

**Tesis Doctoral**  
**Universitat de Barcelona**  
**Facultat de Medicina**

**Departament d'Obstetricia-Ginecologia, Pediatria, Radiologia i Anatomia**

**EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS  
EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EN  
ESPECIAL EN LOS SUBTIPOS DE LOS MONOCITOS  
EN PACIENTES CON ARTRITIS IDIOPÁTICA JUVENIL  
DE INICIO SISTÉMICO COMPARADOS CON  
INDIVIDUOS SANOS.**

**Tesis presentada por Jordi Antón López para optar  
al grado de Doctor en Medicina**

**Director: Profesor Rafael Jiménez González**

**Barcelona, 2008**



*A Vicent pel seu Amor i amb el meu Amor, per la vida junts.*

*A mis padres por su cariño y entrega, por ser siempre un apoyo y ejemplo.*

*A los niños que todos llevamos dentro, a los que fueron, a los que son y a los que vendrán, porque, como dijo el poeta, la verdadera patria del hombre es su infancia.*



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a la doctora Virginia Pascual, sin cuya generosidad personal y científica este proyecto no podría haberse llevado a cabo. Su ejemplo, combinando un excelente nivel científico, la entrega a sus pacientes y colaboradores con una calidad humana indudable, es un modelo a seguir, y su amistad es un preciado tesoro. Agradecerle también al profesor Rafael Jiménez cuyo ánimo, apoyo e insistencia han sido claves a la hora de llegar a buen puerto.

Agradecer también la ayuda de todos los miembros del *Baylor Institute for Immunology Research* de Dallas, Texas. En especial al doctor Edsel Arce, en primer lugar por brindarme su amistad, en segundo por su paciencia enseñándome a procesar y analizar las muestras, sin él este estudio no habría sido posible.

Quisiera agradecer también a todos aquellos compañeros que me han acompañado en mi formación profesional, primero como pediatra, y después como especialista en Reumatología Pediátrica. Gracias a la doctora Pepi Rivera, ejemplo y acicate y que me animo a emprender este viaje por la Reumatología Pediátrica. Gracias también a los compañeros del Hospital de Sabadell, y en especial a las doctoras Montse Bosque, y María Teresa Marco(†), ellas fueron las primeras que me enseñaron a apreciar el mundo de la Reumatología Pediátrica y con su generosidad me animaron. Gracias también al doctor Jordi Pou, por su apoyo constante en la nueva etapa de mi vida profesional en el Hospital Sant Joan de Déu, gracias a él todo ha sido más fácil, gracias en especial porque rápidamente me hizo sentir parte del equipo, y porque ha confiado en un proyecto de futuro para la Unidad de Reumatología Pediátrica. Gracias también a mis compañeros del Servicio de Pediatría, y a los residentes, pieza clave en un hospital docente. Gracias a los compañeros de Urgencias de Pediatría, que con frecuencia ayudan a parar los primeros golpes. Gracias en especial a mis compañeros pediatras reumatólogos, al doctor Joan Ros, siempre con alguna sugerencia desde la experiencia, gracias a las doctoras Rosa Bou y Silvia Ricart, que me han permitido repetidamente rescatar tiempo para este proyecto, y cuyos ánimos han sido constantes. Trabajar con ellas es una de las mejores satisfacciones profesionales.

Gracias a Susana Ochoa, su ayuda con el manejo estadístico de los datos ha sido fundamental. Gracias también a Esperanza Tuset, por su ayuda con la impresión de las tablas de gráficos. Gracias a Ana Sáez, por sus ánimos y por enseñarme como navegar por los caminos administrativos.

Gracias a mi familia y en especial a mis padres, por su cariño, apoyo y ejemplo en la vida. De ellos proviene probablemente esa costumbre de intentar hacerlo todo y siempre de la mejor manera posible.

Gracias a Vicent, sin su apoyo y amor este proyecto habría fracasado multitud de veces. Es el puerto del cual partir y al cual llegar al final del día.

Gracias en especial a los niños con enfermedades reumáticas y a sus familias, tanto los que se ofrecieron a colaborar en Dallas, como los que seguimos en nuestras consultas. Su ánimo es fundamental a la hora de luchar cada día por conocer mejor estas enfermedades y así poder tratarlas eficazmente.







## INDICE

Índice	.....	1
Índice de Tablas y Figuras	.....	5
Listado de abreviaturas utilizadas	.....	7
<b>1. Introducción</b>	<b>.....</b>	<b>9</b>
1.1. La Artritis Idiopática Juvenil	.....	11
1.2. La Artritis Idiopática Juvenil de inicio Sistémico	.....	13
1.2.1. Definición	.....	13
1.2.2. Incidencia	.....	13
1.2.3. Clínica	.....	14
1.2.4. Etiología y Patogénesis	.....	15
1.2.4.1. Predisposición genética	.....	15
1.2.4.2. Autoanticuerpos y linfocitos	.....	15
1.2.4.3. Citoquinas y mediadores autoinflamatorios	.....	16
1.2.5. Diagnóstico	.....	19
1.2.6. Tratamiento	.....	20
1.2.7. Pronóstico	.....	21
1.3. Quimioquinas	.....	23
1.3.1. Quimioquinas en enfermedades autoinmunes.	.....	23
1.3.2. Quimioquinas en la Artritis Idiopática Juvenil	.....	27
1.4. Monocitos y sus subtipos	.....	30
<b>2. Hipótesis de trabajo</b>	<b>....</b>	<b>35</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>.....</b>	<b>39</b>
3.1. Objetivo principal	.....	41
3.2. Objetivos secundarios	.....	41
<b>4. Material y métodos</b>	<b>.....</b>	<b>43</b>
4.1. Pacientes	.....	45

4.2. Selección de anticuerpos	.....	46
4.3. Preparación de las muestras	.....	48
4.4. Análisis de las muestras	.....	50
4.5. Análisis estadístico	.....	52
<b>5. Resultados</b>	<b>.....</b>	<b>53</b>
5.1. Características de los pacientes e individuos control	.....	55
5.2. Análisis individuos sanos versus pacientes con AIJiS	.....	60
5.2.1. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS Asintomáticos Sin Tratamiento	.....	65
5.2.2. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS Asintomáticos Con Tratamiento	.....	67
5.2.3. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS Sintomáticos Sin Tratamiento	.....	71
5.2.4. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS Sintomáticos Con Tratamiento	.....	72
5.3. Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS	.....	76
5.3.1. Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Asintomáticos Sin Tratamiento	.....	79
5.3.2. Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Asintomáticos Con Tratamiento	.....	80
5.3.3. Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Sintomáticos Sin Tratamiento	.....	83
5.3.4. Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Sintomáticos Con Tratamiento	.....	84
5.4. Análisis pacientes con AIJiS sintomáticos versus pacientes asintomáticos	.....	87
5.5. Análisis pacientes con AIJiS en tratamiento versus pacientes sin tratamiento	.....	92
5.6. Resumen de las diferencias significativas y tendencias en los diferentes subtipos celulares según marcador de superficie celular.	.....	105

<b>6. Discusión</b>	.....	<b>113</b>
6.1 Análisis de las diferencias en sangre periférica entre sujetos sanos y pacientes con AIJiS	.....	116
6.1.1 Análisis de las diferencias en las principales poblaciones celulares en sangre periférica entre sujetos sanos y pacientes con AIJiS.	.....	116
6.1.2 Análisis de las diferencias en los principales marcadores de superficie celulares entre sujetos sanos y pacientes con AIJiS	.....	121
6.2 Análisis de las diferencias entre pacientes con AIJiS sintomáticos versus asintomáticos.	.....	139
6.2.1 Análisis de las diferencias en las principales poblaciones celulares en sangre periférica entre pacientes con AIJiS sintomáticos versus asintomáticos.	.....	139
6.2.2 Análisis de las diferencias en los principales marcadores de superficie celular entre pacientes con AIJiS sintomáticos versus asintomáticos	.....	142
6.3 Análisis de las diferencias entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados.	.....	148
6.3.1 Análisis de las diferencias en las principales poblaciones celulares en sangre periférica entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados.	.....	148
6.3.2 Análisis de las diferencias en los principales marcadores de superficie celular entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados.	.....	150
<b>7. Resumen</b>	.....	<b>161</b>
<b>8. Conclusiones</b>	.....	<b>173</b>
<b>9. Bibliografía</b>	.....	<b>177</b>
<b>10. Anexos</b>	.....	<b>207</b>
10.1. Anexo I: Individuo sano H76	.....	209
10.1.1. Gráficos para CCR1	.....	210
10.1.2. Gráficos para CCR4	.....	212

10.1.3. Gráficos para CXCR2	.....	214
10.1.4. Gráficos para CXCR4	.....	216
10.1.5. Gráficos para CD62-L	.....	218
10.1.6. Gráficos para CD64	.....	220
10.1.7. Gráficos para Células Dendríticas	.....	222
10.2. Anexo II: Paciente SYS 2	.....	223
10.2.1. Gráficos para CCR1	.....	224
10.2.2. Gráficos para CCR2	.....	226
10.2.3. Gráficos para CCR4	.....	228
10.2.4. Gráficos para CCR5	.....	230
10.2.5. Gráficos para CXCR1	.....	232
10.2.6. Gráficos para CXCR2	.....	234
10.2.7. Gráficos para CXCR4	.....	236
10.2.8. Gráficos para CD40	.....	238
10.2.9. Gráficos para CD62-L	.....	240
10.2.10. Gráficos para CD64	.....	242
10.2.11. Gráficos para Células Dendríticas	.....	244
10.3. Anexo III: Gráficos accesorios	.....	245

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Índice de Tablas:

<b>Tabla 1.</b> Criterios para la clasificación de la Artritis Reumatoide Juvenil	.....	12
<b>Tabla 2.</b> Criterios para el diagnóstico de Artritis Crónica Juvenil	.....	12
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de la Artritis Idiopática Juvenil (Edmonton 2001)	.....	12
<b>Tabla 4.</b> Actividad biológica y potencia relativa de IL-1, IL-6 y TNF en la inducción de la respuesta inflamatoria sistémica y local.	.....	17
<b>Tabla 5.</b> Familias CXC, C, CX <sub>3</sub> C y CC de quimioquinas y receptores	.....	24
<b>Tabla 6.</b> Quimioquinas con un papel relevante en las enfermedades inflamatorias reumáticas.	.....	26
<b>Tabla 7.</b> Receptores de quimioquinas con sus ligandos más relevantes implicados en la artritis	.....	27
<b>Tabla 8.</b> Fenotipo de los dos subtipos principales de monolitos.	.....	33
<b>Tabla 9.</b> Datos demográficos (diagnóstico, edad al diagnóstico, en el momento del análisis y sexo).	.....	56
<b>Tabla 10.</b> Manifestaciones clínicas.	.....	57
<b>Tabla 11.</b> Datos de laboratorio (hemograma y VSG)	.....	58
<b>Tabla 12.</b> Tratamientos	.....	59

**Índice de Figuras:**

**Figura 1.** Subtipos de células dendríticas humanas y su relación con los precursores monocíticos. .... 34

## **LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS:**

**ACJ:** artritis crónica juvenil

**ACR:** *American College of Rheumatology*

**AIJ:** artritis idiopática juvenil

**AIJiS:** artritis idiopática juvenil de inicio sistémico

**AINES:** antiinflamatorios no esteroideos

**APC:** *allophycocyanin*

**AR:** artritis reumatoide

**ARJ:** artritis reumatoide juvenil

**Asint No Tx:** pacientes asintomáticos sin tratamiento

**Asint Tx Cortis:** pacientes sintomáticos en tratamiento con corticoides

**CAPS:** *Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes*

**CINCA:** *Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular*

**DCs:** *dendritic cells*

**EULAR:** *European League Against Rheumatism*

**FACS:** *fluorescence-activated cell sorter*

**FCS:** *fetal calf serum*

**FITC:** *fluorescein isothiocyanate*

**FSC:** *forward scatter*

**G-CSF:** *granulocyte colony-stimulating factor*

**GM-CSF:** *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

**HLA:** *human leukocyte antigen*

**HLH:** *hemophagocytic lymphohistiocytosis*

**IFN:** interferon

**IL:** interleuquina

**ILAR:** *International League of Associations for Rheumatology*

**LES:** lupus eritematoso sistémico

**MHC:** *major histocompatibility complex*

**MPO:** mieloperoxidasa

**NK:** *natural killer*

**NOMID:** *Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease*

**PBMCs:** *peripheral blood mononuclear cells*

**PBS:** *phosphate buffered saline*

**PCR:** proteína C reactiva

**PE:** *phycoerythrin*

**PerCP:** *peridinin-chlorophyll protein*

**SAM:** Síndrome de activación del macrófago

**SNC:** sistema nervioso central

**Sint No Tx:** pacientes sintomáticos sin tratamiento con corticoides

**Sint Tx Cortis:** pacientes sintomáticos en tratamiento con corticoides

**SSC:** *side scatter*

**TNF:** *tumor necrosis factor*

**TRAPS:** *Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Periodic Syndrome*

**vs:** versus

**VSG:** velocidad de sedimentación globular



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1. La Artritis Idiopática Juvenil

La Artritis Idiopática Juvenil (AIJ), previamente conocida como Artritis Crónica Juvenil (ACJ) en Europa o Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) en Norteamérica, no es una entidad única sino que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades, con diferentes manifestaciones iniciales (articulares y sistémicas), patogenia, curso evolutivo, pronóstico y tratamiento. La AIJ es la enfermedad del tejido conectivo más frecuente en la infancia, y una de las más frecuentes enfermedades crónicas en la edad pediátrica, siendo todavía hoy día una causa importante de discapacidad a corto y largo plazo.(1)

La clasificación de las artritis crónicas en la infancia ha sido un problema durante décadas. En los años 70 se propusieron dos grupos de criterios para la clasificación de las artritis crónicas en la infancia. El *American College of Rheumatology* (ACR) propuso el término Artritis Reumatoide Juvenil y desarrolló y validó una serie de criterios (**Tabla 1**).<sup>(2)</sup> Por su parte la *European League Against Rheumatism* (EULAR) propuso el término Artritis Crónica Juvenil (**Tabla 2**).<sup>(3)</sup> Con posterioridad una tercera clasificación fue propuesta por el Grupo de Trabajo Pediátrico de la ILAR (*International League of Associations for Rheumatology*).<sup>(4)</sup> Esta clasificación y sus subsiguientes revisiones <sup>(5,6)</sup> fueron desarrolladas con la intención de delinear, con intenciones investigadoras, categorías de artritis idiopática en la infancia relativamente homogéneas y mutuamente excluyentes basadas preferentemente en hallazgos clínicos y de laboratorio (**Tabla 3**).<sup>(6)</sup>

**Tabla 1.** Criterios para la clasificación de la Artritis Reumatoide Juvenil

- 1.- Edad al inicio menor de 16 años
- 2.- Artritis (tumefacción o derrame, o presencia de dos o más de los signos siguientes: limitación del grado de movimiento, dolor, y aumento de temperatura) en una o más articulaciones.
- 3.- Duración de la enfermedad de 6 o más semanas.
- 4.- Tipo de inicio definido por el inicio de la enfermedad en los primeros 6 meses:
  - a.- Poliartrosis:  $\geq 5$  articulaciones inflamadas
  - b.- Oligoartritis (enfermedad pauciarticular):  $< 5$  articulaciones inflamadas
  - c.- Inicio sistémico: artritis con fiebre característica
- 5.- Exclusión de otras formas de artritis juvenil.

**Tabla 2.** Criterios para el diagnóstico de Artritis Crónica Juvenil

- 1.- Edad al inicio menor de 16 años
- 2.- Artritis en una o más articulaciones.
- 3.- Duración de la enfermedad de 3 o más meses.
- 4.- Tipo definido por las características al inicio:
  - a.- Pauciarticular:  $< 5$  articulaciones
  - b.- Poliarticular:  $> 4$  articulaciones, factor reumatoide negativo
  - c.- Sistémica: artritis con fiebre característica
  - d.- Artritis Reumatoide Juvenil:  $> 4$  articulaciones, factor reumatoide positivo
  - e.- Espondilitis anquilosante juvenil
  - f.- Artritis psoriática juvenil.

**Tabla 3.** Clasificación de la Artritis Idiopática Juvenil (Edmonton 2001)

- 1.- Sistémica
- 2.- Oligoartritis
- 3.- Poliartrosis (factor reumatoide negativo)
- 4.- Poliartrosis (factor reumatoide positivo)
- 5.- Artritis psoriática
- 6.- Artritis relacionada con entesitis
- 7.- Artritis indiferenciada.

## **1.2. La Artritis Idiopática Juvenil de inicio Sistémico**

### **1.2.1. Definición:**

La forma de inicio sistémico en las artritis crónicas de la infancia ya fue descrita por primera vez por George Frederic Still en 1897.(7) De hecho esta forma de inicio está presente sólo con mínimas matizaciones en las tres clasificaciones más comúnmente aceptadas (ACR, EULAR, ILAR).(2,3,6)

La Artritis Idiopática Juvenil de inicio Sistémico (AIJiS) es definida por la ILAR como aquella artritis en una o más articulaciones acompañada o precedida de fiebre de al menos 2 semanas de duración y que ha sido documentada como diaria (“cotidiana”) al menos durante 3 días seguidos, y que se acompaña de uno o más de los siguientes: exantema evanescente eritematoso (no fijo), aumento de tamaño de los ganglios linfáticos generalizado, hepatomegalia y/o esplenomegalia y serositis. La ILAR a diferencia de otras clasificaciones con el fin de homogeneizar los grupos considera como criterios excluyentes la presencia de psoriasis o una historia de psoriasis en un familiar de primer grado, la presencia de artritis en un niño HLA-B27 + de inicio posterior a los 6 años de edad, la presencia de espondilitis anquilosante, artritis relacionada con entesitis, sacroileitis con enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de Reiter, o uveitis anterior aguda, o una historia de alguna de estas entidades en un familiar de primer grado y la presencia de un factor reumatoide IgM al menos en 2 determinaciones con al menos 3 meses de diferencia en las determinaciones.

### **1.2.2. Incidencia:**

Los datos sobre incidencia de la AIJ varían entre 1’9 y 22’6 por 100.000 niños/año.(8,9) Esto es debido a que los trabajos publicados están sujetos a diferentes sesgos, como son las diferencias en los criterios de definición, el acceso a los sistemas de salud de las poblaciones estudiadas, los criterios de derivación, las fuentes consultadas (estudios poblacionales, clínicos, basados en los profesionales o encuestas de salud), la raza o los años incluidos en la observación.(10,11) Las cifras de prevalencia oscilan entre 10 y

148'1 por 100.000 niños.(8,9) En España, en un reciente estudio sobre la incidencia y prevalencia en Catalunya, las cifras parecen ser menores con una incidencia de 6'86 por 100.000 habitantes menores de 16 años y una prevalencia de 40'2 por 100.000 habitantes menores de 16 años, cifras similares a las de otros países del sur de Europa (Modesto C., Antón J., Rodríguez B., Bou R., Ros J., Arnal C., Barceló P. *Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Catalonia (Spain)*, en preparación).

Los trabajos publicados muestran que la forma de inicio Sistémico de la AIJ representa entre un 10'7% y un 19'49% del total de las AIJ.(12) Con cifras de incidencia calculadas de entre 0'4 y 0'9 por 100.000 niños/año.(13,14) En el estudio realizado en Catalunya las formas de inicio sistémico representarían un 6'9% de los casos incidentes y un 8'8% de los casos prevalentes, (Modesto C., Antón J., Rodríguez B., Bou R., Ros J., Arnal C., Barceló P. *Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Catalonia (Spain)*, en preparación).

Afecta por igual a niños y niñas, y si bien se ha descrito en todas las edades pediátricas, algunos autores han descrito una mayor incidencia entre el año y los cinco años de edad.(15)

### **1.2.3. Clínica:**

La AIJiS se caracteriza por la presencia de síntomas sistémicos, la fiebre es característica, con picos una o dos veces al día hasta 39° C con un rápido descenso hasta la normalidad y un predominio por la tarde-noche. Este patrón en algunas ocasiones al inicio de la enfermedad puede no estar presente. También es típica la presencia de un exantema evanescente, de predominio en el tronco y la parte proximal de las extremidades. El exantema es migratorio, casi siempre asociado a los picos febriles, clásicamente descrito como asalmonado, con un centro pálido, macular en un 90%, maculo-papular en un 10%. En algunas ocasiones puede ser pruriginoso o tener un fenómeno de Koebner asociado. En unos 2/3 de los pacientes se asocian hepatomegalia, esplenomegalia y/o poliadenopatias, y en un 25% de los casos podemos encontrar poliserositis.(15,16)

La artritis puede afectar una o más articulaciones, y puede aparecer al inicio de la enfermedad o durante el desarrollo de la misma, siendo el patrón más característico un inicio oligoarticular con un curso poliarticular.(15)

#### **1.2.4. Etiología y Patogénesis**

##### ***1.2.4.1. Predisposición genética***

La etiología de la AIJiS es desconocida. A pesar de que la AIJiS raramente es familiar se han realizado múltiples estudios, así el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por *major histocompatibility complex*) en el brazo corto del cromosoma 6 ha sido analizado extensamente, y se han encontrado asociaciones con genes HLA y no-HLA. Las asociaciones genéticas con los alelos del MHC se han documentado con HLA de clase II, pero también con ciertos alelos de clase I. Estas asociaciones se relacionan fundamentalmente con el subtipo de AIJ y con la edad,(17) y son más importantes para las formas oligoarticular y poliarticular de la AIJ.(18) Para la AIJiS, se ha observado la asociación con HLA-B8, HLA-Bw35,(19,20) y HLA-DR4,(19,21) mientras que el HLA-DPB1\*0401 se ha asociado con un efecto protector en población caucásica.(22) En población japonesa se han descrito asociaciones con HLA-DRB1\*0401 y HLA-DRB1\*0405.(23) No obstante hay que decir que la mayoría de estas asociaciones no han podido ser confirmadas en estudios posteriores.(24)

##### ***1.2.4.2. Autoanticuerpos y linfocitos***

No se han identificado anticuerpos ni inmunocomplejos característicos en la AIJiS, por lo que parece improbable que estos jueguen un papel importante en la patogénesis de la AIJiS.(15)

Las cifras de linfocitos B se muestran aumentadas.(25,26) En cambio los estudios sobre el papel de los linfocitos T y sus fenotipos han sido contradictorios. En algunos estudios se mostraba un aumento de la frecuencia de los CD8,(27,28) mientras que en otros estaba disminuida.(29,30) Otros autores no hallan un incremento en la activación o marcadores de diferenciación de células T en pacientes con AIJiS, pero si muestran un

descenso importante de las cifras de células *natural killer* (NK) circulantes.(31) Este descenso en las cifras de células NK se ha descrito también en el síndrome de activación del macrófago (SAM),(32) complicación descrita en muchas enfermedades reumáticas, pero especialmente en la AIJiS. El SAM es similar a la linfocitosis hemofagocítica, trastorno genético con una función disminuida o ausente de las células NK. Para algunos autores esta disfunción de las células NK permitiría diferenciar la AIJiS de otras formas de AIJ.(33) De hecho para algunos autores el SAM estaría íntimamente implicado en la patogénesis de la AIJiS, y el SAM oculto sería mucho más común de lo esperado, llegando a identificar, cuando se realizan punciones de médula ósea, extensiones compatibles con SAM hasta en el 53% de los pacientes.(34)

#### ***1.2.4.3. Citoquinas y mediadores autoinflamatorios***

Cada vez se reconoce más el papel que en enfermedades, como la AIJiS, juega el balance entre las citoquinas pro-inflamatorias y las anti-inflamatorias. Las 2 mayores citoquinas inflamatorias inducidas por la activación de la respuesta inmune innata son el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor*) y la interleuquina 1 (IL-1). Ambas citoquinas son claves en el inicio de la respuesta inflamatoria, así como en la inducción de la producción de otras citoquinas inflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6) y algunas quimioquinas. Existen otras citoquinas contra-reguladoras o anti-inflamatorias como son el receptor soluble del TNF, el receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA) y la proteína accesoria de la IL-1 (AcP).

A pesar de que hay un cierto solapamiento en las acciones de la red de citoquinas, parece deducirse de modelos animales y diferentes enfermedades humanas que las citoquinas varían en diferentes enfermedades. Así por ejemplo en un cuadro autoinflamatorio como los CAPS (*Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes*, o síndromes periódicos asociados a criopirina), que agrupan a enfermedades como el síndrome de Muckle-Wells, la Urticaria familiar por Frío o el síndrome CINCA (por *Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular Syndrome*), también conocido como NOMID (por *Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease*), se ha visto sólo una moderada respuesta a los anti-TNF y en cambio una buena respuesta a la inhibición de IL-1.(35,36)



Se han publicado varios estudios que intentan analizar la producción de citoquinas y de inhibidores de citoquinas en muestras de sangre de pacientes con AIJiS. Así en los pacientes con AIJiS se han encontrado aumentos del receptor soluble de IL-2 (sIL-2R),(37,38) y del receptor soluble del TNF (p55 sTNFR).(38,39) Sin embargo si comparamos con la IL-6 o IL-1 no hay correlaciones claras entre los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  y los hallazgos típicos de la AIJiS (**Tabla 4**).(40) Por otra parte, y por lo que respecta al TNF- $\alpha$ , al analizar la expresión en el tejido sinovial y los niveles en el líquido sinovial,(41,42) en las articulaciones de los pacientes con AIJiS se encuentran cifras de TNF-  $\alpha$  similares a otras formas de AIJ y a la AR, sin embargo sabemos que la respuesta a inhibidores del TNF- $\alpha$  tanto por lo que respeta a los síntomas articulares como sistémicos es inferior a la de otras formas de AIJ,(43,44) lo que sugiere que el TNF- $\alpha$  no juega un papel relevante en la AIJiS.(40)

**Tabla 4.** Actividad biológica y potencia relativa de IL-1, IL-6 y TNF en la inducción de la respuesta inflamatoria sistémica y local.

	<b>IL-1</b>	<b>IL-6</b>	<b>TNF</b>
<b>Sistema Nervioso Central</b>			
Fiebre	++	+++	+
Producción hipotalámica de Factor liberador de corticotropina	+	+++	+
<b>Hígado</b>			
Producción de proteínas fase aguda	++	+++	+
<b>Médula ósea</b>			
Aumento polimorfonucleares	+	+++	++
Trombocitopoyesis	-	+++	-
Inhibición de la eritropoyesis	++	++	++
<b>Células endoteliales</b>			
Aumento en la permeabilidad vascular y vasodilatación	+++	+	++
Inducción de quimioquinas y moléculas de adhesión	+	++	+++
Inducción de fenotipo procoagulante	+	+	+++
<b>Fibroblastos</b>			
Liberación de metaloproteinasas y prostaglandinas	+++	-	++
Proliferación	+++	++	-

En cambio diferentes estudios muestran como los niveles de IL-6 están aumentados en el suero y el líquido sinovial de los pacientes con AIJiS.(42) o como las células mononucleares de sangre periférica o de la sinovial expresan espontáneamente niveles altos de IL-6 en los pacientes con AIJiS.(45) Por otra parte otros autores muestran como los niveles de IL-6 se correlacionan con las manifestaciones extraarticulares de la AIJiS,

y así aumentan con los picos de fiebre, y como se correlacionan con la actividad de la enfermedad y el recuento plaquetar.(46,47)

Además en los pacientes con AIJiS se han descritos polimorfismos en el gen promotor de IL-6 que se han asociado con un aumento de la producción de IL-6 (G por C en la posición 174).(48,49) Hay que mencionar no obstante que también se han demostrado una asociación entre la AIJiS y algunos polimorfismos asociados al TNF- $\alpha$ , T por C en la posición 1031C, C por A en la posición 863A y C por T en la posición 857T del alelo del gen del TNF-  $\alpha$ .(23). Entre los polimorfismos asociados a AIJiS también se han descrito polimorfismos del factor inhibidor de los macrófagos (MIF).(50,51)

Por lo que respecta al papel de la IL-1, se han documentado niveles de IL-1 $\beta$  circulantes aumentados en la AIJiS, aunque al compararlos con otras tipos de artritis estos eran más bajos que en formas como la AIJ poliarticular.(52) Otros autores en cambio describen niveles disminuidos(53) y no hay correlación entre los niveles circulantes de IL-1 y los picos de fiebre.(54) Por lo que respecta a los niveles de IL-1 $\beta$  en el líquido sinovial estos son similares a aquellos presentes en la AIJ oligoarticular o la AR.(42)

Sin embargo en un reciente trabajo se muestra como el suero de pacientes con AIJiS induce la transcripción de genes de la inmunidad innata, incluyendo la IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en las células mononucleares de sangre periférica, y como estas células después liberan grandes cantidades de IL-1  $\beta$ .(55) Además el uso de un antagonista del receptor de IL-1 (anakinra) se ha mostrado eficaz en el control de los síntomas clínicos y los hallazgos de laboratorio en los pacientes con AIJiS.(55,56)

Otros trabajos han mostrado un aumento de IL-18 (o CXCL8) en pacientes con AIJiS, además de una relación entre los niveles más altos y las manifestaciones extraarticulares en estos pacientes.(57) Y también el posible papel que citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 pueden tener, ya que se ha visto que los pacientes con AIJiS tienen una capacidad reducida para producir IL-10.(58)

El conocimiento sobre el papel de las citoquinas en la patogénesis de la AIJiS ha aumentado en los últimos años. Estos estudios, junto con características clínicas propias de la AIJiS como el hecho de que los ANA y el factor reumatoide son normalmente

negativos en estos pacientes, sugieren que más que una enfermedad autoinmune bajo el amplio espectro de la AIJ, la AIJiS debería considerarse cómo una enfermedad autoinflamatoria debida probablemente a la disregulación de algunas citoquinas proinflamatorias.(55)

### **1.2.5. Diagnóstico**

El diagnóstico de la AIJiS es clínico, hasta este momento no se dispone de ninguna herramienta que permita el diagnóstico definitivo. El diagnóstico requiere la exclusión de otras enfermedades como infecciones (bacterianas como la *Borrelia burgdorferi*, que causa la enfermedad de Lyme, víricas como el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus parvovirus B-19,...), neoplasias (leucemia, linfoma, neuroblastoma, histiocitosis,...), síndromes autoinflamatorios (fiebre mediterránea familiar, hiperIgD, CAPS o TRAPS (por *Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Periodic Syndrome*)), enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), vasculitis (poliarteritis nodosa, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu,...) y otras enfermedades del tejido conectivo (lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis juvenil,...).(15,16)

El diagnóstico requerirá un examen físico cuidadoso para confirmar la presencia del exantema, que en ocasiones puede pasar desapercibido, la existencia de artritis y la presencia o no de visceromegalias, adenomegalias o serositis. Las pruebas de laboratorio muestran un aumento de los reactantes de fase aguda (con aumento de las cifras de velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR)), anemia, leucocitosis y trombocitosis. Así mismo también es típico el aumento de las cifras de ferritina. No hay un patrón típico de autoanticuerpos, si bien el análisis de estos puede permitir descartar la existencia de otras enfermedades del tejido conectivo. La recogida de cultivos y serologías permitirá descartar la etiología infecciosa. Ante la duda en algunos casos puede ser necesaria la revisión de un frotis sanguíneo o la realización de una punción de médula ósea para descartar leucemias o linfomas. La realización de una gammagrafía ósea permitirá descartar osteomielitis o tumores óseos. La radiografía de tórax simple, la ecografía abdominal o la ecocardiografía pueden poner de relieve la existencia de serositis, hepatomegalia, esplenomegalia y/o

adenomegalias que apoyen el diagnóstico, permitiendo a su vez descartar otras causas como endocarditis, miocarditis, aneurismas, etc.(15)

### **1.2.6. Tratamiento**

El objetivo del tratamiento es el control de la inflamación a nivel sistémico y articular, limitando las complicaciones así como la lesiones en el aparato músculo-esquelético.(16) Los síntomas sistémicos raramente responden a la administración aislada de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), y si el diagnóstico es seguro está indicado el uso precoz de corticoides.(15) La metilprednisolona endovenosa (30 mg/kg/día hasta un máximo de 1g/día de 1 a 3 días consecutivos) es efectiva en controlar los síntomas sistémicos, pero su acción es de corta duración y con frecuencia se deben añadir corticoides orales (prednisona oral de 1 a 2 mg/kg hasta un máximo de 60 mg/día en una o más dosis).(16,59) Aunque el metotrexate es un tratamiento eficaz, la respuesta no es tan buena como en otras formas de artritis. Así por ejemplo en un estudio placebo-control sólo 2 variables mejoraron significativamente (la valoración global por los padres y por el médico) mientras que no había diferencias con el grupo placebo con respecto a la VSG, PCR o síntomas sistémicos.(60) Otros estudios sin embargo muestran mejorías entre el 80 y 89% de estos pacientes.(61,62) El papel de las gammaglobulinas endovenosas en estos pacientes no está del todo claro, aunque se puede considerar su uso en aquellos pacientes con enfermedad sistémica activa que no han respondido a los AINES y corticoides.(15)

Por lo que respeta al tratamiento con fármacos biológicos, diferentes trabajos han mostrado que la respuesta al etanercept no es tan buena como en los pacientes con formas poliarticulares.(43,44,63) El papel de otros anti-TNF, como el infliximab no ha sido estudiado específicamente pero al analizar la respuesta al tratamiento con infliximab en 6 pacientes que habían fallado previamente con etanercept, sólo uno presentó una mejoría significativa.(64) Se ha postulado también el papel de la talidomida, probablemente en parte debido a su acción como anti-TNF, así en 11 de 13 pacientes con AIJiS fue posible reducir la prednisona, y mejorar los reactantes de fase aguda y la anemia, así como las escalas de actividad de la enfermedad.(65)

Un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de IL-6, el tocilizumab, se había mostrado efectivo en un estudio no controlado,(66) y en un ensayo abierto en fase II.(67) Recientemente se han publicado los resultados en fase III (estudio randomizado, a doble ciego, controlado con placebo, con una fase de extensión abierta), que muestran una brusca reducción en la actividad de la enfermedad, con cifras superiores al 90% en la fase de extensión.(68)

Recientemente también se ha publicado la buena respuesta al tratamiento con un inhibidor de la IL-1, anakinra.(55,56,69,70) Esta molécula es idéntica a un antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra), con la excepción de una metionina amino-terminal, y regula la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  al unirse competitivamente con alta afinidad al receptor de IL-1 tipo 1. De esta manera se inhibe la unión de la IL-1 al receptor de IL-1 evitando el anclaje de la proteína accesoria y la subsiguiente señal intracelular.(71) Otros inhibidores de la IL-1 están en la actualidad en desarrollo, lo que incluye anticuerpos monoclonales contra IL-1 y las trampas para citoquinas (*cytokine traps*) como el rilonacept.(36)

Algunos pacientes con AIJiS han sido tratados mediante un trasplante autólogo de células progenitoras,(72) aunque en un registro europeo de 9 centros, con 34 pacientes con AIJ, 29 de ellos con AIJiS, la mortalidad fue del 15%,(73) lo que lleva a considerar esta opción sólo en casos extremos sin respuesta a los tratamientos biológicos.

### **1.2.7. Pronóstico**

Los síntomas sistémicos de la AIJiS son de duración variable, así mientras en algunos pacientes duran sólo unas semanas o meses, en otros pueden persistir durante años. El curso de la enfermedad puede ser monofásico, policíclico (con brotes repetidos), o persistente (con manifestaciones continuas articulares y/o sistémicas). Clásicamente se ha descrito que aproximadamente un 50% de los pacientes presentaban un curso monofásico, del restante 50%, aproximadamente la mitad presentarán persistencia de los síntomas sistémicos junto a poliartritis, mientras que el resto evolucionarán hacia un patrón con poliartritis sin síntomas sistémicos.(15,74) En un reciente estudio con seguimiento de 45 pacientes con AIJiS durante una media de 4'9 años, el 42'2%

presentó un curso monofásico, el 6'7% un patrón policíclico, y un 51'1% un curso persistente.(75) En la actualidad las cifras de mortalidad son menores al 1%, y se asocian fundamentalmente al desarrollo de complicaciones como el síndrome de activación macrofágico, amiloidosis, insuficiencia renal, o infecciones secundarias al estado de inmunosupresión por los tratamientos. Algunos trabajos han relacionado la persistencia de los síntomas sistémicos, la trombocitosis, el número de articulaciones afectas a los 6 meses, la afectación de las caderas, la edad menor de 8 años y la duración superior a 5 años con un peor pronóstico.(76,77) El pronóstico funcional de estos pacientes es muy variable en función del grado de control de la enfermedad conseguido. Además de las limitaciones articulares y la discapacidad que causan otras complicaciones de la AIJiS incluyen la malnutrición, el retraso de crecimiento, la osteoporosis y retrasos escolares relacionados con el absentismo escolar.(78)

Una de las complicaciones más graves de la AIJiS es el Síndrome de Activación del Macrófago (SAM) que tiene una estrecha relación con la linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH, *hemophagocytic lymphohistiocytosis*), y que en algunas ocasiones puede estar presente ya desde el inicio de la enfermedad.(15,79) La presentación clínica puede solaparse con la AIJiS, y se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, depresión de las 3 series hemáticas, afectación hepática, coagulación intravascular diseminada y disfunción del sistema nervioso central. A nivel analítico destacan la pancitopenia, la caída en la VSG, en un paciente que por lo demás no mejora, la hipofibrinogenemia, la hipertrigliceridemia y una hiperferritinemia muy importante. El hallazgo más característico es la presencia de macrófagos fagocitando células hematopoyéticas en la médula ósea o en otros órganos, como los ganglios linfáticos, el hígado o el bazo.(80) Si bien hay que decir que la hemofagocitosis al inicio del SAM sólo se observa en el 50% de los casos. (79) Existe una propuesta preliminar para una guía diagnóstica del SAM asociado a la AIJiS.(81)

### **1.3. Quimioquinas**

#### **1.3.1. Las quimioquinas en las enfermedades autoinmunes**

Las quimioquinas, o citoquinas quimiotácticas, son pequeñas proteínas (6-14 kDa), estructuralmente relacionadas, que funcionan como potentes mediadores de la inflamación por su capacidad para reclutar y activar subpoblaciones específicas de leucocitos, y que juegan un papel en la migración de las células circulantes hacia los tejidos y de las células dentro de los tejidos.(82,83) Hasta hace unos pocos años no había un sistema claro para clasificarlas. La primera descrita fue el factor plaquetar 4 (hoy conocida como CXCL4), otras se habían incluido entre la interleuquinas como la IL-8 (hoy conocida como CXCL8), o se clasificaban por su función como la proteína quimiotáctica del macrófago. En la actualidad se han identificado unas 50 quimioquinas que actúan a través de una 20 receptores, y se clasifican como quimioquinas ligando y quimioquinas receptores (**tabla 5**).(84)

Funcionalmente, las quimioquinas se pueden dividir en quimioquinas inflamatorias, quimioquinas homeostáticas, y quimioquinas angiogénicas/angiostáticas.(82) Las quimioquinas inflamatorias se expresan en las células de los tejidos inflamados y en las células que los infiltran una vez son estimuladas por citoquinas proinflamatorias o por el contacto con agentes microbianos. En cambio, las quimioquinas homeostáticas se producen en tejidos linfoides o no-linfoides, como la piel y las mucosas. Este tipo de quimioquinas homeostáticas se encargan de mantener el tráfico fisiológico y la posición de las células, fundamentalmente las del sistema inmune, al mismo tiempo que se implican en la embriogénesis de los nódulos linfáticos.(85,86) Finalmente las quimioquinas angiogénicas y angiostáticas están implicadas en la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes, con el objetivo de facilitar la migración de las células endoteliales. La distinción entre estas tres categorías funcionales no es absoluta, de manera que varias quimioquinas pueden ser asignadas a más de una categoría.(82) Por todo ello además de la capacidad para reclutar leucocitos directamente mediante un gradiente quimiotáctico, las quimioquinas pueden también activar integrinas, estimular la liberación de mediadores y modular la vascularización, por lo que juegan un papel importante en el proceso inflamatorio.(87)

**Tabla 5.** Familias CXC, C, CX<sub>3</sub>C y CC de quimioquinas y receptores

Nombre sistemático	Cromosoma humano	Ligando humano	Receptor de quimioquina
<b>CXC familia</b>			
CXCL1	4q21.1	GRO $\alpha$ /MGSA- $\alpha$	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q21.1	GRO $\beta$ /MGSA- $\beta$	CXCR2
CXCL3	4q21.1	GRO $\gamma$ /MGSA- $\gamma$	CXCR2
CXCL4	4q21.1	PF4	Desconocido
CXCL5	4q21.1	ENA-78	CXCR2
CXCL6	4q21.1	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q21.1	NAP-2	CXCR2
CXCL8	4q21.1	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.1	Mig	CXCR3 <sup>a</sup>
CXCL10	4q21.1	IP-10	CXCR3 <sup>a</sup>
CXCL11	4q21.1	I-TAC	CXCR3 <sup>a</sup>
CXCL12	10q11.21	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCR4 <sup>b</sup>
CXCL13	4q21.1	BCA-1	CXCR5
CXCL14	5q31.1	BRAK/bolekine	Desconocido
(CXCL15)		Desconocido	Desconocido
CXCL16	17p13		CXCR6
<b>C familia</b>			
XCL1	1q24.2	Lymphotactin/SCM-1 $\alpha$ /ATAC	XCR1
XCL2	1q24.2	SCM-1 $\beta$	XCR1
<b>CX<sub>3</sub>C familia</b>			
CX3CL1	16q13	Fractalkine	CX3CR1
<b>CC familia</b>			
CCL1	17q11.2	I-309	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF/TDCF	CCR2
CCL3	17q12	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	CCR1, CCR5
CCL3L1	17q12	LD78 $\beta$	CCR1, CCR5
CCL4	17q12	MIP-1 $\beta$	CCR5 <sup>c</sup>
CCL5	17q12	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5 <sup>c</sup>
(CCL6)		Desconocido	Desconocido
CCL7	17q11.2	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	CCR3, CCR5 <sup>c</sup>
(CCL9/10)		Desconocido	CCR1
CCL11	17q11.2	Eotaxin	CCR3
(CCL12)		Desconocido	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL14	17q12	HCC-1	CCR1, CCR5
CCL15	17q12	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 $\delta$	CCR1, CCR3
CCL16	17q12	HCC-4/LEC/LCC-1	CCR1, CCR2
CCL17	16q13	TARC	CCR4
CCL18	17q12	DC-CK1/PARC/AMAC-1	Desconocido
CCL19	9p13.3	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	CCR7 <sup>d</sup>
CCL20	2q36.3	MIP-3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	9p13.3	6Ckine/SLC/exodus-2	CCR7 <sup>d</sup>
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	CCR4
CCL23	17q12	MPIF-1/CK $\beta$ 8/CK $\beta$ 8-1	CCR1
CCL24	7q11.23	Eotaxin-2/MPIF-2	CCR3
CCL25	19p13.3	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	CCR3
CCL27	9p13.3	CTACK/ILC	CCR10
CCL28	5p12	MEC	CCR3/CCR10

