

Patrón de citocinas séricas en pacientes con artritis reumatoide de acuerdo a su reactividad al PPD

Darío Ponce de León Pandolfi, César Pastor Asurza, Yasmina Beraun, Eduardo Acevedo-Vásquez, Alfredo Sánchez-Torres, José Alfaro Lozano, Risto Perich Campos, Mariano Cucho Venegas, César Gutiérrez Villafuerte y César Sánchez Schwartz

Servicio de Reumatología. Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen-Red Asistencial Almenara. EsSalud. Lima. Perú.

Introducción: En un reciente estudio, se demostró una alta reactividad negativa al PPD o tuberculina en pacientes con artritis reumatoide (AR), (70%) comparado con controles (30%). Para determinar si esta alta reactividad negativa al PPD está asociada con un determinado patrón de citocinas, se compararon las concentraciones séricas de interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interferón (IFN)- γ en pacientes con AR con reactividad positiva y negativa al PPD. Se analizó también la correlación entre las citocinas y la actividad de la AR.

Material y métodos: Se estudiaron 40 pacientes con AR y 21 individuos sanos. Se consideró reactividad positiva al PPD a una induración ≥ 5 mm y reactividad negativa cuando es < 5 mm. La actividad de la AR se determinó según el DAS28. Las citocinas se determinaron por citometría de flujo utilizando el Kit Multiplex Cytometric Bead Array.

Resultados: De los pacientes con AR, 27 (67,5%) presentaron reactividad negativa al PPD y 13 (32,5%) reactividad positiva al PPD, similares en edad, sexo femenino y enfermedad activa. No se encontraron diferencias significativas en las citocinas entre los grupos con PPD positivo y PPD negativo. El IFN- γ ($r = 0,433$; $p = 0,005$) y la IL-6 ($r = 0,325$; $p = 0,041$) fueron las únicas que mostraron correlación positiva con la actividad de la enfermedad.

Conclusiones: No parece que haya diferencias en el patrón de citocinas séricas en los pacientes con reactividad negativa y positiva al PPD.

Palabras claves: Artritis reumatoide (AR). PPD. Citocinas.

Pattern of serum cytokines in patients with rheumatoid arthritis according to PPD reactivity

Introduction: We demonstrated, in a recently published study, far more PPD negative reactivity among patients who had RA (70%) than among controls (30%). To evaluate the hypothesis that different response to PPD in RA patients is associated with different profiles of serum cytokines, we compared the serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF alpha and IFN gamma from PPD negative and PPD positive RA patients. We also evaluated any correlations between serum cytokines and RA activity.

Material and methods: Forty RA patients and 21 controls were enrolled. Those with an induration < 5 mm were considered as negative and those with ≥ 5 mm as positive PPD. Disease activity was calculated using DAS28.

Plasma levels of cytokines were determined using the multiplex BD TM Cytometric Bead Array Kit Assay.

Results: Of the RA patients, 27 (67.5%) had negative reaction to PPD and 13 (32.5%) a positive reaction to PPD. There was no statistical difference in sex profile, age or activity index between both negative and positive PPD RA patients. There was no significant difference in all the cytokines measured between PPD positive and PPD negative RA patients. Index activity show a positive correlation with IFN gamma ($r = 0.433$; $p = 0.005$) and IL-6 ($r = 0.325$; $p = 0.041$) in RA patients.

Conclusions: Positive and negative tuberculin RA patients seem to show a similar cytokine serum profile.

Key words: Rheumatoid arthritis (RA). PPD. Cytokines.

Correspondencia: Dr. D. Ponce de León Pandolfi.
Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.
Red Asistencial Almenara. EsSalud. Lima.
Avda. Grau, 800. Lima 13. Perú.
Correo electrónico: edacvas@terra.com.pe

Manuscrito recibido el 25-11-2005 y aceptado el 15-9-2006.

