factor para la producción de inmunoglobulinas, entre éstas el factor reumatoide, en la membrana sinovial. Sin embargo, algunos autores sugieren que esta citocina puede tener un efecto protector, pues las proteínas de fase aguda se unen a lípidos y a ciertas citocinas inactivándolas; además liberan radicales de oxígeno y poseen actividad antiproteasa. Por otra parte, la IL-6 estimula la producción de TIMP (inhibidor hístico de metaloproteasas), controlando la acción destructiva de la colagenasa y otras metaloproteasas en los tejidos<sup>14</sup>.

Según los medios disponibles en nuestro laboratorio, abordamos el estudio de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los macrófagos obtenidos mediante LBA en sujetos con AR y EPID asociada y controles sanos. Nuestros resultados mostraron una secreción de TNF- $\alpha$  significativamente elevada en los cultivos de MA de los pacientes con AR y EPID en relación a controles, tanto F como NF. Este incremento de la secreción de TNF- $\alpha$  se observó tanto basalmente como en presencia de un estímulo específico (LPS), sugiriendo una hiperreactividad del MA en los pacientes con AR y EPID asociada. Paralelamente, se observó una secreción significativamente elevada de IL-6 en las muestras incubadas con LPS de los pacientes con AR y EPID con respecto a sujetos sanos F y NF. Por otra parte, datos preliminares de nuestro grupo sugieren que la producción de estas citocinas podría estar incrementada también en pacientes con AR sin EPID asociada, hecho ya observado por Gosset et al<sup>7</sup> en lo que respecta al TNF- $\alpha$ .

Ante estos resultados cabe preguntarse qué factores pueden determinar que incluso la respuesta al potente estímulo que supone la endotoxina sea mayor en los MA de los enfermos con AR y EPID asociada. En diferentes sistemas experimentales se ha observado que otros estímulos, como el IFN- $\gamma$ , potencian la secreción de TNF- $\gamma$  en respuesta al LPS<sup>15</sup>; por otra parte, se ha descrito que los macrófagos aislados de lesiones granulomatosas en las que participan linfocitos T responden más intensamente al LPS que las células obtenidas de granulomas inespecíficos<sup>16</sup>. Considerando estos datos, la interpretación más plausible es que los MA en sujetos con AR y EPID se encuentran presensibilizados como consecuencia del propio proceso inflamatorio

pulmonar en el que, como en la sinovial reumatoide, pueden tener un papel importante las células T. Nuestros datos son, pues, indicativos de que el trastorno inflamatorio pulmonar en la AR puede presentar rasgos fisiopatológicos superponibles a los que desencadenan la sinovitis. Teniendo en cuenta que en la EPID asociada a AR las células más abundantes en la vía aérea distal son los MA y que su activación desempeña un papel esencial en la respuesta inmunoinflamatoria, parece evidente que la modificación funcional de estas células constituye un atractivo objetivo terapéutico. En este sentido, el potencial terapéutico de inhibidores de determinadas citocinas como el TNF- $\alpha$  puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias, con el objeto de interrumpir la cascada de acontecimientos patogénicos que conducen al desarrollo de EPID en la AR.

Por otra parte, a la hora de evaluar la liberación de citocinas por los MA humanos, resulta necesario hacer una consideración especial sobre la posible influencia del hábito tabáquico. En sujetos fumadores se han evidenciado, por ejemplo, una respuesta proliferativa reducida de las células T pulmonares a mitógenos<sup>17</sup>, una menor capacidad de los MA para producir IL-1<sup>18</sup>, un balance alterado entre la proporción de células T CD4 y CD8 en el LBA<sup>19</sup>, y una disminución en la expresión en el LBA de ciertos antígenos de activación linfocitaria (CD69, HLA-DR, 4F2)<sup>19</sup>.

Yamaguchi et al, en un estudio reciente, observan que la capacidad de los MA de fumadores estimulados con LPS para liberar TNF- $\alpha$  está significativamente reducida tanto en sujetos sanos como en enfermos con sarcoidosis pulmonar, en relación a NF<sup>20</sup>. Estudios previos demuestran que la liberación de IL-1 $\beta$  por los MA estimulados in vitro está también reducida en fumadores<sup>18</sup>. En este contexto, se ha sugerido que los procesos inflamatorios e inmunes en el pulmón de fumadores pueden estar notablemente alterados por el déficit relativo de estas dos citocinas. Dado que están implicadas no sólo en la respuesta inmune de hipersensibilidad, sino también en los mecanismos de defensa del huésped frente a agentes infecciosos y neoplasias, la liberación disminuida de estas citocinas puede incrementar el riesgo de los fumadores de cigarrillos de desarrollar toda una variedad de trastornos pulmonares<sup>20</sup>. No obstante, el mecanismo celular preciso de la regulación en la producción de citocinas por el humo del tabaco dista de ser conocido. La liberación de otras citocinas producidas localmente puede también estar afectada por el hábito de fumar.