<sup>a</sup> CD183

<sup>b</sup> CD184

<sup>c</sup> CD195

<sup>d</sup> CD<sub>w</sub> 197



Estructuralmente las quimioquinas se clasifican en 4 familias, basándose en la localización de los residuos de cisteína. La mayoría presentan 4 cisteínas características que forman dos puentes disulfuro que son críticos para la estructura terciaria de estas proteínas, y se clasifican en función de las dos primeras cerca de la región NH<sub>2</sub> terminal en cuatro grandes familias:  $\alpha$  o CXC (porque las dos cisteínas cercanas al N Terminal están separadas por un aminoácido simple),  $\beta$  o CC (las dos cisteínas están adyacentes),  $\gamma$  o C, y  $\delta$  o CX<sub>3</sub>C (que a diferencia del resto presentan sólo dos cisteínas conservadas y un solo puente disulfuro, y que presentan 3 aminoácidos entre las cisteínas).(88)

Las quimioquinas CXC tienen un segundo dominio estructural que determina su potencial angiogénico. El NH<sub>2</sub> terminal de la mayoría de las quimioquinas CXC contiene tres residuos aminoácidos (ácido glutámico-leucina-arginina, el motivo ELR). Aquellas que contiene este motivo (ELR+) son potentes promotores de la angiogénesis y actúan mediante la unión y activación del receptor CXCR2 del endotelio (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8). En contraste aquellas que son inducibles por el interferón y carecen del motivo ELR (ELR-) son potentes inhibidores de la angiogénesis o angiostáticas, y se unen al receptor CXCR3 del endotelio (CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL14).(89,90)

Las quimioquinas ejercen sus efectos a través de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a la proteína G de la superficie celular de las principales células implicadas en la inmunidad. Varios receptores de quimioquinas se unen a diferentes quimioquinas, y también varias quimioquinas se pueden unir a más de un receptor específico.(87) Bodolay en su revisión destaca aquellas quimioquinas con un papel relevante en las enfermedades reumáticas inflamatorias (**tabla 6**)(91) así como los receptores de quimioquinas con sus ligandos más relevantes implicados en la artritis (**tabla 7**).(91)

Es por todo lo anteriormente expuesto que las quimioquinas y los receptores de quimioquinas se han implicado en un gran número de enfermedades infecciosas e inflamatorias, y entre ellas en la patogénesis de enfermedades reumáticas crónicas. De estas el prototipo es la artritis reumatoide (AR), pero también el lupus eritematoso sistémico (LES), la esclerodermia sistémica, el síndrome de Sjögren, la enfermedad

mixta del tejido conectivo, la polimiositis/dermatomiositis, el síndrome antifosfolípido y las vasculitis sistémicas.(91,92)

Esto ha llevado a considerar el desarrollo de tratamientos dirigidos contra ellas. De hecho un primer estudio clínico con el uso de un antagonista específico contra CCR1 en pacientes con AR parece confirmar el potencial de esta aproximación terapéutica.(93)

**Tabla 6.** Quimioquinas con un papel relevante en las enfermedades inflamatorias reumáticas.

#### **Quimioquinas CXC**

- Interleukin-8 (IL-8, CXCL8)
- Epithelial-neutrophil activating protein-78 (ENA-78, CXCL5)
- Growth-related gene product  $\alpha$  (gro $\alpha$ , CXCL1)
- Connective tissue activating protein-III (CTAP-III, CXCL6)1
- Interferon- $\gamma$ -inducible protein (IP-10, CXCL10)
- Platelet factor 4 (PF4, CXCL4)
- Monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG, CXCL9)
- Stromal cell-derived factor (SDF-1, CXCL12)
- B cell-attracting chemokine (BCA-1, CXCL13)

#### **Quimioquinas CC**

- Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, CCL2)
- Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , CCL3)
- Macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ , CCL20)
- Regulated upon activation normally T cell expressed and secreted (RANTES, CCL5)

#### **Quimioquinas C**

- Lymphotactin (XCL1)

#### **Quimioquinas CX3C**

- Fractalkine (CX3CL1)

**Tabla 7.** Receptores de quimioquinas con sus ligandos más relevantes implicados en la artritis

<b>Receptor de Quimioquina</b>	<b>Ligando con importancia en la artritis</b>
<b><i>Receptor de quimioquinas CC (CCR)</i></b>	
CCR1	MIP-1 $\alpha$ , RANTES
CCR2	MCP-1
CCR3	RANTES
CCR4	
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES
CCR6	MIP-3 $\alpha$
CCR7	
CCR8	
CCR10	MCP-1, RANTES
<b><i>Receptor de quimioquinas CXC (CXCR)</i></b>	
CXCR1	IL-8
CXCR2	IL-8, ENA-78, gro $\alpha$
CXCR3	IP-10, MIG
CXCR4	SDF-1
CXCR5	BCA-1
DARC (Duffy antigen receptor for chemokynes)	IL-8, ENA-78, gro $\alpha$
<b><i>Receptor de quimioquinas CX3C (CX3CR)</i></b>	
CX3CR1	Fractalkine

### 1.3.2. Quimioquinas en la Artritis Idiopática Juvenil

Hay pocos trabajos que analicen específicamente el papel de las quimioquinas en las artritis de la infancia. En un estudio para investigar específicamente estas mediante el análisis de la expresión de los genes por técnicas de *microarray* se muestra un incremento de la expresión de ARNm que codifica para quimioquinas, en especial las quimioquinas angiogénicas CXCL (ELR+) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con formas poliarticulares, mientras que la expresión de las quimioquinas angiostáticas CXCL (ELR-) era más baja en las células mononucleares del líquido sinovial de los pacientes con formas poliarticulares comparándolas con muestras de pacientes oligoarticulares. Hay que decir no obstante que solo 3 de estos pacientes presentaban una AIJiS.(94)

En otro trabajo se muestra un aumento de la expresión de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR3 en los linfocitos T del líquido sinovial de pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular. Los ligandos para estos receptores son CXCL10 (o IP-

10, *interferon-inducible protein 10*), CCL5 (RANTES) y CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ). La expresión del receptor de quimioquina estaba asociada con una ratio alta de IFN- $\gamma$ /IL-4 que sugiere que las células T que infiltraban la sinovial expresan el fenotipo Th1 sobre el Th2. No obstante este trabajo sólo analiza pacientes con AIJ oligoarticular, oligoarticular extendida y formas poliarticulares.(95)

De Benedetti y colaboradores muestran como los niveles en el suero de CXCL8 (IL-8) y CCL2 (MCP-1) están elevados en pacientes con AIJiS activa de manera significativa comparándolos con individuos control y pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular. Por otra parte los pacientes con AIJiS y síntomas sistémicos de este estudio presentan niveles más altos de CXCL8 (IL-8) y CCL2 (MCP-1) que aquellos pacientes con AIJiS en que los síntomas sistémicos han cedido.(96)

En un estudio longitudinal durante 6 años Yao y colaboradores muestran como los niveles de CCL5 (RANTES) están estadísticamente aumentados respecto a los pacientes control en el suero de las AIJ oligoarticulares, poliarticulares y sistémicas, y también como este aumento es también mayor de una manera significativa en la AIJiS comparado con las formas oligoarticular y poliarticular. También se muestra como los niveles de CCL2 (MCP-1) están aumentados significativamente en los pacientes con AIJiS activa respecto a los individuos control sanos, y los pacientes con AIJ oligoarticular o poliarticular. Además los niveles de CCL2 (MCP-1) en pacientes con AIJiS activa estaban más altos en aquellos con síntomas sistémicos con respecto a aquellos en que los síntomas sistémicos habían cedido. A pesar de que los niveles de CCL5 (RANTES) y CCL2 (MCP-1) descendían después del tratamiento, durante la remisión estos niveles todavía eran significativamente más altos en los pacientes con AIJ que en los controles. Los autores también muestran una relación entre el nivel en el suero de CCL5 (RANTES) durante la remisión y la duración de esta remisión clínica, así los niveles más bajos se asocian a un remisión clínica más prolongada y los niveles más altos se asocian a una remisión clínica más corta. Los niveles de CCL5 (RANTES) en el suero por otra parte correlacionaban con las concentraciones de proteína C reactiva, las cifras de hemoglobina, de leucocitos y de plaquetas, mientras que las cifras de CCL2 (MCP-1) se correlacionaban con las cifras de leucocitos y los niveles de ferritina. Los autores concluyen que CCL5 (RANTES) es una molécula clave en todos los tipos de AIJ, mientras que CCL2 (MCP-1) es particularmente importante en la

AIIIS, y que estas quimioquinas serían unos marcadores más sensibles de la actividad de la enfermedad que los marcadores de inflamación convencionales.(97)

#### **1.4. Monocitos y sus subtipos:**

Los monocitos son miembros del sistema mononuclear fagocítico, el cuál es importante para la defensa no-específica contra los agentes patógenos y la vigilancia tumoral, y ejercen funciones inmunoregulatoras como la producción de citoquinas.(98) Los monocitos se originan en la médula ósea de un progenitor mielóide común que comparten con los neutrófilos, son liberados en la sangre periférica, donde constituyen entre el 5-10% de los leucocitos y por donde circulan durante 1 a 3 días (**figura 1**). (99) Esta vida tan corta en la sangre periférica ha apoyado el concepto que los monocitos de la sangre pueden repoblar constantemente las poblaciones de macrófagos y células dendríticas para mantener la homeostasis, y durante la inflamación jugar un papel clave en la inmunidad innata y adaptativa.(100) No obstante y aunque es indiscutible la evidencia que los monocitos originan la aparición de macrófagos en virtualmente casi cualquier tejido en el contexto de inflamación,(101) trabajos recientes también han mostrado que macrófagos de algunos tejidos (como pulmón y vías aéreas) se autorenewan sin aportación desde la sangre periférica.(102)

Los monocitos muestran una heterogeneidad morfológica, con una variabilidad en el tamaño, granularidad y morfología nuclear, es por ello que en los extremos de esta variabilidad pueden en algunas ocasiones ser confundidos con granulocitos, linfocitos, células NK o células dendríticas.(102) Los monocitos fueron inicialmente identificados por la expresión de grandes cantidades de CD14 (que es parte del receptor para el lipopolisacárido). Sin embargo, posteriormente se ha visto que la expresión de diferentes marcadores antigénicos muestra que los monocitos humanos en sangre periférica son heterogéneos, lo que apunta a las diferentes acciones fisiológicas de los subtipos de monocitos. La expresión de CD14 y CD16 (también conocido como FcγRIII) permite dividir a los monocitos en dos subtipos principales CD14+CD16-, también conocidos como monocitos clásicos, y que representan aproximadamente el 90-95% de los monocitos de sangre periférica y los CD14<sup>dim</sup>CD16+ (o CD14<sup>low</sup>CD16+, *dim* o *low*, por débil o bajo, haciendo referencia a una menor expresión).(103,104)

Estos dos subtipos difieren en aspectos como la expresión de quimioquinas o de moléculas de adhesión. Así los CD14+CD16- expresan CCR2, CD62-L (L-selectina) y CD64 (o FcγRI), mientras que los CD14<sup>dim</sup>CD16+ carecen de CCR2 y tienen niveles

más altos de MHC tipo II (HLA-DR) y CD32 (o FcγRII).(102,104-106) Ambos subtipos expresan el receptor para fractalquina CX<sub>3</sub>CR1, aunque los monocitos CD14dimCD16+ expresan niveles más altos.(106,107) Un resumen de los fenotipos de marcadores de superficie se puede encontrar en la **tabla 8**.(102,107)

Se ha descrito una población de monocitos intermedia, CD14+CD16+,(98) que sería probablemente el subtipo de monocitos CD16+ que expresaría CCR5.(107) Hay que remarcar la heterogeneidad de las poblaciones del pequeño grupo de monocitos CD16+, de hecho también el anticuerpo de M-DC8, un derivado de PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), se ha utilizado para definir subpoblaciones de monocitos CD16+.(108) Esto tiene interés dado que se ha visto que el anticuerpo M-DC8 define también a un subgrupo de células dendríticas con capacidad pro-inflamatoria.(109) En este sentido mediante la determinación de CD64 (o FcγRI) y CD16 Grage-Griebenow y colaboradores clasifican cuatro poblaciones; de ellas el subtipo CD64+CD16+ combinaría características de monocitos y de células dendríticas, con aumento de la expresión de HLA-DR, CD86 y CD11c y una importante actividad estimuladora de células T, por lo que se podría tratar de un fenotipo de monocito con capacidad inmunoreguladora o un fenotipo intermedio entre los monocitos y las células dendríticas.(98)

Los monocitos CD14dimCD16+ parecen ser más maduros, expresan niveles más altos de MHC tipo II (HLA-DR) y CD32 (también conocido como FcγRII) comparado con los monocitos clásicos por lo que se ha sugerido que se parecen a macrófagos tisulares maduros,(104) por otra parte también muestran la producción de una citoquina proinflamatoria como es el TNF, mientras que no producen la citoquina anti-inflamatoria IL-10.(110)

El interés en los monocitos CD16+ se basa en las observaciones que muestran el aumento de este subtipo durante procesos cancerosos(111) e inflamatorios, como la aterosclerosis,(112) la demencia por virus de la inmunodeficiencia humana(113) o la AR.(114) De ahí que se halla inferido su papel en estos procesos y que se hayan dado en conocer como monocitos inflamatorios en el contexto de la inflamación crónica. No obstante para algunos autores esta afirmación es algo precipitada si se tiene en cuenta que el equivalente a los linfocitos CD16+ en el ratón, las células Ly 6C<sup>-</sup>/Gr-1<sup>low</sup> *in vivo*

no emigran sustancialmente a los sitios de inflamación si se compara con las células CCR2+, Ly 6C<sup>-</sup>/Gr-1<sup>high</sup> que recordemos son el equivalente a los monocitos CD14+CD16<sup>-</sup>.(106,115,116) En este sentido en cultivos se ha visto que ambos tipos de monocitos pueden diferenciarse en células dendríticas (DCs) en presencia de factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) e interleuquina 4 (IL-4).(117,118) Aunque usando un modelo *in vitro* de migración transendotelial Randolph y colaboradores señalan a los CD16<sup>+</sup> como el más posible precursor hacia las células dendríticas,(119) mientras que el trabajo de Ginhoux y colaboradores señala al subtipo CD14+CD16<sup>-</sup> como el precursor de las células de Langerhans, que son las únicas células dendríticas de la epidermis.(116)

Los avances en la determinación de los subtipos de monocitos son importantes porque la modulación de estos monocitos y de sus acciones puede tener implicaciones en el mantenimiento de las poblaciones de macrófagos y células dendríticas de los tejidos y por tanto puede afectar la homeostasis, inmunidad y tolerancia.(102)

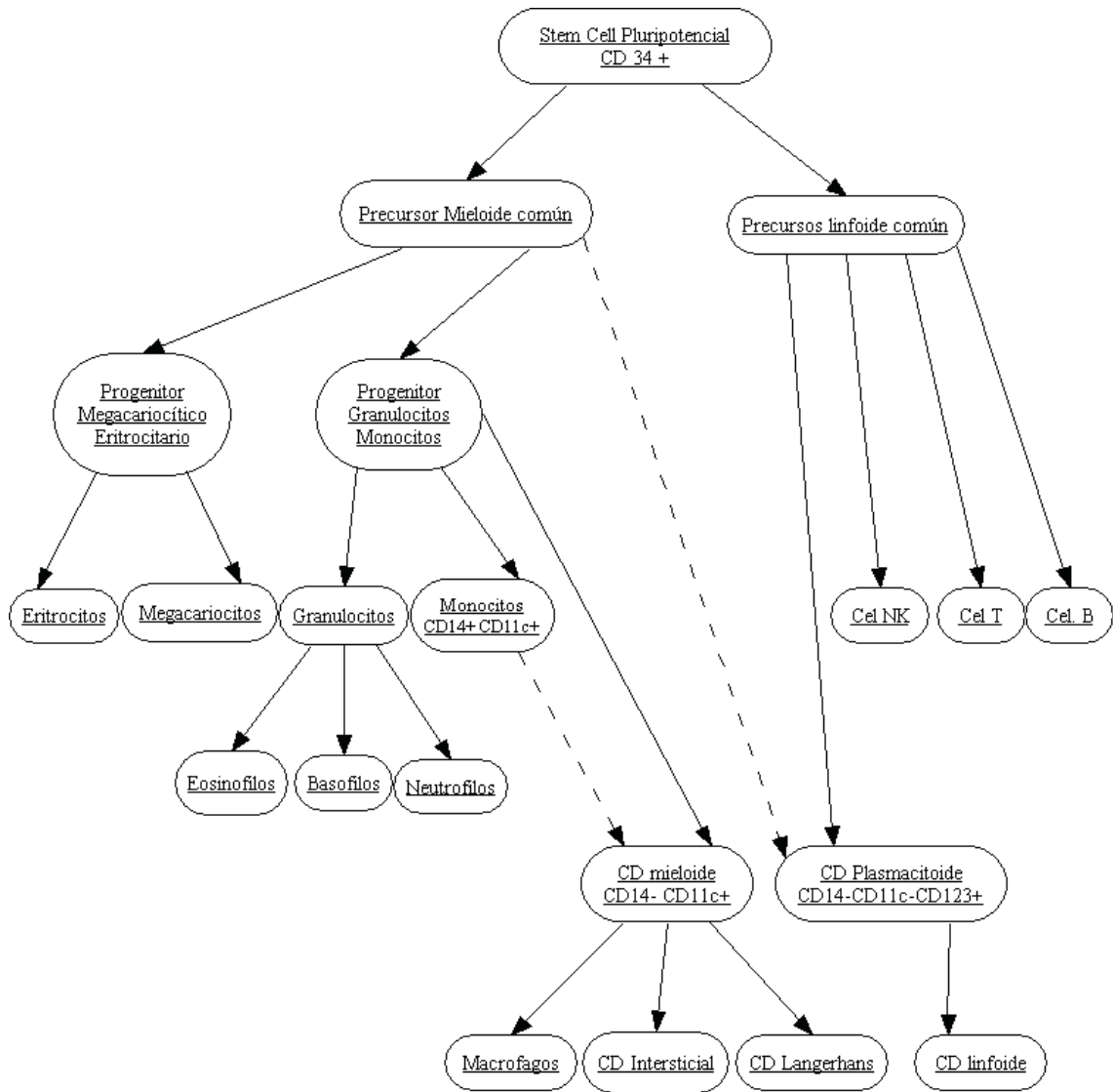
Por otra parte mientras que gran parte de las investigaciones en la migración de los leucocitos se han focalizado en los neutrófilos y las células T,(120,121) la diversidad intrínseca de las células mieloides mononucleares ha hecho que los estudios en el tráfico de los monocitos sean más difíciles.(122) A pesar de ello se ha demostrado como los monocitos circulantes reclutados a los tejidos pueden proceder a diferenciarse en diversas poblaciones de macrófagos residentes o en células dendríticas mieloides.(106,123,124) Se ha propuesto que los monocitos que expresan CCR2, los CD14+CD16<sup>-</sup>, son reclutados a zonas de inflamación, mientras que los monocitos CCR2<sup>-</sup> permanecerían en los tejidos normales originando los macrófagos residentes. Xu y colaboradores apoyan la hipótesis de una extravasación continua y una progresiva diferenciación en el tiempo de los monocitos inflamatorios de la circulación en vez de una replicación en los tejidos inflamados, apoyando el concepto de una diferenciación en células dendríticas mieloides a partir de los monocitos circulantes bajo condiciones fisiológicas *in vivo*.(125) Otros estudios han mostrado el paso de los monocitos desde la sangre o el tejido inflamado periférico a los ganglios linfáticos de drenaje donde se puede dar la diferenciación en células dendríticas funcionales.(126,127) Sin embargo muchas preguntas sobre el tráfico y diferenciación de los monocitos en situaciones



fisiológicas in vivo permanecen abiertas, como por ejemplo los mecanismos y las moléculas implicadas en la interacciones entre los monocitos y las células del endotelio de la sangre que controlan el tráfico a los tejidos normales o inflamados lo que podría tener implicaciones terapéuticas.

**Tabla 8.** Fenotipo de los dos subtipos principales de monocitos

Antígeno	CD14+CD16- “Monocitos clásicos”	CD14+CD16+ “Monocitos intermedios”	CD14dimCD16+ “Monocitos no-clásicos”
<b>Receptores de quimioquinas</b>			
CCR1	++	++	-
CCR2	+	+	-
CCR3	-	-	-
CCR4	+		-
CCR5	-	+	-
CCR7	+		-
CXCR1	+	+	-
CXCR2	+	+	-
CXCR4	+	+	+
CXCR5	-		
CX <sub>3</sub> CR1	-	+	++
<b>Otros receptores</b>			
CD11c	++		+++
CD14	+++		+
CD32	+++		+
CD33	+++		+
CD62L	++	+	-
CD64	++	++	-
CD86	+		++
MHC clase II	+		++



**Figura 1.** Subtipos de células dendríticas humanas y su relación con los precursores monocíticos.

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La Artritis Idiopática Juvenil de inicio Sistémico es una enfermedad inflamatoria caracterizada fundamentalmente por sus síntomas sistémicos y la afectación articular. Los monocitos son miembros del sistema mononuclear fagocítico, el cuál está implicado en la inmunidad no-específica, y ejercen funciones inmunoregulatoras como la producción de citoquinas. Se han identificado quimioatrayentes y activadores celulares responsables del paso de neutrófilos a través de los tejidos inflamatorios, así como de los linfocitos que se dirigen hacia órganos linfoides secundarios y focos de inflamación crónica. No obstante se conoce menos acerca de los monocitos y las moléculas que regulan su tráfico a través de los tejidos sanos, así como de los mecanismos de reclutamiento de los monocitos en las enfermedades.

Las quimioquinas juegan un papel en el reclutamiento, la función de las células del sistema inmune, y la angiogénesis. La caracterización de los receptores de quimioquinas en la superficie celular de los monocitos y sus diferentes subtipos puede contribuir a entender y ampliar el conocimiento sobre el papel de las quimioquinas en la patogénesis de la AIJiS, lo que podría tener implicaciones de cara al desarrollo de nuevos tratamientos orientados al desarrollo de antagonistas específicos.

La hipótesis de trabajo es que la expresión de los receptores de quimioquinas en la superficie celular de los monocitos es diferente en los enfermos con AIJiS respecto a los individuos sanos. Diferentes subtipos de células también pueden expresar diferentes receptores de quimioquinas en estos pacientes dependiendo de si estos pacientes están sintomáticos o no o si están con o sin tratamiento.



### **3. OBJETIVOS:**





### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. Objetivo principal:**

1.- Analizar la expresión de los receptores de quimioquinas en células de sangre periférica, y en especial en los subtipos de monocitos, de pacientes afectos de AIJiS y compararla con la expresión de estos receptores en individuos sanos.

#### **3.2. Objetivos secundarios:**

2.- Analizar la expresión de los receptores de quimioquinas en células de sangre periférica, y en especial en los subtipos de monocitos, de pacientes afectos de AIJiS sintomáticos y compararla con los individuos con AIJiS que se encuentran asintomáticos.

3.- Analizar la expresión de los receptores de quimioquinas en células de sangre periférica, y en especial en los subtipos de monocitos, de pacientes afectos de AIJiS en tratamiento y compararla con los pacientes afectos de AIJiS que no están recibiendo tratamiento.



## **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Pacientes:

Durante el período entre el 8 de agosto y el 5 de noviembre de 2003 se obtuvieron muestras de 21 pacientes con AIJiS seguidos en la Unidad de Reumatología Pediátrica del *Texas Scottish Rite Hospital y Children's Medical Center* in Dallas, Texas. Se obtuvieron también muestras de 7 controles sanos en edad pediátrica entre los pacientes visitados en dicho centro por hiper movilidad o cuadros de dolor músculo-esquelético sin patología inflamatoria, así como muestras de 5 sujetos sanos adultos. Se informó a los pacientes y las familias, así como a los sujetos sanos, obteniéndose el consentimiento informado según protocolo del centro.

Para su inclusión todos los pacientes debían cumplir los criterios revisados para el diagnóstico de AIJiS de la clasificación de la ILAR.(5) Los pacientes (y sus padres) debían autorizar su participación el estudio, informar de su historia médica pasada y situación clínica en ese momento y someterse a una exploración física y extracción de muestra de sangre.

Como criterios de exclusión se consideraron el no tener un diagnóstico de AIJiS confirmado, o presentar en el momento de la visita alguna otra enfermedad concomitante, (como por ejemplo cuadros febriles infecciosos), el no disponer de todos los datos necesarios de un paciente, o la falta de autorización del paciente o sus padres.

Las muestras de sangre fueron obtenidas extrayendo 10 ml adicionales a las muestras de sangre recogidas durante las visitas de seguimiento de estos pacientes.

#### 4.2. Selección de anticuerpos:

Se optó por utilizar para el estudio de receptores de quimioquinas en las subpoblaciones de monocitos en sangre completa la siguiente combinación:

- FL1: CD14 FITC (*fluorescein isothiocyanate*)
- FL2: CCR1 PE (*phycoerythrin*), CCR2 PE, CCR4 PE, CCR5 PE, CCR7 PE, CXCR1 PE, CXCR2 PE, CXCR4 PE, CD2 PE, CD40 PE, CD80 PE, CD86 PE, CX3CR1 PE

Con controles también en FL2: IgG1 PE, IgG2a PE, IgG2b PE

- FL3: HLA-DR PerCP (*peridinin-chlorophyll protein*)
- FL4: CD16 APC (*allophycocyanin*)

Excepto para CD62-L y CD64 que se utilizó la combinación:

- FL1: CD62-L FITC o CD64 FITC
- FL2: CD14 PE
- FL3: HLA-DR PerCP
- FL4: CD16 APC

Para el estudio de las poblaciones de células dendríticas:

- FL1: Lin 1 FITC (*Lineage Cocktail 1* (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) de Becton Dickinson
- FL2: CD123 PE
- FL3: HLA-DR PerCP
- FL4: CD11c APC

Con control:

- FL1: Lin 1 FITC (*Lineage Cocktail 1* (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) de Becton Dickinson
- FL2: IgG1 PE
- FL3: HLA-DR PerCP
- FL4: IgG2a APC

Para el estudio intracelular de citoquinas en sangre periférica de células mononucleares:

- FL1: CD14 FITC
- FL2: Intracelular IL6 PE, intracelular MPO PE, intracelular IL-1 $\beta$  PE, intracelular TNF- $\alpha$
- FL3: HLA-DR PerCP
- FL4: CD16 APC

Los anticuerpos monoclonales procedían de:

- **BD Biosciences Pharmingen:** HLADR-PerCP, CD14 FITC, CD14 PE, CCR4 PE, CD2 PE, CD3 PE, CD40 PE, CD62L FITC, CD64 FITC, CD 86 PE, Lin 1 FITC, CD123 PE CD11c APC, IgG1 PE
- **R&D Systems:** CCR1 PE, CCR2 PE, CCR5 PE, CCR7 PE, CXCR1 PE, CXCR2 PE, CXCR4 PE, CD80 PE, intracelular IL-1 $\beta$  PE, intracelular IL-6 PE, intracelular TNF- $\alpha$  PE, IgG1 PE, IgG2a PE, IgG2b PE
- **MBL International Corporation:** CX3CR1 PE
- **Caltag Laboratories:** CD16 APC
- **Serotec:** intracelular MPO PE

#### **4.3. Preparación de las muestras:**

*Para el estudio de los receptores de quimioquinas de la superficie celular en sangre completa:*

1. Se obtuvieron muestras de 10 ml de sangre periférica recogidas en tubos con EDTA.
2. Se prepararon los tubos con la combinación de anticuerpos a analizar según previamente expuesto:
3. Se añadieron 100 – 200 microlitros de sangre a cada uno de los tubos y se agitaron e incubaron durante 20 – 30 minutos.
4. Se procedió al lisado de los hematíes añadiendo FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) *lysing solution* de Becton Dickinson, agitando e incubando durante 20 minutos. Se procedió posteriormente a centrifugar los tubos con 1 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) conteniendo 2% de FCS (*heat-inactivated Fetal Calf Serum*, suero fetal bovino inactivado por el calor) a 1200 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 minutos.
5. Se retiró el sobrenadante y se procedió a resuspender las células añadiendo 300 microlitros de solución fijadora.
6. Se almacenaron las muestras a 4° C hasta su análisis.

*Para el estudio de citoquinas intracelulares en células mononucleares de sangre periférica:*

1. Se obtuvieron muestras de sangre periférica recogidas en tubos con EDTA.
2. Se procedió a la separación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*)
3. Se añadieron 100 – 200 microlitros de sangre a cada uno de los tubos y se agitaron e incubaron durante 20 – 30 minutos.
4. Se procedió al lisado de los hematíes añadiendo FACS (*fluorescence-activated cell sorter*) *lysing solution* de Becton Dickinson, agitando e incubando durante 20 minutos. Se procedió posteriormente a centrifugar los tubos con 1 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) conteniendo 2% de FCS (*heat-inactivated Fetal Calf Serum*, suero fetal bovino inactivado por el calor) a 1200 rpm a una temperatura de 4° C durante 10 minutos.



5. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l en cada tubo de Cytotfix/Cytoperm y se incubaron en hielo durante 20 minutos. A continuación se procedió a centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces.
6. Seguidamente se añadieron los anticuerpos monoclonales contra las quimioquinas intracelulares y se incubaron durante 20 minutos.
7. Se procedió a centrifugar las muestras con 1 ml de PBS a 1200 rpm durante 10 minutos a 4° C y a decantar el sobrenadante.
8. Finalmente se retiró el sobrenadante y se procedió a resuspender las células añadiendo 300 microlitros de solución fijadora.
9. Se almacenaron las muestras a 4° C hasta su análisis.

#### 4.4. Análisis de las muestras:

Las poblaciones de células circulantes en sangre periférica fueron identificadas mediante citometría de flujo usando el sistema FACSCalibur y se analizaron mediante el programa de software Cellquest (ambos de Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Mediante este programa se seleccionaron una serie de poblaciones de manera secuencial seleccionando una serie de regiones y ventanas que limitaban las poblaciones en estudio:

- G1 (*gate* 1, ventana 1): Mediante el FSC (*forward scatter*) y el SSC (*side scatter*) se procedió a un primer “gating” de las células, eliminando el *debris* (células adheridas o lisadas) y dejando todos los leucocitos que se iban a analizar.
- G2: A continuación se procedió a seleccionar mediante FSC y el SSC los monocitos.
- G3: Mediante la combinación CD14-FITC HLA-DR PerCP se seleccionaron el conjunto de todos los monocitos como aquellos que marcaban positivo para CD14 y HLA-DR.

A continuación se seleccionaron las diferentes subpoblaciones de monocitos:

- G4: Los monocitos que marcan positivo para CD14 y negativo para CD16 (que a partir de este momento llamaremos CD14+CD16-)
- G5: Los monocitos que marcan positivo para CD14 y CD16 (los abreviaremos como CD14+CD16 +)
- G6: Los monocitos que marcan CD14 débil y altamente positivo para CD16 (CD14dimCD16+)

En los trabajos preliminares con sangre total se identificó lo que podría ser una subpoblación de monocitos que para poder estudiar posteriormente decidimos marcar en una nueva ventana:

- G7: Células que marcaban altamente positivo para CD14 y CD16 (CD14++CD16 ++)

A efectos de analizar las poblaciones de neutrófilos y linfocitos seleccionamos también en dos nuevas ventanas:

- G8: Neutrófilos seleccionados mediante FSC y SSC en el área de los neutrófilos y que no marcaban para monocitos.
- G9: Linfocitos seleccionados mediante el FSC y SSC en el área de los linfocitos y que no marcaban para monocitos.

Una vez seleccionada cada una de las poblaciones podíamos analizar las quimioquinas que iban variando según las muestras en estudio. De esta manera se obtenían los % positivos para los diferentes tipos de células. Se adjuntan en los **Anexos 1 y 2**, un ejemplo de los gráficos obtenidos en el estudio de un individuo sano y un paciente.

Dado que conocíamos las cifras de leucocitos totales en la sangre periférica de las diferentes muestras esto nos permitía también calcular las cifras de los diferentes subtipos celulares para cada una de las quimioquinas. Se introdujeron los datos en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Office Excel 2003 de Microsoft Corporation).

#### **4.5. Análisis estadístico:**

El análisis estadístico se realizó mediante el estudio de las cifras absolutas de los diferentes subtipos de células obtenidos. Se utilizó la prueba no paramétrica para muestras independientes de la U de Mann-Whitney. Como medida de tendencia central se utilizó la mediana ( $P_{50}$ ) y como medida de dispersión el intervalo intercuartil (percentil 25 a 75). No se ha calculado la media como medida de tendencia central ni la desviación típica como medida de dispersión porque la distribución de los datos no lo permitía, dado el bajo número de casos.

Se utilizó el programa SPSS 12.OS para Windows (Versión 12.0.1) de SPSS incl. La significación estadística se estableció con  $p \leq 0'05$ .

Dada la baja frecuencia de la AIJiS, el interés de analizar los pacientes en diferentes subgrupos según su grado de actividad, la dificultad para recoger un número significativo de pacientes, y puesto que no se pudieron realizar tinciones para todos los receptores de quimioquinas en cada individuo, se incluyeron también en el **Anexo 3** aquellos grupos que mostrando diferencias estadísticamente significativas no permitían extraer conclusiones en firme porque no llegaban a incluir un número mínimo de 5 casos en cada grupo. Por el mismo motivo se hace mención, con las reservas lógicas, de aquellos grupos en los que se observó tendencia a la significación.

## **5.- RESULTADOS**



## 5.- RESULTADOS

### 5.1 Características de los pacientes e individuos control:

Se recogieron muestras de 21 pacientes afectos de AIJiS; 6 pacientes asintomáticos que no recibían tratamiento (AIJiS en remisión), 6 pacientes asintomáticos en tratamiento con corticoides (AIJiS en remisión con tratamiento), 5 pacientes sintomáticos a pesar de estar en tratamiento con corticoides, y 4 pacientes sintomáticos que en ese momento no estaban recibiendo tratamiento con corticoides, (pacientes con nuevo brote de AIJiS). Se obtuvieron también muestras de 12 sujetos sanos; 7 en edad pediátrica y 5 adultos.

En las siguientes tablas se pueden ver: las características demográficas de los pacientes (diagnóstico, edad en el momento del análisis, edad al diagnóstico de la enfermedad y sexo) (**tabla 9**), la clínica en el momento de la visita (presencia de síntomas sistémicos, (fiebre, rash y otros síntomas), artritis y el número de articulaciones afectadas) (**tabla 10**), así como su hemograma y VSG (**tabla 11**), y la medicación que seguían en ese momento (**tabla 12**). A partir de estos resultados se subdividieron los pacientes con AIJiS en 6 grupos:

- Grupo 1: Niños sanos
- Grupo 2: Adultos sanos
- Grupo 3: Asintomáticos sin tratamiento
- Grupo 4: Asintomáticos en tratamiento con corticoides
- Grupo 5: Sintomáticos en tratamiento con corticoides
- Grupo 6: Sintomáticos sin tratamiento con corticoides en el momento del análisis

La edad media de los niños sanos fue de 11 años y 6 meses, mientras que la de los niños con AIJiS fue de 9 años y 4 meses.

En el grupo de pacientes sanos, la proporción de niñas fue del 57'1 %, mientras que en el grupo de pacientes con AIJiS fue del 66'7%.

**Tabla 9.** Datos demográficos (diagnóstico, edad al diagnóstico, en el momento del análisis y sexo).

	<b>Código</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Edad</b>	<b>Edad Diagnóstico</b>	<b>Sexo</b>
Niño sano	<b>H79</b>	Hipermovilidad	4 a 6 m		F
Niño sano	<b>H37</b>	Sde. dolor amplificado	9 a 5 m		F
Niño sano	<b>H83</b>	Sana	4 a 7 m		F
Niño sano	<b>H75</b>	Artralgias	17 a 10 m		M
Niño sano	<b>H64</b>	Sana	14 a 10 m		F
Niño sano	<b>H77</b>	Sano	17 a		M
Niño sano	<b>H76</b>	Artralgias	12 a 10 m		M
Adulto sano	<b>HA</b>	Sano	24 a		M
Adulto sano	<b>HDS</b>	Sana	28 a		F
Adulto sano	<b>HAC</b>	Sana	29 a		F
Adulto sano	<b>HJA</b>	Sano	35 a		M
Adulto sano	<b>HEA</b>	Sano	37 a 1 m		M
Asint No Tx	<b>SYS 63</b>	AIJiS	6 a 6 m	1 a 9 m	F
Asint No Tx	<b>SYS 64</b>	AIJiS	7 a 9 m	8 m	M
Asint No Tx	<b>SYS 23</b>	AIJiS	8 a 7 m		M
Asint No Tx	<b>SYS 54</b>	AIJiS	10 a 11 m	3 a 1 m	M
Asint No Tx	<b>SYS 7</b>	AIJiS	12 a 9 m	8 a 6 m	F
Asint No Tx	<b>SYS 34</b>	AIJiS	14 a 2 m	1 a 1 m	F
Asint Tx Cortis	<b>SYS 31</b>	AIJiS	6 a 8 m	5 a 1 m	F
Asint Tx Cortis	<b>SYS 20</b>	AIJiS	5 a 2 m	2 a 11 m	F
Asint Tx Cortis	<b>SYS 52</b>	AIJiS	13 a 11m	3 a 8 m	F
Asint Tx Cortis	<b>SYS 13</b>	AIJiS	3 a 4 m	1 a 2 m	F
Asint Tx Cortis	<b>SYS 46</b>	AIJiS	6 a 9 m	5 a 11 m	M
Asint Tx Cortis	<b>SYS 21</b>	AIJiS	6 a 3 m	3 a 5 m	F
Sint Tx Cortis	<b>SYS 38</b>	AIJiS	4 a 0 m	1 a 3 m	M
Sint Tx Cortis	<b>SYS 2</b>	AIJiS	11 a 10 m	2 a 0 m	F
Sint Tx Cortis	<b>SYS 51</b>	AIJiS	2a 0 m	10 m	F
Sint Tx Cortis	<b>SYS 33</b>	AIJiS	17 a 7 m	14 a 3 m	F
Sint Tx Cortis	<b>SYS 47</b>	AIJiS	9 a 8 m	7 a 3 m	M
Sint No Tx	<b>SYS 29</b>	AIJiS	16 a 10 m	14 a 0 m	F
Sint No Tx	<b>SYS 36</b>	AIJiS	16 a 7 m	13 a 11 m	F
Sint No Tx	<b>SYS 60</b>	AIJiS	7 a 4 m	5 a 0 m	M
Sint No Tx	<b>SYS 62</b>	AIJiS	7 a 8 m		F



**Tabla 10.** Manifestaciones clínicas

	<b>Código</b>	<b>Fiebre</b>	<b>Rash</b>	<b>Otros síntomas</b>	<b>Artritis</b>	<b>Numero articulaciones</b>
Niño sano	<b>H79</b>					
Niño sano	<b>H37</b>					
Niño sano	<b>H83</b>					
Niño sano	<b>H75</b>					
Niño sano	<b>H64</b>					
Niño sano	<b>H77</b>					
Niño sano	<b>H76</b>					
Adulto sano	<b>HA</b>					
Adulto sano	<b>HDS</b>					
Adulto sano	<b>HAC</b>					
Adulto sano	<b>HJA</b>					
Adulto sano	<b>HEA</b>					
Asint No Tx	<b>SYS 63</b>	No	No	No	No	0
Asint No Tx	<b>SYS 64</b>	No	No	No	No	0
Asint No Tx	<b>SYS 23</b>	No	No	No	No	0
Asint No Tx	<b>SYS 54</b>	No	No	No	No	0
Asint No Tx	<b>SYS 7</b>	No	No	No	No	0
Asint No Tx	<b>SYS 34</b>	No	No	No	No	0
Asint Tx Cortis	<b>SYS 31</b>	No	Si	No	No	0
Asint Tx Cortis	<b>SYS 20</b>	No	No	No	No	0
Asint Tx Cortis	<b>SYS 52</b>	No	No	No	No	0
Asint Tx Cortis	<b>SYS 13</b>	No	No	No	No	0
Asint Tx Cortis	<b>SYS 46</b>	No	No	No	No	0
Asint Tx Cortis	<b>SYS 21</b>	No	No	No	No	0
Sint Tx Cortis	<b>SYS 38</b>	No	No	No	Si	0
Sint Tx Cortis	<b>SYS 2</b>	No	Si	No	Si	2
Sint Tx Cortis	<b>SYS 51</b>	No	No	No	Si	4
Sint Tx Cortis	<b>SYS 33</b>	Si	Si	No	Si	4
Sint Tx Cortis	<b>SYS 47</b>	Si	Si	Si Cefalea	Si	2
Sint No Tx	<b>SYS 29</b>	No	No	No	Si	3
Sint No Tx	<b>SYS 36</b>	No	No	No	Si	10
Sint No Tx	<b>SYS 60</b>	No	No	No	Si	3
Sint No Tx	<b>SYS 62</b>					

**Tabla 11.** Datos de laboratorio (hemograma y VSG)

	<b>Código</b>	<b>VSG</b>	<b>Leucocitos</b>	<b>Hemoglobina</b>	<b>Hematíes</b>	<b>Plaquetas</b>
Niño sano	<b>H79</b>	17	10,2	12,3	4,2	307
Niño sano	<b>H37</b>	16	5,9	12,9	3,99	304
Niño sano	<b>H83</b>	23	7,5	13,1	4,14	314
Niño sano	<b>H75</b>	1	6,3	14,3	5,05	241
Niño sano	<b>H64</b>	7	4,6	13,5	4,49	201
Niño sano	<b>H77</b>		5			
Niño sano	<b>H76</b>	19	3,6	13,7	4,69	240
Adulto sano	<b>HA</b>		6,5			
Adulto sano	<b>HDS</b>		5,1			
Adulto sano	<b>HAC</b>		6,9			
Adulto sano	<b>HJA</b>		3,2			
Adulto sano	<b>HEA</b>		3,9			
Asint No Tx	<b>SYS 63</b>	15	5,5	12,1	4,12	383
Asint No Tx	<b>SYS 64</b>	4	6,5	14,1	4,78	381
Asint No Tx	<b>SYS 23</b>	10	6,4	12,8	4,38	324
Asint No Tx	<b>SYS 54</b>	11	5,6	13,4	4,6	259
Asint No Tx	<b>SYS 7</b>	4	5,2	12,7	4,65	242
Asint No Tx	<b>SYS 34</b>	5	3,6	13,4	4,25	254
Asint Tx Cortis	<b>SYS 31</b>	9	13,4	12,3	4,34	349
Asint Tx Cortis	<b>SYS 20</b>	18	10,2	11,9	3,85	347
Asint Tx Cortis	<b>SYS 52</b>	11	12,9	13,8	5,19	295
Asint Tx Cortis	<b>SYS 13</b>	29	11,6	11,7	5,19	395
Asint Tx Cortis	<b>SYS 46</b>	37	6,2	12,9	4,75	227
Asint Tx Cortis	<b>SYS 21</b>	50	13,1	9,7	3,35	627
Sint Tx Cortis	<b>SYS 38</b>	49	8,4	12,7	4,86	276
Sint Tx Cortis	<b>SYS 2</b>	70	29	11,2	4,77	711
Sint Tx Cortis	<b>SYS 51</b>	68	17,2	10,7	4,88	485
Sint Tx Cortis	<b>SYS 33</b>	91	17,3	11,1	4,33	335
Sint Tx Cortis	<b>SYS 47</b>	61	34,2	10,9	4,53	504
Sint No Tx	<b>SYS 29</b>	97	6,8	9,3	4,55	431
Sint No Tx	<b>SYS 36</b>	55	8,2	11,1	3,98	326
Sint No Tx	<b>SYS 60</b>	74	11,6	11,1	4,66	502
Sint No Tx	<b>SYS 62</b>	92	11	10,9	3,89	667

**Tabla 12.** Tratamientos

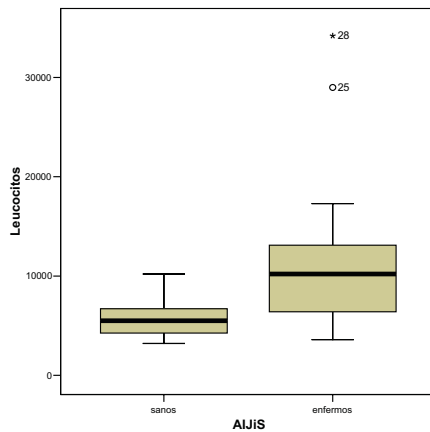
	<b>Código</b>	<b>Cortis po</b>	<b>Dosis cortis po</b>	<b>Cortis ev</b>	<b>Dosis cortis ev</b>	<b>MTX</b>	<b>Anti-TNF</b>	<b>Otros</b>
Niño sano	<b>H79</b>							
Niño sano	<b>H37</b>							
Niño sano	<b>H83</b>							
Niño sano	<b>H75</b>							
Niño sano	<b>H64</b>							
Niño sano	<b>H77</b>							
Niño sano	<b>H76</b>							
Adulto sano	<b>HA</b>							
Adulto sano	<b>HDS</b>							
Adulto sano	<b>HAC</b>							
Adulto sano	<b>HJA</b>							
Adulto sano	<b>HEA</b>							
Asint No Tx	<b>SYS 63</b>	No		No		No	No	Naproxeno
Asint No Tx	<b>SYS 64</b>	No		No		No	No	No
Asint No Tx	<b>SYS 23</b>	No		No		Si po	No	No
Asint No Tx	<b>SYS 54</b>	No		No		No	No	Naproxeno
Asint No Tx	<b>SYS 7</b>	No		No		No	No	Ibuprofeno
Asint No Tx	<b>SYS 34</b>	No		No		No	No	Ibuprofeno
Asint Tx Cortis	<b>SYS 31</b>	Si	Predni 2mg/d	No	No	No	No	Ibuprofeno
Asint Tx Cortis	<b>SYS 20</b>	Si	Predni 5 mg/d	No		Si sc	Infliximab	Fólico
Asint Tx Cortis	<b>SYS 52</b>	Si	Predni 10 mg/d	Si		No	No	Naproxeno
Asint Tx Cortis	<b>SYS 13</b>	Si	Met-pred 5mg/d	Si	30 mg/kg/d	No	No	Ibuprofeno
Asint Tx Cortis	<b>SYS 46</b>	Si	Predni 6 mg/d	No		No	No	No
Asint Tx Cortis	<b>SYS 21</b>	Si	Predni 1 mg/d	No	No	Si	no	Fólico
Sint Tx Cortis	<b>SYS 38</b>	Si	Predni 3 mg/d	No	No	Si	Etanercept	
Sint Tx Cortis	<b>SYS 2</b>	Si	Predni 25mg/d	No		Si po	Infliximab	Hidroxiclороq.
Sint Tx Cortis	<b>SYS 51</b>	Si	Predni 5 mg/d	Si	30 mg/kg/d	Si sc	No	Indometacina,
Sint Tx Cortis	<b>SYS 33</b>	Si	Predni 15 mg/d	No		Si sc	Infliximab	Fólico, ibuprofen
Sint Tx Cortis	<b>SYS 47</b>	Si	Predni 10 mg/d	Si	30 mg/kg/d	No	No	Ibuprofeno
Sint No Tx	<b>SYS 29</b>	No	No	No	No	Si	No	Fólico
Sint No Tx	<b>SYS 36</b>	No		No		Si sc	No	Ibuprofeno, fólico
Sint No Tx	<b>SYS 60</b>	No		No		No	No	Ibuprofeno, ranitidina
Sint No Tx	<b>SYS 62</b>	No		No				

## 5.2. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS:

Se constató un aumento de las cifras de leucocitos en los pacientes con AIJiS respecto a los individuos sanos, con valores significativos ( $p = 0,03$ ), así como de las cifras de granulocitos ( $p = 0,009$ ) y monocitos totales (CD14+) ( $p = 0,022$ ), y en especial el subtipo CD14+CD16- ( $p = 0,024$ ), así como de las células CD14++CD16++ ( $p = 0,008$ ).