Introducción

Después de la colocación intradérmica del derivado proteico purificado (PPD) (*purified protein derivative*) o tuberculina, se activan las células T antígeno específicas y secretan citocinas que median la reacción de hipersens-

sibilidad, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el interferón (IFN)- γ y la linfotóxina (TNF- β), entre otras¹. Es conocido que los pacientes con artritis reumatoide (AR) presentan respuestas atenuadas de hipersensibilidad de tipo retardado y disminución en la proliferación de linfocitos hacia antígenos universales²⁻⁵. En un reciente estudio, nosotros demostramos una reactividad negativa al PPD mucho mayor en los pacientes con AR (70%), comparado con sujetos controles (30%) y con la población general (32%)⁶, respuestas que podrían estar relacionadas con diferentes patrones y concentraciones séricas de citocinas.

El mecanismo exacto de esta respuesta atenuada al PPD *in vitro* por parte de las células mononucleares de sangre periférica en pacientes con AR, no está completamente definida, aunque algunos se han propuesto, como la participación de algunas citocinas, incluyendo la interleucina (IL)-10⁷, la IL-2³ y la exposición crónica del TNF- α ⁸.

El objetivo fundamental del estudio es comparar el patrón de citocinas séricas entre pacientes con AR al estratificarlos de acuerdo a su reactividad al PPD.

Como objetivos secundarios se compararán las concentraciones séricas de citocinas entre los pacientes con AR activa e inactiva y se determina si hay alguna correlación entre la actividad de la enfermedad y las concentraciones séricas de citocinas.

Material y métodos

Pacientes y controles

El estudio se realizó en el Servicio de Reumatología y Biología Molecular del Hospital Nacional Guillermo Almenara, Lima-Perú. Se estudiaron las muestras de sangre periférica de 40 pacientes con AR, 27 de ellos con reactividad negativa al PPD y 13 con reactividad positiva al PPD. Como grupo de referencia se obtuvieron 21 muestras de individuos sanos, trabajadores del hospital, sin enfermedades concomitantes o tratamiento inmunosupresor.

Investigación clínica y de laboratorio

En los pacientes con AR se recogieron los siguientes datos: duración de la enfermedad, número de articulaciones dolorosas y tumefactas (recuento de 28 articulaciones), rigidez matutina, valoración global de la enfermedad por el paciente y velocidad de sedimentación globular (VSG). La actividad de la AR se evaluó según el *disease activity score* en 28 articulaciones (DAS 28). Se consideró como pacientes activos los que presentaban una puntuación > 2,6. Todos los pacientes recibían dosis bajas de prednisona (< 7,5 mg/día) y metotrexato entre 7,5 a 15 mg/semana.

Colocación del PPD

Mediante la técnica de Mantoux, se aplicó a todos los participantes 5 unidades de tuberculina y la reacción dérmica fue medida a las 72 h. El punto de corte para determinar la reactividad positiva al PPD se basó en las guías de la Sociedad Americana de Tórax⁹. Se consideró como reacción positiva al PPD una induración ≥ 5 mm para los pacientes con AR y ≥ 10 mm en los controles. Se consideró como reacción negativa al PPD una induración < 5 mm, tanto en los pacientes con AR como en los controles.

Determinación de las citocinas séricas

La muestra de sangre de cada participante se centrifugó por 10 min a 1.000 g. Alicuotas de las muestras séricas se congelaron a -80 °C inmediatamente después de la recolección de la muestra. Luego, se determinaron las concentraciones séricas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α mediante la técnica de citometría de flujo utilizando el Kit Multiplex BD Cytometric Bead Array (CBA).

Análisis estadístico

Se realizó en primer lugar un análisis univariado con el cálculo de medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, y distribución de frecuencias para las cualitativas. La comparación de medianas se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney, y la relación entre las concentraciones de citocinas a través del cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. Para la comparación de variables cualitativas se realizó la prueba de χ^2 o exacta de Fisher. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 11.0 y las concentraciones séricas de citocinas se expresaron en sus valores promedios (pg/ml \pm desviación estándar [DE]).

Resultados

Se incluyeron 40 pacientes con AR con una edad media de $50,33 \pm 10,2$ años, un 92,5% eran mujeres, un 70% con enfermedad activa según DAS28 y 21 individuos controles con una edad media de $44,62 \pm 9,68$ años y un 90,5% de ellos fueron mujeres.