Nuestros resultados mostraron que, efectivamente, el tabaquismo influye en la producción local de ciertas citocinas por los MA. Observamos una clara tendencia a una menor producción de TNF- $\alpha$  por los MA incubados con LPS de sujetos sanos F en relación a NF. En lo relativo a la IL-6, y a pesar del número limitado de casos estudiados, tanto la producción espontánea como la inducida de esta glucoproteína estaban significativamente reducidas en las muestras del LBA de fumadores. Estos datos resaltan el marcado impacto del hábito tabáquico sobre la respuesta inmunitaria de las células del LBA, aspecto ya destacado por nuestro grupo a propósito del

estudio de la expresión de antígenos de activación linfocitaria<sup>19</sup>. Para profundizar más en la cuestión, debería abordarse el análisis de la expresión de receptores para la endotoxina en los MA y, eventualmente, estudiar las vías de transducción de señales. Este capítulo es particularmente complejo dado que, aunque el papel de CD14 como receptor para LPS está bien establecido, hay indicios de la existencia de otras moléculas en macrófagos implicadas en la respuesta a la endotoxina<sup>21</sup>. Por otra parte, las rutas metabólicas que preceden a la biosíntesis y secreción de TNF- $\alpha$  son sólo parcialmente conocidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Panayi GS, Lanchbury JS, Kingsley GH. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35:729-733.
- Humbria A, García de Vicuña R, Alvaro-Gracia JM, Laffón A. Membrana sinovial de la artritis reumatoide: infiltrado de células mononucleares. *Rev Esp Reumatol* 1992; 19: 399-411.
- Harris ED. Rheumatoid Arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1.277-1.289.
- Firestein GS. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1991; 3: 398-406.
- Arend W, Dayer JM. Cytokine and cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 305-315.
- Álvaro-Gracia JM. Citocinas en la membrana sinovial de la artritis reumatoide. *Rev Esp Reumatol* 1992; 19: 378-387.
- Gosset P, Pérez T, Lassalle P, Duquesnoy B, Farre JM, Tonnel AB et al. Increased TNF- $\alpha$  secretion by alveolar macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 593-597.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324.
- Aramburu J, Balboa MA, Rodríguez A, Melero I, Alonso M, Alonso JL et al. Stimulation of IL-2 activated natural killer cells through the Kp 43 surface antigen upregulates TNF- $\alpha$  production involving the LFA-1 integrin. *J Immunol* 1993; 151: 3.420-3.429.
- Jochems GJ, Klein MR, Jordens R, Pascual Salcedo D, Van Boxtel Oosterhof F, Van Lier RA et al. Heterogeneity in both cytokine production and responsiveness of a panel of monoclonal human Epstein-Barr virus transformed B-cell lines. *Hum Antibod Hybridomas* 1991; 2: 57-64.
- Sewell KL, Trentham DE. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1993; 341: 283-286.
- Xaubet A, Agustí C. Lavado broncoalveolar. *Arch Bronconeumol* 1991; 27: 134-138.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 1991; 10: 4.025-4.031.
- Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 1991; 266: 2.017-2.020.
- Stein M, Gordon S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol* 1991; 21: 431-437.
- Chensue S, Otterness I, Higashi G, Forsch C, Kunkel S. Monokine production by hypersensitivity (Schistosoma mansoni egg) and foreign body (sephadex bead)-type granuloma macrophages. Evidence for sequential production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989; 142: 1.281-1.286.
- Daniele RP, Dauber JH, Altose MD, Rowlands DT, Gorenberg DJ. Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette smokers: a comparison between lung and peripheral blood. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 997-1.005.
- Yamaguchi E, Okazaki N, Itoh A, Abe S, Kawakami Y, Okuyama H. Interleukin-1 production by alveolar macrophages is decreased in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 397-402.
- Ancochea J, González A, Sánchez MJ, Aspa J, López-Botet M. Expression of lymphocyte activation surface antigens in bronchoalveolar lavage and peripheral blood cells from young healthy subjects. *Chest* 1993; 104: 32-37.
- Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y. Release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* 1993; 103: 479-483.
- Wright SD. Multiple receptors for endotoxin. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 83-90.