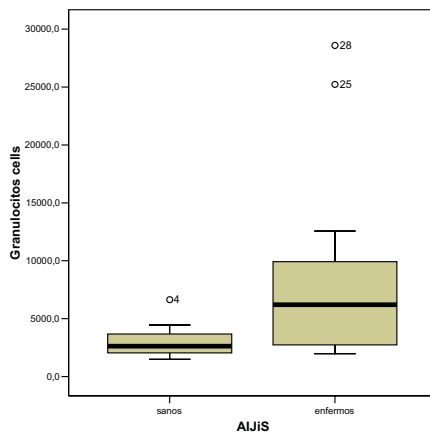
Sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	sanos	12	3200	10200	4075	5500	6800	,003
	enfermos	21	3600	34200	6300	10200	13250	

**Gráfico 1**



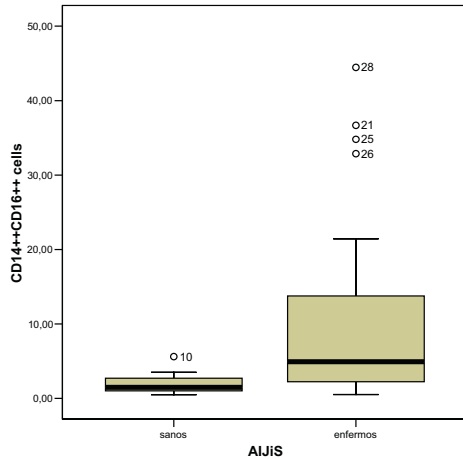
Sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Granulocitos cells	sanos	11	1495,08	6640,20	1971,20	2621,37	4041,05	,009
	enfermos	21	1978,20	28587,78	2655,40	6201,72	10030,88	

**Gráfico 2**



Sanos vs AIJIS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14++CD16++ cells	sanos	11	0,50	5,61	0,96	1,50	3,06	,008
	enfermos	21	0,52	44,46	1,67	4,92	17,60	

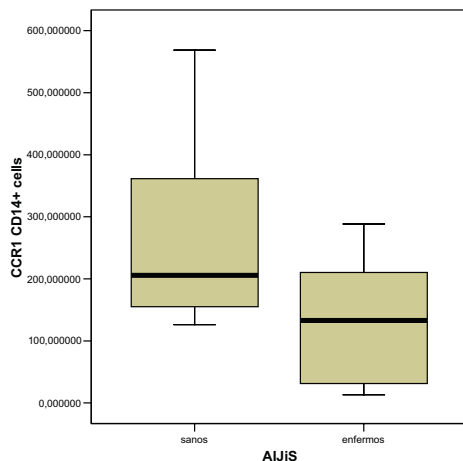
**Gráfico 3**



Destacar el hallazgo de diferencias significativas de CCR1, con expresión disminuida en pacientes con AIJIS respecto sujetos sanos para CD14+ (p 0'005), CD14+CD16- (p 0'028), CD14+CD16+ (p 0'047) y CD14dimCD16+ (p 0'009).

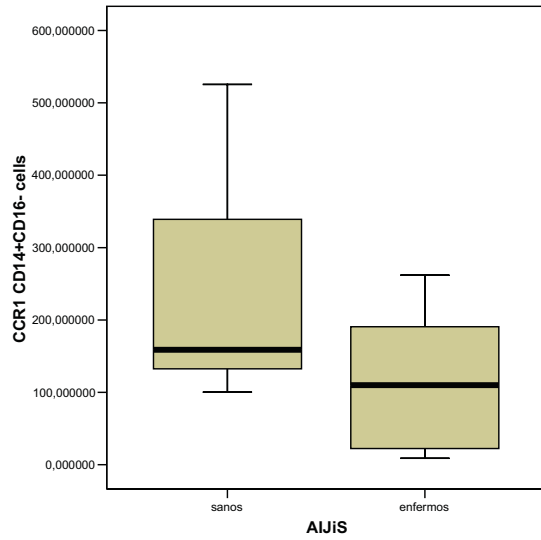
Sanos vs AIJIS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+ cells	sanos	10	126,18	568,64	151,56	205,70	389,28	,005
	enfermos	20	13,28	288,46	29,87	132,91	213,53	

**Gráfico 4**



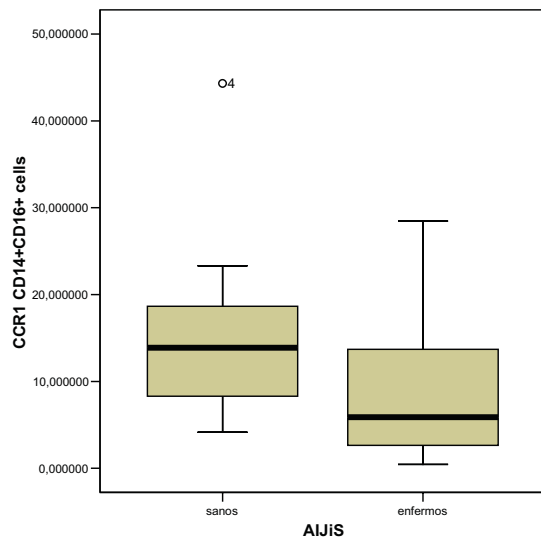
Sanos vs AIJiS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+CD16- cells	sanos	10	100,21	525,41	129,90	158,78	370,71	,028
	enfermos	20	9,03	261,98	22,16	109,93	190,94	

Gráfico 5



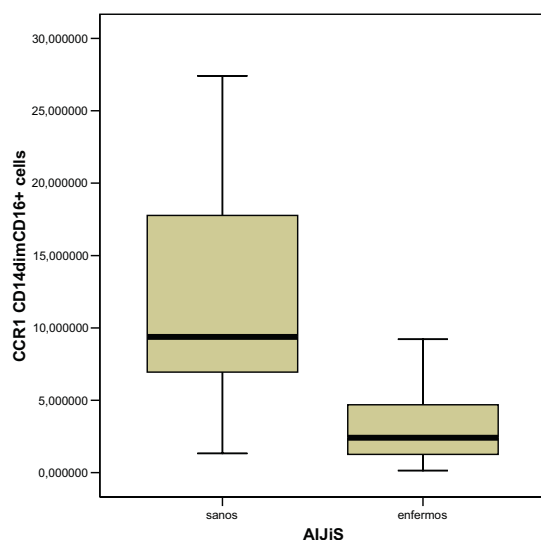
Sanos vs AIJiS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+CD16+ cells	sanos	10	4,16	44,31	7,57	13,89	19,82	,047
	enfermos	20	0,45	28,46	2,58	5,90	15,19	

Gráfico 6



Sanos vs AIJiS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14dimCD16+ cells	sanos	10	1,33	27,41	6,11	9,38	19,42	,009
	enfermos	20	0,15	9,21	1,18	2,41	4,77	

**Gráfico 7**

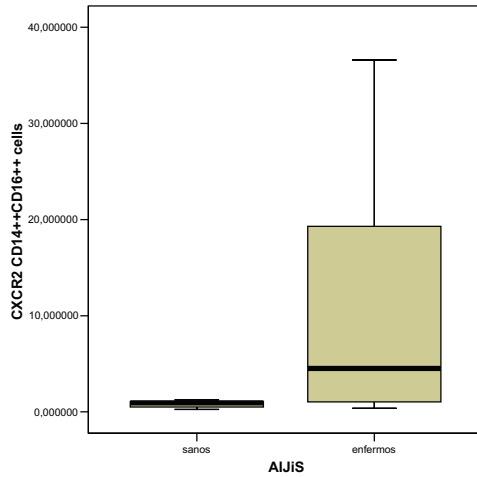


Aunque con un número reducido de casos se observó también significación para CXCR1, con valores más altos en los enfermos respecto a los sanos, en los granulocitos (p 0'03), y en algunos subtipos de monocitos, CD14+CD16+ (p 0'048) y CD14dimCD16+ (p 0'048), (**Anexo 3, gráficos I, II y III**) con tendencias aunque no significativas en el subtipo de monocitos CD14+CD16- (p 0'076) y en las células CD14++CD16++ (p 0'076).

Se observó también significación para CXCR2, con valores más altos en los pacientes con AIJiS que en los sanos, en las células CD14++CD16++ (p 0'042).

Sanos vs AIJIS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR2 CD14++CD16++ cells	sanos	5	0,27	1,26	0,38	0,93	1,17	,042
	enfermos	14	0,37	36,58	0,90	4,52	22,50	

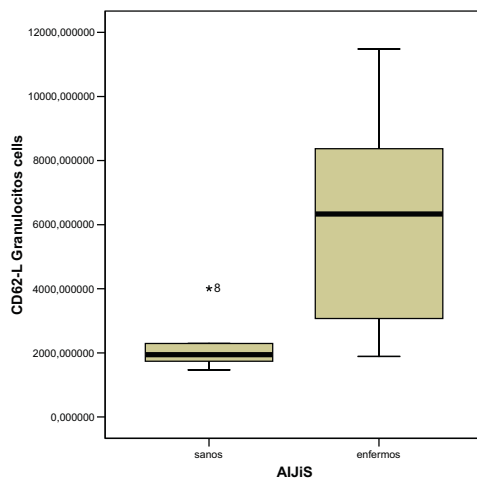
**Gráfico 8**



Para CD62-L se observaron diferencias significativas para los granulocitos (p 0'015), con cifras más altas en los pacientes con AIJIS que en los sujetos sanos.

Sanos vs AIJIS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD62-L Granulocitos cells	sanos	5	1472,65	4009,93	1605,27	1944,19	3151,58	,015
	enfermos	11	1891,15	11479,61	2321,37	6332,28	9836,31	

**Gráfico 9**





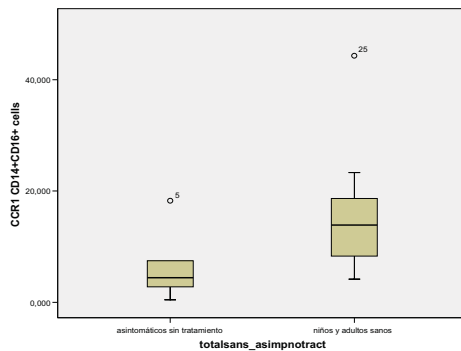
### 5.2.1 Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS

#### Asintomáticos Sin Tratamiento:

Destaca en este grupo de pacientes en remisión sin tratamiento el mantenimiento de diferencias significativamente más bajas que los sujetos sanos, a nivel de CCR1, en especial en los subtipos CD14+CD16+ (p 0'039) y CD14dimCD16+ (p 0'039), con tendencias también en las células CD14++CD16++ (p 0'065).

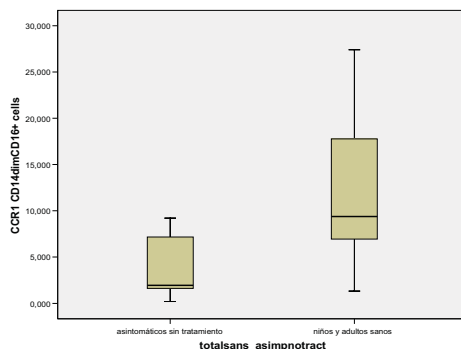
Total sanos vs AIJiS Asintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14+CD16+ cells	AIJiS Asintom No Tx	6	0,45	18,26	2,20	4,42	10,16	,039
	Total sanos	10	4,16	44,31	7,57	13,89	19,82	

Gráfico 10



Total sanos vs AIJiS Asintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14dimCD16+ cells	AIJiS Asintom No Tx	6	0,20	9,21	1,26	1,94	7,68	,039
	Total sanos	10	1,33	27,41	6,11	9,38	19,42	

Gráfico 11



Aunque con un número reducido de casos para CD62-L se observaron también diferencias significativamente más bajas en los pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento con respecto al total de sanos para el total de monocitos, CD14+, y el subtipo principal, CD14+CD16-, (**Anexo 3, IV y V**) con tendencias a nivel de los CD14dimCD16+ (p 0'053).

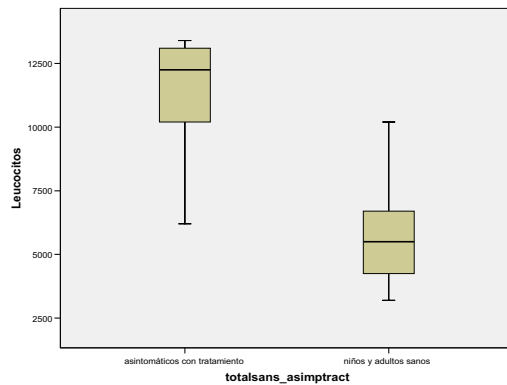
## 5.2.2 Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS

### Asintomáticos Con Tratamiento:

En este subgrupo se observan diferencias significativas, con mayores cifras en los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento a nivel de las cifras de leucocitos (p 0'004), granulocitos (p 0'004) y en las células CD14++CD16++ (p 0'035).

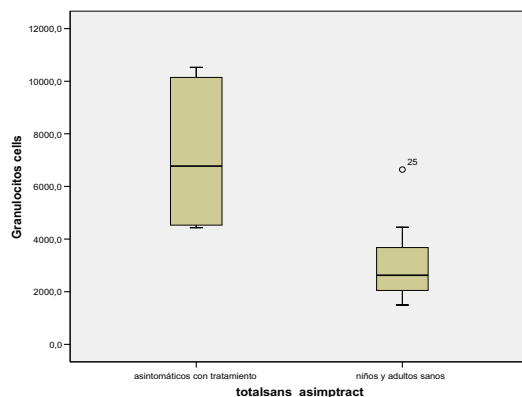
Total sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	AIJiS Asintom Tx	6	6200	13400	9200	12250	13175	,004
	Total sanos	12	3200	10200	4075	5500	6800	

Gráfico 12



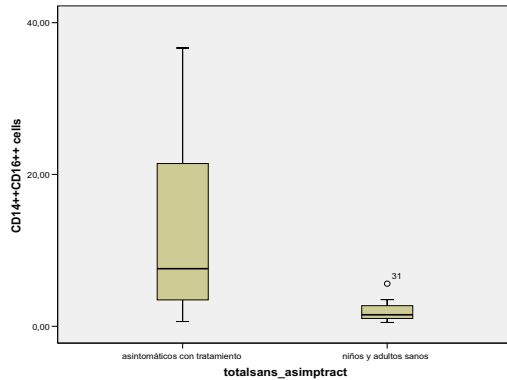
Total sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Granulocitos cells	AIJiS Asintom Tx	6	4430,52	10528,98	4505,85	6772,40	10241,71	,004
	Total sanos	11	1495,08	6640,20	1971,20	2621,37	4041,05	

Gráfico 13



Total sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD14++CD16++ cells	AIJiS Asintom Tx	6	0,62	36,68	2,77	7,58	25,25	,035
	Total sanos	11	0,50	5,61	0,96	1,50	3,06	

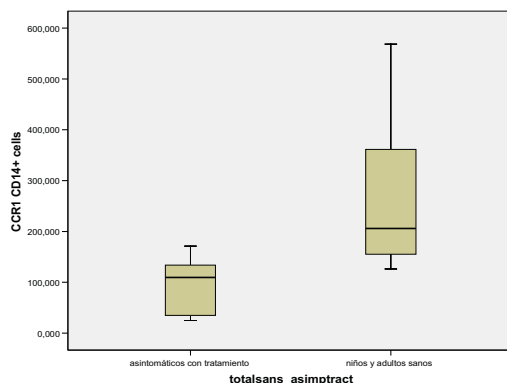
Gráfico 14



En cambio a nivel de CCR1, se observan diferencias significativamente más bajas para los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento a nivel del global de los monocitos (CD14+) (p 0'007) y los subtipos de monocitos CD14+CD16- (p 0'007) y CD14dimCD16+ (p 0'017).

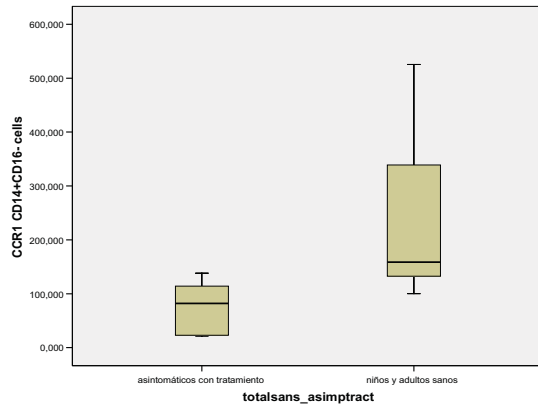
Total sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14+ cells	AIJiS Asintom Tx	6	24,86	171,06	32,28	109,59	143,08	,007
	Total sanos	10	126,18	568,64	151,56	205,70	389,28	

Gráfico 15



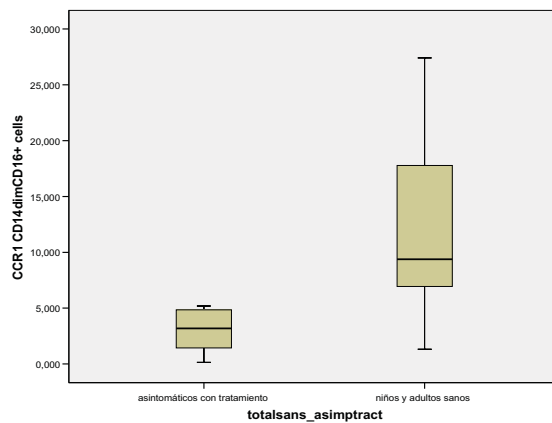
Total sanos vs AIJiS Asintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+CD16- cells	AIJiS Asintom Tx	6	21,92	138,25	22,65	82,20	120,27	,007
	Total sanos	10	100,21	525,41	129,90	158,78	370,71	

Gráfico 16



Total sanos vs AIJiS Asintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14dimCD16+ cells	AIJiS Asintom Tx	6	0,15	5,19	1,11	3,19	4,93	,017
	Total sanos	10	1,33	27,41	6,11	9,38	19,42	

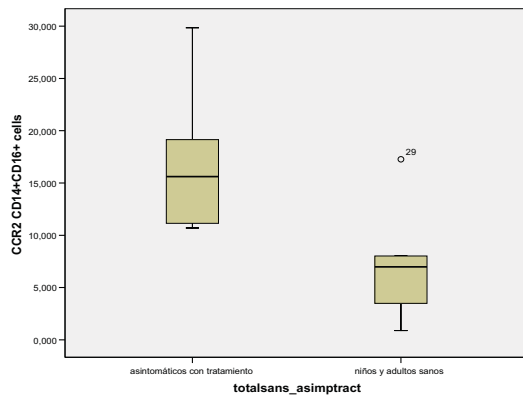
Gráfico 17



A nivel de CCR2, se objetivan diferencias significativas con cifras superiores para AIJ asintomáticos con tratamiento en el subtipo de monocitos CD14+CD16+ (p 0'047).

Total sanos vs AIJiS Asintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR2 CD14+CD16+ cells	AIJiS Asintom Tx	5	10,69	29,84	10,92	15,61	24,50	,047
	Total sanos	5	0,89	17,27	2,19	6,98	12,65	

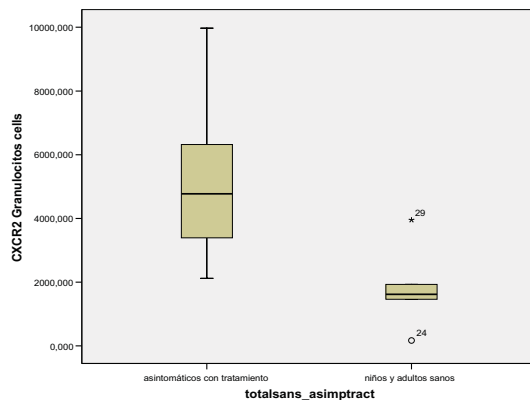
Gráfico 18



Se observan también diferencias significativas a nivel de CXCR2 en los granulocitos (p 0'028), con cifras más altas en los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento.

Total sanos vs AIJiS Asintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR2 Granulocitos cells	AIJiS Asintom Tx	5	2117,79	9974,48	2754,61	4772,92	8145,94	,028
	Total sanos	5	167,21	3952,96	814,10	1616,49	2941,18	

Gráfico 19



### **5.2.3. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS Sintomáticos Sin Tratamiento:**

Aunque solo tuvimos 4 pacientes con AIJiS Sintomáticos Sin Tratamiento al compararlos con los individuos sanos se observan diferencias significativas con aumentos en las cifras de leucocitos (p 0'15) y linfocitos (p 0'006) (**Anexo 3, gráficos VI y VII**) Con tendencia en las cifras de granulocitos (p 0'068).

Igualmente en los pacientes con AIJiS sintomáticos sin tratamiento se observan diferencias significativas con descenso en las cifras de CCR1, en los monocitos CD14dimCD16+ (p 0'24), (**Anexo 3, gráfico VIII**) con tendencia en los linfocitos (p 0'90).

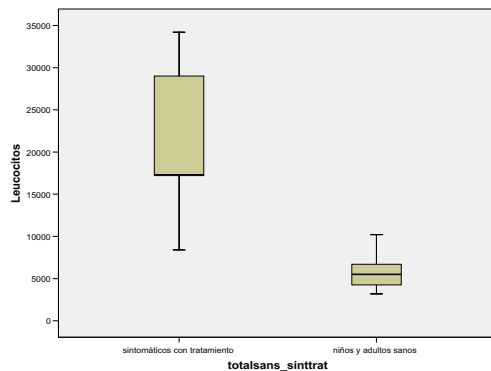
## 5.2.4. Análisis individuos sanos (niños y adultos) versus pacientes con AIJiS

### Sintomáticos Con Tratamiento:

En los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento se observan diferencias significativas con aumentos de las cifras de leucocitos (p 0'002), granulocitos (p 0'003), y monocitos totales, CD14 + (p 0'002) y los subtipos CD14+CD16- (p 0'002), y CD14++CD16++ (p 0'002).

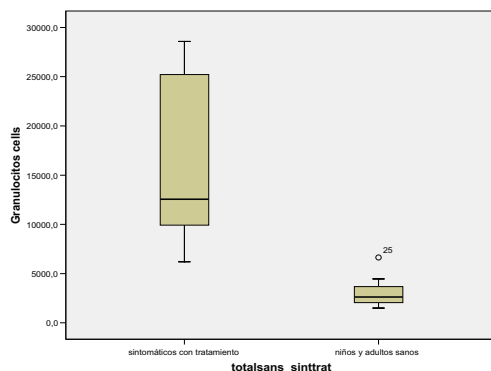
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	AIJiS Sintom Tx	5	8400	34200	12800	17300	31600	,002
	Total sanos	12	3200	10200	4075	5500	6800	

Gráfico 20



Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Granulocitos cells	AIJiS Sintom Tx	5	6201,72	28587,78	8058,76	12552,88	26904,54	,003
	Total sanos	11	1495,08	6640,20	1971,20	2621,37	4041,05	

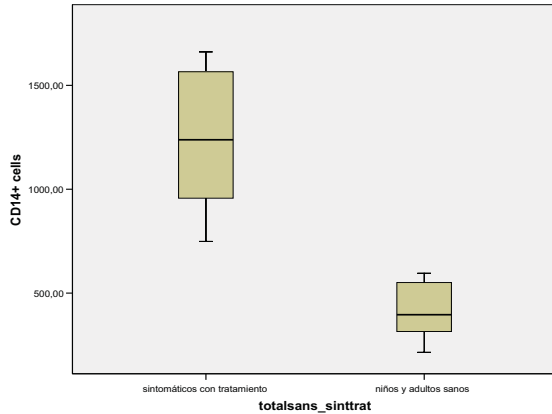
Gráfico 21





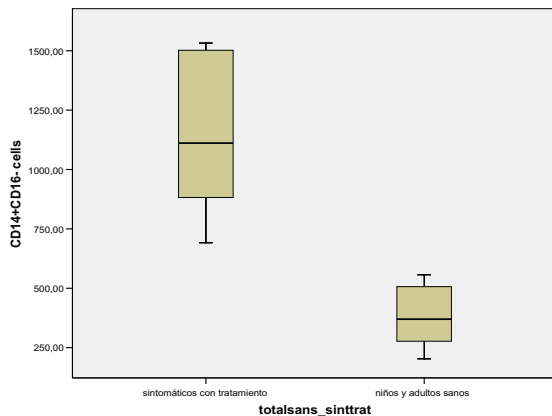
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14+ cells	AIJiS Sintom Tx	5	748,44	1661,52	852,57	1238,04	1613,76	,002
	Total sanos	11	214,08	595,47	273,39	395,89	567,00	

Gráfico 22



Total sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14+CD16- cells	AIJiS Sintom Tx	5	691,32	1532,52	786,81	1111,50	1517,36	,002
	Total sanos	11	202,24	556,14	248,43	369,93	543,40	

Gráfico 23



Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
AIJiS Sintom Tx	5	5,88	44,46	9,82	32,87	39,63	,002
Total sanos	11	0,50	5,61	0,96	1,50	3,06	

**Gráfico 24**



Aunque solo tuvimos 4 pacientes con AIJiS Sintomáticos Con Tratamiento a nivel de CCR1 se observan diferencias con disminución significativas en las cifras de linfocitos (p 0'034), y en los subtipos de monocitos CD14dimCD16+ (p 0'024). En cambio para CCR1 en los pacientes sintomáticos con tratamiento se observa un aumento significativo para las células CD14++CD16++ (p 0'024). (**Anexo 3, gráficos IX, X y XI**)

También con un número reducido se observaron diferencias significativas en los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento a nivel de CCR2 con aumentos en el total de los monocitos, CD14+ (p 0'025) y en el subtipo CD14+CD16- (p 0'025) y las células CD14++CD16++ (p 0'025), (**Anexo 3, gráficos XII, XIII y XIV**) con tendencias en las cifras de granulocitos (p 0'053).

Por lo que respecta a CXCR2 se observan también diferencias significativas con aumento de las cifras de granulocitos (p 0'025) y de las células CD14++CD16++ (p 0'025) en los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento. (**Anexo 3, gráficos XV y XVI**)

Para CD62-L los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento presentaron aumentos significativos en las cifras de granulocitos (p 0'025), los monocitos totales

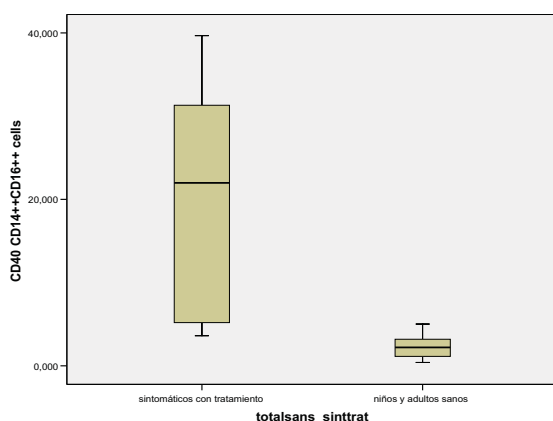
CD14+ (p 0'025), y el subtipo de monocitos CD14+CD16- (p 0'025) y las células CD14++CD16++ (p 0'025), (anexo 3, gráficos XVII, XVIII, XIX y XX) con tendencia en el subtipo de monocitos CD14dimCD16+ (p 0'053).

Igualmente, y aunque también con un reducido número de casos se observó para CD64, de manera similar, que los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento mostraron aumentos significativos en el total de monocitos, CD14+ (p 0'025), en el subtipo CD14+CD16- (p 0'025) y en las células CD14++CD16++ (p 0'025) (anexo 3, gráficos XXI, XXII y XXIII) y tendencia en las cifras de granulocitos (p 0'053).

A nivel de CD40, los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento presentaron aumentos significativos en el subtipo de células CD14++CD16++ (p 0'005).

Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD40 CD14++CD16++ cells	AIJiS Sintom Tx	5	3,61	39,68	4,40	21,99	35,50	,005
	Total sanos	8	0,40	5,03	1,01	2,22	3,33	

Gráfico 25



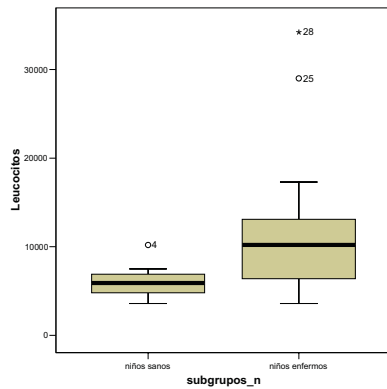
También para CD83, en los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento se observó un aumento significativo en el subtipo de células CD14++CD16++ (p 0'046), pero de nuevo con pocos casos (anexo 3, gráfico XXIV)

### 5.3. Análisis niños sanos versus pacientes con AIJiS:

Al aplicar unos criterios más restrictivos y analizar sólo las diferencias entre niños sanos y los afectos de AIJiS, pese a ser menor el número de casos continúan observándose diferencias significativas con aumento en los pacientes con AIJiS de las cifras de leucocitos (p 0'021), granulocitos (p 0'036), y las células CD14++CD16++ (p 0'031).

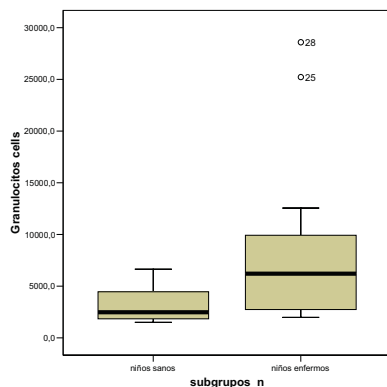
Niños sanos vs AIJiS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
Leucocitos	Niños sanos	7	3600	10200	4600	5900	7500	,021
	AIJiS	21	3600	34200	6300	10200	13250	

Gráfico 26



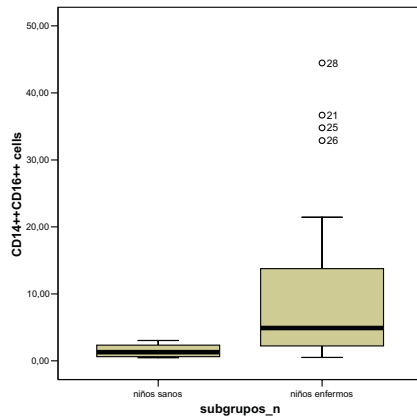
Niños sanos vs AIJiS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
Granulocitos cells	Niños sanos	6	1495,08	6640,20	1751,15	2486,58	4999,05	,036
	AIJiS	21	1978,20	28587,78	2655,40	6201,72	10030,88	

Gráfico 27



Niños sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD14++CD16++ cells	Niños sanos	6	0,50	3,06	0,60	1,29	2,54	,031
	AIJiS	21	0,52	44,46	1,67	4,92	17,60	

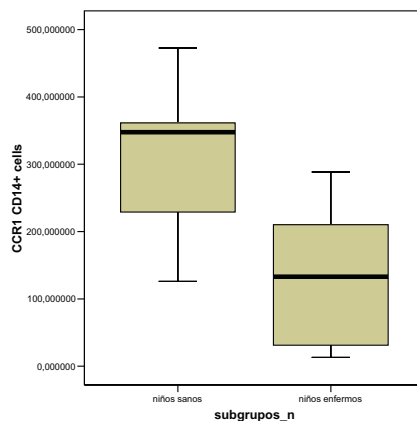
Gráfico 28



Por lo que respecta a CCR1 se observa como los pacientes con AIJiS presentan niveles significativamente más bajos en las poblaciones de los monocitos totales, CD14+, (p 0'017), y en los subtipos CD14+CD16- (p 0'03) y CD14dimCD16+ (p 0'021), con tendencias a la significación en CD14+CD16+ (p 0'057).

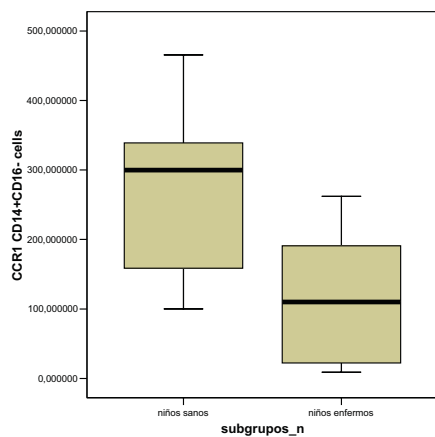
Niños sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14+ cells	Niños sanos	5	126,18	472,59	177,60	347,59	417,05	,017
	AIJiS	20	13,28	288,46	29,87	132,91	213,53	

Gráfico 29



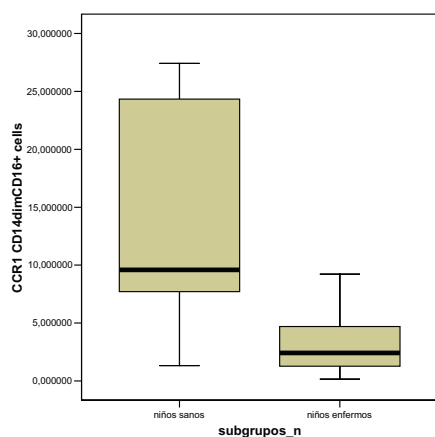
Niños sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14+CD16- cells	Niños sanos	5	100,21	465,67	129,43	299,88	402,36	,030
	AIJiS	20	9,03	261,98	22,16	109,93	190,94	

**Gráfico 30**



Niños sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14dimCD16+ cells	Niños sanos	5	1,33	27,41	4,52	9,59	25,87	,021
	AIJiS	20	0,15	9,21	1,18	2,41	4,77	

**Gráfico 31**



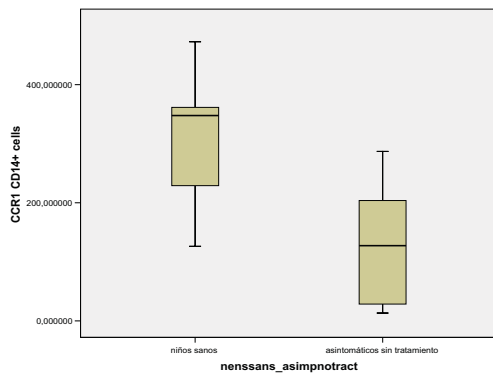
Con un número reducido de casos para CD62-L en los pacientes con AIJiS se observan aumentos significativos en las poblaciones de granulocitos (p 0'016). (Anexo 3, gráfico XXV)

### 5.3.1 Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Asintomáticos Sin Tratamiento

Al analizar solo los niños respecto a los subgrupos vemos al comparar el grupo de niños sanos con pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento, es decir en remisión sin tratamiento, que en estos persiste una disminución significativa para CCR1, en concreto para los monocitos totales, CD14+ (p 0'045) y el subtipo CD14+CD16+ (p 0'045).

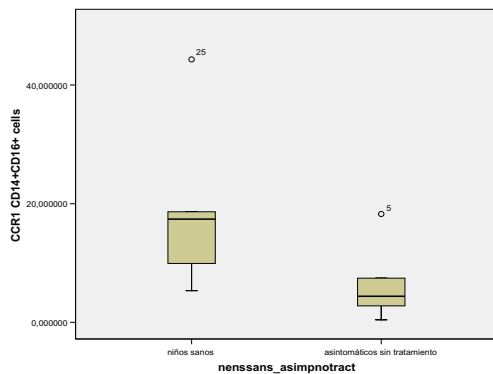
Niños sanos vs AIJiS Asintom No Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+ cells	Niños sanos	5	126,18	472,59	177,60	347,59	417,05	,045
	AIJiS Asintom No Tx	6	13,28	286,92	24,71	127,34	224,55	

Gráfico 32



Niños sanos vs AIJiS Asintom No Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+CD16+ cells	Niños sanos	5	5,36	44,31	7,64	17,41	31,48	,045
	AIJiS Asintom No Tx	6	0,45	18,26	2,20	4,42	10,16	

Gráfico 33

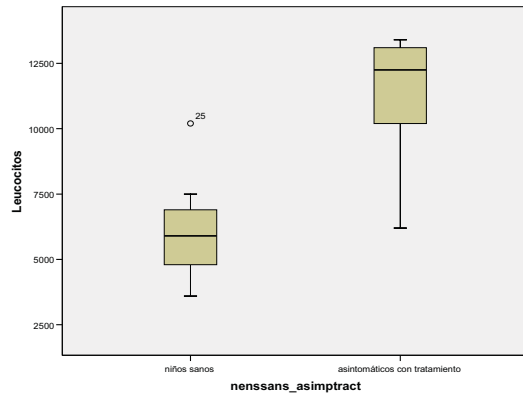


### 5.3.2 Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Asintomáticos Con Tratamiento

Al analizar los pacientes con AIJ asintomáticos con tratamiento se objetiva un aumento significativo de las cifras de leucocitos (p 0'012) y granulocitos (p 0'025), así como de las células CD14++CD16++ (p 0'037).

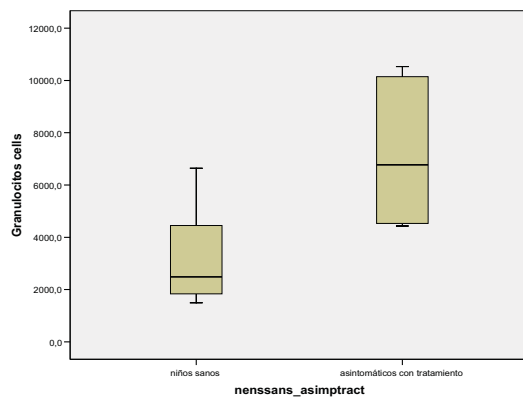
Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	Niños sanos	7	3600	10200	4600	5900	7500	,012
	AIJiS Asintom Tx	6	6200	13400	9200	12250	13170	

Gráfico 34



Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Granulocitos cells	Niños sanos	6	1495,08	6640,20	1751,15	2486,58	4999,05	,025
	AIJiS Asintom Tx	6	4430,52	10528,98	4505,85	6772,40	10241,71	

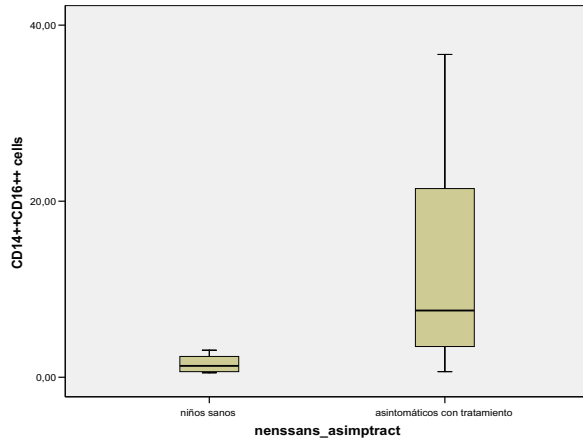
Gráfico 35





Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD14++CD16++ cells	Niños sanos	6	0,50	3,06	0,60	1,29	2,54	,037
	AIJiS Asintom Tx	6	0,62	36,68	2,77	7,58	25,25	

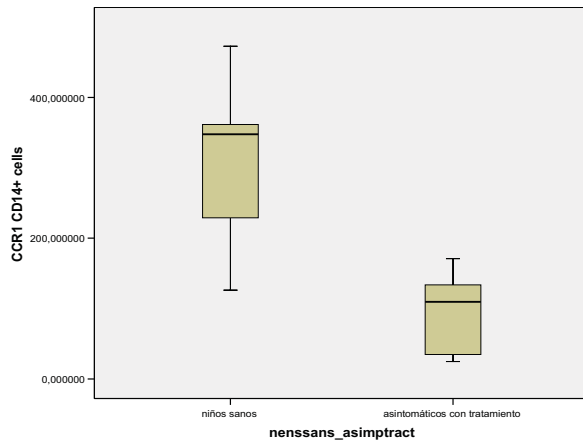
Gráfico 36



De nuevo para CCR1 se objetiva una disminución significativa en los pacientes con AIJ asintomáticos con tratamiento, en los monocitos totales (p 0'028) y en el subtipo CD14+CD16- (p 0'028), con tendencia en CD14dimCD16+ (p 0'068).