De los 40 pacientes con AR, 27 (67,5%) presentaron reactividad negativa al PPD y 13 (32,5%) reactividad positiva. No hubo diferencias significativas entre éstos 2 grupos respecto a la edad ($50,8 \pm 10,8$ frente a $49,3 \pm 9,15$; $p = 0,66$), el sexo femenino (el 92,6 frente al

TABLA 1. Concentraciones séricas de citocinas en pacientes con artritis reumatoide (AR) de acuerdo a su reactividad al PPD

	AR PPD (+) n = 13	AR PPD (-) n = 27	Control n = 21	Diferencias estadísticas*		
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	AR PPD (+) frente a AR PPD (-)	AR PPD (+) frente a control	AR PPD (-) frente a control
INF- γ	5,04 ± 3,6893	5,49 ± 8,9112	4,30 ± 3,47	0,385	0,218	0,755
FNT- α	0,73 ± 1,0349	1,31 ± 1,4575	1,14 ± 1,19	0,322	0,658	0,489
IL-2	1,19 ± 1,4534	2,22 ± 1,6312	2,27 ± 1,27	0,071	0,129	1,000
IL-4	2,50 ± 1,8921	2,72 ± 2,3310	3,74 ± 2,23	0,794	0,209	0,306
IL-6	11,1 ± 10,4219	12,90 ± 18,1146	11,04 ± 35,5	0,891	0,042	0,002
IL-10	2,17 ± 2,6960	1,97 ± 2,2394	2,25 ± 1,72	0,943	0,828	0,763

DE: desviación estándar; INF- γ : interferón-gamma; IL: interleucina; n: número de test séricos; TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa.

*Calculado por el test de Mann-Whitney.

Las concentraciones séricas están expresadas en pg/ml.

TABLA 2. Concentraciones séricas de citocinas en pacientes con artritis reumatoide (AR) de acuerdo a la actividad de la enfermedad

	AR activos n = 28	AR inactivos n = 12	Control n = 21	Diferencias estadísticas*		
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	AR activos frente a AR inactivos	AR activos frente a control	AR inactivos frente a control
INF- γ	7,375 ± 3,78	3,263 ± 3,02	4,30 ± 3,47	0,050	0,393	0,197
FNT- α	1,425 ± 1,604	1,438 ± 0,94	1,14 ± 1,19	0,673	0,659	0,969
IL-2	2,906 ± 1,43	1,588 ± 1,33	2,27 ± 1,27	0,600	0,470	0,181
IL-4	3,063 ± 2,28	3,725 ± 2,48	3,74 ± 2,23	0,295	0,036	0,586
IL-6	18,106 ± 22,96	9,513 ± 10,86	11,04 ± 35,5	0,092	0,001	0,129
IL-10	3,631 ± 2,331	3,35 ± 1,72	2,25 ± 1,72	0,562	0,409	0,835

DE: desviación estándar; INF- γ : interferón-gamma; IL: interleucina; n: número de test séricos; TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa.

*Calculado por el test de Mann-Whitney.

Las concentraciones séricas están expresadas en pg/ml.

Actividad según DAS 28.

92,3%; $p = 0,97$) o la actividad de la enfermedad (el 66,6 frente al 76,9%; $p = 0,71$).

En los pacientes con AR no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de las citocinas entre los grupos con reactividad positiva y negativa al PPD. Las concentraciones séricas de IL-6 fueron significativamente mayores en los pacientes con AR con PPD positivo ($p = 0,042$) y PPD negativo ($p = 0,002$) comparado con los controles (tabla 1).

En los pacientes con AR, el grupo con enfermedad activa presentó concentraciones séricas más elevadas de INF- γ ($7,375 \pm 3,78$ frente a $3,263 \pm 3,02$; $p = 0,05$) e IL-6 ($18,106 \pm 22,96$ frente a $9,513 \pm 10,86$; $p = 0,09$) comparado con el grupo de pacientes con AR inactivos, aunque esta última diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. No se encontraron diferencias en las concentraciones séricas de TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-10 entre estos 2 grupos.

Al compararlos con el grupo control, el grupo con AR activa presentó concentraciones mayores de IL-6 ($p = 0,001$) y menores de IL-4 ($p = 0,03$) comparado con el grupo control; sin embargo, no hubo diferencias en las concentraciones de IL-6 e IL-4 en el grupo con AR inactivos comparado con el grupo control (tabla 2).

En los estudios de correlación entre las citocinas séricas y la actividad de la enfermedad según DAS 28 (tabla 3), sólo se observó una correlación positiva entre el INF- γ ($r = 0,433$; $p = 0,005$) y la IL-6 ($r = 0,325$; $p = 0,041$) en los pacientes con AR (fig. 1).

Discusión

En un estudio previo⁶, demostramos una alta tasa de reactividad negativa al PPD en los pacientes con AR (70%) comparado con los controles (30%). Esta alta

TABLA 3. Correlación entre las concentraciones séricas de citocinas y actividad de la artritis reumatoide (AR) (n = 40)

		INF- γ	TNF α	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10
Actividad	r (Spearman)	0,433 ^a	0,003	0,047	0,325 ^b	0,038	0,138
	Valor p	0,005	0,987	0,774	0,041	0,818	0,397

INF- γ : interferón-gamma; IL: interleucina; n: número de test séricos; TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa.

Actividad según DAS 28.

^aLa correlación es significativa para alfa = 0,01 (bilateral).

^bLa correlación es significativa para alfa = 0,05 (bilateral).

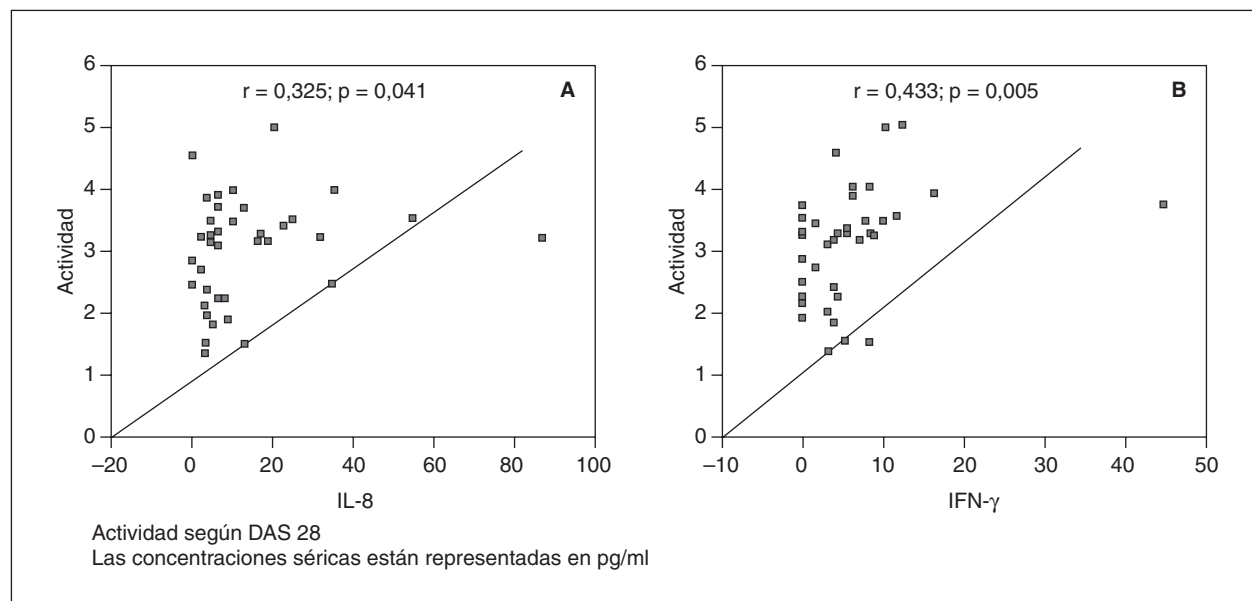


Figura 1. Las concentraciones séricas de IL-6 (A) e IFN- γ (B) fueron las únicas citocinas que mostraron correlación positiva con la actividad de la AR. AR: artritis reumatoide; IFN: interferón-gamma; IL: interleucina.

tasa de negatividad al PPD no se puede explicar por un patrón de citocinas séricas en particular, pues en este estudio las concentraciones séricas de las citocinas estudiadas fueron similares en los pacientes con AR, tanto en el grupo con reactividad negativa como en el grupo con reactividad positiva al PPD.