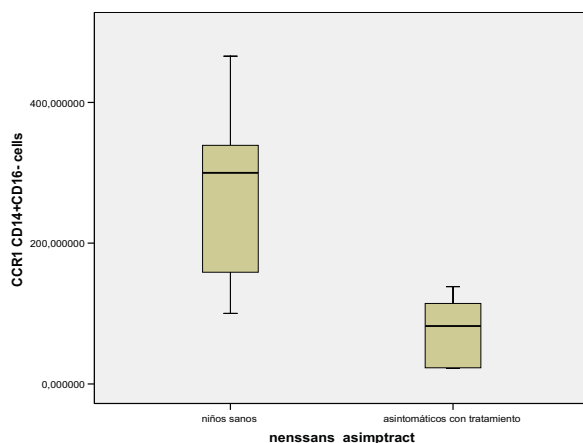
Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14+ cells	Niños sanos	5	126,18	472,59	177,60	347,59	417,05	,028
	AIJiS Asintom Tx	6	24,86	171,06	32,28	109,59	143,08	

Gráfico 37



Niños sanos vs ALJiS Asintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14+CD16- cells	Niños sanos	5	100,21	465,67	129,43	299,88	402,36	,028
	ALJiS Asintom Tx	6	21,92	138,25	22,65	82,20	120,27	

**Gráfico 38**



De nuevo con un reducido número de casos para CCR2 en los pacientes asintomáticos con tratamiento se objetivo un aumento significativo de los monocitos CD14+CD16+ (p 0'025) (**anexo 3, gráfico XXVI**) con tendencias a nivel de CD14dimCD16+ (p 0'053).

También para CXCR2 en los pacientes asintomáticos con tratamiento se vio un aumento significativo a nivel de las cifras de granulocitos (p 0'025), pero de nuevo se pudo obtener sólo un reducido número de pacientes (**anexo 3, gráfico XXVII**).

### **5.3.3 Análisis Niños Sanos versus pacientes con AIJiS Sintomáticos Sin Tratamiento**

En el análisis de los pacientes con AIJiS sintomáticos sin tratamiento se observó un aumento significativo de las cifras de leucocitos (p 0'038) y linfocitos (p 0'019), pero se pudieron obtener pocos pacientes sintomáticos sin tratamiento (**anexo 3, gráficos XXVIII y XXIX**).

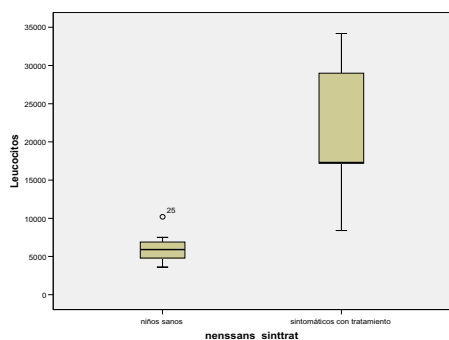
También se objetivo una tendencia la significación a nivel de CCR1 para el global de monocitos totales, CD14+, (p 0'086) y los subtipos CD14+CD16- (p 0'086) y CD14dimCD16+ (p 0'086).

### 5.3.4 Análisis Niños Sanos versus pacientes AIJiS Sintomáticos Con Tratamiento

En los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento se objetivó un aumento significativo para las cifras de leucocitos (p 0'007), granulocitos (p 0'011), y monocitos totales, CD14+, (p 0'006), el subtipo de monocitos CD14+CD16- (p 0'006) y las células CD14++CD16++ (p 0'006). También se objetivo una tendencia para las células dendríticas CD123 (p 0'083).

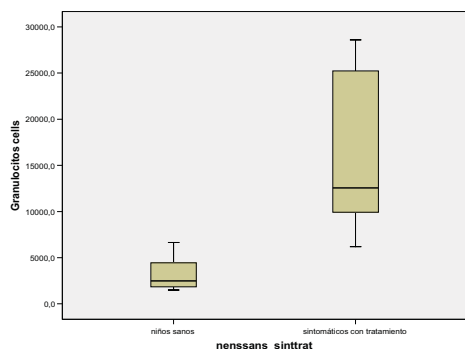
Niños sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
Leucocitos	Niños sanos	7	3600	10200	4600	5900	7500	,007
	AIJiS Sintom Tx	5	8400	34200	12800	17300	31600	

Gráfico 39



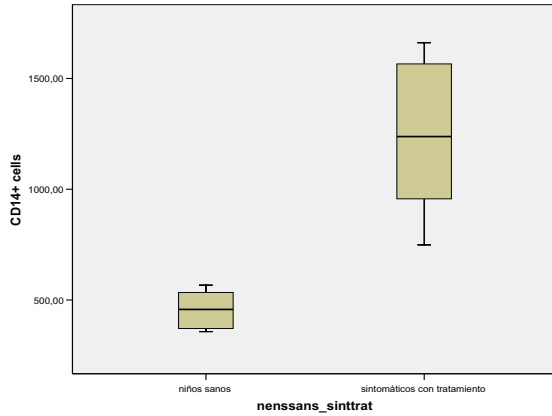
Niños sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
Granulocitos cells	Niños sanos	6	1495,08	6640,20	1751,15	2486,58	4999,05	,011
	AIJiS Sintom Tx	5	6201,72	28587,78	8058,76	12552,88	26904,54	

Gráfico 40



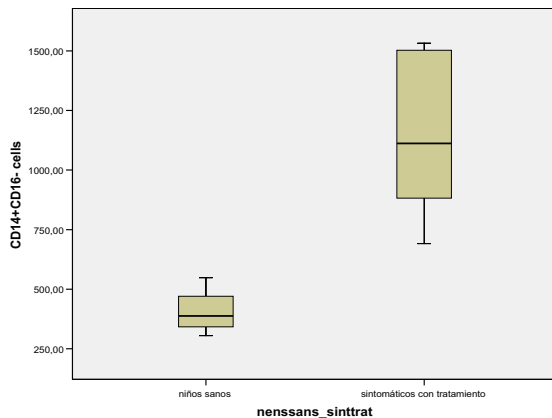
Niños sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14+ cells	Niños sanos	6	356,76	567,00	367,82	457,54	542,25	,006
	AIJiS Sintom Tx	5	748,44	1661,52	852,57	1238,04	1613,76	

Gráfico 41



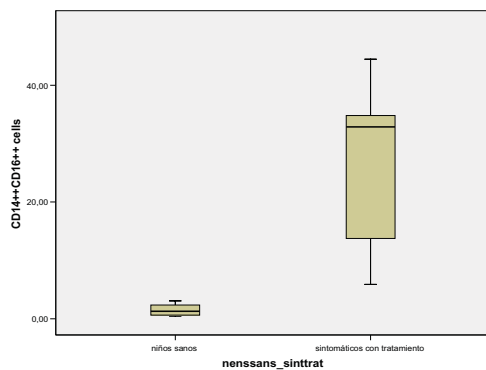
Niños sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14+CD16- cells	Niños sanos	6	305,28	548,10	332,82	387,95	489,71	,006
	AIJiS Sintom Tx	5	691,32	1532,52	786,81	1111,50	1517,36	

Gráfico 42



Niños sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14++CD16++ cells	Niños sanos	6	0,50	3,06	0,60	1,29	2,54	,006
	AIJIS Sintom Tx	5	5,88	44,46	9,82	32,87	39,63	

**Gráfico 43**



Aunque se pudieron obtener pocos casos, por lo que respecta a CCR1 en los pacientes sintomáticos con tratamiento se vio un aumento significativo para las células CD14++CD16++ (p 0'027) (**anexo 3, gráfico XXX**) y tendencias para las poblaciones de linfocitos (p 0'05) y CD14dimCD16+ (p 0'05).

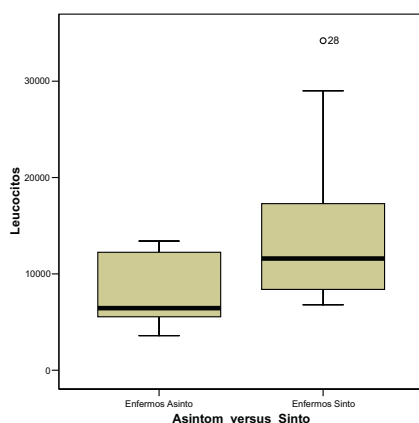
También para CD40 a pesar del número reducido de casos se vio un aumento significativo en los pacientes con AIJIS sintomáticos con tratamiento para las células CD14++CD16++ (p 0'014). (**Anexo 3, gráfico XXXI**)

#### 5.4. Análisis pacientes con AIJiS sintomáticos versus pacientes asintomáticos:

En los pacientes con AIJiS sintomáticos se observó un aumento significativo en las poblaciones de leucocitos (p 0'025). A pesar del número reducido destaca en cambio la disminución en la subpoblación de células dendríticas CD123+ (p 0'034) (**anexo 3, gráfico XXXII**), con tendencias en las poblaciones de granulocitos (p 0'055), monocitos totales CD14+ (p 0'076), células CD14++CD16++ (p 0'065), y basófilos (p 0'077).

AIJiS Asintomat. vs Sintomat.		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
Leucocitos	Asintomat.	12	3600	13400	5525	6450	12575	,025
	Sintomat.	9	6800	34200	8300	11600	23150	

**Gráfico 44**

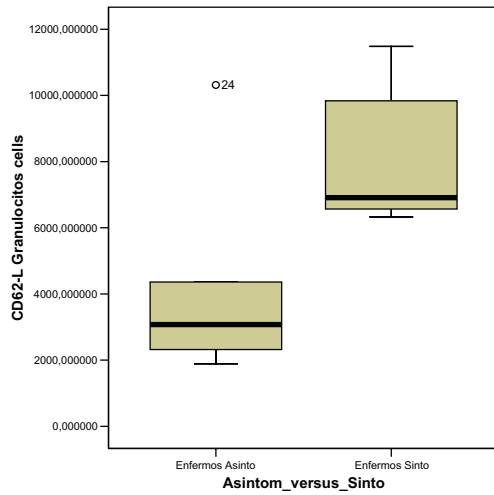


A pesar del número reducido de casos en los pacientes con AIJiS sintomáticos se observó un aumento significativo para CCR4 en las poblaciones de granulocitos (p 0'034), (**anexo 3, gráfico XXXIII**). Igualmente para CCR5 en los pacientes con AIJiS sintomáticos también se observaron diferencias en las poblaciones de granulocitos (p 0'021)., (**anexo 3, gráfico XXXIV**)

Por lo que respecta a CD62-L los pacientes con AIJiS sintomáticos presentaron un aumento significativo para las poblaciones de granulocitos (p 0'045), monocitos totales CD14+ (p 0'018) y subtipo CD14+CD16- (p 0'018), y las células CD14++CD16++ (p 0'045).

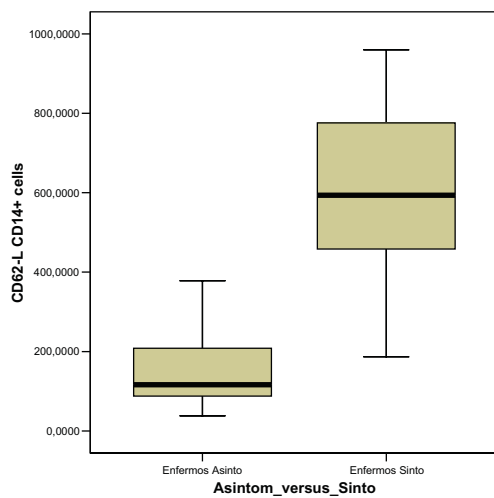
AIJIS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L Granulocitos cells	Asintomat.	6	1891,15	10315,24	2212,66	3073,88	5848,87	,045
	Sintomat.	5	6332,28	11479,61	6450,25	6910,32	10657,96	

Gráfico 45



AIJIS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14+ cells	Asintomat.	6	38,22	378,25	75,46	116,40	250,83	,018
	Sintomat.	5	187,12	960,18	322,56	593,63	867,91	

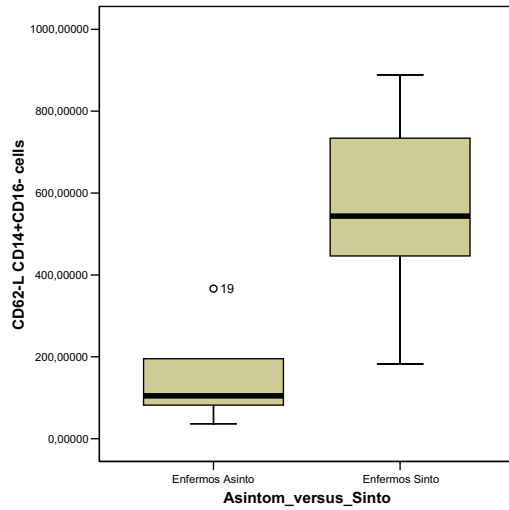
Gráfico 46





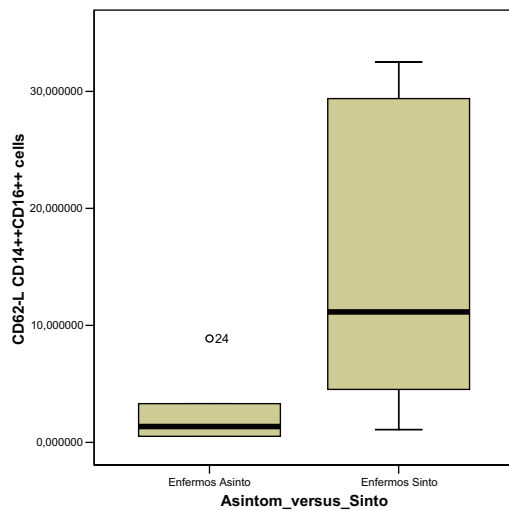
AIJis Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14+CD16- cells	Asintomat.	6	36,90	366,68	70,78	104,84	238,34	,018
	Sintomat.	5	182,20	888,86	314,31	543,50	811,34	

Gráfico 47



AIJis Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14++CD16++ cells	Asintomat.	6	0,52	8,87	0,52	1,36	4,70	,045
	Sintomat.	5	1,10	32,51	2,81	11,15	30,95	

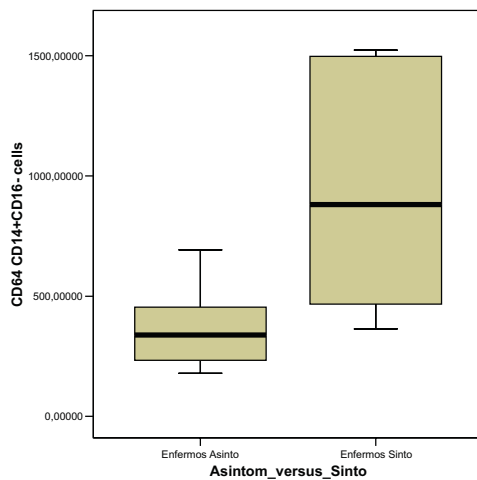
Gráfico 48



En pacientes con AIJiS sintomáticos para CD64, se encontró un aumento significativo para los monocitos CD14+CD16- (p 0'045) y las células CD14++CD16++ (p 0'045).

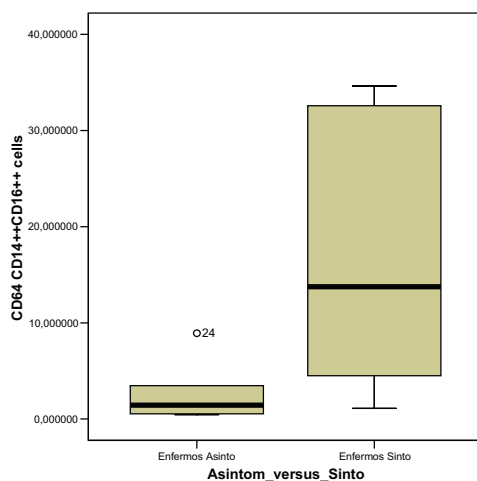
AIJiS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD64 CD14+CD16- cells	Asintomat.	6	179,20	692,50	219,87	338,87	513,93	,045
	Sintomat.	5	363,55	1523,78	415,27	881,15	1510,59	

Gráfico 49



AIJiS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD64 CD14++CD16++ cells	Asintomat.	6	0,46	8,92	0,53	1,43	4,84	,045
	Sintomat.	5	1,10	34,63	2,80	13,76	33,60	

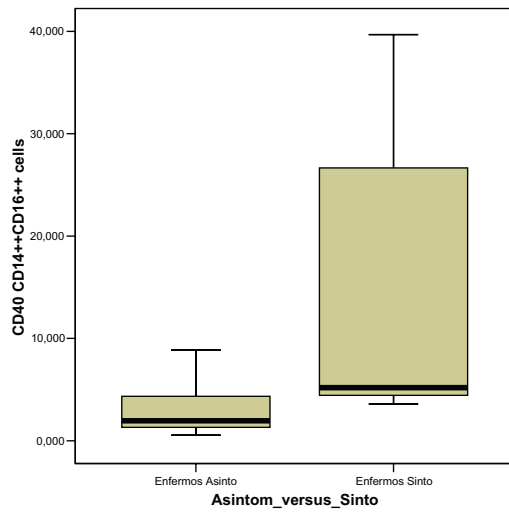
Gráfico 50



Para CD40 los pacientes con AIJiS sintomáticos presentaron un aumento significativo en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> (p 0'035), así como tendencia en la población de granulocitos (p 0'064).

AIJiS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD40 CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>++</sup> cells	Asintomat.	7	0,55	8,86	0,72	1,95	6,12	,035
	Sintomat.	7	3,61	39,68	3,98	5,19	31,32	

Gráfico 51

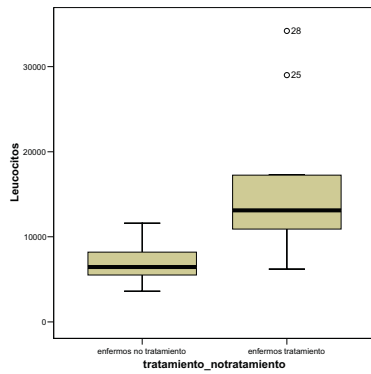


**5.5. Análisis pacientes con AIJiS en tratamiento versus pacientes sin tratamiento:**

Los pacientes con AIJiS con tratamiento presentaron un aumento significativo de las poblaciones de leucocitos (p 0'002) y granulocitos (p 0'002), así como en las subpoblaciones de monocitos totales CD14+ (p 0'006) y CD14+CD16- (p 0'011), y de las células CD14++CD16++ (p 0'002).

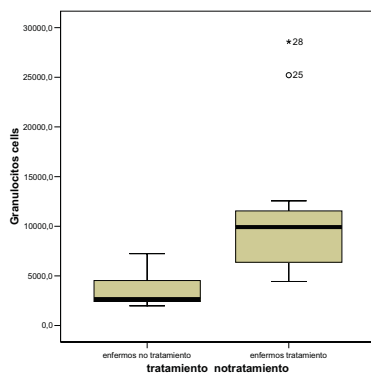
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	En Tratamiento	11	6200	34200	10200	13100	17300	0,002
	No Tratamiento	10	3600	11600	5425	6450	8900	

**Gráfico 52**



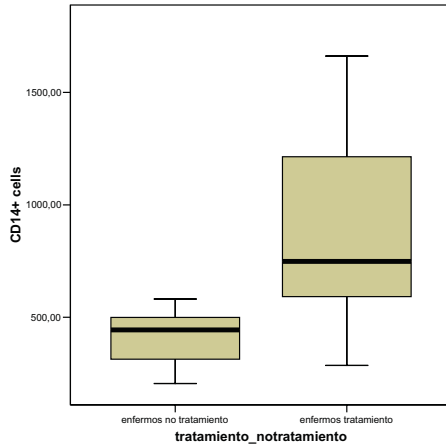
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Granulocitos cells	En Tratamiento	11	4430,52	28587,78	6201,72	9915,80	12552,88	,002
	No Tratamiento	10	1978,20	7230,28	2378,54	2655,40	5119,04	

**Gráfico 53**



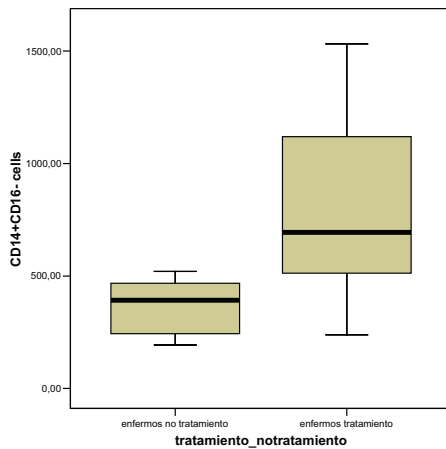
AIJis Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14+ cells	En Tratamiento	11	285,82	1661,52	494,07	748,44	1238,04	,006
	No Tratamiento	10	205,92	581,75	299,93	443,94	515,83	

Gráfico 54



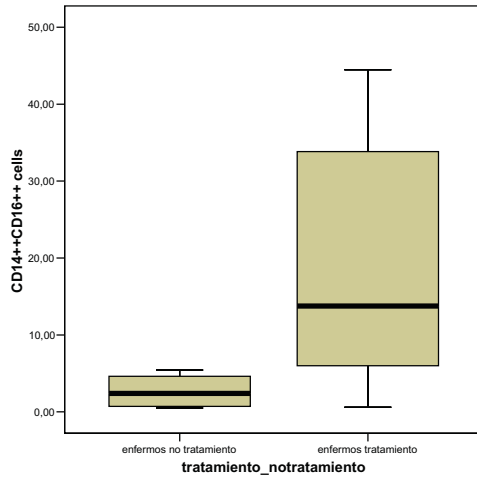
AIJis Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14+CD16- cells	En Tratamiento	11	238,70	1532,52	398,61	693,68	1126,94	,011
	No Tratamiento	10	192,92	520,00	243,15	392,00	477,83	

Gráfico 55



AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD14++CD16++ cells	En Tratamiento	11	0,62	44,46	5,88	13,76	34,80	,002
	No Tratamiento	10	0,52	5,44	0,68	2,40	4,71	

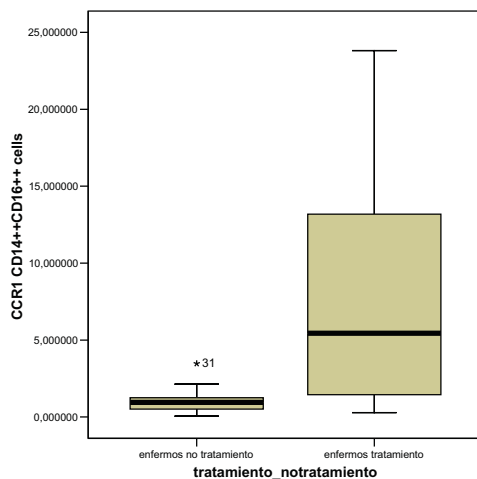
Gráfico 56



Para CCR1 los pacientes con AIJiS en tratamiento presentaron un aumento significativo de las células CD14++CD16++ (p 0'01).

AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14++CD16++ cells	En Tratamiento	10	0,29	23,82	1,27	5,45	14,20	,010
	No Tratamiento	10	0,06	3,47	0,46	0,96	1,48	

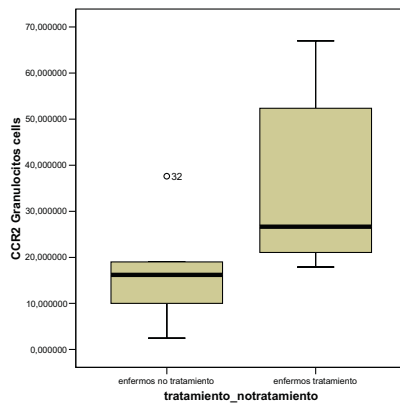
Gráfico 57



Para CCR2 los pacientes con AIJiS en tratamiento presentaron un aumento significativo de las poblaciones de granulocitos (p 0'028), de los monocitos totales CD14+ (p 0'007), y subtipos CD14+CD16- (p 0'007), CD14+CD16+ (p 0'002), CD14dimCD16+ (p 0'004), y de las células CD14++CD16++ (p 0'014).

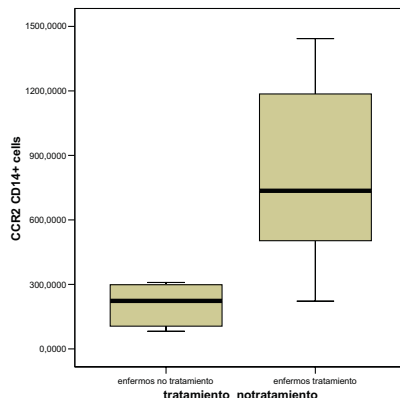
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 Granulocitos cells	En Tratamiento	8	17,90	66,96	20,72	26,63	55,92	,028
	No Tratamiento	6	2,48	37,60	8,14	16,20	23,66	

Gráfico 58



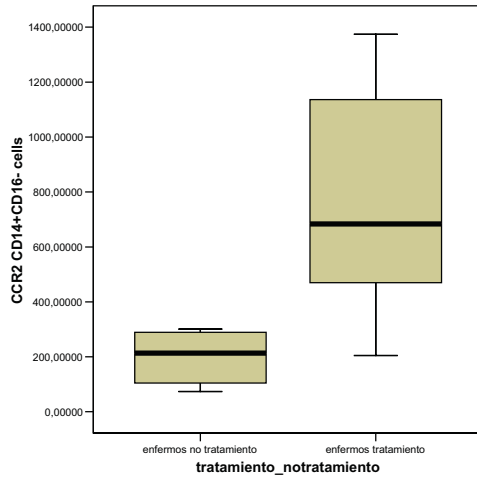
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14+ cells	En Tratamiento	8	221,88	1443,03	440,00	735,16	1302,00	,007
	No Tratamiento	6	82,20	308,95	100,19	223,30	301,26	

Gráfico 59



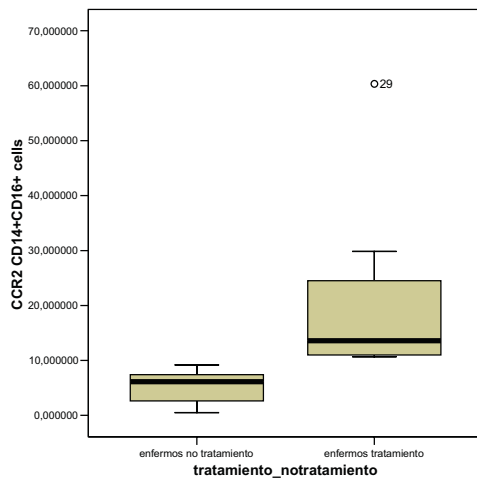
AIJis Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14+CD16- cells	En Tratamiento	8	204,54	1374,06	400,84	683,40	1244,87	,007
	No Tratamiento	6	73,98	301,16	97,12	213,46	292,15	

Gráfico 60



AIJis Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14+CD16+ cells	En Tratamiento	8	10,69	60,33	10,91	13,59	27,17	,002
	No Tratamiento	6	0,51	9,19	2,10	6,14	7,86	

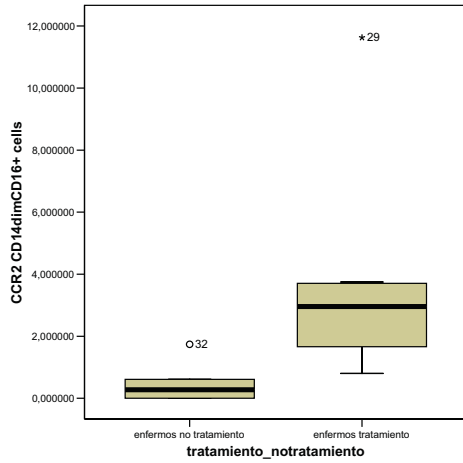
Gráfico 61





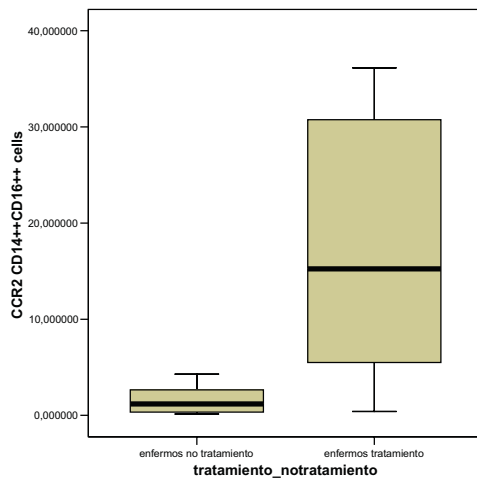
AIJIS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14dimCD16+ cells	En Tratamiento	8	0,80	11,63	1,52	2,96	3,73	,004
	No Tratamiento	6	0	1,74	0	0,27	0,89	

Gráfico 62



AIJIS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14++CD16++ cells	En Tratamiento	8	0,41	36,14	4,49	15,24	30,84	,014
	No Tratamiento	6	0,14	4,28	0,29	1,19	3,07	

Gráfico 63

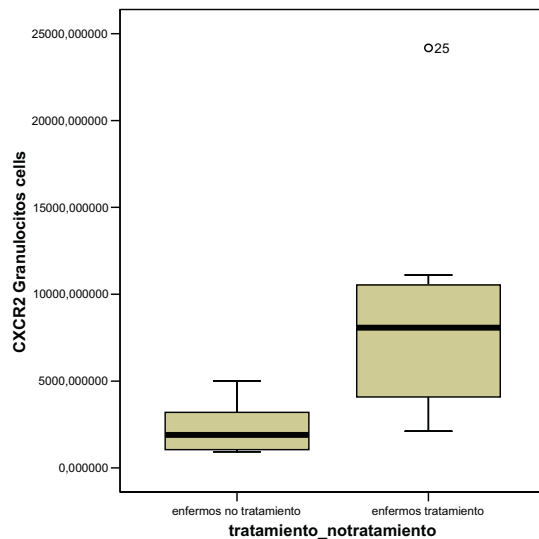


A pesar del número reducido de casos se observó para CXCR1 que los pacientes con AIJiS en tratamiento presentaron un aumento significativo para los granulocitos (p 0'023) y los monocitos del subtipo CD14dimCD16+ (p 0'038), (**anexo 3, gráficos XXXV y XXXVI**) y tendencia en las poblaciones de monocitos totales CD14+ (p 0'059) y CD14+CD16- (p 0'059), y de las células CD14++CD16++ (p 0'059).

Para CXCR2 los pacientes con AIJiS en tratamiento mostraron un aumento significativo de las poblaciones de granulocitos (p 0'014), y monocitos CD14dimCD16+ (p 0'028) y de las células CD14++CD16++ (p 0'028), con tendencia en la población de monocitos CD14+CD16+ (p 0'053).

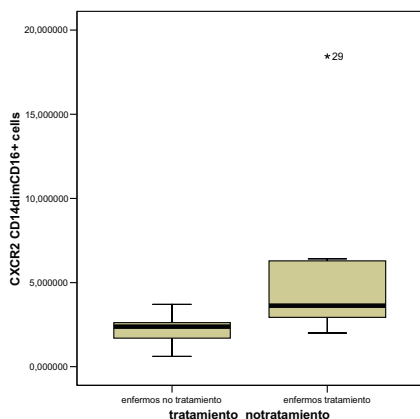
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CXCR2 Granulocitos cells	En Tratamiento	8	2117,79	24179,66	3736,80	8074,95	10821,83	,014
	No Tratamiento	6	934,08	5017,25	1028,11	1901,39	3656,03	

**Gráfico 64**



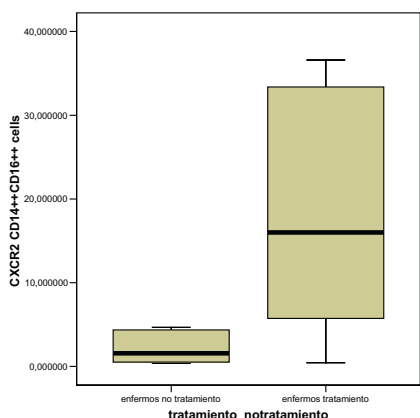
AIJIS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR2 CD14dimCD16+ cells	En Tratamiento	8	2,00	18,44	2,85	3,62	6,35	,028
	No Tratamiento	6	0,61	3,71	1,42	2,38	2,89	

Gráfico 65



AIJIS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR2 CD14++CD16++ cells	En Tratamiento	8	0,44	36,58	4,44	16,00	34,03	,028
	No Tratamiento	6	0,37	4,67	0,48	1,58	4,45	

Gráfico 66

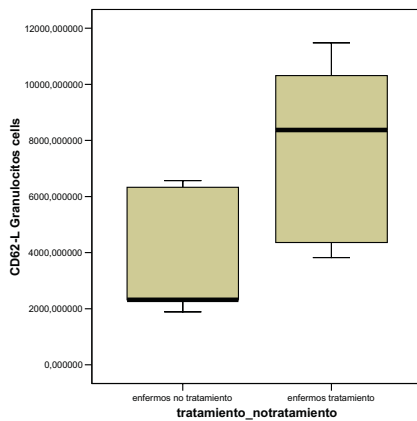


Para CXCR4, a pesar de no tener significación, posiblemente por el bajo número de casos (6 en tratamiento y 4 sin tratamiento), si se objetivó una tendencia para las poblaciones de granulocitos (p 0'088), CD14+ (p 0'055), CD14+CD16- (p 0'088), CD14+CD16+ (p 0'088), CD14dimCD16+ (p 0'055), y CD14++CD16++ (p 0'055).

Para CD62-L los pacientes con AIJiS en tratamiento presentaron un aumento significativo de las poblaciones de granulocitos (p 0'045), y de los monocitos totales CD14+ (p 0'045), y lo subtipos CD14+CD16- (p 0'045) y CD14dimCD16+ (p 0'006), con tendencia en el subtipo CD14+CD16+ (p 0'068).

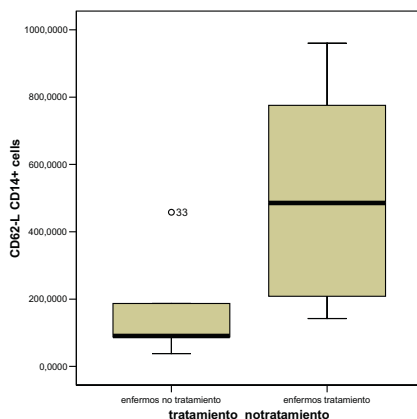
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD62-L Granulocitos cells	En Tratamiento	6	3826,40	11479,61	4226,65	8373,31	10606,33	,045
	No Tratamiento	5	1891,15	6568,23	2105,49	2321,37	6450,25	

Gráfico 67



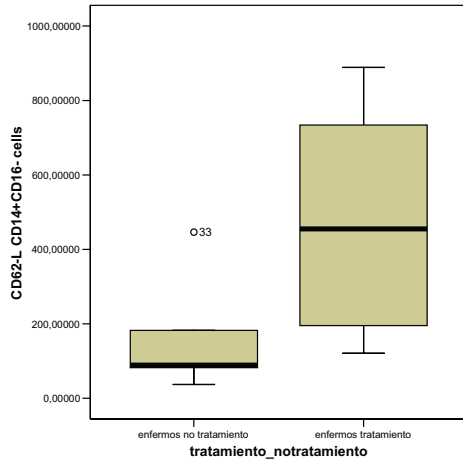
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD62-L CD14+ cells	En Tratamiento	6	142,24	960,18	191,83	485,94	821,77	,045
	No Tratamiento	5	38,22	458,00	63,05	90,56	322,56	

Gráfico 68



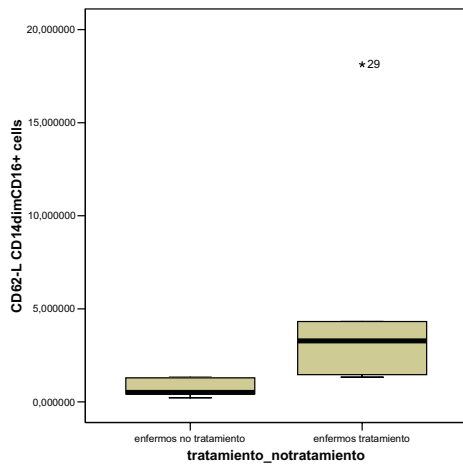
AIJIS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD62-L CD14+CD16- cells	En Tratamiento	6	120,70	888,86	176,85	455,09	772,58	,045
	No Tratamiento	5	36,90	446,42	59,48	88,97	314,31	

Gráfico 69



AIJIS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD62-L CD14dimCD16+ cells	En Tratamiento	6	1,33	18,13	1,43	3,28	7,77	,006
	No Tratamiento	5	0,23	1,32	0,33	0,51	1,31	

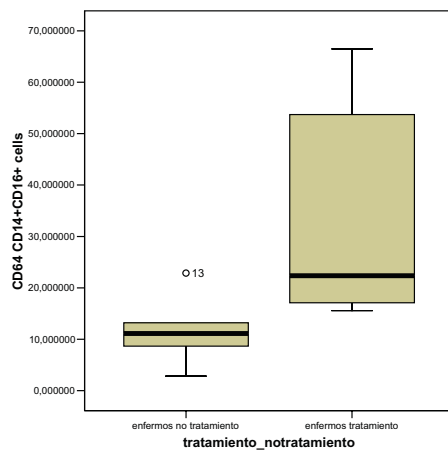
Gráfico 70



Para CD64 los pacientes con AIJiS en tratamiento presentaron un aumento significativo en las subpoblaciones de monocitos CD14+CD16+ (p 0'045), CD14dimCD16+ (p 0'045), y las células CD14++CD16++ (p 0'045).

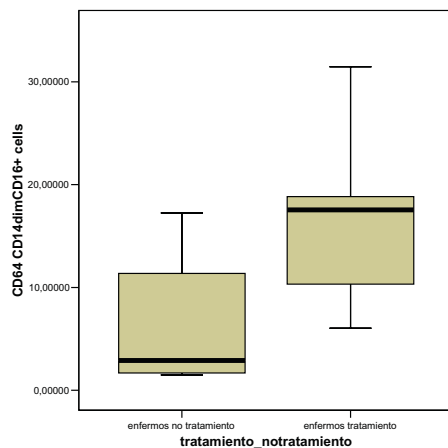
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD64 CD14+CD16+ cells	En Tratamiento	6	15,57	66,47	16,72	22,36	56,90	,045
	No Tratamiento	5	2,84	22,86	5,75	11,13	18,03	

Gráfico 71



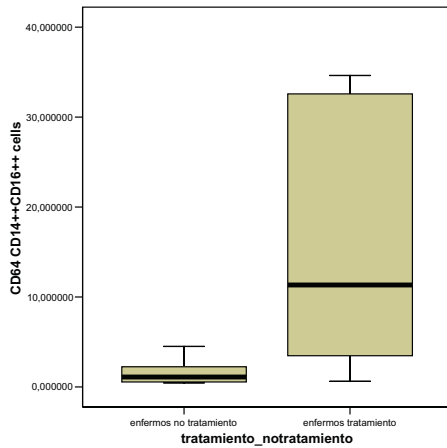
AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD64 CD14dimCD16+ cells	En Tratamiento	6	6,04	31,46	9,26	17,54	21,99	,045
	No Tratamiento	5	1,50	17,25	1,60	2,89	14,31	

Gráfico 72



AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD64 CD14++CD16++ cells	En Tratamiento	6	0,62	34,63	2,77	11,34	33,09	,045
	No Tratamiento	5	0,46	4,50	0,50	1,10	3,37	

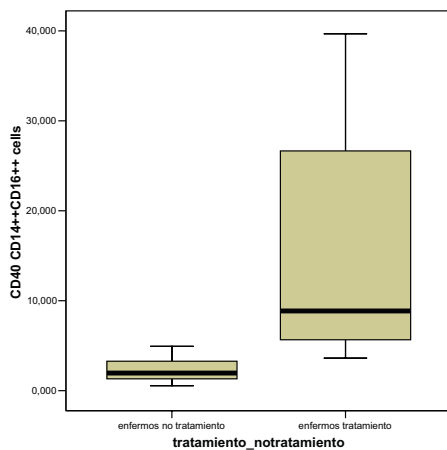
Gráfico 73



Para CD40 los pacientes con AIJiS en tratamiento presentaron un aumento significativo de las células CD14++CD16++ (p 0'004), con tendencias para los monocitos totales CD14+ (p 0'085), y el subtipo CD14+CD16- (p 0'085).

AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD40 CD14++CD16++ cells	En Tratamiento	7	3,61	39,68	5,19	8,86	31,32	,004
	No Tratamiento	7	0,55	4,92	0,72	1,95	3,98	

Gráfico 74



Para MPO se objetivaron tendencias en las poblaciones de monocitos totales CD14+ (p 0'05), y del subtipo CD14+CD16- (p 0'05), así como de las células CD14++CD16++ (p 0'05).



## **5.6. Resumen de las diferencias significativas y tendencias en los diferentes subtipos celulares según marcador de superficie celulares.**

Se adjuntan 3 tablas esquemáticas que muestran aquellas poblaciones que han mostrado diferencias significativas para los diferentes receptores de superficie celular, y también para algunos de los intracelulares testados. Con fines informativos se incluyen también aquellas poblaciones que mostrando diferencias estadísticamente significativas no permiten extraer conclusiones en firme porque no llegan a incluir un número mínimo de 5 casos en cada grupo, así como aquellas poblaciones que muestran tendencias a la significación.

En la primera tabla (**Tabla 13**) se muestran las diferencias a grandes rasgos entre los individuos sanos (adultos y niños) versus el global de pacientes con AIJiS, también de una manera más restrictiva comparando sólo los niños sanos con el global de pacientes con AIJiS, finalmente en las dos últimas columnas, se compara el global de pacientes con AIJiS sintomático versus los asintomáticos, y el de los pacientes sin tratamiento versus el de los pacientes en tratamiento con dosis significativas de corticoides.

En la segunda tabla (**Tabla 14**) se resume con más detenimiento el grupo de población total, comparándolo con los pacientes asintomáticos sin tratamiento, los pacientes asintomáticos con tratamiento, los pacientes sintomáticos sin tratamiento y los pacientes sintomáticos con tratamiento.

En la tercera tabla resumen (**Tabla 15**) se resumen los datos más restringidos comparando sólo los niños sanos con los pacientes asintomáticos sin tratamiento, los pacientes asintomáticos con tratamiento, los pacientes sintomáticos sin tratamiento y los pacientes sintomáticos con tratamiento.

**Tabla 13. Significación para diferentes receptores de superficie en poblaciones absolutas de los diferentes subtipos celulares. Análisis inicial.**

<b>SIGNIFICACIÓN EN POBLACIONES ABSOLUTAS</b>	<b>Sanos vs AIJiS</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS</b>	<b>AIJiS Sintomat vs Asintomat</b>	<b>AIJiS Tx vs No-Tx</b>
Leucocitos	<b>0'03</b>	<b>0'021</b>	<b>0'025</b>	<b>0'002</b>
Granulocitos cells	<b>0'009</b>	<b>0'036</b>	<i>0'055</i>	<b>0'002</b>
Linfocitos cells	<i>0'062</i>			
CD14+ cells			<i>0'076</i>	<b>0'006</b>
CD14+CD16- cells				<b>0'011</b>
CD14++CD16++ cells	<b>0'008</b>	<b>0'031</b>	<i>0'065</i>	<b>0'002</b>
Basofils cells			<i>0'077</i>	
CD123+ DCs			0'034	
CCR1 linfocitos cells			<i>0'090</i>	
CCR1 CD14+ cells	<b>0'005</b>	<b>0'017</b>		
CCR1 CD14+CD16- cells	<b>0'028</b>	<b>0'03</b>		
CCR1 CD14+CD16+ cells	<b>0'047</b>	<i>0'057</i>		
CCR1 CD14dimCD16+ cells	<b>0'009</b>	<b>0'021</b>		
CCR1 CD14++CD16++ cells	<i>0'079</i>		<i>0'09</i>	<b>0'01</b>
CCR2 granulocitos cells				<b>0'028</b>
CCR2 linfocitos cells			<i>0'093</i>	
CCR2 CD14+ cells				<b>0'007</b>
CCR2 CD14+CD16- cells				<b>0'007</b>
CCR2 CD14+CD16+ cells				<b>0'002</b>
CCR2 CD14dimCD16+ cells				<b>0'004</b>
CCR2 CD14++CD16++ cells				<b>0'014</b>
CCR4 granulocitos cells		<i>0'087</i>	0'034	
CCR4 CD14dimCD16+ cells	<i>0'059</i>			
CCR4 CD14++CD16++ cells			<i>0'077</i>	<i>0'077</i>
CCR5 granulocitos cells			0'021	
CCR5 linfocitos cells	<i>0'068</i>			
CCR5 CD14+CD16+ cells				<i>0'053</i>
CCR5 CD14++CD16++ cells			<i>0'083</i>	
CXCR1 Granulocitos cells	0'03			0'023
CXCR1 CD14+ cells				<i>0'059</i>
CXCR1 CD14+CD16- cells	<i>0'076</i>			<i>0'059</i>
CXCR1 CD14+CD16+ cells	0'048			
CXCR1 CD14dimCD16+ cells	0'048			0'038
CXCR1 CD14++CD16++ cells	<i>0'076</i>			<i>0'059</i>
CXCR2 Granulocitos cells	<i>0'079</i>	<i>0'059</i>		<b>0'014</b>
CXCR2 CD14+CD16+ cells				<i>0'053</i>
CXCR2 CD14dimCD16+ cells			<i>0'053</i>	<b>0'028</b>
CXCR2 CD14++CD16++ cells	<b>0'042</b>	<i>0'059</i>		<b>0'028</b>
CXCR4 granulocitos cells				<i>0'088</i>
CXCR4 CD14+ cells				<i>0'055</i>
CXCR4 CD14+CD16- cells				<i>0'088</i>
CXCR4 CD14+CD16+ cells				<i>0'088</i>
CXCR4 CD14dimCD16+ cells				<i>0'055</i>
CXCR4 CD14++CD16++ cells				<i>0'055</i>

<b>SIGNIFICACIÓN EN POBLACIONES ABSOLUTAS</b>	<b>Sanos vs AIJiS</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS</b>	<b>AIJiS Sintomat vs Asintomat</b>	<b>AIJiS Tx vs No-Tx</b>
CD62-L granulocitos cells	<b>0'015</b>	<b>0'016</b>	<b>0'045</b>	<b>0'045</b>
CD62-L CD14+ cells			<b>0'018</b>	<b>0'045</b>
CD62-L CD14+CD16- cells			<b>0'018</b>	<b>0'045</b>
CD62-L CD14+CD16+ cells				<i>0'068</i>
CD62-L CD14dimCD16+ cells				<b>0'006</b>
CD62-L CD14++CD16++ cells			<b>0'045</b>	
CD64 CD14+ cells			<i>0'068</i>	
CD64 CD14+CD16- cells			<b>0'045</b>	
CD64 CD14+CD16+ cells				<b>0'045</b>
CD64 CD14dimCD16+ cells				<b>0'045</b>
CD64 CD14++CD16++ cells			<b>0'045</b>	<b>0'045</b>
CD40 granulocitos cells			<i>0'064</i>	
CD40 CD14+ cells				<i>0'085</i>
CD40 CD14+CD16- cells	<i>0'088</i>			<i>0'085</i>
CD40 CD14++CD16++ cells	<i>0'076</i>	<i>0'071</i>	<b>0'035</b>	<b>0'004</b>
CD80 CD14+CD16- cells				<i>0'063</i>
CD86 CD14++CD16++ cells				<i>0'05</i>
MPO CD14+ cells				<i>0'05</i>
MPO CD14+CD16- cells				<i>0'05</i>
MPO CD14++CD16++ cells				<i>0'05</i>
IL-6 linfocitos cells		<i>0'064</i>		

\* en caracteres con formato en negrita:  $p < 0'05$  y número superior a 5 en cada grupo

\*\* en caracteres con formato normal:  $p < 0'05$  y número inferior a 5 en uno o ambos grupos

\*\*\* en caracteres con formato en azul y cursiva:  $0'05 > p < 0'1$

**Tabla 14. Significación para diferentes receptores de superficie en poblaciones absolutas de los diferentes subtipos celulares. Análisis de subtipos comparados con el total de sujetos sanos.**

SIGNIFICACIÓN EN POBLACIONES ABSOLUTAS	Total vs AIJiS	Total vs AIJiS Asintom No Tx	Total vs AIJiS Asintom Tx	Total vs AIJiS Sintom No Tx	Total vs AIJiS Sintom Tx
Leucocitos	<b>0'03</b>		<b>,004</b>	,015	<b>,002</b>
Granulocitos cells	<b>0'009</b>		<b>,004</b>	<i>,068</i>	<b>,003</b>
Linfocitos cells	<i>0'062</i>			,006	
CD14+ cells					<b>,002</b>
CD14+CD16- cells					<b>,002</b>
CD14++CD16++ cells	<b>0'008</b>		<b>,035</b>		<b>,002</b>
CD123+ DCs					<i>,064</i>
CCR1 linfocitos cells				<i>,090</i>	,034
CCR1 CD14+ cells	<b>0'005</b>		<b>,007</b>		
CCR1 CD14+CD16- cells	<b>0'028</b>		<b>,007</b>		
CCR1 CD14+CD16+ cells	<b>0'047</b>	<b>,039</b>			
CCR1 CD14dimCD16+ cells	<b>0'009</b>	<b>,039</b>	<b>,017</b>	,024	,024
CCR1 CD14++CD16++ cells	<i>0'079</i>	<i>,065</i>			,024
CCR2 granulocitos cells			<i>,076</i>		<i>,053</i>
CCR2 CD14+ cells		<i>,064</i>			,025
CCR2 CD14+CD16- cells		<i>,064</i>			,025
CCR2 CD14+CD16+ cells			<b>,047</b>		
CCR2 CD14++CD16++ cells					,025
CCR4 granulocitos cells					<i>,064</i>
CCR4 CD14dimCD16+ cells	<i>0'059</i>				
CCR4 CD14++CD16++ cells					<i>,064</i>
CCR5 granulocitos cells					<i>,083</i>
CCR5 linfocitos cells	<i>0'068</i>				<i>,083</i>
CCR5 CD14+CD16+ cells					<i>,083</i>
CCR5 CD14++CD16++ cells					<i>,083</i>
CXCR1 Granulocitos cells	0'03		<i>,064</i>		<i>,083</i>
CXCR1 CD14+ cells					<i>,083</i>
CXCR1 CD14+CD16- cells	<i>0'076</i>				<i>,083</i>
CXCR1 CD14+CD16+ cells	0'048		<i>,064</i>		<i>,083</i>
CXCR1 CD14dimCD16+ cells	0'048		<i>,064</i>		<i>,083</i>
CXCR1 CD14++CD16++ cells	<i>0'076</i>				<i>,083</i>
CXCR2 Granulocitos cells	<i>0'079</i>		<b>,028</b>		,025
CXCR2 CD14++CD16++ cells	<b>0'042</b>		<i>,076</i>		,025
CXCR4 CD14++CD16++ cells			<i>,083</i>		<i>,064</i>
CD62-L granulocitos cells	<b>0'015</b>		<i>,053</i>	<i>,053</i>	,025
CD62-L linfocitos cells				<i>,053</i>	
CD62-L CD14+ cells		,025			,025
CD62-L CD14+CD16- cells		,025			,025
CD62-L CD14+CD16+ cells		<i>,053</i>			
CD62-L CD14dimCD16+ cells					<i>,053</i>
CD62-L CD14++CD16++ cells					,025

SIGNIFICACIÓN EN POBLACIONES ABSOLUTAS	Total vs AIJiS	Total vs AIJiS Asintom No Tx	Total vs AIJiS Asintom Tx	Total vs AIJiS Sintom No Tx	Total vs AIJiS Sintom Tx
CD64 granulocitos cells		<i>,053</i>			<i>,053</i>
CD64 CD14+ cells					,025
CD64 CD14+CD16- cells					,025
CD64 CD14++CD16++ cells					,025
CD40 granulocitos cells					<i>,079</i>
CD40 CD14+ cells					<i>,079</i>
CD40 CD14+CD16- cells	<i>0'088</i>				<i>,079</i>
CD40 CD14++CD16++ cells	<i>0'076</i>				<b>,005</b>
CD80 CD14+CD16+ cells					<i>,088</i>
CD83 CD14++CD16++ cells					,046
MPO CD14+ cells			<i>,053</i>		
MPO CD14+CD16- cells			<i>,053</i>		
MPO CD14++CD16++ cells			<i>,053</i>		

\* en caracteres con formato en negrita:  $p < 0'05$  y número superior a 5 en cada grupo

\*\* en caracteres con formato normal:  $p < 0'05$  y número inferior a 5 en uno o ambos grupos

\*\*\* en caracteres con formato en azul y cursiva:  $0'05 > p < 0'1$

**Tabla 15. Significación para diferentes receptores de superficie en poblaciones absolutas de los diferentes subtipos celulares. Análisis de subtipos más restringido comparando con los niños sanos.**

<b>SIGNIFICACIÓN EN POBLACIONES ABSOLUTAS</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Asintom No Tx</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Sintom No Tx</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Sintom Tx</b>
Leucocitos	<b>0'021</b>		<b>,012</b>	,038	<b>,007</b>
Granulocitos cells	<b>0'036</b>		<b>,025</b>		<b>,011</b>
Linfocitos cells				,019	
CD14+ cells					<b>,006</b>
CD14+CD16- cells					<b>,006</b>
CD14++CD16++ cells	<b>0'031</b>		<b>,037</b>		<b>,006</b>
CD123+ DCs					<i>,083</i>
CCR1 linfocitos cells					<i>,086</i>
CCR1 CD14+ cells	<b>0'017</b>	<b>,045</b>	<b>,028</b>	<i>,086</i>	
CCR1 CD14+CD16- cells	<b>0'03</b>		<b>,028</b>	<i>,086</i>	
CCR1 CD14+CD16+ cells	<i>0'057</i>	<b>,045</b>			
CCR1 CD14dimCD16+ cells	<b>0'021</b>		<i>,068</i>	<i>,086</i>	<i>,050</i>
CCR1 CD14++CD16++ cells					<i>,027</i>
CCR2 granulocitos cells		<i>,083</i>			
CCR2 linfocitos cells		<i>,083</i>			
CCR2 CD14+ cells		<i>,083</i>			<i>,050</i>
CCR2 CD14+CD16- cells		<i>,083</i>			<i>,050</i>
CCR2 CD14+CD16+ cells			<i>,025</i>		<i>,050</i>
CCR2 CD14dimCD16+ cells			<i>,053</i>		
CCR2 CD14++CD16++ cells					<i>,050</i>
CCR4 granulocitos cells	<i>0'087</i>				<i>,083</i>
CCR4 CD14++CD16++ cells					<i>,083</i>
CXCR2 Granulocitos cells	<i>0'059</i>		<i>,025</i>		<i>,050</i>
CXCR2 CD14++CD16++ cells	<i>0'059</i>				<i>,050</i>
CXCR4 granulocitos cells					<i>,083</i>
CXCR4 CD14+ cells					<i>,083</i>
CXCR4 CD14+CD16- cells					<i>,083</i>
CXCR4 CD14++CD16++ cells					<i>,083</i>
CD62-L granulocitos cells	0'016		<i>,050</i>	<i>,083</i>	<i>,050</i>
CD62-L linfocitos cells				<i>,083</i>	
CD62-L CD14+ cells		<i>,050</i>			<i>,050</i>
CD62-L CD14+CD16- cells		<i>,050</i>			<i>,050</i>
CD62-L CD14dimCD16+ cells					<i>,050</i>
CD62-L CD14++CD16++ cells				<i>,083</i>	<i>,050</i>
CD64 granulocitos cells		<i>,050</i>			<i>,050</i>
CD64 CD14+ cells					<i>,050</i>
CD64 CD14+CD16- cells					<i>,050</i>
CD64 CD14+CD16+ cells			<i>,050</i>		
CD64 CD14++CD16++ cells				<i>,083</i>	<i>,050</i>

<b>SIGNIFICACIÓN EN POBLACIONES ABSOLUTAS</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Asintom No Tx</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Sintom No Tx</b>	<b>Niños sanos vs AIJiS Sintom Tx</b>
CD40 granulocitos cells				<i>,064</i>	
CD40 CD14+CD16- cells			<i>,064</i>		
CD40 CD14++CD16++ cells	<i>0'071</i>		<i>,064</i>	<i>,064</i>	<i>,014</i>
CD80 linfocitos cells			<i>,083</i>		
CD80 CD14+CD16- cells				<i>,083</i>	
CD80 CD14++CD16++ cells			<i>,083</i>	<i>,083</i>	
CD83 granulocitos cells		<i>,083</i>			
CD83 CD14+CD16+ cells		<i>,083</i>			
CD83 CD14++CD16++ cells					<i>,083</i>
IL-6 linfocitos cells	<i>0'064</i>				

\* en caracteres con formato en negrita:  $p < 0'05$  y número superior a 5 en cada grupo

\*\* en caracteres con formato normal:  $p < 0'05$  y número inferior a 5 en uno o ambos grupos

\*\*\* en caracteres con formato en azul y cursiva:  $0'05 > p < 0'1$





## **6. DISCUSIÓN**



## **6. DISCUSIÓN**

Una de las principales limitaciones en la elaboración de este estudio fue el número de pacientes. La AIJiS es una enfermedad de baja incidencia como se ha comentado en la introducción, y a pesar de disponer de acceso a una de las mayores unidades de Reumatología Pediátrica de los Estados Unidos, es difícil poder obtener un gran número de muestras en un período de tiempo limitado. Por otra parte al subdividir a los enfermos para su análisis según si la enfermedad estaba o no activa y si el paciente estaba o no recibiendo tratamiento se dificulta aún más el recoger un número significativo de pacientes en cada subgrupo. Es por ello, y teniendo en cuenta las salvedades oportunas, que se ha optado por comentar en la discusión los gráficos incluidos en el anexo 3, a pesar que en algunos subgrupos el número de casos analizado fuera reducido.

## **6.1 Análisis de las diferencias en sangre periférica entre sujetos sanos y pacientes con AIJiS**

### **6.1.1 Análisis de las diferencias en las principales poblaciones celulares en sangre periférica entre sujetos sanos y pacientes con AIJiS.**

#### **6.1.1.1 Las cifras de leucocitos y granulocitos están aumentadas en los pacientes con AIJiS.**

*En el análisis de las muestras se constata como las cifras de leucocitos en los pacientes con AIJiS son significativamente más altas que el total de individuos sanos (gráficos 1). Lo mismo ocurre con las cifras de granulocitos (gráfico 2). Si se analiza de manera más restringida se observa también al comparar el global de los pacientes con los niños sanos (gráficos 26 y 27).*

*Al analizar los pacientes sintomáticos con tratamiento (gráficos 20, 21, 39 y 40) y los pacientes asintomáticos con tratamiento se encuentran diferencias tanto a nivel de leucocitos como de los granulocitos (gráficos 12, 13, 34 y 35). Mientras que en los pacientes sintomáticos sin tratamiento (tanto con el total de sanos como solo con los niños), sólo se encuentran diferencias a nivel de los leucocitos (anexo 3 gráficos VI y XXVIII).*

La leucocitosis con un predominio de los polimorfonucleares es una de las características ya conocidas de la AIJiS.(15) Uno de los factores posibles es el aumento del factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*). Recientemente se ha descrito al G-CSF como una importante citoquina inflamatoria.(128) Así se ha demostrado un aumento de los niveles de G-CSF en el suero y el líquido sinovial de pacientes con AR.(129) Es más, se ha comprobado *in vitro* como la producción de G-CSF y GM-CSF (factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos) está inducida en cultivos de fibroblastos de sinovial humanos por la IL-1,(130) cuyo papel en la AIJiS ya hemos descrito previamente. Está

inducción por la IL-1 de la producción de G-CSF y GM-CSF también se ha observado en los condrocitos.(131)

El aumento de IL-6 observado en los pacientes con AIJiS(42,45) también puede jugar un papel en el aumento de las cifras de los leucocitos, ya que se ha visto como la expresión aumentada de IL-6 causa leucocitosis y fiebre *in vivo*.(132)

Por otra parte se sabe que los glucocorticoides producen un aumento de los neutrófilos al aumentar la liberación desde el pool marginal, prolongando su permanencia en la circulación periférica y reduciendo la quimiotaxis de los neutrófilos a los sitios de inflamación.(133) Estas diferencias en los leucocitos y granulocitos no se hallan al comparar los pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento (en remisión) tanto con el total de individuos sanos como con el de niños sanos.

#### **6.1.1.2 Las cifras de linfocitos están aumentadas en los pacientes sintomáticos sin tratamiento**

*En los pacientes sintomáticos sin tratamiento las cifras de linfocitos están aumentadas cuando se comparan con el total de individuos sanos y con los niños sanos (anexo 3 gráficos VII y XXIX), a pesar de que el número de pacientes fue reducido.*

En un estudio sobre el perfil de los linfocitos circulantes en pacientes con diferentes subtipos de AIJiS no se encontraban diferencias.(31) No obstante se han descrito aumentos de las células B en los pacientes con AIJiS,(25,26) mientras que los datos sobre las células T muestran en ocasiones incremento de CD8,(27,28) y otras veces disminución.(29,30)

Por otra parte no es extraño que estas diferencias que encontramos no se hallen al comparar con los pacientes sintomáticos que están recibiendo tratamiento con corticoides, pues se sabe que estos afectan el perfil de linfocitos en sangre periférica.(134) La acción de los glucocorticoides sobre el sistema inmune está mediada fundamentalmente a través de los linfocitos T.(135) Los linfocitos T se afectan más que los B, y los T *helper* más que los T *supresor*.(136) Por otra parte la administración de glucocorticoides se ha implicado en la apoptosis en especial de los linfocitos T.(137)

### **6.1.1.3 Las cifras de monocitos totales y el subtipo CD14+CD16- aumentan en los enfermos sintomáticos con tratamiento.**

*En los pacientes sintomáticos con tratamiento las cifras de monocitos totales están aumentadas al comparar tanto con el total de individuos sanos como con solo los niños sanos (gráficos 22 y 41).*

*Por otra parte si analizamos los diferentes monocitos el principal subtipo, los CD14+CD16-, presentan cifras más altas de manera significativa en los pacientes con AIJS sintomáticos con tratamiento tanto con el total de sanos y también con los niños sanos (gráficos 23 y 42).*

El aumento de las cifras de monocitos puede estar relacionado con el aumento de GM-CSF que como hemos comentado anteriormente se ha observado en algunas enfermedades como la AR,(129) que daría lugar a un aumento de la producción por la médula ósea.

A pesar de que algunos autores describen un descenso de las cifras de monocitos circulantes de hasta el 90% dentro de las 6 primeras horas de la administración de corticoides,(138) otros trabajos han mostrado como con el tratamiento con corticoides aumentan las cifras de los monocitos clásicos, CD14+CD16-, como hemos podido ver en nuestro caso, mientras que las cifras de los monocitos pro-inflamatorios CD14+CD16+ disminuyen.(139-141)

En nuestros pacientes sometidos a tratamiento no observamos cambios significativos en los monocitos CD14+CD16+, lo que podría ser debido a los diferentes tratamientos, su duración y a las dosis del tratamiento con corticoides. Para entender el descenso de las cifras de los monocitos CD14+CD16+ Fingerle-Rowson se plantean varias posibilidades, un aumento de la adherencia de los monocitos al endotelio y de aquí su paso a los tejidos, (aunque improbable debido a que los corticoides inhiben la trans migración),(142) un incremento de la apoptosis, o bien, el bloqueo de la diferenciación en CD14+CD16+.(139)

#### **6.1.1.4 Las cifras de las células CD14++CD16 ++ aumentan en los enfermos con AIJiS sintomáticos con tratamiento.**

*De interés particular es el análisis de las células CD14++CD16++, observamos un aumento significativo en los pacientes con AIJiS al comparar tanto el total como los niños (gráficos 3 y 28), este aumento significativo también se observa en los pacientes sintomáticos con tratamiento (gráficos 24 y 43), y en los pacientes asintomáticos con tratamiento (gráficos 14 y 36), comparados con el total y el grupo de niños sanos.*

El papel que estas células pueda tener no está claro, si bien en algunas ocasiones expresan un perfil similar al de algunos subtipos de monocitos, en ocasiones expresan marcadores de superficie diferenciados.

En los análisis iniciales del estudio de los monocitos observamos este pequeño subtipo de células que se separaban claramente del resto, marcando alto para CD14 y CD16. Los valores absolutos de estas células representan una población muy pequeña, en nuestros cálculos aproximadamente de 15 a 300 por 180.000 células, lo que implicaba en alrededor del 0'01-0'03 % del total de leucocitos en individuos sanos y de un 0'03 a un 0'17 % del total de leucocitos en los pacientes con AIJiS. Las observaciones iniciales se mantuvieron de manera repetida, por lo que nos planteamos descartar la posibilidad que se tratara de una falsa población celular. Para ello procedimos a considerar diferentes posibilidades:

1.- Se descartó que se tratara de una unión no-específica, para evitar este problema se había trabajado para la preparación de las muestras con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) conteniendo 2% de FCS (*heat-inactivated Fetal Calf Serum*, suero fetal bovino inactivado por el calor).

2.- Por otra parte conforme fuimos analizando las muestras de los pacientes vimos que estas células no puntuaban alto para todos los marcadores de superficie. No se trataba de una tinción inespecífica ya que en tinciones con el mismo isotipo no teñían con la misma intensidad.

3.- Tampoco no parecían agregados inespecíficos, si no que en algunas ocasiones marcaban niveles bajos, en otras intermedios y en otras altos, de una manera por cierto a veces coincidente con las poblaciones de monocitos y otras no.

4.- Consideramos también la posibilidad que se tratará de una pequeña población de granulocitos que pudieran marcar alto para CD14 y CD16, pero tal como se observa en los anexos para la selección de las poblaciones habíamos utilizado ventanas muy excluyentes (“*gating*”), con márgenes amplios en el FSC y SSC que excluían las poblaciones de granulocitos, como se observa en las gráficas que añadimos resituando estas células según CD16 y CD14 para FSC y SSC (Véanse los **anexos 1 y 2**).

Finalmente una de las preguntas que nos planteamos fue el porque no se habían identificado previamente en otros trabajos con monocitos. La respuesta procedía de las propias características de estas células que eran granulares. La mayoría de estudios publicados se habían realizado con células mononucleares de sangre periférica (*PMBCs*), en el proceso de preparación de las cuáles se eliminan las células granulares, mientras que nosotros trabajamos con sangre completa (*whole blood*), y sólo utilizamos las células mononucleares en el proceso de preparación para el estudio de citoquinas intracelulares, no observándose por cierto poblaciones significativas de este tipo de células en estas muestras. Es por todo lo anteriormente expuesto que pensamos que estábamos delante de una población celular diferenciada. A lo largo de la discusión podremos ver algunas características diferenciales de estas células.



## **6.1.2 Análisis de las diferencias en los principales marcadores de superficie celulares.**

### **6.1.2.1 CCR1:**

#### ***6.1.2.1.1 La expresión de CCR1 está disminuida en los linfocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión de CCR1 en los linfocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento está disminuida al comparar con el total de individuos sanos a pesar que tuvimos pocos pacientes (anexo 3 gráfico IX), observándose tendencias también al comparar con los niños sanos (p 0'086) y al comparar con los sintomático sin tratamiento (p 0'090).*

#### ***6.1.2.1.2 La expresión de CCR1 está disminuida en los monocitos de los pacientes con AIJiS***

*La expresión de CCR1 en la superficie de los monocitos totales, CD14+, de los pacientes con AIJiS está significativamente disminuida al compararla tanto con el global de los sujetos sanos como sólo con los niños (gráficos 4 y 29). Estas diferencias son consistentes y se observan también para los subtipos de monocitos, CD14+CD16- (gráficos 5 y 30), y CD14dimCD16+ (gráficos 7 y 31). Para los monocitos CD14+CD16+ sólo se observan diferencias significativas comparando el total (gráfico 6), pero con los niños se observa una tendencia (p 0'057).*

*Al analizar los diferentes subtipos de pacientes con AIJiS en función de si están o no sintomáticos y si siguen o no tratamiento con corticoides persisten diferencias significativas por lo que respecta a la expresión de CCR1.*

*Así en los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento la expresión de CCR1 en el total de monocitos, CD14+, y en el subtipo más numeroso, CD14+CD16-, también está disminuida respecto al total de sanos (gráficos 15 y 16) y el grupo de niños sanos (gráficos 37 y 38).*

*En los pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento se observa una disminución significativa para el total de monocitos, CD14+, respecto a los niños sanos (gráfico 32). Para CD14+CD16+ la disminución significativa se observa tanto comparando con el total de sanos como solo con los niños (gráficos 10 y 33).*

*Lo más consistente es que para los monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> la expresión de CCR1 está disminuida respecto al total de sujetos sanos, en todos los subgrupos con AIJiS, (asintomáticos sin tratamiento, asintomáticos con tratamiento, sintomáticos sin tratamiento y sintomáticos con tratamiento) (gráficos 11, 17, anexo 3 gráfico VIII y X). Estas diferencias sólo se ven al comparar los niños sanos con el global de AIJiS (gráfico 31), pero se observan tendencias en los subgrupos, lo que sugiere que con una muestra mayor estas diferencias posiblemente estarían también presentes.*

El tráfico de los leucocitos implica la activación secuencial y coordinada de múltiples moléculas de adhesión y de señal. La expresión de quimioquinas y la presencia de receptores de quimioquinas específicos en los diferentes subtipos de leucocitos controla de manera selectiva el reclutamiento de las células efectoras inmunes desde la circulación periférica.(143)

El receptor CCR1 fue clonado por primera vez en 1993.(144) Se sabe que los monocitos humanos expresan niveles altos de CCR1 y que este ha mostrado un papel especializado en el reclutamiento de monocitos y linfocitos T tipo Th1 bajo condiciones inflamatorias.(143) Se sabe que el lipopolisacárido causa una rápida reducción de CCR1 en los monocitos mediante la disminución de los niveles de ARNm, lo que lleva a una disminución de la respuesta celular a las quimioquinas ligando-específicas.(145)

En el trabajo de Katschke y colaboradores, en un modelo de inflamación como es la AR, se muestra como la expresión de CCR1 en los monocitos de sangre periférica sigue una correlación inversa con la VSG, de manera que la expresión de CCR1 disminuye conforme aumenta la VSG, así mismo muestran como los sujetos sanos expresan CCR1 en un 87% de los monocitos de sangre periférica, frente a sólo un 56% de los monocitos de sangre periférica de pacientes con AR, y en sólo un 17% de los monocitos del líquido sinovial de los pacientes con AR.(146) Los autores sugieren que CCR1 podría jugar un

papel importante en el reclutamiento de los monocitos a la articulación inflamada.(146) De manera similar Haringman y colaboradores muestran como en pacientes con AR el tanto por ciento de monocitos CCR1+ en la sangre periférica está disminuido comparado con los sujetos normales. Al mismo tiempo describen un aumento de la expresión de CCR1 en el tejido sinovial de estos pacientes sugiriendo una regulación aumentada de estos receptores y/o un acumulo de células CCR1+ en la sinovial inflamada.(147)

Por lo que respecta a las AIJiS en estudios realizados con técnicas de *microarrays* se ha visto como la expresión de CCR1 en una población seleccionada de monocitos está significativamente disminuida respecto a los individuos control, (datos proporcionados por la doctora Virginia Pascual, *Baylor Institute for Immunology Research*, datos no publicados).

CCR1 es el receptor para varias quimioquinas entre ellas CCL3 (o MIP-1 $\alpha$ , *Macrophage Inflammatory Protein 1a*), CCL7 (o MCP-3, *Monocyte Chemoattractant Protein 3*), CCL23 (o MPIF-1, *Myeloid Progenitor Inhibitory Factor-1*) y CCL5 (o RANTES, *Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted protein*). La disminución de la expresión de CCR1 en la superficie de los monocitos puede ser debida a diferentes causas, entre ellas, la disminución de su producción, (sea por inhibición de su síntesis, o por el bloqueo a su migración a la superficie celular y externalización), o bien porque los receptores estén ocupados por quimioquinas agonistas. En este sentido pasamos a analizar el papel de las principales quimioquinas para las que CCR1 actúa como receptor:

- CCL3 (o MIP-1 $\alpha$ ) participa en las respuestas agudas y crónicas a la inflamación en los sitios de lesión o inflamación, fundamentalmente al reclutar células proinflamatorias. En este sentido la activación de CCR1 por CCL3 lleva entre otros a la liberación de Ca<sup>2+</sup>, el incremento de los marcadores de activación y la liberación de mediadores pro-inflamatorios como el leucotrieno C4, ácido araquidónico e histamina.(148) En este sentido no es sorprendente que la familia de proteínas MIP-1 jueguen un papel clave en la patogénesis de muchas enfermedades incluyendo el asma, la formación de granulomas, la curación de heridas, artritis, esclerosis múltiple, neumonía y psoriasis.(149)

- CCL7 (o MCP-3) se ha identificado como una proteína con capacidad quimiotáctica para monocitos.(150) Se trata de una de las quimioquinas más pluripotenciales por su habilidad para unirse al menos a 3 receptores diferentes de quimioquinas (CCR2, CCR3, y también CCR1) y se ha implicado en los mecanismos de homeostasis así como en patologías como la esclerosis múltiple, cirrosis biliar, colitis ulcerosa o el asma, o en la activación de la respuesta inmune antitumoral.(151) En un reciente trabajo el diseño de una variante de CCL7 con afinidades agonistas para entre otros CCR1, se ha mostrado eficaz en inhibir la respuesta quimiotáctica generada *in vitro* por líquido sinovial de pacientes con AR.(152)
- CCL23 (o MPIF-1 o MIP-3 o CKβ8) ha mostrado su actividad quimiotáctica sobre monocitos y células dendríticas, pero mientras un trabajo mostraba que los monocitos activados la producían,(153) otros no encontraban liberación de CCL23 al medio ante monocitos, monocitos activados o macrófagos, pero sí ante células dendríticas derivadas de los monocitos.(154) Mientras que la mayoría de quimioquinas están implicadas en procesos inflamatorios, algunas como CCL23 (MPIF-1) están implicadas en procesos de mantenimiento de la homeostasis. Así para Nardelli y colaboradores CCL23 participaría en la localización de las células dendríticas inmaduras en los tejidos periféricos. En este contexto la liberación de CCL23 podría inducir un circuito de amplificación y células dendríticas inmaduras serían reclutadas por quimioquinas pro-inflamatorias a los sitios de estímulo inmune o inflamatorio. Este estímulo causaría la maduración de las células dendríticas y el cambio en la expresión de los receptores de quimioquinas, (se sabe que las células dendríticas maduras pierden la expresión de algunos receptores, como CCR1, mientras ganan las de otros como CCR7).(154) Por otra parte un trabajo reciente también ha mostrado como CCL23 induce la migración quimiotáctica de células endoteliales promoviendo la neovascularización vía CCR1, de hecho el único receptor conocido para CCL23.(155)
- CCL5 (o RANTES) es producida por los tejidos inflamados y liberada por plaquetas estimuladas. Participa en el stop al flujo de los monocitos en la sangre

y su unión a las células endoteliales microvasculares humanas.(143) En un reciente trabajo Yao y colaboradores muestran como CCL5 (RANTES) juega un papel clave en la patogénesis de la AIJ, incluyendo la forma de inicio sistémico.(97) En su trabajo muestran como los niveles de CCL5 están estadísticamente aumentados respecto a los pacientes control en el suero de las AIJ oligoarticulares, poliarticulares y sistémicas, y también como este aumento es también mayor en la AIJiS comparado con las formas oligoarticular y poliarticular de una manera significativa. A pesar de que los niveles de CCL5 descendían después del tratamiento, durante la remisión estos niveles todavía eran significativamente más altos en los pacientes con AIJ que en los controles. Los autores también muestran una relación entre el nivel en el suero de CCL5 durante la remisión y la duración de esta remisión clínica, así los niveles más bajos se asocian a una remisión clínica más prolongada y los niveles más altos se asocian a una remisión clínica más corta.(97)

#### ***6.1.2.1.3 La expresión de CCR1 está aumentada en las células CD14++CD16++ en los pacientes sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión de CCR1 en las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento está aumentada de con respecto al total de individuos sanos y a los niños sanos a pesar que solo pudimos recoger 4 pacientes en este subgrupo (anexo 3 gráficos XI y XXX).*

CCR1 se expresa claramente de manera diferente en las células CD14++CD16++ comparando con los monocitos en los pacientes con AIJiS. Estas diferencias se observan concretamente en los pacientes sintomáticos en tratamiento.

#### **6.1.2.2 CCR2:**

##### ***6.1.2.2.1 La expresión de CCR2 está aumentada en el total de monocitos y en especial en el subtipo CD14+CD16- en los pacientes sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión de CCR2 en la superficie del total de monocitos, CD14+, y en el principal subtipo, CD14+CD16-, de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento está aumentada versus el total de individuos sanos (anexo 3 gráficos XII y XIII). Al mismo tiempo se objetivaron tendencias, probablemente debido al menor número al comparar solo con los niños sanos (p 0'05).*

***6.1.2.2 La expresión de CCR2 está aumentada en CD14++CD16++ en los pacientes sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión de CCR2 en la superficie de las células CD14++CD16++ está aumentada en los individuos sintomáticos con tratamiento (anexo 3 gráfico XIV), con tendencia a la significación al comparar sólo con los niños sanos (p 0'05).*

***6.1.2.3 La expresión de CCR2 está aumentada en CD14+CD16+ en los pacientes asintomáticos con tratamiento.***

*La expresión de CCR2 en la superficie de los monocitos CD14+CD16+ en los pacientes asintomáticos con tratamiento está aumentada de manera significativa tanto con respecto al total de sujetos sanos (gráfico 18) como al comparar con los niños (anexo 3 gráfico XXVI).*

CCR2 es el receptor para la quimioquina CCL2 (o MCP-1, *Monocyte Chemotactic Protein-1*, o SCYA2, *Small Inducible Cytokine A2*) o MCAF (*Monocyte Chemotactic and Activating Factor*). CCR2 se expresa en la superficie de los monocitos “clásicos”, linfocitos T, células dendríticas, basófilos y células *natural killer* (NK), así como en el tejido sinovial de los pacientes con AR.(156)

CCL2 puede atraer por tanto a estos tipos celulares, y su expresión se ha implicado en diversos procesos caracterizados por infiltrados de células mononucleares, sugiriéndose que puede contribuir al componente inflamatorio de enfermedades como la aterosclerosis, la esclerosis múltiple o la AR.(157) También se ha implicado en la AIJ, y en especial en la AIJiS así por ejemplo De Benedetti y colaboradores muestran niveles de CCL2 elevados de manera significativa en el suero de pacientes con AIJiS activa comparándolos con individuos control y pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular.

Además señalan como los pacientes con AIJiS y síntomas sistémicos presentaban niveles más altos de CCL2 que aquellos pacientes con AIJiS en que los síntomas sistémicos habían cedido.(96) Yao y colaboradores muestran también como los niveles de CCL2 están aumentados significativamente en los pacientes con AIJiS activa respecto a los individuos control sanos, y los pacientes con AIJ oligoarticular o poliarticular. Además señalan como los niveles de CCL2 en pacientes con AIJiS activa estaban más altos en aquellos con síntomas sistémicos con respecto a aquellos en que los síntomas sistémicos habían cedido. Por otra parte los niveles de CCL2 se correlacionaban con las cifras de leucocitos y los niveles de ferritina.(97) Sin embargo hay que hacer notar que en otro trabajo De Jaeger y colaboradores señalan que los niveles de CCL2 no estarían tan elevados en los pacientes con AIJiS como en las formas de AIJ poliarticular y oligoarticular.(158)

Los polimorfismos parecen influenciar, al menos en población caucásica y japonesa, la actividad transcripcional del gen CCL2 (MCP-1) ya que células obtenidas con los polimorfismos GG o AG en la posición -2518 producen más CCL2 que aquellos individuos con la forma AA.(159) Hwang y colaboradores han presentado una expresión del genotipo AG más alta en 19 pacientes con Still del adulto que en el grupo control, y en un reciente trabajo Özyürek y colaboradores muestran que el genotipo AG fue más alto también en los pacientes con AIJiS, por lo que se plantean que los polimorfismos en el gen para CCL2 predispondrían a los individuos a una forma de la enfermedad más severa.(160)

En nuestro caso al estudiar los pacientes con AIJiS no encontramos un aumento generalizado de la expresión de CCR2 en los monocitos. Una explicación podría ser por una disminución de la expresión ante los niveles altos de CCL2 en el suero de estos pacientes. Llama la atención que se encuentre un aumento de la expresión en los monocitos, CD14+CD16-, de los pacientes sintomáticos con tratamiento. En este sentido un trabajo reciente puede sugerir una hipótesis al menos para algunos casos; tradicionalmente se había pensado que el principal mecanismo para la inmunosupresión inducida por los corticoides (al menos en los monocitos) era por la inhibición de la transcripción de genes, aunque otros mecanismos podían estar implicados, pero Ehrchen y colaboradores muestran que los monocitos activados por los corticoides presentan un aumento de la transcripción genética, incluyendo muchos mediadores antiinflamatorios.

Los glucocorticoides promoverían pues la supervivencia de este fenotipo antiinflamatorio el cual se acumula específicamente en los sitios donde se desarrollan los procesos inflamatorios debido a la mayor migración por el estímulo quimiotáctico.(161) Esta hipótesis sobre la inducción de la expresión de CCR2 por los corticoides apoyaría también el aumento de expresión en los monocitos intermedios, CD14+CD16+, y en las células CD14++CD16++.

### **6.1.2.3 CXCR1:**

#### ***6.1.2.3.1 La expresión de CXCR1 está aumentada en los granulocitos de los individuos con AIJiS***

*La expresión del receptor de superficie CXCR1 en los granulocitos del global de pacientes con AIJiS está aumentada al comparar con el total de individuos sanos (anexo 3 gráfico I), aunque el grupo de sujetos sanos con el que se compararon los pacientes fue reducido.*

#### ***6.1.2.3.2 La expresión de CXCR1 está aumentada en los monocitos CD14+CD16+ y CD14dimCD16+ de los individuos con AIJiS***

*La expresión del receptor de superficie CXCR1 en los monocitos CD14+CD16+ y CD14dimCD16+ del global de pacientes con AIJiS está aumentada al comparar con el total de individuos sanos (anexo 3 gráficos II y III), aunque de nuevo hay que hacer la salvedad que el grupo de sujetos sanos para este receptor fue limitado.*

CXCR1 es el receptor para CXCL8 (o IL-8) y también para CXCL6 y CXCL1. CXCR1 se expresa principalmente en la superficie de neutrófilos y monocitos. No hay estudios sobre la expresión de CXCR1 en la superficie de los monocitos en pacientes con AIJiS. No obstante un trabajo con diferentes formas de artritis del adulto muestra como la expresión de CXCR1 en los monocitos de sangre periférica está más elevada que en los monocitos del líquido sinovial.(162) Los autores consideran que aunque la baja expresión de este receptor podría reflejar una diferenciación de los monocitos hacia macrófagos, también podría indicar que algunos de los receptores se han unido durante



la quimiotaxis y en consecuencia se han desplazado desde la superficie celular por un mecanismo de internalización inducido por la unión ligando-receptor.(162) Los autores plantean también una posibilidad para la reducción de CXCR1 que también observan en la superficie de los neutrófilos del líquido sinovial comparados con la sangre periférica, en esta otra hipótesis la presencia de TNF- $\alpha$  en el líquido sinovial llevaría a una degradación proteolítica de los receptores de CXCL8 (IL-8).(163)

CXCL8 se encuentra presente tanto en el líquido como en el tejido sinovial.(164,165) Los macrófagos pueden producir y responder a CXCL8 pero esta quimioquina se caracteriza por su habilidad para atraer a los neutrófilos,(166) por lo que se considera una quimioquina inflamatoria, aunque también se sabe que contribuye a la angiogénesis.(82,167) Tras la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y el TNF- $\alpha$  las células aumentan la expresión de esta quimioquina. En la artritis reumatoide se ha demostrado como los niveles de CXCL8 estaban aumentados en las articulaciones inflamadas con respecto a las no afectadas, indicando un posible papel en las recaídas agudas y locales típicas de esta enfermedad.(168) También se ha visto como se hallaban niveles significativamente más altos de CXCL8 en el líquido sinovial que en el plasma de los diferentes tipos de AIJ, incluyendo la AIJiS.(158) Si bien en otros trabajos no se han hallado estas diferencias significativas para CXCL8 en pacientes con AIJiS,(169) ni tampoco cuando más específicamente se compararon por separado pacientes con AIJiS en fase activa e inactiva con controles sanos.(170)

CXCL8 también se ha encontrado aumentada en el suero de pacientes con Still del adulto.(171) Además también se ha visto que estos niveles aumentados persistían no mostrando diferencias entre los pacientes con enfermedad activa e inactiva.(172) De hecho CXCL8 y el IFN- $\gamma$  que también se encuentra aumentado, serían para algunos autores los marcadores más específicos de las formas articulares crónicas del Still del adulto.(173) Por otra parte se sabe que CXCL8, al igual que el IFN- $\gamma$ , son inducidos por la IL-18,(172) que se ha implicado en diversos trabajos en la AIJiS,(57) habiéndose incluso planteado como un marcador de actividad de la enfermedad.(174)

En nuestro trabajo llama la atención el aumento de la expresión de CXCR1 en el subtipo de monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> de los pacientes con AIJiS, ya que algunas revisiones plantean que este tipo de monocitos “no-clásicos”, expresarían menos CXCR1.(102)

Hay que notar no obstante, en referencia al análisis de esta quimioquina, que analizamos pocos sujetos sanos, por lo que no podemos valorar un análisis en más profundidad o comparando con los diferentes subgrupos.