Si bien es cierto que en ningún estudio previo se ha analizado el perfil de citocinas séricas en pacientes con AR de acuerdo a su reactividad al PPD *in vivo*, algunos estudios *in vitro* han pretendido estudiar los mecanismos implicados en esta respuesta proliferativa deficiente.

Es una observación conocida que la hipersensibilidad cutánea retardada *in vivo*^{5,6} y la proliferación de células T *in vivo* a antígenos memorizados¹⁰, por parte de las células T de la membrana sinovial reumatoide, se encuentra disminuida frente a sujetos controles. Los mecanismos implicados en esta respuesta reducida son desconocidos, aunque se han propuesto varios, incluyendo la participación de IL-10 y FNT- α . Corrigan et al¹¹ propusieron que la respuesta proliferativa deficiente al derivado proteico purificado de la tuberculina por las células T de sangre periférica de AR era el resultado de

una proporción relativamente alta de IL-10 secretada frente a IL-2, más que a la cantidad absoluta de IL-2 producida.

Katsikis et al¹² fueron capaces de demostrar que la IL-10 ejercía un efecto regulador negativo, ya que la adición de anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 a explantes de membrana sinovial reumatoide *in vitro* conducía a un incremento en la producción de citocinas, así como a un aumento en la proliferación de células T. Yudoh et al¹³ concluyeron que en la AR, la presencia reducida del subgrupo de células T CD4+ que producen IL-10 podrían ser responsables del predominio de las células Th1 sobre las Th2 en los lugares de inflamación sinovial y en sangre periférica.

Otros mecanismos adicionales que resultan en una proliferación deficiente de células T ante la exposición antigénica incluyen la exposición crónica al FNT- α ⁸ o la producción de citocinas de tipo 2, como la IL-10.

A diferencia de estos resultados realizados en estudios *in vitro*, en muchos de ellos utilizando mitógenos como activadores de actividad de las células T, nosotros no encontramos concentraciones séricas aumentadas de

IL-2, IL-10, TNF- α o IFN- γ en nuestros pacientes con AR con reactividad negativa al PPD. Aunque la explicación para estas aparentes discrepancias no es muy clara, es probable que se deban a las diferencias en las técnicas de cultivo y aislamiento, y diferencias en los estímulos utilizados. Además, debe tomarse en cuenta que la producción estimulada de citocinas no necesariamente concuerda con el estatus de citocinas *in vivo*. Es importante recalcar que es el primer estudio en la bibliografía en determinar las concentraciones de citocinas séricas *in vivo* en estado espontáneo, sin utilizar mitógenos como activadores de células mononucleares, en los pacientes con respuesta atenuada al PPD.

Este estudio muestra que no hay una predominancia de TNF- α , IL-1 e IFN- γ en sangre periférica en nuestros pacientes con AR comparado con los controles. Estos hallazgos llaman la atención pues esperaríamos que la alta actividad celular tipo Th1 en la sinovia, la que lleva a la activación macrofágica y subsiguiente inflamación, debería hallarse también en la periferia. Estas diferencias se podrían explicar por la migración selectiva de células Th1 desde la sangre periférica hacia la articulación inflamada y consecuentemente una disminución en las células productoras de estas citocinas en la sangre periférica¹⁴.

En este estudio se refuerzan los hallazgos realizados en estudios previos donde se comprueba el rol de la IL-6 en la actividad de la AR, pues ésta se encontró en concentraciones séricas más elevadas en los pacientes con enfermedad activa comparado con los pacientes con AR inactivos ($p = 0,09$) y los sujetos controles ($p = 0,001$). En un estudio realizado por Gratacós et al¹⁵, se encontraron concentraciones séricas aumentadas de IL-6 y TNF- α en los pacientes con AR comparado con sujetos con espondilitis anquilosante y dolor lumbar no inflamatorio. La producción de IL-6 promueve la diferenciación de las células B y la maduración hacia células secretoras de anticuerpos. De hecho, las concentraciones altas de IL-6 correlacionan con concentraciones altas de factor reumatoide¹⁶. Más aún, la IL-6 promueve la resorción ósea y puede jugar un rol importante en la osteoporosis periarticular característica de la AR temprana. Además, induce la diferenciación de la célula B, activa la célula T e induce la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos¹⁷. Las concentraciones séricas de IL-6 en nuestros pacientes están altamente correlacionados con los niveles de actividad de la enfermedad ($p = 0,041$), al igual que en otros estudios donde hay correlación de la IL-6 con las concentraciones de proteína C reactiva, un indicador de actividad en la AR¹⁸.