#### **6.1.2.4 CXCR2:**

##### ***6.1.2.4.1 La expresión de CXCR2 está aumentada en los granulocitos de los individuos con AIJiS con tratamiento***

*La expresión del receptor de superficie CXCR2 en los granulocitos de los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento se encuentra aumentada de manera significativa al compararla con el total de individuos sanos (gráfico 19), y también al comparar los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento (anexo 3 gráfico XV). Estas diferencias también se aprecian cuando se comparan los niños sanos con los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento (anexo 3 gráfico XXVII). También se observa una tendencia ( $p < 0.05$ ) cuando se comparan los niños sanos con los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento.*

##### ***6.1.2.4.2 La expresión de CXCR2 está aumentada en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> de los individuos con AIJiS***

*La expresión de CXCR2 en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> del total de individuos con AIJiS está aumentada de manera significativa al comparar con el total de individuos sanos (gráfico 8). Estas diferencias persisten al comparar los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento con el total de sanos (anexo 3 gráfico XVI), y con tendencia al comparar sólo con los niños sanos ( $p < 0.059$ ), o al analizar comparando los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento con el total de sanos ( $p < 0.076$ ).*

CXCR2 es el receptor para múltiples quimioquinas, CXCL6 (o GCP-2, por *Granulocyte Chemotactic Protein 2*), pero también para CXCL8, CXCL5 (o ENA-78, por *Epithelial-Neutrophil Activating peptide*), CXCL1 (o GRO- $\alpha$ , por *Growth Related Oncogen- $\alpha$* , o MGSA, por *Melanocyte Growth-Stimulatory Activity* o MIP-2), CXCL2 (o GRO- $\beta$ ), CXCL3 (o GRO- $\gamma$ ) y CXCL7 (o NAP-2, por *Neutrophil-activating peptide-2*).

Los monocitos en sangre periférica expresan niveles elevados de CXCR2 al compararse con los monocitos del tejido sinovial, de manera similar a lo explicado anteriormente para CXCR1, pero sin llegar en este caso a ser significativo, cuando se analiza un grupo de enfermedades con afectación articular. Similares resultados se obtienen al comparar los neutrófilos de sangre periférica y del tejido sinovial.(162)

Dentro de la subfamilia de las quimioquinas CXC, las que son ELR+, (CXCL8, CXCL6, CXCL7, CXCL1, CXCL2 y CXCL3), interactúan directamente con sus receptores CXCR2 y también CXCR1, y se considera que están implicadas en la migración y activación de los leucocitos, y por ello juegan un papel clave en varias enfermedades inflamatorias, como la colitis ulcerosa, la lesión post-reperfusión de tejidos isquémicos, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la progresión de tumores.(175) Las quimioquinas ELR+ reclutan los polimorfos nucleares hacia los tejidos inflamados mediante diferentes pasos, (rodamiento (*rolling*), adhesión y transmigración), capacitando a las células para salir de la corriente sanguínea y entrar en los tejidos periféricos.(175)

Se sabe que CXCL6 induce la quimiotaxis de los neutrófilos pero no la de los monocitos. CXCL6 también induce la activación de los neutrófilos, por lo que se ha implicado en la sepsis, el síndrome de distrés respiratorio agudo, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes y la invasibilidad por tumores que secretan CXCL6.(176) Por lo que respecta a CXCL8 se piensa que al interactuar con CXCR1 tendría un papel predominante en la quimiotaxis de los polimorfonucleares,(177) mientras que al unirse a CXCL6 tendría un papel preferente en el estímulo de la angiogénesis.(178)

Al estudiar los niveles de CXCL8, CXCL6, CXCL1 y CXCL5 en pacientes con AR, osteoartritis, fiebre mediterránea familiar y enfermedad de Behçet, se ha visto que en los pacientes con AR presentan un aumento marcado a nivel sinovial comparado con el resto, y que este aumento persiste tanto al compararse en los pacientes con formas activas como inactivas.(179) El estudio de Pay y colaboradores postula que la expresión de CXCR2 lleva a la acumulación a largo plazo de los neutrófilos en el tejido sinovial y la subsiguiente liberación por estos neutrófilos de citoquinas y quimioquinas como IL-1,

IL-1Ra, CXCL8 y CCL3 (MIP-1) lo que tendría efectos lesivos sobre las estructuras articulares,(180)

#### **6.1.2.5 CD62-L**

##### ***6.1.2.5.1 La expresión de CD62-L está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS***

*La expresión de CD62-L en la superficie de los granulocitos en el total de los pacientes con AIJiS está aumentada de manera significativa al comparar con el total de individuos sanos (gráfico 9) y también con el total de niños sanos (anexo 3 gráfico XXV). Al analizar por grupos estas diferencias persisten al comparar el total de pacientes sanos con los individuos sintomáticos con tratamiento (anexo 3 gráfico XVII), a pesar que el número de pacientes es más reducido, observándose una tendencia al comparar el total de sanos con los pacientes sintomáticos no tratados ( $p < 0'053$ ) y los asintomáticos con tratamiento ( $p < 0'053$ ). Se observan también tendencias al comparar los niños sanos con los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento ( $p < 0'05$ ), los pacientes con AIJiS sintomáticos sin tratamiento ( $p < 0'083$ ), y pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento ( $p < 0'05$ ).*

Interesante es de notar que no se observa ningún tipo de diferencia significativa ni tendencia al comparar los individuos sanos con los pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento.

##### ***6.1.2.5.2 La expresión de CD62-L está disminuida en los monocitos totales y en el subgrupo CD14+CD16- de los pacientes asintomáticos sin tratamiento.***

*La expresión de CD62-L en la superficie de los monocitos, totales y el subgrupo principal de los monocitos, CD14+CD16-, en los pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento está disminuida al comparar con el total de individuos sanos (anexo 3 gráficos IV y V), observándose también una tendencia ( $p < 0'05$ ) al comparar sólo con los niños sanos.*

**6.1.2.5.3 La expresión de CD62-L está aumentada en monocitos totales y en el subgrupo CD14+CD16- de los pacientes sintomáticos con tratamiento.**

*La expresión de CD62-L en la superficie de los monocitos, totales y el subgrupo principal de los monocitos, CD14+CD16-, en los pacientes con ALiS sintomáticos con tratamiento está aumentada al comparar con el total de individuos sanos (anexo 3 gráficos XVIII y XIX), observándose también una tendencia ( $p < 0.05$ ) al comparar sólo con los niños sanos.*

**6.1.2.5.4 La expresión de CD62-L está aumentada en el subgrupo CD14++CD16++ de los pacientes sintomáticos con tratamiento.**

*La expresión de CD62-L en la superficie de las células CD14++CD16++, en los pacientes con ALiS sintomáticos con tratamiento está aumentada al comparar con el total de individuos sanos (anexo 3 gráfico XX).*

CD62-L (o *L-selectin*) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las selectinas. Las selectinas se diferencian de otras moléculas de adhesión porque mientras que estas forman uniones proteína-proteína, las selectinas se unen a ligandos carbohidratos, formando ligandos proteína-carbohidrato.(181) CD62-L se expresa en la superficie de los linfocitos T y B, y su función se relaciona con la unión de los linfocitos al endotelio de las vénulas de los ganglios linfáticos y la recirculación de los linfocitos.(182) Los monocitos y los granulocitos también expresan CD62-L lo que facilita su marginalización (“*rolling*”) a lo largo de la pared del vaso durante una respuesta inflamatoria.(182) En individuos sanos se calcula que entre un 40-80% de los monocitos, 95% de los granulocitos polimorfonucleares y el 50% de los linfocitos expresan CD62-L.(183) Los monocitos que expresan CD62-L son los clásicos, CD14+CD16-, y en menor grado los intermedios, CD14+CD16+, no expresándose en los CD14dimCD16+.(101)

CD62-L es rápidamente liberada de las superficies celulares con la activación por parte de quimioquinas y factores quimiotácticos. sCD62-L (o soluble CD62-L o *soluble-L-selectin*) se encuentra presente en el plasma humano y es funcionalmente activa.(184)

un factor para la regulación de la migración a los sitios de inflamación podría ser el balance entre CD62-L y sCD62-L.(182)

Algunos trabajos en AR muestran que CD62-L tiene su expresión aumentada en las células mononucleares de sangre periférica de estos pacientes si se comparan con controles sanos, incluso se encuentra una correlación positiva entre la expresión de CD62-L y la actividad de la enfermedad.(185) No obstante otros trabajos muestran que los niveles de CD62-L en granulocitos, monocitos y linfocitos son significativamente mas bajos en los pacientes con artritis reumatoide que en los individuos sanos, lo que los autores atribuyen a diferentes mecanismos de autorregulación.(186) Por otra parte en pacientes con esclerodermia sistémica se han encontrado niveles elevados de sCD62-L con expresión disminuida de CD62-L en los linfocitos CD8 y cifras normales en los monocitos.(187)

Algunos trabajos han mostrado niveles de sCD62L aumentados significativamente en pacientes con lupus eritematoso sistémico activo,(188) correlacionándose el aumento de estos niveles con la enfermedad activa y los niveles anti-DNA.(189)

En nuestro caso hallamos un aumento de la expresión de CD62-L en los granulocitos de los pacientes en términos globales. También hallamos un aumento de la expresión en los monocitos de los pacientes sintomáticos con tratamiento. Este punto es de más difícil interpretación, no existen trabajos sobre la acción de los corticoides sobre la expresión de CD62-L en los monocitos, pero se sabe que la metilprednisolona disminuye la expresión de CD62-L en los neutrófilos circulantes, aunque también aumenta la cifra de neutrófilos circulantes.(190)

Es de notar que al analizar los monocitos hallamos una disminución de la expresión de CD62-L en los monocitos clásicos, CD14+CD16-, de los pacientes asintomáticos sin tratamiento al comparar con los individuos sanos. Es decir la expresión de CD62-L es en estas células incluso inferior a los pacientes sanos, fenómeno que no se puede atribuir al tratamiento, son pacientes que no están tomando fármacos, ni a la actividad de la enfermedad, ya que están asintomáticos. A pesar del pequeño número de sujetos estudiados cabría plantearse si este hallazgo no podría ser una característica propia de estos enfermos con AIJiS en remisión.

### **6.1.2.6 CD64**

#### ***6.1.2.6.1 La expresión de CD64 está aumentada en monocitos totales y en el subgrupo CD14+CD16- de los pacientes sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión del receptor de membrana CD64 en la superficie celular de los monocitos totales y en el principal subgrupo CD14+CD16- de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento está aumentada cuando se compara con el total de individuos sanos (anexo 3 gráficos XXI y XXII), mostrando tendencia cuando se analiza sólo comparando con el grupo de niños sanos (p 0'005).*

#### ***6.1.2.6.2 La expresión de CD64 está aumentada en las células CD14++CD16++ de los pacientes sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión del receptor de membrana CD64 en la superficie de las células CD14++CD16++ de los pacientes sintomáticos con tratamiento está aumentada cuando se compara con el total de individuos sanos (anexo 3 gráfico XXIII), mostrando tendencia cuando se analiza sólo comparando con el grupo de niños sanos (p 0'005).*

CD64 (o Fc $\gamma$ RI, por *Fc gamma Receptor type I*), es un receptor tipo I para la fracción Fc de la IgG. Los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas son glicoproteínas de membrana y tienen un importante papel en la conexión entre la inmunidad humoral y celular, conectando la unión de anticuerpos a antígenos específicos con mecanismos efectores no específicos de las células que expresan los receptores para la fracción Fc.(191) Se han identificado 4 tipos de receptores Fc; Fc $\gamma$ RI (o CD64), Fc $\gamma$ RII (o CD32), Fc $\gamma$ RIII (o CD16), y Fc $\gamma$ RIV.(192) Estos receptores difieren en su afinidad para la IgG o los inmunocomplejos que contienen IgG. Así Fc $\gamma$ RI se une a la IgG monomérica y se clasifica como un receptor de alta afinidad, mientras que Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII solo se unen a complejos inmunes multiméricos que contienen IgG y se conocen como receptores de baja afinidad.(193) Funcionalmente a grandes rasgos los Fc $\gamma$ R se pueden dividir en dos grupos, los receptores activadores (como Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIIb) y los inhibidores (como Fc $\gamma$ RIIb).(191)

FcγRIV es un receptor identificado recientemente con una afinidad intermedia y una afinidad a las subclases restringida.(194)

Los granulocitos, monocitos, macrófagos y las células NK expresan FcγR en sus membranas plasmáticas.(193) CD64 (FcγRI) se expresa de manera similar a CD62-L en los monocitos “clásicos”, CD14+CD16-, y en menor grado en los intermedios, CD14+CD16+, no expresándose en los CD14dimCD16+.(101)

Hay pocos datos sobre la expresión de CD64 en los monocitos de enfermedades reumatológicas, se sabe por ejemplo que la expresión de CD64 en los monocitos de pacientes con lupus eritematoso sistémico está significativamente aumentada y que este aumento además se correlaciona con las concentraciones de inmunocomplejos en el suero.(195) Otro trabajo con pacientes con artritis reumatoide muestra también un aumento de la expresión de CD64 en los monocitos respecto a los controles y como además habría una correlación significativa entre los niveles de proteína C reactiva y las cifras de plaquetas.(196) Sin embargo otros autores no confirman este aumento de la expresión de CD64 en los monocitos de pacientes con artritis reumatoide, y el incremento que observan en los pacientes con lupus eritematoso sistémico no alcanza la significación.(197)

Es de notar que en nuestro trabajo las diferencias se observan al comparar el grupo de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento, y no en otros subgrupos. Ello podría llevar a considerar un posible papel del tratamiento en este incremento de la expresión de CD64, no obstante algunos trabajos han mostrado como la expresión de CD64 en los monocitos de los pacientes con artritis reumatoide se ve reducida por la administración de metotrexate y dosis bajas de prednisona,(196,198) al contrario de lo que observamos en nuestro caso.

#### **6.1.2.7 CD40**

***6.1.2.7.1 La expresión de CD40 está aumentada en las células CD14++CD16++ de los pacientes sintomáticos con tratamiento.***



*La expresión de CD40 en la superficie de las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> de los pacientes sintomáticos con tratamiento está aumentada de manera significativa respecto al total de individuos sanos y también al comparar sólo con los niños sanos (gráficos 25 y anexo 3 gráfico XXXI), observándose tendencias al comparar el global de pacientes con AIJiS con el total de sanos (p 0'076) y el grupo de niños sanos (p 0'071).*

CD40 es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral. Se trata de una proteína transmembrana que se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígeno, macrófagos activados, células dendríticas, monocitos y células dendríticas foliculares, así como en células mesangiales y endoteliales.(199)

CD40 se une a CD154 (o CD40L), esta unión es clave en la activación de varios procesos del sistema inmune, produce las señales para la activación y diferenciación de las células B, y la posterior de la células T, además la unión sobre las células dendríticas las lleva a madurar para expresar un fenotipo presentador de antígeno.(200) La interacción CD40-CD40L está implicada en muchas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico,(201) artritis reumatoide,(202) esclerosis múltiple(203) o la enfermedad inflamatoria intestinal.(204)

No está claro el significado de estos hallazgos pero podríamos suponer que estas células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> mediante la expresión de receptores como CD40 podrían tener un papel activo en la respuesta inmune.

#### **6.1.2.8 CD83:**

##### ***6.1.2.8.1 La expresión de CD83 está aumentada en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> de los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento.***

*La expresión del receptor CD83 sobre la superficie de las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> en los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento está aumentada respecto al total de individuos sanos (anexo 3 gráfico XXIV), observándose tendencia a la significación cuando se compara sólo con el grupo de niños sanos (p 0'083).*

CD83 es un receptor de la superficie celular que es expresado por los linfocitos T y B activados,(205) y de manera muy característica por las células dendríticas activadas, sirviendo como un marcador útil para identificar estas poblaciones.(206) Se ha observado como los monocitos CD14+ pueden diferenciarse en células dendríticas maduras CD83+.(207)

A pesar que pocas conclusiones se pueden extraer dado que sólo obtuvimos 2 pacientes con AIJiS sintomáticos, otros 2 estaban asintomáticos sin tratamiento, parece que la células CD14++CD16++ que consideramos un posible subtipo de los monocitos, en los pacientes con AIJiS exhiben cambios sugestivos de las células dendríticas.

## **6.2 Análisis de las diferencias entre pacientes con AIJiS sintomáticos versus asintomáticos.**

### **6.2.1 Análisis de las diferencias en las principales poblaciones celulares en sangre periférica entre pacientes con AIJiS sintomáticos versus asintomáticos.**

#### **6.2.1.1 Las cifras de leucocitos están aumentadas en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.**

*En el análisis de las muestras se constata como las cifras de leucocitos en los pacientes con AIJiS sintomáticos son significativamente más altas que en los pacientes con AIJiS asintomáticos (gráfico 44). Se observan además tendencias a la significación en las cifras de granulocitos ( $p 0'055$ ) y en los monocitos totales, CD14+, ( $p 0'076$ ), así como en el subtipo de células CD14++CD16++ ( $p 0'065$ ).*

La leucocitosis con un predominio de los polimorfonucleares es una de las características ya conocidas de la AIJiS en sus fases activas, y este resultado no hace más que confirmarlo.(15)

#### **6.2.1.2 Las cifras de células dendríticas plasmacitoides están disminuidas en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.**

*Las cifras de células dendríticas plasmacitoides que marcan positivo para CD123 están disminuidas de manera muy marcada en los pacientes con AIJiS sintomáticos versus los asintomáticos (anexo 3 gráfico XXXII).*

*A pesar de las diferencias tan importantes hay que destacar que en los subgrupos analizados había pocos sujetos.*

El antígeno CD123 (o cadena- $\alpha$  del receptor para la IL-3), es una subunidad de baja afinidad para IL-3, se asocia con CD131 (o cadena- $\beta$  de la IL-3) y con la IL-5 y el receptor para GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating factor*, o factor

estimulador de colonias de granulocitos y monocitos) para formar el receptor de alta afinidad de IL-3. CD123 en la sangre periférica se expresa en altas concentraciones sólo en las células dendríticas plasmacitoides.

Las células dendríticas juegan un papel clave en la regulación de la respuesta inmune. Dependiendo de su estado de maduración pueden promover o inhibir la activación de las células T antígeno específicas, y mediante este proceso constituyen un nexo esencial entre las respuestas de defensa innata y adaptativa del organismo.(109) Dos subtipos principales de células dendríticas (DC) se han descrito, las células mieloides (CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>dim</sup>) y las plasmacitoides (CD11c<sup>-</sup>, CD123<sup>high</sup>).(208) Las células plasmacitoides son producidas constantemente en la médula ósea y emigran desde ésta a los ganglios linfáticos, los tejidos linfoides asociados a las mucosas y el bazo, los estudios cinéticos muestran que en ratones estas células tienen un recambio medio de unas 2 semanas.(209) Las células plasmacitoides comprenden menos del 0'3% de todas las células mononucleares circulantes y secretan grandes cantidades de interferón tipo I en respuesta a la estimulación por agentes infecciosos como el virus del herpes o el de la gripe.(210)

Se ha sugerido que las células dendríticas podrían jugar un papel en la iniciación y perpetuación de la artritis inflamatoria mediante la presentación de antígenos artritogénicos a células T autorreactivas.(211) Por otra parte la infiltración de la sinovial por las células dendríticas se ha descrito en la AR en fases precoces.(212) En un reciente trabajo se muestra como las células dendríticas plasmacitoides están significativamente disminuidas en la sangre periférica de pacientes con Artritis Reumatoide y Artritis Psoriática, tanto en valores absolutos como en tantos por ciento de los leucocitos circulantes.(210) En este mismo trabajo los autores se plantean si este descenso en las artritis inflamatorias está relacionado con un aumento de la migración al compartimiento sinovial o con una reducción de la liberación desde la médula ósea, de hecho describen como las células plasmacitoides, pese a haber migrado al líquido sinovial, expresan un patrón de inmadurez similar al de las células plasmacitoides circulantes.(210) Esta reducción de las células plasmacitoides circulantes también se ha observado en el LES y en la hepatitis autoinmune crónica.(213,214)

Hay pocos trabajos que analicen el papel de las células dendríticas en el tejido sinovial de los pacientes con AIJ. Varsani y colaboradores muestran la infiltración por células dendríticas en la sinovial de pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular.(215) Sin embargo en un reciente trabajo Gattorno y colaboradores muestran como las células plasmacitoides están implicadas en la iniciación, mantenimiento y regulación de la respuesta inflamatoria en la AIJ.(216)

Cabría considerar la posibilidad que el descenso en el número de células plasmacitoides en los pacientes con AIJiS sintomáticos estuviera sesgado por el tratamiento con corticoides, de hecho se sabe que los corticoides reducen las células plasmacitoides en sangre periférica,(217) pero curiosamente cuando procedimos a analizar las diferencias entre los pacientes con AIJiS tratados y no tratados estas diferencias solo se observaron en tendencia. Otra posibilidad podría ser que este descenso fuera un reflejo de una regulación cruzada, en este sentido Palucka y colaboradores han mostrado como el TNF regula la producción de IFN- $\alpha$  inhibiendo la generación de células dendríticas plasmacitoides.(218)

## **6.2.2 Análisis de las diferencias en los principales marcadores de superficie celular entre pacientes con AIJiS sintomáticos versus asintomáticos**

### **6.2.2.1 CCR4**

#### ***6.2.2.1.1 La expresión de CCR4 está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.***

*La expresión de CCR4 en la superficie de los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada respecto a la de los pacientes con AIJiS asintomáticos (anexo 3 gráfico XXXIII).*

CCR4 es el receptor de alta afinidad para CCL17 (o TARC, *Thymus and Activation-Regulated Chemokine*), CCL22 (o MDC, o *Macrophage Derived Chemokine*), y CCL5 (RANTES). Se trata de un receptor que predominantemente se expresa en timocitos, células *natural killer* y células T, en especial en las células T *helper 2* (Th2), y en menor grado en otras células. La expresión de CCR4 en los granulocitos neutrófilos está documentada,(219) aunque su función en estas células no está clara.

Un aumento de los niveles de CCL17 circulante se ha descrito en pacientes con asma bronquial y dermatitis atópica, así como en el plasma de enfermos con LES no tratado comparado con individuos sanos y en LES no tratado comparado con individuos con LES en tratamiento.(220) Por otra parte se ha visto un aumento de la expresión de CCL22 (o MDC) en los macrófagos y células dendríticas, induciendo además CCL22 la quimiotaxis de células dendríticas derivadas de monocitos, células T activadas y células NK.(221)

Se ha documentado el acúmulo de células T CD4+ que expresan CCR4 en el líquido sinovial de pacientes con los diferentes tipos de AIJ, acúmulo que no se halla en las muestras de pacientes con AR.(222) En el mismo trabajo se muestra que los niveles de CCL17 están aumentados en casi todas las muestras de líquido sinovial y sangre periférica de los pacientes con AIJ, pero no en el líquido sinovial de los pacientes con

AR o en el plasma normal, lo que en opinión de los autores sugeriría que las células T CCR4+ jugarían un papel en la AIJ.(222)

Utilizando la nueva tecnología del inmunoensayo *multiplex* De Jager y colaboradores muestran un aumento, entre otras citoquinas, de CCL22 en el plasma de pacientes con AIJ, independientemente de su subtipo, comparados con los controles.(158) En este mismo trabajo al analizar el líquido sinovial en los diferentes subtipos de AIJ los autores muestran como mientras los niveles de CCL22 aumentan en el líquido sinovial de los pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular, no lo hacen en la AIJiS.(158)

En el análisis de las diferencias para CCR4 hay que tener en cuenta que sólo obtuvimos muestras de 3 sujetos sanos, 4 pacientes con AIJiS asintomáticos, y 3 con AIJiS sintomáticos, por lo que no nos atrevemos a extraer conclusiones. No obstante llama la atención el aumento de la expresión de CCR4 en los granulocitos.

#### **6.2.2.2 CCR5**

##### ***6.2.2.2.1 La expresión de CCR5 está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.***

*La expresión de CCR5 en la superficie de los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada respecto a los pacientes con AIJiS asintomáticos (anexo 3 grafico XXXIV).*

CCR5 es un receptor para CCL3 (MIP-1 $\alpha$ , o *Macrophage-Inflammatory Protein-1 $\alpha$* ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES) y CCL8 (MCP-2), y se expresa en células T de memoria, especialmente del tipo TH1, macrófagos, células dendríticas y microglia.

Se ha visto un aumento de la expresión de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR3 en los linfocitos T del líquido sinovial de pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular.(95,222) Es más los ARNm de CCL3 y CCL5, ligandos ambos de CCR5, han sido detectados a altas concentraciones en muestras de tejido sinovial de AIJ comparadas con otras sinoviales control de procesos no-autoinmunes.(95)

En un estudio con diferentes formas de artritis de la rodilla se documentó la expresión de los diferentes tipos de leucocitos tanto en sangre periférica como en líquido sinovial. En este trabajo la expresión de CCR5 en los monocitos de sangre periférica era mucho más alta que en los monocitos de la sinovial (87% versus el 21%). En cambio mientras que la expresión de CCR5 en los linfocitos T CD4+ y CD8+ era alta en el líquido sinovial (88% y 93%), en la sangre periférica sólo una minoría de células T expresaban CCR5. Además en este mismo trabajo no se encontró expresión para CCR5 en los granulocitos neutrófilos ni en la sangre periférica ni en el líquido sinovial.(162)

El reclutamiento de los neutrófilos a los sitios de inflamación es un proceso complejo orquestado por diferentes tipos celulares, quimioatrayentes y citoquinas, que crean un clima favorable para la migración y activación. Los neutrófilos a su vez pueden amplificar el proceso inflamatorio por su capacidad para liberar diferentes citoquinas y quimioquinas, en este sentido los neutrófilos pueden secretar CCL3.(223) Pues bien, recientemente Ottonello y colaboradores han confirmado por 3 métodos diferentes la expresión de CCR5 en neutrófilos frescos recién aislados.(224) En su trabajo estos autores plantean la hipótesis que los neutrófilos inicializados por GM-CSF, que se ha demostrado aumentado en tejidos inflamados como la sinovial de la AR,(225) activan la expresión de CCR5 y secretan CCL3.(224)

De nuevo es difícil extraer conclusiones dado el poco número de casos estudiados para CCR5, como hemos visto apenas hay trabajos sobre la expresión de CCR5 sobre los granulocitos, aunque cabe considerar que este aumento de CCR5 en los granulocitos de los pacientes sintomáticos es una muestra de la activación de estas células en los pacientes con AIJiS sintomáticos.

#### **6.2.2.2 CD62-L**

***6.2.2.2.1 La expresión de CD62-L está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.***



*La expresión de CD62-L en la superficie de los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes con AIJiS asintomáticos (gráfico 45).*

Esto está en consonancia con el hecho que la expresión de CD62-L en la superficie de los granulocitos está también aumentada de manera significativa al comparar el total de los pacientes con AIJiS con el total de individuos sanos (gráfico 14) y también con el total de niños sanos (gráfico 58). De hecho previamente hemos mostrado como no se observa ningún tipo de diferencia significativa ni tendencia al comparar los individuos sanos con los pacientes con AIJiS asintomáticos sin tratamiento.

***6.2.2.2.2 La expresión de CD62-L está aumentada en los monocitos totales y en el subgrupo CD14+CD16- de los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos***

*La expresión de CD62-L en la superficie de los monocitos totales (CD14+) y en su principal subgrupo (CD14+CD16-) de los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada de manera significativa versus los pacientes asintomáticos (gráficos 46 y 47).*

Curiosamente al comparar los pacientes asintomáticos sin tratamiento con los individuos sanos observamos que los pacientes asintomáticos sin tratamiento presentaban niveles significativamente más bajos que los individuos sanos (gráficos 17 y 18).

***6.2.2.2.3 La expresión de CD62-L está aumentada en las células CD14++CD16++ en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.***

*La expresión de CD62-L en la superficie de las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes asintomáticos (gráfico 48).*

Como anteriormente habíamos comentado CD62-L se expresa en la superficie de los granulocitos, pero también en la de los monocitos preferentemente en los monocitos

clásicos, CD14+CD16<sup>-</sup>.(101,183) Pese que no hay literatura al respecto en la AIJiS, y que los trabajos en AR no son concluyentes, estos resultados sugieren que la expresión aumentada en los granulocitos y monocitos de sangre periférica podría ser una expresión de la actividad de la enfermedad, como se había propuesto en otras enfermedades como la AR.(185)

### **6.2.2.3 CD64**

#### ***6.2.2.3.1 La expresión de CD64 está aumentada en los monocitos CD14+CD16<sup>-</sup> en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.***

*La expresión de CD64 en la superficie de los monocitos clásicos, CD14+CD16<sup>-</sup>, en los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada de manera significativa versus los pacientes con AIJiS asintomáticos (gráfico 49), mostrando tendencia al analizar el conjunto de todos los monocitos (p 0'068).*

#### ***6.2.2.3.2 La expresión de CD64 está aumentada en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los pacientes asintomáticos.***

*La expresión de CD64 en la superficie de las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> en los pacientes con AIJiS sintomáticos está aumentada de manera significativa versus los pacientes con AIJiS asintomáticos (gráfico 50).*

CD64 (o FcγRI) se expresa de manera similar a CD62-L en los monocitos “clásicos”, CD14+CD16<sup>-</sup>, y en menor grado en los intermedios, CD14+CD16<sup>+</sup>, no expresándose en los CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>(101) Como comentamos anteriormente hay pocos datos sobre la expresión de CD64 en las enfermedades reumatológicas, no obstante estos datos, como los anteriormente expuestos al comparar los pacientes en sus diferentes subgrupos con individuos sanos parecen sugerir de manera paralela a CD62-L que un aumento de la expresión de CD64 en la superficie de los monocitos de los pacientes con AIJiS sería una expresión de la actividad de la enfermedad, de manera similar a lo que algunos autores describen en el LES o en la AR.(195,196)

#### 6.2.2.4 CD40

##### ***6.2.2.4.1 La expresión de CD40 está aumentada en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los asintomáticos.***

*La expresión de la proteína transmembrana CD40 sobre la superficie de las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> en los pacientes con AIJiS sintomáticos está significativamente aumentada respecto a los pacientes asintomáticos (gráfico 51).*

CD40 se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígeno, macrófagos activados, células dendríticas, monocitos y células dendríticas foliculares, así como en células mesangiales y endoteliales.(199) Su unión a CD154 (o CD40L) es clave en la activación de varios procesos del sistema inmune. En la AR se ha visto como la unión de CD40 y CD154 (CD40L) activa diferentes vías en las células sinoviales CD14<sup>+</sup> de estos pacientes produciendo TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que a su vez amplifican la respuesta inflamatoria al estimular a los sinoviocitos FLS (*Fibroblast-like Synoviocytes*). (226)

### **6.3 Análisis de las diferencias entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados.**

Al analizar estos dos grupos hay que hacer una observación. En el grupo de los pacientes con AIJiS sin tratamiento, se incluyen tanto pacientes con AIJiS que no llevan tratamiento porque están en remisión, como los pacientes que se presentan con un nuevo brote y que se analizaron previamente al inicio del tratamiento. Los resultados con más detenimiento al comparar los individuos sanos con estos subgrupos se han discutido anteriormente. No obstante el análisis de las diferencias que a continuación se hace creemos puede tener su valor en intentar identificar características diferenciales entre ambos grupos.

#### **6.3.1 Análisis de las diferencias en las principales poblaciones celulares en sangre periférica entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados.**

##### **6.3.1.1 Las cifras de leucocitos y granulocitos están aumentadas en los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los pacientes sin tratamiento.**

*Las cifras de leucocitos y granulocitos en los pacientes con AIJiS en tratamiento están aumentadas de manera significativa al comparar con los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráficos 52 y 53).*

A pesar que la leucocitosis con un predominio de los polimorfonucleares es una de las características de la AIJiS en sus fases activas,(15) es posible que en algunos pacientes el tratamiento con corticoides haya podido contribuir. En este sentido está documentado el papel de los glucocorticoides sobre los neutrófilos al aumentar la liberación desde el pool marginal, prolongando su permanencia en la circulación periférica y reduciendo la quimiotaxis de los neutrófilos a los sitios de inflamación.(133)

##### **6.3.1.2 Las cifras de monocitos totales y el subtipo principal CD14+CD16- están aumentadas en los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los pacientes sin tratamiento.**

*Las cifras de monocitos totales, CD14+, y el subtipo principal, CD14+CD16- en los pacientes con AIJiS en tratamiento están aumentadas de manera significativa respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráficos 54 y 55).*

Es posible que estos resultados puedan verse influenciados por los tratamientos de estos pacientes. En este sentido como se ha comentado anteriormente algunos trabajos muestran como el tratamiento con corticoides aumenta las cifras de monocitos clásicos, CD14+CD16-, mientras que hacen disminuir las cifras de los monocitos pro-inflamatorios CD14+CD16+.(139-141)

### **6.3.1.3 Las cifras de las células CD14++CD16++ están aumentadas en los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los pacientes sin tratamiento.**

*Las cifras de células CD14++CD16++ en los pacientes con AIJiS en tratamiento están aumentadas de manera significativa al comparar con los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráfico 56).*

Las diferencias que observamos en las células CD14++CD16++ podrían ser explicadas de manera similar a lo que observamos en los monocitos clásicos. Sobre todo si como parece observarse en este trabajo estas células no serían más que un subtipo de monocitos.

## **6.3.2 Análisis de las diferencias en los principales marcadores de superficie celular entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados.**

### **6.3.2.1 CCR1**

#### ***6.3.2.1.1 La expresión de CCR1 está aumentada en las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CCR1 en la superficie de las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa con respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráfico 57).*

Al analizar las diferencias en sangre periférica observamos como los niveles de CCR1 en los monocitos y sus poblaciones eran inferiores en líneas generales en los subgrupos de los pacientes con AIJiS comparados con los sujetos sanos (véase el apartado **6.1.2.1.2**) Sin embargo observamos que las células CD14++CD16++ presentan un aumento en los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados, de manera similar a lo que observamos para este tipo de células en los pacientes sintomáticos con tratamiento frente a los individuos sanos (véase el apartado **6.1.2.1.3**). Podría suponerse que el aumento de la expresión de CCR1 en la superficie de estas células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento sería un reflejo del tratamiento. En este sentido podría ser que se frenase la depleción de las células que marcan para CCR1, o se disminuyera la pérdida de la expresión de CCR1 debida a la inhibición de la síntesis.(146)

### **6.3.2.2 CCR2**

#### ***6.3.2.2.1 La expresión de CCR2 está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CCR2 en la superficie de los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráfico 58).*

Hay pocos trabajos sobre la expresión de las quimioquinas en los neutrófilos, y en especial de CCR2. Se ha visto como los neutrófilos de la médula ósea en un modelo murino expresan CCR2 funcional durante la diferenciación mediada por G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), maduración o activación y que pueden ser atraídos con CCL2 (o MCP-1).(227) De hecho en un trabajo previo se había visto como CCL2 podía inducir la quimiotaxis de los neutrófilos en ratas que habían sido inmunizadas, mientras que esta respuesta no se observaba en ratas *naive*. Esto llevaba a los autores a especular que la inmunización había llevado a un estado pre-inflamatorio que produciría G-CSF, que a su vez estimularía a los neutrófilos maduros o inmaduros a expresar CCR2, el cual estaría disponible para ligarse a CCL2. En este sentido otro trabajo muestra como la expresión de CCR2 esta aumentada en los neutrófilos de ratón durante la sepsis.(228)

De manera similar a los que habíamos comentado para CCR5, se sabe que G-CSF tiene un papel clave en la dirección de la inflamación en las articulaciones(229) y es posible que en los pacientes más afectados esto lleve a un aumento de la expresión de CCR2 en los granulocitos.

***6.3.2.2.2 La expresión de CCR2 está aumentada en los monocitos totales y en los subtipos CD14+CD16-, CD14+CD16+, CD14dimCD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CCR2 en la superficie de los monocitos totales y en los subtipos CD14+CD16-, CD14+CD16+, CD14dimCD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes sin tratamiento (gráficos 59, 60, 61 y 62).*

***6.3.2.2.3 La expresión de CCR2 está aumentada en las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CCR2 en la superficie de las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes sin tratamiento (gráfico 63).*

Previamente hemos descrito el aumento que observamos en la expresión de CCR2 en diferentes subtipos de monocitos en los pacientes con AIJiS en tratamiento, tanto sintomáticos como asintomáticos (véase 6.1.2.2.1 y 6.1.2.2.3)

CCR2 es el receptor para la quimioquina CCL2 (o MCP-1). CCL2 juega un papel importante en la atracción de los monocitos a los sitios de inflamación.(157) En varios trabajos se han documentado niveles altos de CCL2 en los pacientes con AIJiS.(96,97)

En nuestro estudio y como hemos comentado con anterioridad al comparar a los pacientes con AIJiS con los individuos sanos no encontramos un aumento generalizado de la expresión de CCR2 en los monocitos. En cambio al separar los pacientes en función de si reciben o no tratamiento vemos que aquellos en tratamiento presentan niveles significativamente más altos de CCR2. Diferentes trabajos han mostrado que el tratamiento con corticoides disminuye la producción de CCL2, por diferentes mecanismos, tanto en modelos como la AR,(230) como en otros modelos inflamatorios como la aterosclerosis(231) o en procesos inmunes e inflamatorios del sistema nervioso central (SNC).(232)

### **6.3.2.3 CXCR1**

***6.3.2.3.1 La expresión de CXCR1 está aumentada en los granulocitos de pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión del receptor de superficie CXCR1 en la superficie de los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada versus los pacientes sin tratamiento (anexo 3 gráfico XXXV).*

***6.3.2.3.2 La expresión de CXCR1 está aumentada en los monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***



*La expresión del receptor de superficie CXCR1 en la superficie de los monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada versus los pacientes sin tratamiento (anexo 3 gráfico XXXVI). Además se observan tendencias a la significación en el total de los monocitos, CD14<sup>+</sup>, (p 0'059), en el subtipo principal, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (p 0'059) y en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> (p 0'059).*

CXCR1 es el receptor para CXCL8 (o IL-8) y también para CXCL6 y CXCL1. CXCR1 se expresa principalmente en la superficie de neutrófilos y monocitos.

Previamente hemos descrito como la expresión de CXCR1 estaba aumentada en los granulocitos y en algunos subtipos de los monocitos en los pacientes con AIJiS al compararlos con los individuos sanos (véase **6.1.2.3.1** y **6.1.2.3.2**), y eso a pesar que sólo se pudieron comparar los dos grupos principales, ya que se realizaron pocos estudios con CXCR1 en individuos sanos. No obstante los resultados obtenidos y los que observamos al analizar los pacientes con AIJiS con tratamiento versus los no tratados sugieren un papel de esta quimioquina. En este sentido vemos de nuevo que la significación es sobre todo para el tipo de monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, precisamente un subtipo de monocitos que teóricamente expresan menos CXCR1.(102)

CXCR1 es junto con CXCR2 uno de los receptores para CXCL8 (o IL-8), que algunos trabajos muestran aumentada en el suero de los pacientes con Still del adulto,(171-173) y que es inducida por la IL-18(172) que se ha implicado en la patogenia de la AIiS y como marcador de actividad de esta.(174)

No parece posible que este aumento de la expresión de CXCR1 en los pacientes con AIJiS al comparar con los individuos sanos, y al comparar los pacientes con AIJiS con los pacientes con AIJiS sin tratamiento sea un reflejo de la actividad de la enfermedad, ya que no se observaron diferencias al comparar el total de individuos sanos con los pacientes con AIJiS sintomáticos sin tratamiento (aunque en este grupo para CXCR1 solo se analizaron dos casos).

Se ha demostrado que un corticoide como la dexametasona aumenta la expresión de CXCR4 en sangre periférica de las células mononucleares. Aunque en este mismo

trabajo no se muestra un aumento significativo para CXCR1, otra de las quimioquinas  $\alpha$  (CXC), esto puede ser a que no se analizan los diferentes tipos celulares, ni tampoco las diferencias entre los diferentes subtipos de monocitos.(233)

Otra posibilidad es que las diferencias observadas sean debidas al tratamiento. Se sabe que por ejemplo la dexametasona inhibe la síntesis de CXCL8,(234) y esto podría llevar a una mayor observación de la expresión de su receptor CXCR1 en algunos subtipos celulares.

#### **6.3.2.4 CXCR2**

##### ***6.3.2.4.1 La expresión de CXCR2 está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión del receptor de superficie CXCR2 en la superficie de los granulocitos en los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa versus los pacientes sin tratamiento (gráfico 64).*

##### ***6.3.2.4.2 La expresión de CXCR2 está aumentada en los monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión del receptor de superficie CXCR2 en la superficie de los monocitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> en los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa versus los pacientes sin tratamiento (gráfico 65).*

##### ***6.3.2.4.3 La expresión de CXCR2 está aumentada en las células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión del receptor de superficie CXCR2 en la superficie de los monocitos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> en los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa versus los pacientes sin tratamiento (gráfico 66).*

Previamente habíamos visto también como la expresión de CXCR2 en los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento (sintomáticos o no) era superior a la de los individuos sanos (véase **6.1.2.4.1**). Aunque no podemos sacar conclusiones dado el pequeño tamaño de los subgrupos que analizamos en general podemos ver como no se hallaban diferencias significativas entre los individuos sanos y los pacientes sin tratamiento, independientemente de si estaban en remisión (AIJiS asintomáticos sin tratamiento, 3 casos) o acudían por un brote nuevo de su enfermedad (AIJiS sintomáticos sin tratamiento, 3 casos). Estos hallazgos nos obligan a considerar que las diferencias halladas al comparar los pacientes con AIJiS con tratamiento versus los no tratados no estarían tan relacionadas con la enfermedad como con los fármacos que están recibiendo estos pacientes.

CXCR2 es el receptor para múltiples quimioquinas, CXCL6 (o GCP-2), CXCL5 (o ENA-78), CXCL1 (o GRO- $\alpha$  o MGSA o MIP-2), CXCL2 (o GRO- $\beta$ ), CXCL3 (o GRO- $\gamma$ ), CXCL7 (o NAP-2), y también CXCL8 (o IL-8). Dado que CXCR2 es junto con CXCR1 un receptor para CXCL8, parte de lo comentado para CXCR1, y el posible papel que jugaría CXCL8 al unirse a este receptor podría ser aplicado en este caso. De hecho esto podría explicar las similitudes que existen entre ambos receptores de quimioquinas.

### **6.3.2.5 CD62-L**

#### ***6.3.2.5.1 La expresión de CD62-L está aumentada en los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CD62-L en la superficie de los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráfico 67).*

Como en anteriores apartados hemos analizado (véase **6.1.2.5.1** y **6.2.2.2.1**) destaca el aumento de la expresión de CD62-L en los granulocitos de los pacientes en tratamiento. Destacamos que este aumento significativo de la expresión de CD62-L, no se observa al comparar los individuos sanos con los pacientes con AIJiS asintomáticos sin

tratamiento, por lo que parece que estos pacientes que han entrado en remisión manifestarían, al menos por lo que respecta a la expresión de CD62-L sobre los granulocitos, un perfil similar al de los individuos sanos.

***6.3.2.5.2 La expresión de CD62-L está aumentada en el total de los monocitos, y en los subtipos CD14+CD16- y CD14dimCD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CD62-L en la superficie de los monocitos totales, CD14+, y en los subtipos CD14+CD16- y CD14dimCD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes con AIJ sin tratamiento (gráficos 68, 69 y 70), presentando tendencia a la significación en el subtipo de monocitos, CD14+CD16+ (p 0'068)*

Como anteriormente habíamos comentado se calcula que en individuos sanos un 40-80% de los monocitos, 95% de los granulocitos polimorfonucleares y el 50% de los linfocitos expresan CD62-L.(183) Los monocitos que expresan CD62-L son los clásicos, CD14+CD16-, y en menor grado los intermedios, CD14+CD16+, no expresándose en los CD14dimCD16+.(101)

De manera similar a lo observado con los granulocitos, CD62-L en los monocitos se expresa de manera significativamente menor en los pacientes con AIJiS sin tratamiento. Curiosamente no obstante, cuando previamente habíamos analizado sólo el subgrupo de asintomáticos no tratados, estos incluso presentaban diferencias significativas más bajas que los individuos sanos (véase 6.1.2.5.2). Este punto marca una diferencia con lo que observamos en la expresión de CD62-L en los granulocitos, en los que los pacientes asintomáticos sin tratamiento no presentaban diferencias con los sujetos sanos, mientras en el caso de CD62-L en los monocitos, los pacientes con AIJiS sin tratamiento expresan niveles más bajos que incluso los individuos sanos.

Es de destacar también que hallemos diferencias en la expresión de CD62-L en los monocitos que expresan CD16+ que clásicamente lo expresan en menores cantidades, lo que podríamos atribuir a la actividad de la propia enfermedad o al tratamiento que están recibiendo los pacientes.

### 6.3.2.6 CD64

#### ***6.3.2.6.1 La expresión de CD64 está aumentada en los monocitos CD14+CD16+ y CD14dimCD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CD64 en la superficie de los monocitos CD14+CD16+ y CD14dimCD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa con respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráficos 71 y 72).*

#### ***6.3.2.6.2 La expresión de CD64 está aumentada en las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CD64 en la superficie de las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa con respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráfico 73).*

Cuando comparamos entre pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados, las diferencias significativas para CD64 sólo se observan entre los monocitos CD14+CD16+ y CD14dimCD16+, pero no con los CD14+CD16-. Mientras cuando comparamos con los individuos sanos sólo se observan diferencias respecto a los pacientes con AIJiS sintomáticos con tratamiento en los monocitos CD14+CD16-, al igual que cuando se comparan los pacientes con AIJiS sintomáticos versus los no sintomáticos.

Sería de esperar que en los pacientes con tratamiento, y entre ellos, los corticoides, aumentasen las cifras de monocitos clásicos, CD14+CD16-, mientras que disminuirían las cifras de los monocitos pro-inflamatorios CD14+CD16+.(139-141) En cambio nuestros hallazgos van en sentido contrario. Tampoco se observa el descenso de CD64 asociado al metotrexate que algunos de nuestros pacientes llevaban y descrito por Bunescu y colaboradores.(198)

Se sabe que la estimulación de los monocitos a través de receptores para la región Fc de la inmunoglobulina G (FcγR) como es el caso de CD64 (FcγI) activa una variedad de respuestas, incluyendo fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la producción de citoquinas. Una posible explicación sería que los pacientes con AIJiS sintomáticos expresarían niveles superiores de CD64 en los monocitos CD14+CD16- comparados con los individuos sanos y los pacientes con AIJiS asintomáticos, y que como respuesta al tratamiento parte de estas células CD14+CD16- pasarían a expresar CD16.

Grage-Griebenow y colaboradores clasifican a los monocitos en 4 subtipos, según si expresan o no CD64. La mayoría de los monocitos que expresan CD64 son CD14+CD16-, sólo un pequeño grupo que ellos describen sería CD14+CD16+CD64+, para estos autores estas células serían únicas en exhibir una combinación de características de los monocitos y las células dendríticas, por lo que se plantean la posibilidad que se traten de una etapa intermedia de la maduración de los monocitos a células dendríticas mieloides.(235)

### **6.3.2.7 CD40**

#### ***6.3.2.7.1 La expresión de CD40 está aumentada en las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los pacientes sin tratamiento.***

*La expresión de CD40 en la superficie de las células CD14++CD16++ de los pacientes con AIJiS en tratamiento está aumentada de manera significativa respecto a los pacientes con AIJiS sin tratamiento (gráfico 74), observándose además tendencias a la significación en los monocitos totales, CD14+, y el principal subtipo, CD14+CD16- (p 0'085 y p 0'085).*

Observamos el aumento significativo de CD40 sobre las células CD14++CD16++ en los pacientes en tratamiento, previamente ya hemos descrito este aumento respecto a los sujetos sanos y a los pacientes no sintomáticos. No queda claro el porque del aumento de la expresión de CD40 en la superficie de estas células no obstante se sabe que la estimulación de CD40 sobre los monocitos humanos, células dendríticas o células

epiteliales induce cambios que aumentan y prolongan las respuestas inflamatorias, incluyendo la producción de quimioquinas, como TNF $\alpha$ , IL-8 y MIP-1 $\alpha$  por las células dendríticas, e IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$  y MIP-1 $\alpha$  por los monocitos.(236,237)





## **7. RESUMEN**



## 7. RESUMEN

En este trabajo hemos caracterizado los receptores para quimioquinas de las diferentes poblaciones celulares de leucocitos en sangre periférica, y en especial de los diferentes subtipos de monocitos. Hemos podido ver como la expresión de estos receptores es diferente en los enfermos con AIJiS respecto a la de los individuos sanos, y también como existen diferencias en función de si los pacientes con AIJiS están en una fase activa de su enfermedad o en una fase de remisión, o de si están o no en tratamiento.

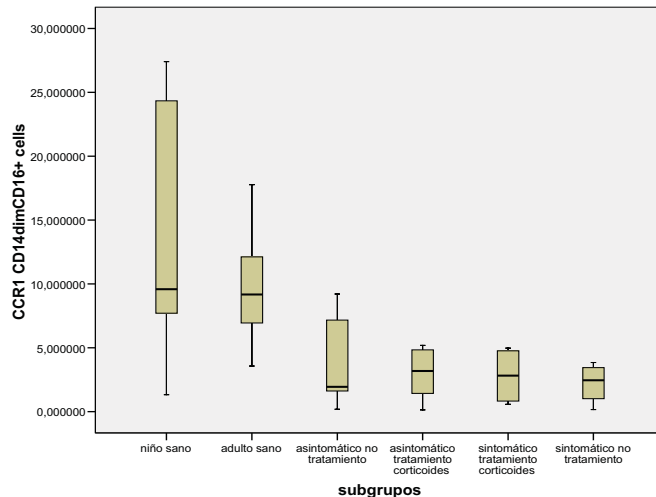
Hemos analizado como las quimioquinas juegan un papel fundamental en el reclutamiento y la función de las células del sistema inmune y como las diferencias en la expresión de los receptores para estas quimioquinas en los diferentes tipos de células sugieren diferentes vías de activación y migración.

Entre los resultados de este trabajo hemos constatado el aumento previamente ya conocido de las cifras de leucocitos y granulocitos en los pacientes con AIJiS, curiosamente también hemos objetivado un aumento de las cifras de linfocitos en valores absolutos en aquellos pacientes sintomáticos sin tratamiento.

Al analizar los receptores de quimioquinas, uno de los hallazgos principales, y también uno de los más constantes ha sido las diferencias encontradas para CCR1, que es el receptor para varias quimioquinas como CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL7 (MCP-3), CCL23 (MPIF-1) y CCL5 (RANTES). En este trabajo hemos mostrado como la expresión de CCR1 está disminuida en los monocitos de los pacientes con AIJiS, siendo esta diferencia observada de manera consistente para todos los subtipos de monocitos tanto al comparar con el conjunto de individuos sanos como al ser más restrictivos y analizar sólo comparando con el grupo de niños sanos de control. Estas diferencias se han observado especialmente con los monocitos CD14dimCD16+ como se puede apreciar en el gráfico adjunto (*gráfico 75*). De hecho también hemos comentado como en los monocitos de los pacientes con AIJiS la expresión de CCR1 está disminuida con respecto a los sujetos control. Algunos autores que han observado un esta misma disminución de CCR1 es los monocitos de sangre periférica, junto con un aumento de su expresión en los monocitos del tejido sinovial, han sugerido que el aumento en este tejido sinovial

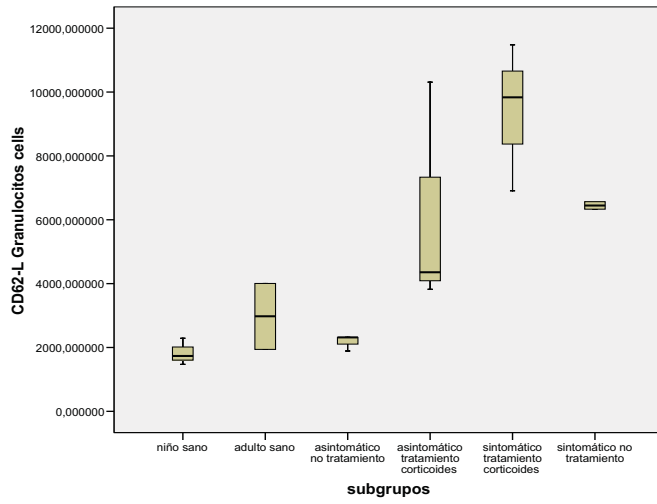
podría ser debido a una sobreexpresión de estos receptores o bien por una migración aumentada de las células que expresan este receptor CCR1 a los sitios de inflamación.(147) Otros trabajos han mostrado una correlación inversa con la VSG, disminuyendo la expresión de CCR1 conforme aumenta la VSG.(146)

**Gráfico 75**

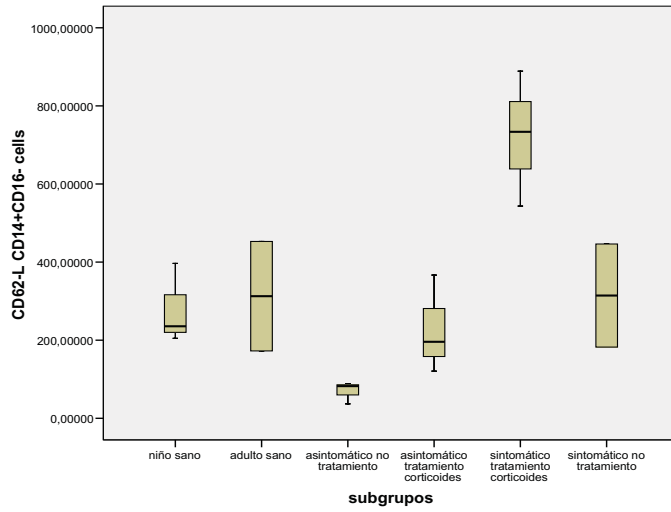


Destacamos también el haber mostrado el aumento de la expresión de CD62-L en los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos y asintomáticos en tratamiento respecto a los asintomáticos y sanos como se puede ver en el gráfico resumen (*gráfico 76*). CD62-L o L-selectin es una glicoproteína que facilita la marginalización (o “*rolling*”) a lo largo de la pared de los vasos durante una respuesta inflamatoria, y su expresión aumentada podría ser una manifestación de la actividad de la enfermedad de una manera parecida a lo descrito para la AR.(185) Destaca en particular que los pacientes con AIJiS en remisión, es decir asintomáticos sin tratamiento, presentan una expresión de CD62-L en los monocitos CD14+CD16- menor que los sujetos sanos, lo que de confirmarse en muestras más amplias podría ser una característica propia de estos pacientes con AIJiS en fase de remisión (*gráfico 77*). Por otra parte el aumento de CD64 en los monocitos CD14+CD16- y CD14+CD16+ de los pacientes con AIJiS parece estar más relacionado con el tratamiento con corticoides que con una expresión de la actividad de la enfermedad como se había descrito en otras enfermedades como la AR o el LES (*gráfico 78 y 79*). (195,196)

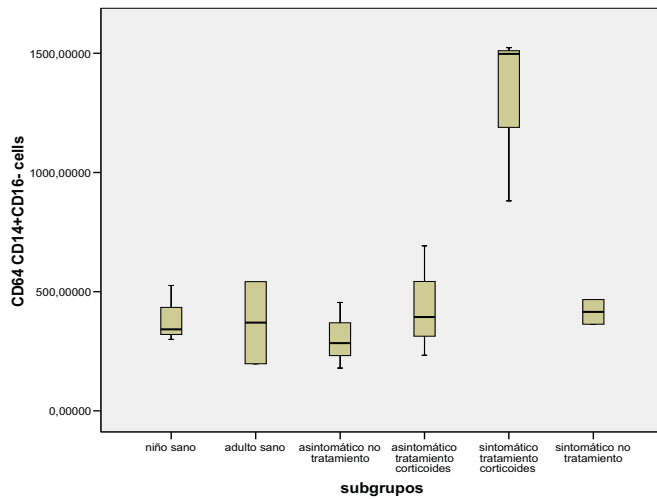
**Gráfico 76**



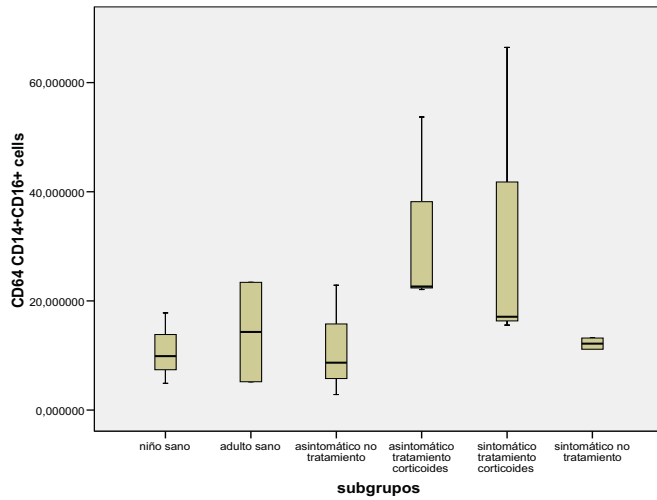
**Gráfico 77**



**Gráfico 78**

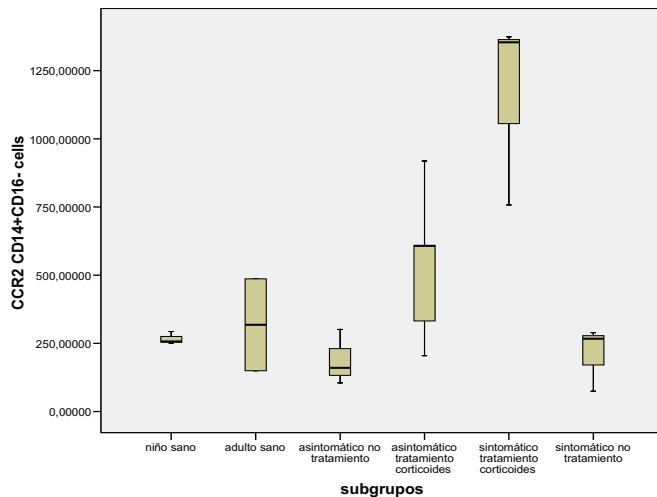


**Gráfico 79**

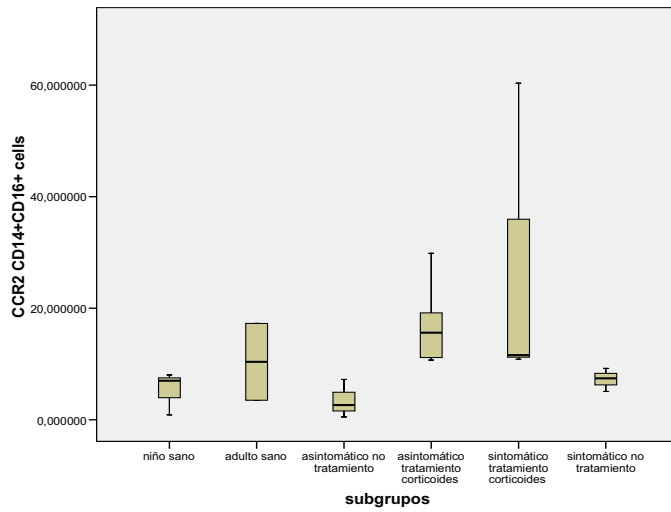


Finalmente al comparar los pacientes con AIJiS en tratamiento versus los no tratados hallamos un aumento de la expresión de CCR2 en todos los subtipos de monocitos, CD14+CD16-, CD14+CD16+ y CD14dimCD16+, aunque de manera parecida a lo que vimos con CD64 estos cambios parecen más relacionados con el tratamiento con corticoides, ya que en los pacientes sintomáticos sin tratamiento no se observaban (*gráficos resumen 80, 81 y 82*). CCR2 es receptor para la quimioquina CCL2 (MCP-1). Se ha demostrado que CCL2 está aumentada en todos los subtipos de AIJ, y en especial en la AIJiS, y que además se correlaciona con la presencia de síntomas sistémicos, las cifras de leucocitos y de ferritina.(96,97) Es posible pues que el descenso de los niveles de CCL2 debido al tratamiento en estos pacientes permita una mayor expresión de CCR2.

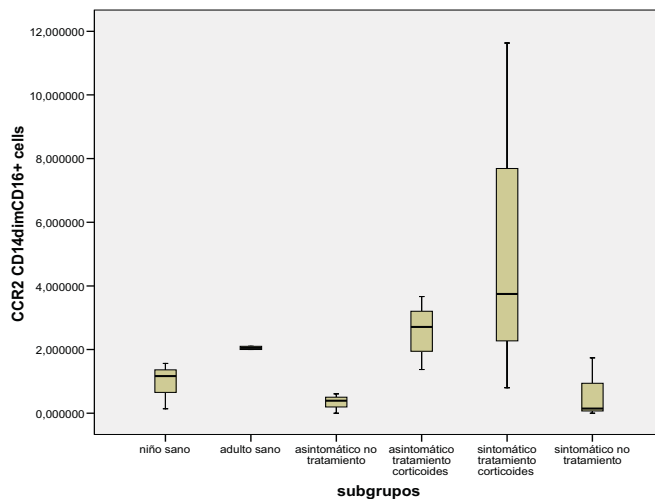
**Gráfico 80**



**Gráfico 81**



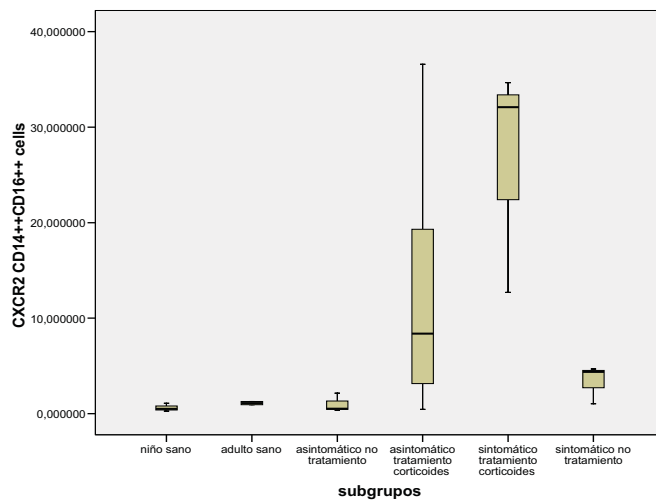
**Gráfico 82**



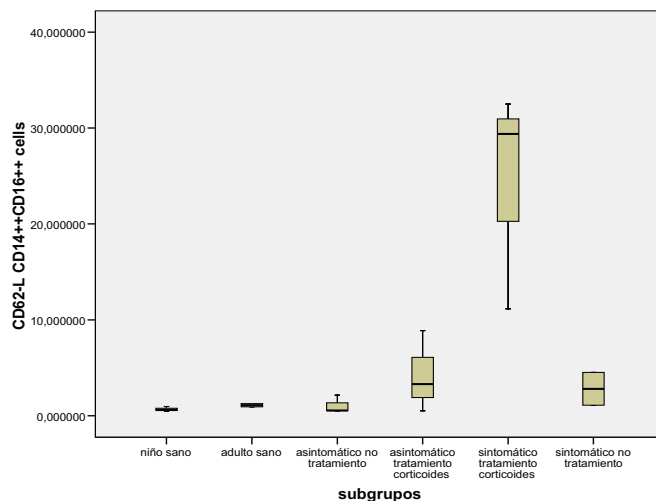
Tras la observación inicial de un pequeño grupo de células que expresaban muy positivamente CD14 y CD16 y que no habían sido previamente descritas nos planteamos la posibilidad que se tratase de una falsa población celular. Sin embargo como hemos discutido con anterioridad al descartar la posibilidad de una unión no-específica, al descartar que se tratara de granulocitos o el hecho de que no marcaran alto para todos los marcadores sino solo para algunos, (muchas veces coincidentes con los monocitos, otras no), nos inclinamos a considerar que se trataba de un tipo diferente de células, tal vez un subtipo de monocitos. Así podemos decir que lo que hemos dado en

llamar células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> se encuentran aumentadas en los pacientes con AIJiS. También que estas células expresan un aumento significativo de CXCR2 en los pacientes con AIJiS comparado con los individuos sanos y los asintomáticos sin tratamiento (pacientes en remisión), y si bien las diferencias son más notables para aquellos en tratamiento, también se observan en los sintomáticos que todavía no recibían tratamiento (*gráfico resumen 83*). Por otro lado los individuos con AIJiS sintomáticos expresan niveles de CD62-L, CD64 y CD40 más altos en estas células que los asintomáticos. Y finalmente en los pacientes con AIJiS en tratamiento los niveles de CCR1, CCR2, CXCR2, CD64 y CD40 en estas células son más altos que en los pacientes sin tratamiento (*véanse los gráficos resumen 84, 85 y 86*).

**Gráfico 83**

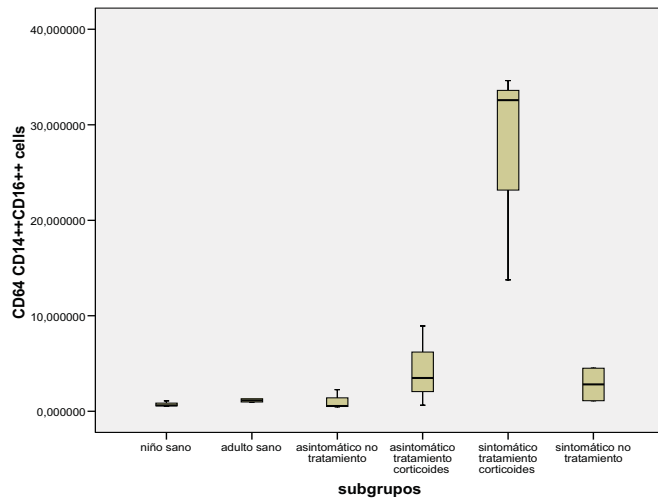


**Gráfico 84**

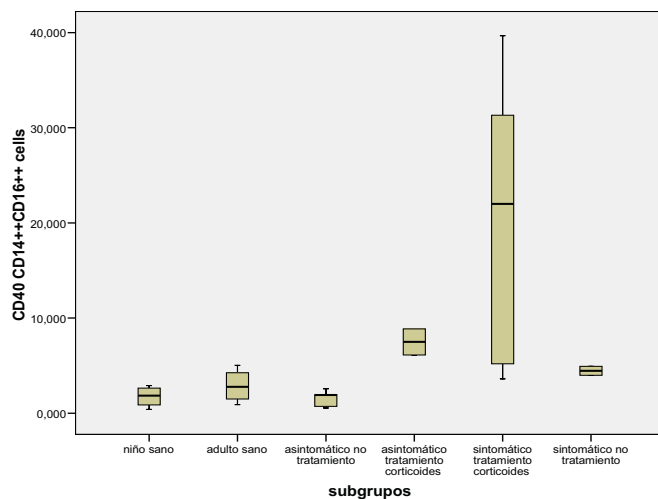




**Gráfico 85**



**Gráfico 86**



Nuestra hipótesis de trabajo era que la expresión de los receptores de quimioquinas en la superficie celular de los monocitos era diferente en los enfermos con AIJiS respecto a los individuos sanos, y que diferentes subtipos de células también podían expresar diferentes receptores de quimioquinas en estos pacientes dependiendo de si estos pacientes estaban sintomáticos o no o si estaban con o sin tratamiento. Hemos podido demostrar que estas diferencias existen y son consistentes. Estos hallazgos pueden contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos de reclutamiento celular implicados en la patogenia de los mecanismos inflamatorios de la AIJiS.

Por otra parte el conocimiento de la diferente expresión de los receptores de quimioquinas, ha permitido el desarrollo reciente de una serie de moléculas, con un teórico potencial terapéutico. En modelos animales de enfermedades como la AR, el asma, la esclerosis múltiple o el SIDA se ha propuesto la posibilidad de neutralizar los receptores de quimioquinas mediante tres vías, el uso de anticuerpos neutralizantes, el uso de quimioquinas modificadas que actúen como un antagonista del receptor y el uso de pequeñas moléculas antagonistas del receptor.(238) Como hemos explicado anteriormente la mayoría de receptores se unen con diferente intensidad a diferentes quimioquinas, y a su vez son expresados en diferentes tipos de células, lo que plantea la cuestión sobre que receptores deberían ser bloqueados. Es en este sentido que el conocimiento de la expresión de los diferentes receptores sobre la superficie de las células es clave. Por lo que respecta a quimioquinas modificadas, el descubrimiento accidental que en la producción recombinante de CCL5 (RANTES) por *Escherichia coli* se producía una potente antagonista de CCR1 abrió los estudios iniciales dirigidos contra los receptores de quimioquinas.(239) La proteína resultante, o Met-RANTES, por ser el resultado de la retención de una metionina inicializadora en el amino terminal, tiene la capacidad también de unirse a CCR3 y CCR5, funcionando como un antagonista competitivo de los 3 receptores. La modificación química del amino terminal al añadir una aminooxipentano al grupo produjo la molécula AOP-RANTES, que mostró una mayor afinidad por CCR1. Estos análogos amino-terminales han mostrado sus efectos beneficiosos en varios modelos in vivo en animales, incluyendo modelos de artritis y inflamación alérgica de las vías aéreas.(240) Por lo que respecta a la tercera vía, las pequeñas moléculas antagonistas del receptor, la primera descrita fue BX 513, de Berlex Biosciences, y también era antagonista de CCR1.(241) Posteriormente científicos del mismo laboratorio han descrito otra molécula BX 471,(242) que es un antagonista potente y selectivo de CCR1, disponible vía oral, y que se ha mostrado útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas.(243) En la actualidad se están realizando ensayos clínicos en fase II con BX 471.(244) Otras moléculas antagonistas pequeñas están en investigación como UCB 35625 antagonista para CCR1 y CCR3.(245) Además alimentados por el descubrimiento que CXCR4 y CCR5 sirven como co-receptores para la entrada del HIV-1 a las células se han desarrollado los antagonistas AMD3100 y TAK-779.(246,247) En los últimos años se han desarrollado otras muchas moléculas como antagonistas posibles de estos y otros receptores de

quimioquinas con el objetivo de poder bloquear los procesos inflamatorios que se producen en diversas enfermedades.(240)

Vemos pues como el mejor conocimiento de la expresión de los receptores de quimioquinas en la superficie de las células en sangre periférica de los pacientes con AIJiS permite además de contribuir al entendimiento de los mecanismos inflamatorios implicado en su patogenia, el identificar que tratamientos podrían ser potencialmente útiles en estos pacientes. Nuevos estudios profundizando en este campo pueden permitir un mejor diagnóstico y tratamiento en estos pacientes, mejorando su calidad de vida y pronóstico.



## **8. CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

1.- Se ha analizado la expresión de los receptores de quimioquinas en células de sangre periférica, y en especial en los subtipos de monocitos, de pacientes afectados de AIJiS y se ha comparado con la expresión de estos receptores en individuos sanos, destacando:

- Se ha demostrado la disminución de la expresión de CCR1 en todos los subtipos de los monocitos de los pacientes con AIJiS respecto a los sujetos sanos.
- Se ha demostrado el aumento de la expresión de CD62-L en los granulocitos de los pacientes con AIJiS respecto a los sujetos sanos.
- Se ha demostrado el aumento de la expresión de CXCR2 en los granulocitos de los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento respecto a los individuos sanos.
- Se ha demostrado el aumento de la expresión de CCR2 en los monocitos CD14+CD16+ de los pacientes con AIJiS asintomáticos con tratamiento respecto a los individuos sanos.

2.- Se ha analizado la expresión de los receptores de quimioquinas en células de sangre periférica, y en especial en los subtipos de monocitos, de pacientes afectados de AIJiS sintomáticos y se ha comparado con los individuos con AIJiS que se encontraban asintomáticos, destacando:

- Se ha demostrado el aumento de la expresión de CD62-L en los granulocitos de los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los asintomáticos.
- Se ha demostrado el aumento de la expresión de CD62-L y CD64 en los monocitos clásicos (CD14+CD16-) de los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los asintomáticos.

3.- Se ha analizado la expresión de los receptores de quimioquinas en células de sangre periférica, y en especial en los subtipos de monocitos, de pacientes

afectos de AIJiS en tratamiento y se ha comparado con los pacientes afectos de AIJiS que no estaban recibiendo tratamiento, destacando:

- Se ha demostrado un aumento de la expresión de CCR2 y CXCR2 en los granulocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los pacientes no tratados.
- Se ha demostrado un aumento de la expresión de CCR2 y CD62-L en todos los subtipos de monocitos de los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los pacientes no tratados.
- Se ha demostrado un aumento de la expresión de CD64 en los subtipos de monocitos CD16+ de los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los pacientes no tratados.

4.- Durante el estudio se ha identificado una población celular de pequeño tamaño, con una alta expresión de CD14 y CD16, que no había sido previamente descrita.

- Se ha demostrado que esta población se encuentra aumentada en los pacientes con AIJiS.
- Se ha demostrado que esta población de células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> expresan un aumento de la expresión CXCR2 en los pacientes con AIJiS respecto a los sujetos sanos.
- Se ha demostrado que esta población de células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> expresan un aumento de la expresión de CD62-L, CD64 y CD40 en los pacientes con AIJiS sintomáticos respecto a los asintomáticos.
- Se ha demostrado que esta población de células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> expresan un aumento de la expresión de CCR1, CCR2, CXCR2, CD64 y CD40 en los pacientes con AIJiS en tratamiento respecto a los no tratados.

5.- En conclusión, la demostración de la expresión diferenciada de los receptores de quimioquinas en los pacientes con AIJiS permite identificar que moléculas, incluyendo algunos fármacos ya en desarrollo, podrían jugar un papel en el tratamiento de estos enfermos.



## **9. BIBLIOGRAFÍA:**



## 9. BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Cassidy JT, Petty RE. Chronic Arthritis in childhood. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. Textbook of Pediatric Rheumatology. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2005. p. 206-260.
- (2) Brewer EJ, Bass JC, Cassidy JT. Criteria for the classification of the juvenile rheumatoid arthritis. Bull Rheum Dis 1972; 23: 712-719.
- (3) European League Against Rheumatism. EULAR Bulletin N° 4: Nomenclature and Classification of Arthritis in Children. Basel, National Zeitung AG 1977.
- (4) Fink CW. Proposal for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood. J Rheumatol 1995 Aug; 22(8): 1566-1569.
- (5) Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. J Rheumatol 1998 Oct; 25(10): 1991-1994.
- (6) Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. J.Rheumatol. 2004 Feb; 31(2): 390-392.
- (7) On a form of chronic joint disease in children by George Frederic Still, MA, MD, MRCP. Am J Dis Child 1978 Feb; 132(2): 195-200.
- (8) Prieur AM, Le Gall E, Karman F, Edan C, Lasserre O, Goujard J. Epidemiologic survey of juvenile chronic arthritis in France. Comparison of data obtained from two different regions. Clin Exp Rheumatol 1987 Jul-Sep; 5(3): 217-223.
- (9) Moe N, Rygg M. Epidemiology of juvenile chronic arthritis in northern Norway: a ten-year retrospective study. Clin Exp Rheumatol 1998 Jan-Feb; 16(1): 99-101.
- (10) Oen KG, Cheang M. Epidemiology of chronic arthritis in childhood. Semin Arthritis Rheum 1996 Dec; 26(3): 575-591.

- (11) Oen K. Comparative epidemiology of the rheumatic diseases in children. *Curr Opin Rheumatol* 2000 Sep; 12(5): 410-414.
- (12) Kurahara D, Tokuda A, Grandinetti A, Najita J, Ho C, Yamamoto K, et al. Ethnic differences in risk for pediatric rheumatic illness in a culturally diverse population. *J Rheumatol* 2002 Feb; 29(2): 379-383.
- (13) Huemer C, Huemer M, Dorner T, Falger J, Schacherl H, Bernecker M, et al. Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *J Rheumatol* 2001 Sep; 28(9): 2116-2119.
- (14) Kaipainen-Seppanen O, Savolainen A. Incidence of chronic juvenile rheumatic diseases in Finland during 1980-1990. *Clin Exp Rheumatol* 1996 Jul-Aug; 14(4): 441-444.
- (15) Petty RE, Cassidy JT. Systemic Arthritis. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. *Textbook of Pediatric Rheumatology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2005. p. 291-303.
- (16) Hofer MF, Saurenmann T, Ozen S, Anton J, van der Net, J. Pediatric Rheumatology European Society Clinical Guidelines: Systemic Arthritis. *Ped Rheum Online J* 2004 July, August 2004; 2(4): 20th June 2006.
- (17) Murray KJ, Moroldo MB, Donnelly P, Prahalad S, Passo MH, Giannini EH, et al. Age-specific effects of juvenile rheumatoid arthritis-associated HLA alleles. *Arthritis Rheum* 1999 Sep; 42(9): 1843-1853.
- (18) Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum* 1999 Nov; 42(11): 2261-2268.
- (19) Miller ML, Aaron S, Jackson J, Fraser P, Cairns L, Hoch S, et al. HLA gene frequencies in children and adults with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1985 Feb; 28(2): 146-150.
- (20) Glass DN, Litvin DA. Heterogeneity of HLA associations in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1980 Jul; 23(7): 796-799.

- (21) Bedford PA, Ansell BM, Hall PJ, Woo P. Increased frequency of DR4 in systemic onset juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1992 Mar-Apr; 10(2): 189-193.
- (22) Paul C, Yao Z, Nevinny-Stickel C, Keller E, Schoenwald U, Truckenbrodt H, et al. Immunogenetics of juvenile chronic arthritis. I. HLA interaction between A2, DR5/8-DR/DQ, and DPB1\*0201 is a general feature of all subsets of early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis II. DPB1 polymorphism plays a role in systemic juvenile chronic arthritis. *Tissue Antigens* 1995 Apr; 45(4): 280-283.
- (23) Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, et al. Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNFalpha gene and HLA genes. *Arthritis Rheum* 1999 Dec; 42(12): 2577-2582.
- (24) Bukulmez H, Fife M, Tsoras M, Thompson SD, Twine NA, Woo P, et al. Tapasin gene polymorphism in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: a family-based case-control study. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(2): R285-90.
- (25) Tsokos GC, Inghirami G, Pillemer SR, Mavridis A, Magilavy DB. Immunoregulatory aberrations in patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1988 Apr; 47(1): 62-74.
- (26) Tsokos GC, Mavridis A, Inghirami G, Pillemer SR, Emery HM, Magilavy DB. Cellular immunity in patients with systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1987 Jan; 42(1): 86-92.
- (27) Alarcon-Riquelme ME, Vazquez-Mellado J, Gomez-Cordillo M, Alcocer-Varela J, Burgos-Vargas R, Alarcon-Segovia D. Immunoregulatory defects in juvenile rheumatoid arthritis. Comparison between patients with the systemic or polyarticular forms. *J Rheumatol* 1988 Oct; 15(10): 1547-1550.
- (28) Wedderburn LR, Maini MK, Patel A, Beverley PC, Woo P. Molecular fingerprinting reveals non-overlapping T cell oligoclonality between an inflamed site and peripheral blood. *Int Immunol* 1999 Apr; 11(4): 535-543.
- (29) Oen K. Defects in pokeweed mitogen (PWM) induced immunoglobulin (Ig) synthesis by lymphocytes of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1985 Aug; 12(4): 728-734.

- (30) Dobloug JH, Chattopadhyay C, Forre O, Hoyeraal HM, Natvig JB. Con A-induced suppressor cell activity and T-lymphocyte subpopulations in peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1981; 13(4): 367-373.
- (31) Wouters CH, Ceuppens JL, Stevens EA. Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002 Mar-Apr; 20(2): 239-248.
- (32) Grom AA, Villanueva J, Lee S, Goldmuntz EA, Passo MH, Filipovich A. Natural killer cell dysfunction in patients with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *J Pediatr* 2003 Mar; 142(3): 292-296.
- (33) Villanueva J, Lee S, Giannini EH, Graham TB, Passo MH, Filipovich A, et al. Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(1): R30-7.
- (34) Behrens EM, Beukelman T, Paessler M, Cron RQ. Occult macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2007 May; 34(5): 1133-1138.
- (35) Hawkins PN, Lachmann HJ, Aganna E, McDermott MF. Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum* 2004 Feb; 50(2): 607-612.
- (36) Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005 May 2; 201(9): 1355-1359.
- (37) Silverman ED, Laxer RM, Nelson DL, Rubin LA. Soluble interleukin-2 receptor in juvenile rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 1991 Sep;18(9):1398-1402.
- (38) Mangge H, Schauenstein K. Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis (JRA). *Cytokine* 1998 Jun; 10(6): 471-480.
- (39) Muzaffer MA, Dayer JM, Feldman BM, Pruzanski W, Roux-Lombard P, Schneider R, et al. Differences in the profiles of circulating levels of soluble tumor necrosis factor

receptors and interleukin 1 receptor antagonist reflect the heterogeneity of the subgroups of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002 May; 29(5): 1071-1078.

(40) De Benedetti F. Inflammatory cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Ped Rheum Online J* 2005; 3(2): 122-136.

(41) Grom AA, Murray KJ, Luyrink L, Emery H, Passo MH, Glass DN, et al. Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1996 Oct; 39(10): 1703-1710.

(42) De Benedetti F, Pignatti P, Gerloni V, Massa M, Sartirana P, Caporali R, et al. Differences in synovial fluid cytokine levels between juvenile and adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997 Jul; 24(7): 1403-1409.

(43) Quartier P, Taupin P, Bourdeaut F, Lemelle I, Pillet P, Bost M, et al. Efficacy of etanercept for the treatment of juvenile idiopathic arthritis according to the onset type. *Arthritis Rheum* 2003 Apr; 48(4): 1093-1101.

(44) Kimura Y, Pinho P, Walco G, Higgins G, Hummell D, Szer I, et al. Etanercept treatment in patients with refractory systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005 May; 32(5): 935-942.

(45) Pignatti P, Vivarelli M, Meazza C, Rizzolo MG, Martini A, De Benedetti F. Abnormal regulation of interleukin 6 in systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2001 Jul; 28(7): 1670-1676.

(46) De Benedetti F, Martini A. Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease? *J Rheumatol* 1998 Feb; 25(2): 203-207.

(47) Yokota S. Interleukin 6 as a therapeutic target in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003 Sep; 15(5): 581-586.

(48) Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998 Oct 1; 102(7): 1369-1376.

- (49) Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, et al. The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* 2003 Nov; 48(11): 3202-3206.
- (50) Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W, British Paediatric Rheumatology Study Group. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 Aug; 44(8): 1782-1785.
- (51) De Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, et al. Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003 May; 48(5): 1398-1407.
- (52) Rooney M, David J, Symons J, Di Giovine F, Varsani H, Woo P. Inflammatory cytokine responses in juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol* 1995 May; 34(5): 454-460.
- (53) De Benedetti F, Pignatti P, Massa M, Sartirana P, Ravelli A, Martini A. Circulating levels of interleukin 1 beta and of interleukin 1 receptor antagonist in systemic juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995 Nov-Dec; 13(6): 779-784.
- (54) Prieur AM, Roux-Lombard P, Dayer JM. Dynamics of fever and the cytokine network in systemic juvenile arthritis. *Rev Rhum Engl Ed* 1996 Mar; 63(3): 163-170.
- (55) Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2005 May 2; 201(9): 1479-1486.
- (56) Verbsky JW, White AJ. Effective use of the recombinant interleukin 1 receptor antagonist anakinra in therapy resistant systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004 Oct; 31(10): 2071-2075.
- (57) Maeno N, Takei S, Nomura Y, Imanaka H, Hokonohara M, Miyata K. Highly elevated serum levels of interleukin-18 in systemic juvenile idiopathic arthritis but not in other juvenile idiopathic arthritis subtypes or in Kawasaki disease: comment on the



article by Kawashima et al. *Arthritis Rheum* 2002 Sep; 46(9): 2539-41; author reply 2541-2.

(58) Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol* 1998 May; 37(5): 562-569.

(59) Adebajo AO, Hall MA. The use of intravenous pulsed methylprednisolone in the treatment of systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol* 1998 Nov; 37(11): 1240-1242.

(60) Woo P, Southwood TR, Prieur AM, Dore CJ, Grainger J, David J, et al. Randomized, placebo-controlled, crossover trial of low-dose oral methotrexate in children with extended oligoarticular or systemic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000 Aug; 43(8): 1849-1857.

(61) al-Sewairy W, al-Mazyed A, al-Dalaan, al-Balaa S, Bahabri S. Methotrexate therapy in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis in Saudi Arabia: a retrospective analysis. *Clin Rheumatol* 1998; 17(1): 52-57.

(62) Ruperto N, Murray KJ, Gerloni V, Wulffraat N, de Oliveira SK, Falcini F, et al. A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004 Jul; 50(7): 2191-2201.

(63) Horneff G, Schmeling H, Biedermann T, Foeldvari I, Ganser G, Girschick HJ, et al. The German etanercept registry for treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004 Dec; 63(12): 1638-1644.

(64) Katsicas MM, Russo RA. Use of infliximab in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis refractory to etanercept. *Clin Exp Rheumatol* 2005 Jul-Aug; 23(4): 545-548.

(65) Lehman TJ, Schechter SJ, Sundel RP, Oliveira SK, Huttenlocher A, Onel KB. Thalidomide for severe systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: A multicenter study. *J Pediatr* 2004 Dec; 145(6): 856-857.

- (66) Yokota S, Miyamae T, Imagawa T, Iwata N, Katakura S, Mori M, et al. Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2005 Mar; 52(3): 818-825.
- (67) Woo P, Wilkinson N, Prieur AM, Southwood T, Leone V, Livermore P, et al. Open label phase II trial of single, ascending doses of MRA in Caucasian children with severe systemic juvenile idiopathic arthritis: proof of principle of the efficacy of IL-6 receptor blockade in this type of arthritis and demonstration of prolonged clinical improvement. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(6): R1281-8.
- (68) Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 2008 Mar 22; 371(9617): 998-1006.
- (69) Lequerre T, Quartier P, Rosellini D, Alaoui F, De Bandt M, Mejjad O, et al. Interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) treatment in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis or adult onset Still disease: preliminary experience in France. *Ann Rheum Dis* 2008 Mar; 67(3): 302-308.
- (70) Woo P. Anakinra treatment for systemic juvenile idiopathic arthritis and adult onset Still disease. *Ann Rheum Dis* 2008 Mar; 67(3): 281-282.
- (71) Dinarello CA. Setting the cytokine trap for autoimmunity. *Nat Med* 2003 Jan; 9(1): 20-22.
- (72) Brinkman DM, de Kleer IM, ten Cate R, van Rossum MA, Bekkering WP, Fasth A, et al. Autologous stem cell transplantation in children with severe progressive systemic or polyarticular juvenile idiopathic arthritis: long-term follow-up of a prospective clinical trial. *Arthritis Rheum* 2007 Jul; 56(7): 2410-2421.
- (73) De Kleer IM, Brinkman DM, Ferster A, Abinun M, Quartier P, Van Der Net J, et al. Autologous stem cell transplantation for refractory juvenile idiopathic arthritis: analysis of clinical effects, mortality, and transplant related morbidity. *Ann Rheum Dis* 2004 Oct; 63(10): 1318-1326.