Extraña el no aumento del TNF- α en nuestros pacientes con AR, sobre todo si son activos respecto a los controles. Podría deberse a diferencias en la medicación de

los pacientes o incluso al polimorfismo genético que controla la producción de TNF- α . Tampoco se descarta que se trate de una característica de esta citocina en su forma de actuar o un sesgo debido al tamaño muestral. En conclusión, a la vista de los resultados, no parece que haya diferencias en el patrón de citocinas séricas en los pacientes con AR de acuerdo a su reactividad al PPD.

Bibliografía

1. Barnetson R, Gawkrödger D, Britton W. Tuberculin-Type Hipersensitivity. En: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. Immunology. London: Mosby; 1996. p. 25.5
2. Emery P, Panayi GS, Nouri AM. Interleukin-2 reverses deficient cell-mediated immune responses in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 1984;57:123-9.
3. Kingsley GH, Pitzalis C, Panayi GS. Abnormal lymphocyte reactivity to self major histocompatibility antigens in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1987;14:667-73.
4. Paimela L, Johansson-Stephansson EA, Koskimies S, Leurisalo-Repo M. Depressed cutaneous cell mediated immunity in early rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 1990;8:433-7.
5. Helliwell MG, Panayi GS, Unger A. Delayed cutaneous hypersensitivity in rheumatoid arthritis: the influence of nutrition and drug therapy. Clin Rheumatol. 1984;3:39-43.
6. Ponce de León D, Acevedo-Vásquez E, Sánchez-Torres A, Cucho M, Alfaro J, Perich R, et al. Attenuated response to purified protein derivative in patients with rheumatoid arthritis: study in a population with a high prevalence of tuberculosis. Ann Rheum Dis. 2005;64:1360-1.
7. De Waal R, Haanen J, Spits HM. Interleukin 10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med. 1991;174:915-24.
8. Cope AE, Landei M, Chu NR, et al. Chronic exposure to TNF in vitro impairs the activation of T cells through the T cell receptor/CD3 complex; reversal in vivo by anti-TNF antibodies in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 1994;94:749-55.
9. American Thoracic Society. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. Am J Resp Crit Care Med. 2000;161:221-47.
10. Kingsley GH, Panayi GS. Mechanism of the deficient mononuclear cell response to tuberculin PPD in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 1986;5:149-52.
11. Corrigal VM, Garyfallos G, Panayi GS. The relative proportions of secreted interleukin 2 and interleukin 10 determine the magnitude of rheumatoid arthritis T-cell proliferation to the recall antigen tuberculin purified protein derivative. Rheumatology. 1999;38:1203-7.
12. Katsikis PD, Chu C, Brennan FM, et al. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. J Exp Med. 1994;179:1517-22.
13. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, et al. Reduced expression of the regulatory CD4 + T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000;43:617-23.
14. Al-Janadi M, Al-Balla S, Al-Dalaan A, Raziuddin S. Cytokine production by helper T cell populations from the synovial fluid and peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 1993;20:1647-53.
15. Gratacós J, Collado A, Filella X, Sanmarti R, Cañete J, Llena J, et al. Serum cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 and IFN- γ) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. Br J Rheum. 1994;33:927-33.
16. Holt I, Cooper RG, Hopkins SJ. Relationships between local inflammation, IL-6 concentration and the acute phase protein response in arthritis patients. Eur J Clin Invest. 1991;21:479-84.
17. Smith B, Haynes M. Rheumatoid Arthritis-A Molecular Understanding. Ann Internal Med. 2002;136:908-22.
18. Brozik M, Rosztoczy I, Meretey K, et al. IL-6 levels in synovial fluids of patients with different arthritides: Correlation with local IgM rheumatoid factor and systemic acute phase protein production. J Rheumatol. 1992;19:63-8.