- (74) Prieur AM. Systemic forms of idiopathic juvenile arthritis: clinical course. *Presse Med* 2000 Mar 11; 29(9): 503-509.
- (75) Singh-Grewal D, Schneider R, Bayer N, Feldman BM. Predictors of disease course and remission in systemic juvenile idiopathic arthritis: significance of early clinical and laboratory features. *Arthritis Rheum* 2006 May; 54(5): 1595-1601.
- (76) Modesto C, Woo P, Garcia-Consuegra J, Merino R, Garcia-Granero M, Arnal C, et al. Systemic onset juvenile chronic arthritis, polyarticular pattern and hip involvement as markers for a bad prognosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001 Mar-Apr; 19(2): 211-217.
- (77) Ravelli A, Martini A. Early predictors of outcome in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003 Sep-Oct; 21(5 Suppl 31): S89-93.
- (78) Ilowite NT. Current treatment of juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics* 2002 Jan; 109(1): 109-115.
- (79) Cortis E, Insalaco A. Macrophage activation syndrome in juvenile idiopathic arthritis. *Acta Paediatr Suppl* 2006 Jul; 95(452): 38-41.
- (80) Kelly A, Ramanan AV. Recognition and management of macrophage activation syndrome in juvenile arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2007 Sep; 19(5): 477-481.
- (81) Ravelli A, Magni-Manzoni S, Pistorio A, Besana C, Foti T, Ruperto N, et al. Preliminary diagnostic guidelines for macrophage activation syndrome complicating systemic juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr* 2005 May; 146(5): 598-604.
- (82) Vergunst CE, van de Sande MG, Lebre MC, Tak PP. The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2005 Nov-Dec; 34(6): 415-425.
- (83) Haringman JJ, Ludikhuizen J, Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum Dis* 2004 Oct; 63(10): 1186-1194.
- (84) International Union of Immunological Societies/World Health Organization Subcommittee on chemokine nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Leukoc Biol* 2001 Sep; 70(3): 465-466.

- (85) Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001 Feb; 2(2): 123-128.
- (86) Cupedo T, Mebius RE. Cellular interactions in lymph node development. *J.Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):21-25.
- (87) Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001 Feb; 2(2): 95-101.
- (88) Rollins BJ. Chemokines *Blood* 1997 Aug 1; 90(3): 909-928.
- (89) Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 Dec; 16(6): 593-609.
- (90) Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000 Jul; 68(1): 1-8.
- (91) Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med* 2002 Jul-Sep; 6(3): 357-376.
- (92) Szekanecz Z, Szucs G, Szanto S, Koch AE. Chemokines in rheumatic diseases. *Curr Drug Targets* 2006 Jan; 7(1): 91-102.
- (93) Haringman JJ, Kraan MC, Smeets TJ, Zwinderman KH, Tak PP. Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003 Aug; 62(8): 715-721.
- (94) Barnes MG, Aronow BJ, Luyrink LK, Moroldo MB, Pavlidis P, Passo MH, et al. Gene expression in juvenile arthritis and spondyloarthritis: pro-angiogenic ELR+ chemokine genes relate to course of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004 Aug; 43(8): 973-979.
- (95) Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2000 Apr; 43(4): 765-774.

- (96) De Benedetti F, Pignatti P, Bernasconi S, Gerloni V, Matsushima K, Caporali R, et al. Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Relation to onset types, disease activity, and synovial fluid leukocytes. *J Rheumatol* 1999 Feb; 26(2): 425-431.
- (97) Yao TC, Kuo ML, See LC, Ou LS, Lee WI, Chan CK, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein 1 as sensitive markers of disease activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis: a six-year longitudinal study. *Arthritis Rheum* 2006 Aug; 54(8): 2585-2593.
- (98) Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001 Jan; 69(1): 11-20.
- (99) Whitelaw DM. Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet* 1972 Jul; 5(4): 311-317.
- (100) Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000 May; 67(5): 603-606.
- (101) Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006; 211(6-8): 609-618.
- (102) Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005 Dec; 5(12): 953-964.
- (103) Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989 Nov 15; 74(7): 2527-2534.
- (104) Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, et al. The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993 Sep; 23(9): 2053-2058.
- (105) Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 2000 May; 67(5): 699-704.

- (106) Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003 Jul; 19(1): 71-82.
- (107) Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16<sup>+</sup> monocytes. *J Exp Med* 2003 Jun 16; 197(12): 1701-1707.
- (108) Siedlar M, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock LH, Belge KU. The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes. *Immunobiology* 2000 May; 202(1): 11-17.
- (109) Schakel K, Kannagi R, Kniep B, Goto Y, Mitsuoka C, Zwirner J, et al. 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 2002 Sep; 17(3): 289-301.
- (110) Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996 Jan 1; 87(1): 373-377.
- (111) Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, et al. CD16<sup>+</sup> monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1995 May 15; 85(10): 2910-2917.
- (112) Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, et al. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost* 2004 Aug; 92(2): 419-424.
- (113) Pulliam L, Gascon R, Stubblebine M, McGuire D, McGrath MS. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet* 1997 Mar 8; 349(9053): 692-695.
- (114) Baeten D, Boots AM, Steenbakkers PG, Elewaut D, Bos E, Verheijden GF, et al. Human cartilage gp-39<sup>+</sup>,CD16<sup>+</sup> monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000 Jun; 43(6): 1233-1243.

- (115) Qu C, Edwards EW, Tacke F, Angeli V, Llodra J, Sanchez-Schmitz G, et al. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 2004 Nov 15; 200(10): 1231-1241.
- (116) Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006 Mar; 7(3): 265-273.
- (117) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994 Apr 1; 179(4): 1109-1118.
- (118) Sanchez-Torres C, Garcia-Romo GS, Cornejo-Cortes MA, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G. CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol* 2001 Dec; 13(12): 1571-1581.
- (119) Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002 Aug 19; 196(4): 517-527.
- (120) Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 129-156.
- (121) von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003 Nov; 3(11): 867-878.
- (122) Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004 Jun; 4(6): 432-444.
- (123) Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-296.
- (124) Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003 Jan; 3(1): 23-35.
- (125) Xu H, Manivannan A, Dawson R, Crane IJ, Mack M, Sharp P, et al. Differentiation to the CCR2<sup>+</sup> inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-

limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators. *J Immunol* 2005 Nov 15; 175(10): 6915-6923.

(126) Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999 Dec; 11(6): 753-761.

(127) Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 2001 Nov 5; 194(9): 1361-1373.

(128) Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006 Sep; 2(9): 500-510.

(129) Nakamura H, Ueki Y, Sakito S, Matsumoto K, Yano M, Miyake S, et al. High serum and synovial fluid granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000 Nov-Dec; 18(6): 713-718.

(130) Leizer T, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA. Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood* 1990 Nov 15; 76(10): 1989-1996.

(131) Campbell IK, Novak U, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA. Human articular cartilage and chondrocytes produce hemopoietic colony-stimulating factors in culture in response to IL-1. *J Immunol* 1991 Aug 15; 147(4): 1238-1246.

(132) Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006 Nov; 2(11): 619-626.

(133) Butterfield JH, Gleich GJ. Anti-inflammatory effects of glucocorticoids of eosinophils and neutrophils. In: Schleimer RP, Claman HN, Oronsky A, editors. *Anti-inflammatory steroid action. Basic and clinical aspects* San Diego: Academic Press; 1989. p. 151.



- (134) Cupps TR, Fauci AS. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev* 1982; 65: 133-155.
- (135) Weston WL, Claman HN, Krueger GG. Site of action of cortisol in cellular immunity. *J Immunol* 1973 Mar; 110(3): 880-883.
- (136) Cohen JJ. Lymphocyte death induced by glucocorticoids. In: Schleimer RP, Claman HN, Oronsky A, editors. *Anti-inflammatory steroid action. Basic and clinical aspects*. San Diego: Academic Press; 1989. p. 110.
- (137) Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; 42(1): 71-104.
- (138) Laxer RM, Gazarian M. Pharmacology and drug therapy. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. *Textbook of pediatric rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 90.
- (139) Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 1998 Jun; 112(3): 501-506.
- (140) Scherberich JE, Nockher WA. CD14<sup>++</sup> monocytes, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin Chem Lab Med* 1999 Mar; 37(3): 209-213.
- (141) Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes. *J Leukoc Biol* 2003 Jul; 74(1): 33-39.
- (142) Mancuso F, Flower RJ, Perretti M. Leukocyte transmigration, but not rolling or adhesion, is selectively inhibited by dexamethasone in the hamster post-capillary venule. Involvement of endogenous lipocortin 1. *J Immunol* 1995 Jul 1; 155(1): 377-386.

- (143) Weber C, Weber KS, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, et al. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood* 2001 Feb 15; 97(4): 1144-1146.
- (144) Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 1993 Feb 12; 72(3): 415-425.
- (145) Sica A, Sacconi A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, et al. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 1997 Mar 3; 185(5): 969-974.
- (146) Katschke KJ, Jr, Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, LaRosa G, et al. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 May; 44(5): 1022-1032.
- (147) Haringman JJ, Smeets TJ, Reinders-Blankert P, Tak PP. Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006 Mar; 65(3): 294-300.
- (148) Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004 Oct;36(10):1882-1886.
- (149) Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000 May 15; 95(10): 3032-3043.
- (150) Van Damme J, Proost P, Lenaerts JP, Opdenakker G. Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med* 1992 Jul 1; 176(1): 59-65.
- (151) Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw* 2001 Oct-Dec; 12(4): 554-560.
- (152) Ali S, Robertson H, Wain JH, Isaacs JD, Malik G, Kirby JA. A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte

chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation. *J Immunol* 2005 Jul 15; 175(2): 1257-1266.

(153) Forssmann U, Delgado MB, Ugucioni M, Loetscher P, Garotta G, Baggiolini M. CKbeta8, a novel CC chemokine that predominantly acts on monocytes. *FEBS Lett.* 1997 May 19; 408(2): 211-216.

(154) Nardelli B, Morahan DK, Bong GW, Semenuk MA, Kreider BL, Garotta G. Dendritic cells and MPIF-1: chemotactic activity and inhibition of endogenous chemokine production by IFN-gamma and CD40 ligation. *J Leukoc Biol* 1999 Jun; 65(6): 822-828.

(155) Hwang J, Son KN, Kim CW, Ko J, Na DS, Kwon BS, et al. Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* 2005 Jun 7; 30(5): 254-263.

(156) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992 Sep; 90(3): 772-779.

(157) Gu L, Rutledge B, Fiorillo J, Ernst C, Grewal I, Flavell R, et al. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 1997 Nov; 62(5): 577-580.

(158) de Jager W, Hoppenreijns EP, Wulffraat NM, Wedderburn LR, Kuis W, Prakken BJ. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 2007 May; 66(5): 589-598.

(159) Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Jun 7; 259(2): 344-348.

(160) Ozyurek AR, Gurses D, Ulger Z, Levent E, Bakiler AR, Berdeli A. Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Turkish population and in Turkish patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007 Apr; 26(4): 546-550.

- (161) Ehrchen J, Steinmuller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* 2007 Feb 1; 109(3): 1265-1274.
- (162) Bruhl H, Wagner K, Kellner H, Schattenkirchner M, Schlondorff D, Mack M. Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin Exp Immunol* 2001 Dec; 126(3): 551-559.
- (163) Khandaker MH, Mitchell G, Xu L, Andrews JD, Singh R, Leung H, et al. Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. *Blood* 1999 Apr 1; 93(7): 2173-2185.
- (164) Endo H, Akahoshi T, Takagishi K, Kashiwazaki S, Matsushima K. Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine Cytokine Res* 1991 Aug; 10(4): 245-252.
- (165) Deleuran B, Lemche P, Kristensen M, Chu CQ, Field M, Jensen J, et al. Localisation of interleukin 8 in the synovial membrane, cartilage-pannus junction and chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1994; 23(1): 2-7.
- (166) Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, et al. Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol* 1991 Oct 1; 147(7): 2187-2195.
- (167) Koch AE, Volin MV, Woods JM, Kunkel SL, Connors MA, Harlow LA, et al. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 2001 Jan; 44(1): 31-40.
- (168) Kraan MC, Patel DD, Haringman JJ, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, et al. The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). *Arthritis Res* 2001; 3(1): 65-71.

- (169) Mangge H, Kenzian H, Gallistl S, Neuwirth G, Liebmann P, Kaulfersch W, et al. Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. Correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes. *Arthritis Rheum* 1995 Feb; 38(2): 211-220.
- (170) Yilmaz M, Kendirli SG, Altintas D, Bingol G, Antmen B. Cytokine levels in serum of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2001; 20(1): 30-35.
- (171) Arlet JB, Le Thi Huong DB, Pouchot J, Piette JC. Current concepts on the physiopathology of adult-onset Still's disease. *Rev Med Interne* 2005 Jul; 26(7): 549-556.
- (172) Choi JH, Suh CH, Lee YM, Suh YJ, Lee SK, Kim SS, et al. Serum cytokine profiles in patients with adult onset Still's disease. *J Rheumatol* 2003 Nov; 30(11): 2422-2427.
- (173) Fujii T, Nojima T, Yasuoka H, Satoh S, Nakamura K, Kuwana M, et al. Cytokine and immunogenetic profiles in Japanese patients with adult Still's disease. Association with chronic articular disease. *Rheumatology (Oxford)* 2001 Dec; 40(12): 1398-1404.
- (174) Lotito AP, Campa A, Silva CA, Kiss MH, Mello SB. Interleukin 18 as a marker of disease activity and severity in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2007 Apr; 34(4): 823-830.
- (175) Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006 Oct; 112(1): 139-149.
- (176) Van Damme J, Wuyts A, Froyen G, Van Coillie E, Struyf S, Billiau A, et al. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. *J Leukoc Biol* 1997 Nov; 62(5): 563-569.
- (177) Di Cioccio V, Strippoli R, Bizzarri C, Troiani G, Cervellera MN, Gloaguen I, et al. Key role of proline-rich tyrosine kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis. *Immunology* 2004 Apr; 111(4): 407-415.

- (178) Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 2000 Nov 1; 165(9): 5269-5277.
- (179) Erdem H, Pay S, Serdar M, Simsek I, Dinc A, Musabak U, et al. Different ELR (+) angiogenic CXC chemokine profiles in synovial fluid of patients with Behcet's disease, familial Mediterranean fever, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2005 Dec; 26(2): 162-167.
- (180) Pay S, Musabak U, Simsek I, Pekel A, Erdem H, Dinc A, et al. Expression of CXCR-1 and CXCR-2 chemokine receptors on synovial neutrophils in inflammatory arthritides: does persistent or increasing expression of CXCR-2 contribute to the chronic inflammation or erosive changes? *Joint Bone Spine* 2006 Dec; 73(6): 691-696.
- (181) Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990 Aug 2; 346(6283): 425-434.
- (182) Beekhuizen H, van Furth R. Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J Leukoc Biol* 1993 Oct; 54(4): 363-378.
- (183) Rainer TH. L-selectin in health and disease. *Resuscitation* 2002 Feb; 52(2): 127-141.
- (184) Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 1992 Oct; 119(1): 229-238.
- (185) Kurohori Y, Sato K, Suzuki S, Kashiwazaki S. Adhesion molecule expression on peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis: positive correlation between the proportion of L-selectin and disease activity. *Clin Rheumatol* 1995 May; 14(3): 335-341.
- (186) Bond A, Hay FC. L-selectin expression on the surface of peripheral blood leucocytes from rheumatoid arthritis patients is linked to disease activity. *Scand J Immunol* 1997 Sep; 46(3): 312-316.

- (187) Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Elevated serum L-selectin levels and decreased L-selectin expression on CD8(+) lymphocytes in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2001 Jun; 124(3): 474-479.
- (188) Sfrikakis PP, Charalambopoulos D, Vaiopoulos G, Mavrikakis M. Circulating P- and L-selectin and T-lymphocyte activation and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 1999; 18(1): 28-32.
- (189) Font J, Pizcueta P, Ramos-Casals M, Cervera R, Garcia-Carrasco M, Navarro M, et al. Increased serum levels of soluble L-selectin (CD62L) in patients with active systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 2000 Jan; 119(1): 169-174.
- (190) Youssef P, Roberts-Thomson P, Ahern M, Smith M. Pulse methylprednisolone in rheumatoid arthritis: effects on peripheral blood and synovial fluid neutrophil surface phenotype. *J Rheumatol* 1995 Nov; 22(11): 2065-2071.
- (191) Ioan-Facsinay A, de Kimpe SJ, Hellwig SM, van Lent PL, Hofhuis FM, van Ojik HH, et al. FcγRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* 2002 Mar; 16(3): 391-402.
- (192) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006 Jan; 24(1): 19-28.
- (193) Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fcγ receptors in autoimmune diseases. *Eur J Clin Invest* 2001 Sep; 31(9): 821-831.
- (194) Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005 Jul; 23(1): 41-51.
- (195) Szucs G, Kawai M, Suranyi P, Kiss E, Csipo I, Szegedi G. Correlations of monocyte phagocytic receptor expressions with serum immune complex level in systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1994 Nov; 40(5): 481-484.
- (196) Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, Hakansson L. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): increased integrin, Fc gamma and complement receptor

expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 1999 Mar; 115(3): 554-560.

(197) Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fc $\gamma$  and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004 May; 43(5): 547-554.

(198) Bunescu A, Seideman P, Lenkei R, Levin K, Egberg N. Enhanced Fc $\gamma$  receptor I,  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *J Rheumatol* 2004 Dec; 31(12): 2347-2355.

(199) Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111-135.

(200) Goules A, Tzioufas AG, Manousakis MN, Kirou KA, Crow MK, Routsias JG. Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2006 May; 26(3): 165-171.

(201) Koshy M, Berger D, Crow MK. Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 1996 Aug 1; 98(3): 826-837.

(202) Wang CR, Liu MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1 $\alpha$  production in CD4<sup>+</sup> T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003 May; 132(2): 371-378.

(203) Fillion LG, Matusevicius D, Graziani-Bowering GM, Kumar A, Freedman MS. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2003 Feb; 106(2): 127-138.

(204) Ludwiczek O, Kaser A, Tilg H. Plasma levels of soluble CD40 ligand are elevated in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 2003 Mar; 18(2): 142-147.

(205) Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992 Jul 15; 149(2): 735-742.



- (206) Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995 Apr 15; 154(8): 3821-3835.
- (207) Zhou LJ, Tedder TF. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 Mar 19; 93(6): 2588-2592.
- (208) O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994 Jul; 82(3): 487-493.
- (209) Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004 Dec; 5(12): 1219-1226.
- (210) Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(1): R15.
- (211) Tsark EC, Wang W, Teng YC, Arkfeld D, Dodge GR, Kovats S. Differential MHC class II-mediated presentation of rheumatoid arthritis autoantigens by human dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 2002 Dec 1; 169(11): 6625-6633.
- (212) Pettit AR, Thomas R. Dendritic cells: the driving force behind autoimmunity in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol* 1999 Oct; 77(5): 420-427.
- (213) Cederblad B, Blomberg S, Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha-producing cells. *J Autoimmun* 1998 Oct; 11(5): 465-470.
- (214) Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, et al. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2004 Dec 1; 190(11): 1919-1926.

- (215) Varsani H, Patel A, van Kooyk Y, Woo P, Wedderburn LR. Synovial dendritic cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptor activator of NF-kappaB (RANK). *Rheumatology (Oxford)* 2003 Apr; 42(4): 583-590.
- (216) Gattorno M, Chicha L, Gregorio A, Ferlito F, Rossi F, Jarrossay D, et al. Distinct expression pattern of IFN-alpha and TNF-alpha in juvenile idiopathic arthritis synovial tissue. *Rheumatology (Oxford)* 2007 Apr; 46(4): 657-665.
- (217) Shodell M, Siegal FP. Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Sep; 108(3): 446-448.
- (218) Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Mar 1; 102(9): 3372-3377.
- (219) Yousefi S, Cooper PR, Potter SL, Mueck B, Jarai G. Cloning and expression analysis of a novel G-protein-coupled receptor selectively expressed on granulocytes. *J Leukoc Biol* 2001 Jun; 69(6): 1045-1052.
- (220) Okamoto H, Koizumi K, Yamanaka H, Saito T, Kamatani N. A role for TARC/CCL17, a CC chemokine, in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003 Nov; 30(11): 2369-2373.
- (221) Godiska R, Chantry D, Raport CJ, Sozzani S, Allavena P, Leviten D, et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 1997 May 5; 185(9): 1595-1604.
- (222) Thompson SD, Luyrink LK, Graham TB, Tsoras M, Ryan M, Passo MH, et al. Chemokine receptor CCR4 on CD4+ T cells in juvenile rheumatoid arthritis synovial fluid defines a subset of cells with increased IL-4:IFN-gamma mRNA ratios. *J Immunol* 2001 Jun 1; 166(11): 6899-6906.
- (223) Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000 Oct; 177: 195-203.

- (224) Ottonello L, Montecucco F, Bertolotto M, Arduino N, Mancini M, Corcione A, et al. CCL3 (MIP-1alpha) induces in vitro migration of GM-CSF-primed human neutrophils via CCR5-dependent activation of ERK 1/2. *Cell Signal* 2005 Mar; 17(3): 355-363.
- (225) Xu WD, Firestein GS, Taetle R, Kaushansky K, Zvaifler NJ. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. II. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid synovial effusions. *J Clin Invest* 1989 Mar; 83(3): 876-882.
- (226) Harigai M, Hara M, Kawamoto M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Tanaka M, et al. Amplification of the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB using ligation of CD40 on CD14+ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004 Jul; 50(7): 2167-2177.
- (227) Iida S, Kohro T, Kodama T, Nagata S, Fukunaga R. Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation. *J Leukoc Biol* 2005 Aug; 78(2): 481-490.
- (228) Speyer CL, Gao H, Rancilio NJ, Neff TA, Huffnagle GB, Sarma JV, et al. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol* 2004 Dec; 165(6): 2187-2196.
- (229) Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, et al. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Aug 3; 101(31): 11398-11403.
- (230) Wong PK, Cuello C, Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD, et al. Effects of pulse methylprednisolone on macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in rheumatoid synovium. *J Rheumatol* 2001 Dec; 28(12): 2634-2636.
- (231) Dhawan L, Liu B, Blaxall BC, Taubman MB. A novel role for the glucocorticoid receptor in the regulation of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA stability. *J Biol Chem* 2007 Apr; 282(14): 10146-10152.

- (232) Zhou Y, Ling EA, Dheen ST. Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *J Neurochem* 2007 Aug; 102(3): 667-678.
- (233) Caulfield J, Fernandez M, Snetkov V, Lee T, Hawrylowicz C. CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells. *Immunology* 2002 Feb; 105(2): 155-162.
- (234) Anttila HS, Reitamo S, Ceska M, Hurme M. Signal transduction pathways leading to the production of IL-8 by human monocytes are differentially regulated by dexamethasone. *Clin Exp Immunol* 1992 Sep; 89(3): 509-512.
- (235) Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* 2001 Jan; 31(1): 48-56.
- (236) Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994 Oct 1; 180(4): 1263-1272.
- (237) Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* 1995 Nov 15; 155(10): 4917-4925.
- (238) Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002 Feb; 2(2): 106-115.
- (239) Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, et al. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 1996 Feb 2; 271(5): 2599-2603.
- (240) Pease JE, Williams TJ. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol* 2006 Jan; 147 Suppl 1: S212-21.

- (241) Hesselgesser J, Ng HP, Liang M, Zheng W, May K, Bauman JG, et al. Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor. *J Biol Chem* 1998 Jun 19; 273(25): 15687-15692.
- (242) Liang M, Mallari C, Rosser M, Ng HP, May K, Monahan S, et al. Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1. *J Biol Chem* 2000 Jun 23; 275(25): 19000-19008.
- (243) Horuk R. BX471: a CCR1 antagonist with anti-inflammatory activity in man. *Mini Rev Med Chem* 2005 Sep; 5(9): 791-804.
- (244) Pease JE, Horuk R. CCR1 antagonists in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 2005 Jul; 14(7): 785-796.
- (245) Sabroe I, Peck MJ, Van Keulen BJ, Jorritsma A, Simmons G, Clapham PR, et al. A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J Biol Chem* 2000 Aug 25; 275(34): 25985-25992.
- (246) De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2003 Jul; 2(7): 581-587.
- (247) Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, et al. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 May 9; 97(10): 5639-5644.



## **10. ANEXOS**





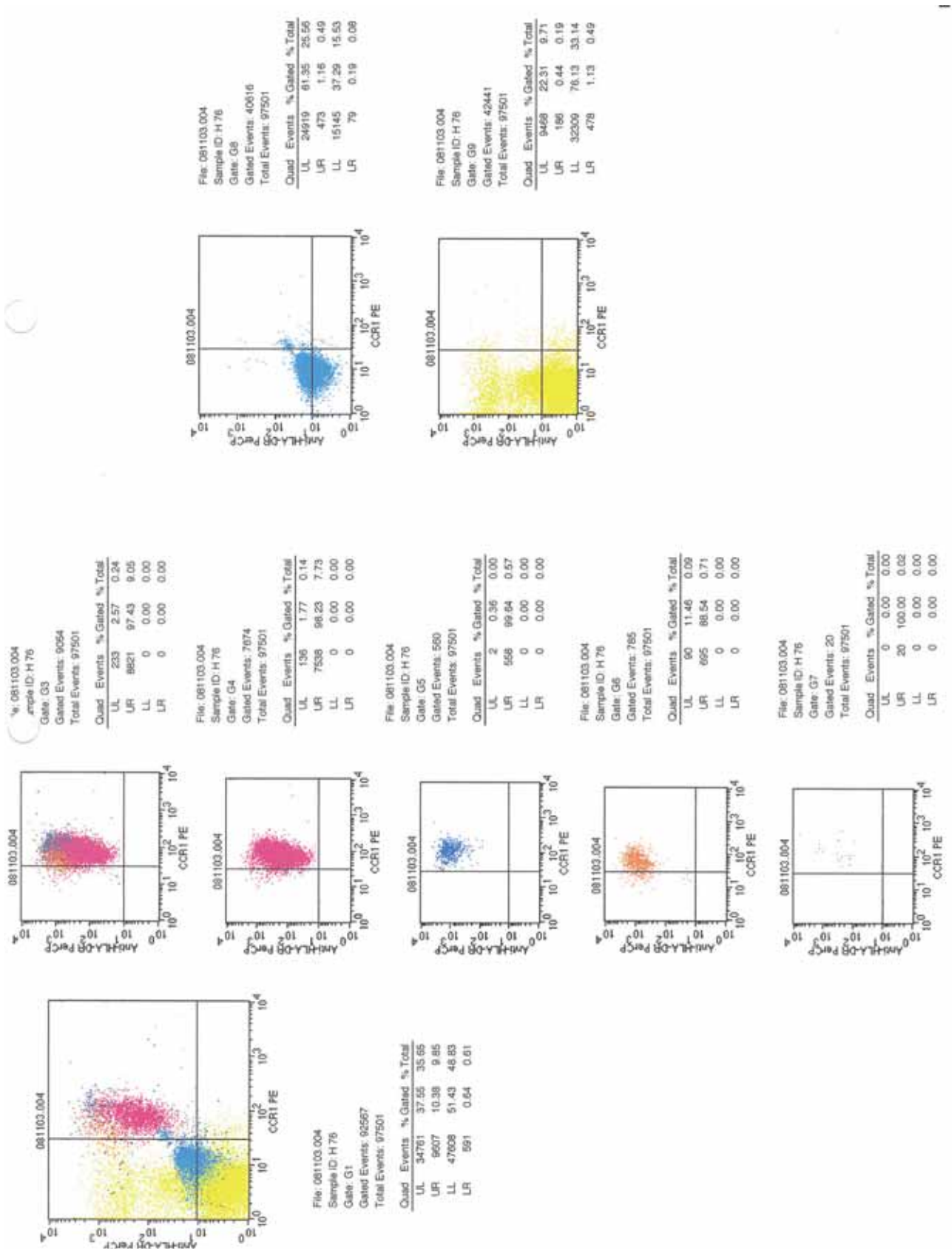
## **10. ANEXOS**

### **10. 1. Anexo I**

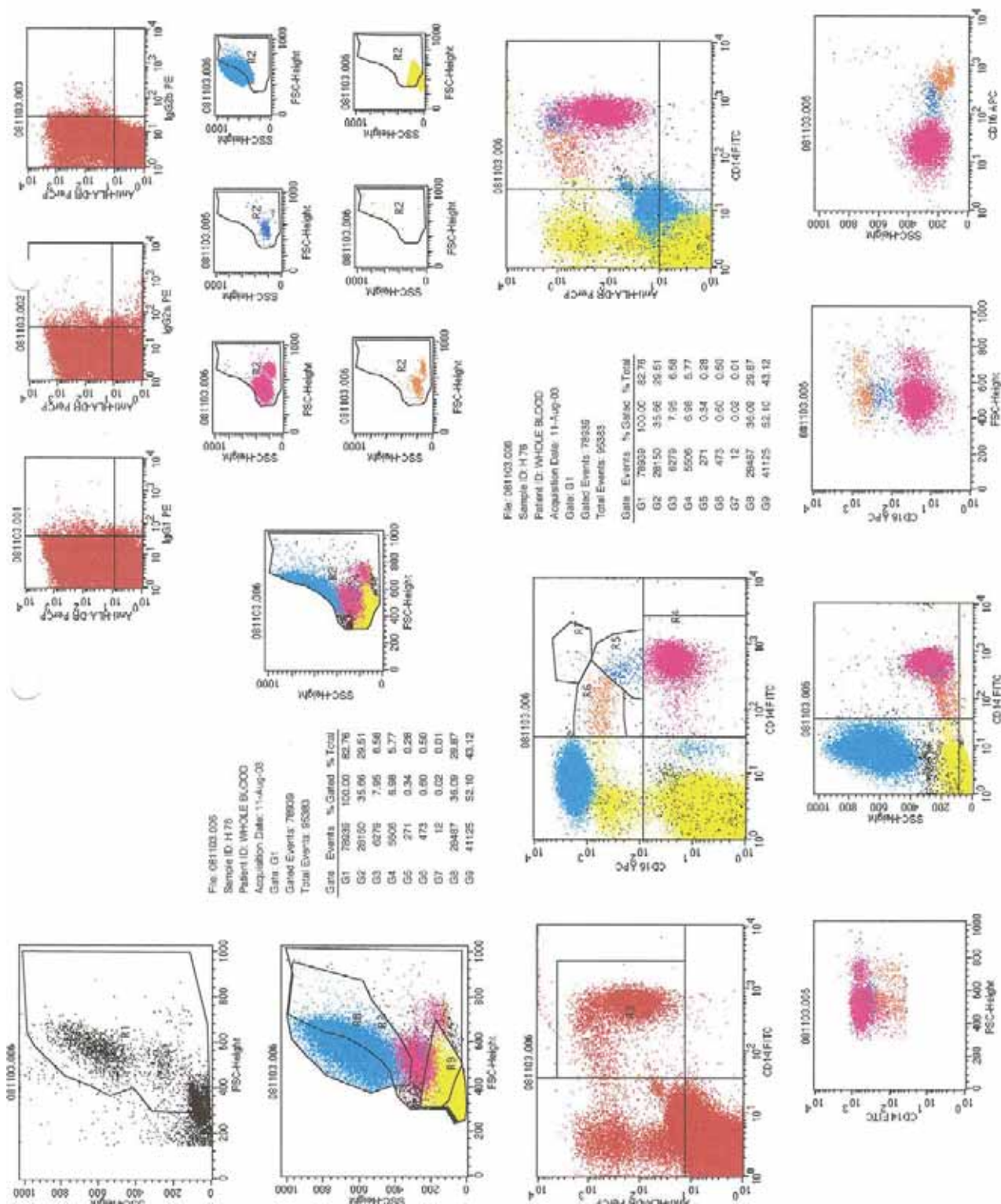
Individuo Sano: H76

- Gráficos para CCR1
- Gráficos para CCR4
- Gráficos para CXCR2
- Gráficos para CXCR4
- Gráficos para CD62-L
- Gráficos para CD64
- Gráficos para Células Dendríticas

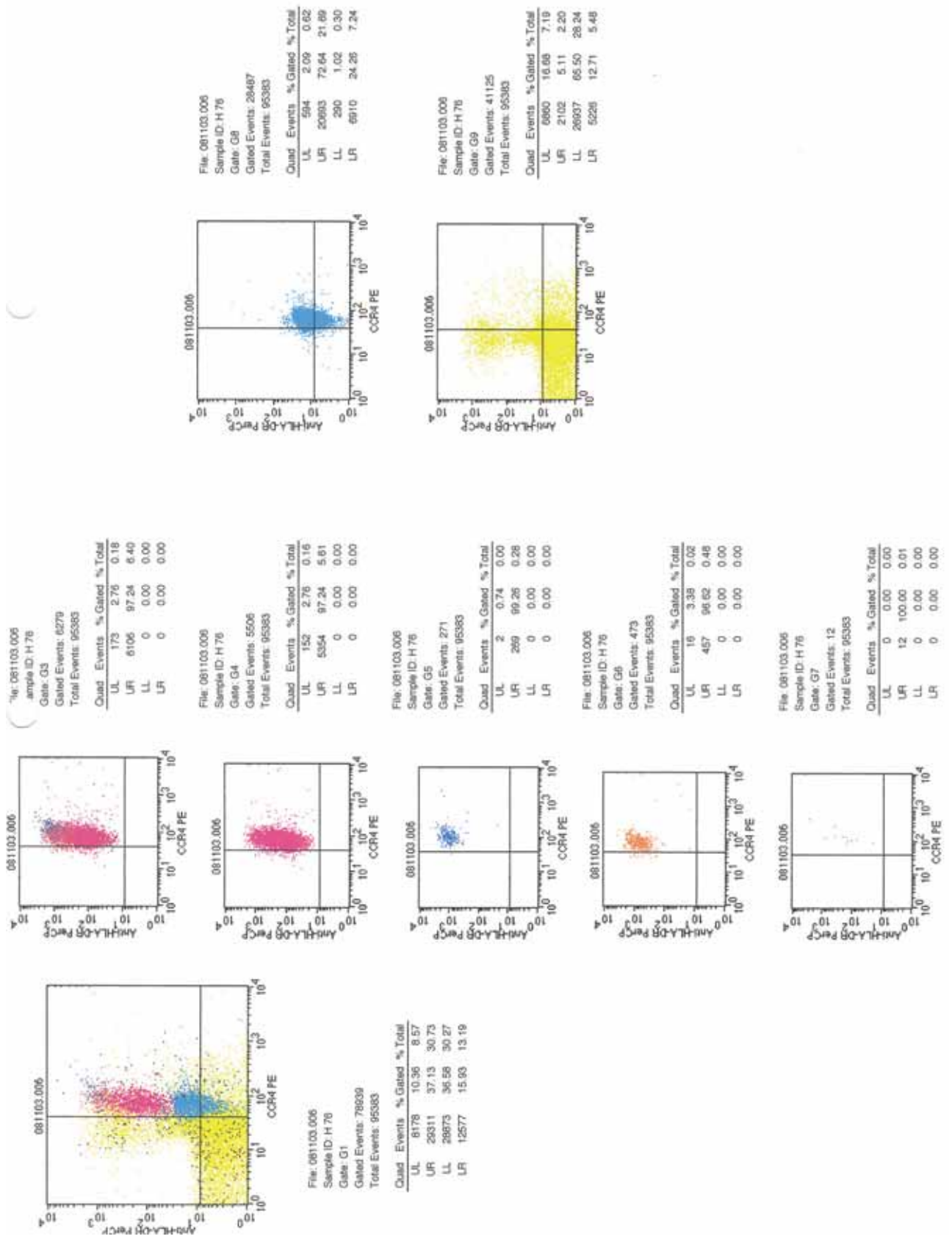




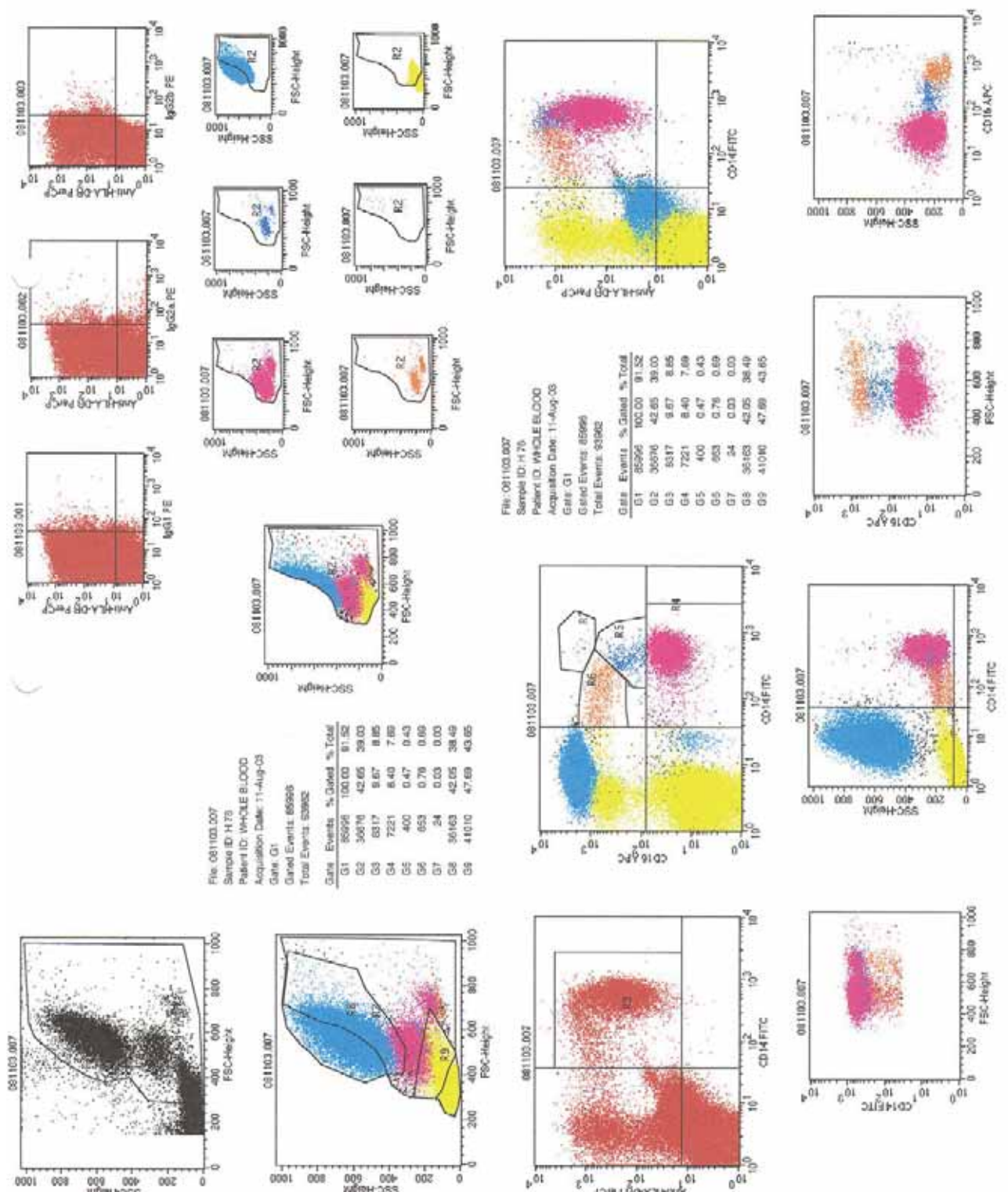
Individuo Sano: H76: CCR1: Valores de CCR1 para los diferentes subtipos celulares



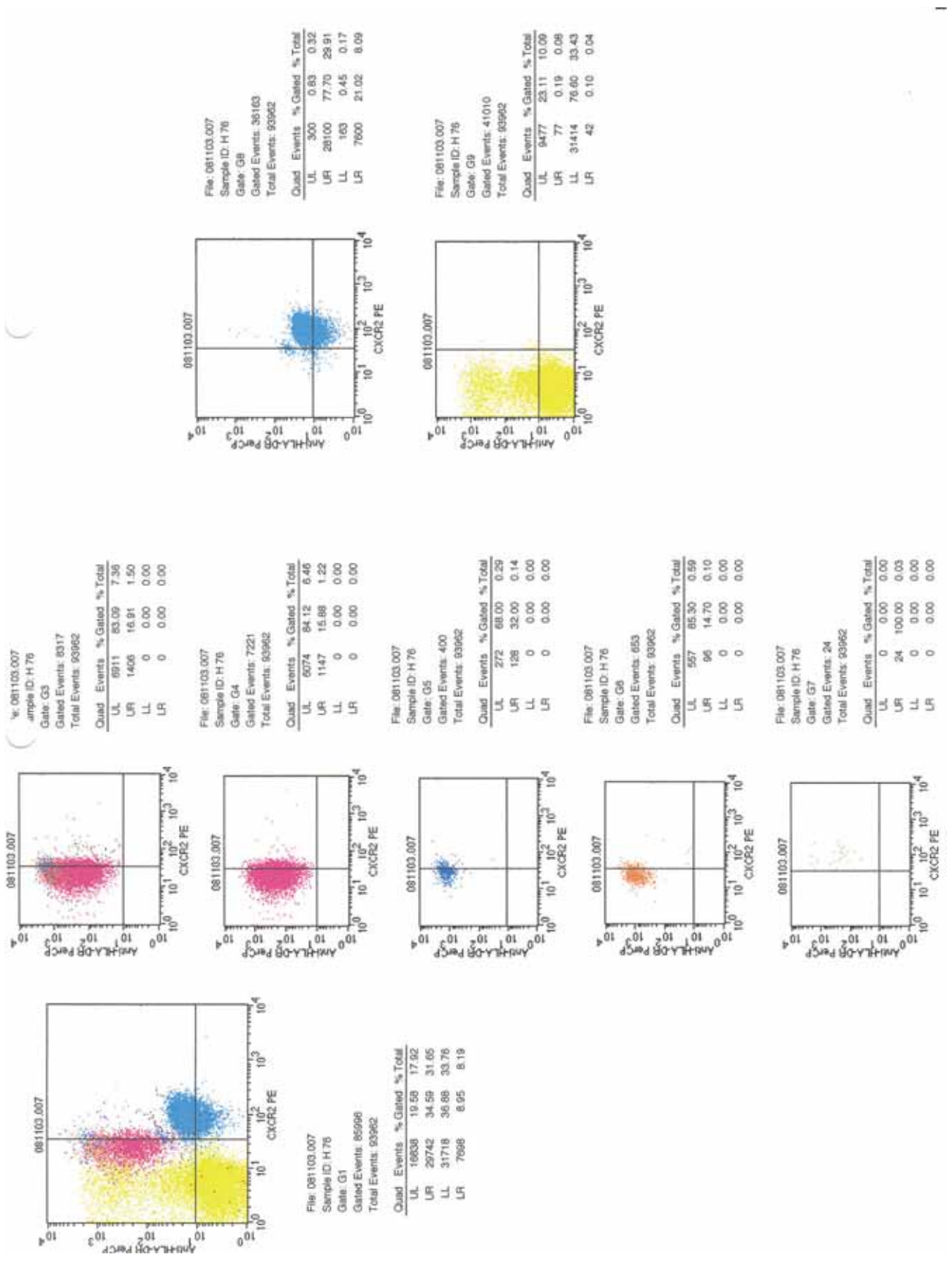
Individuo Sano: H76: CCR4: Selección de los subtipos celulares



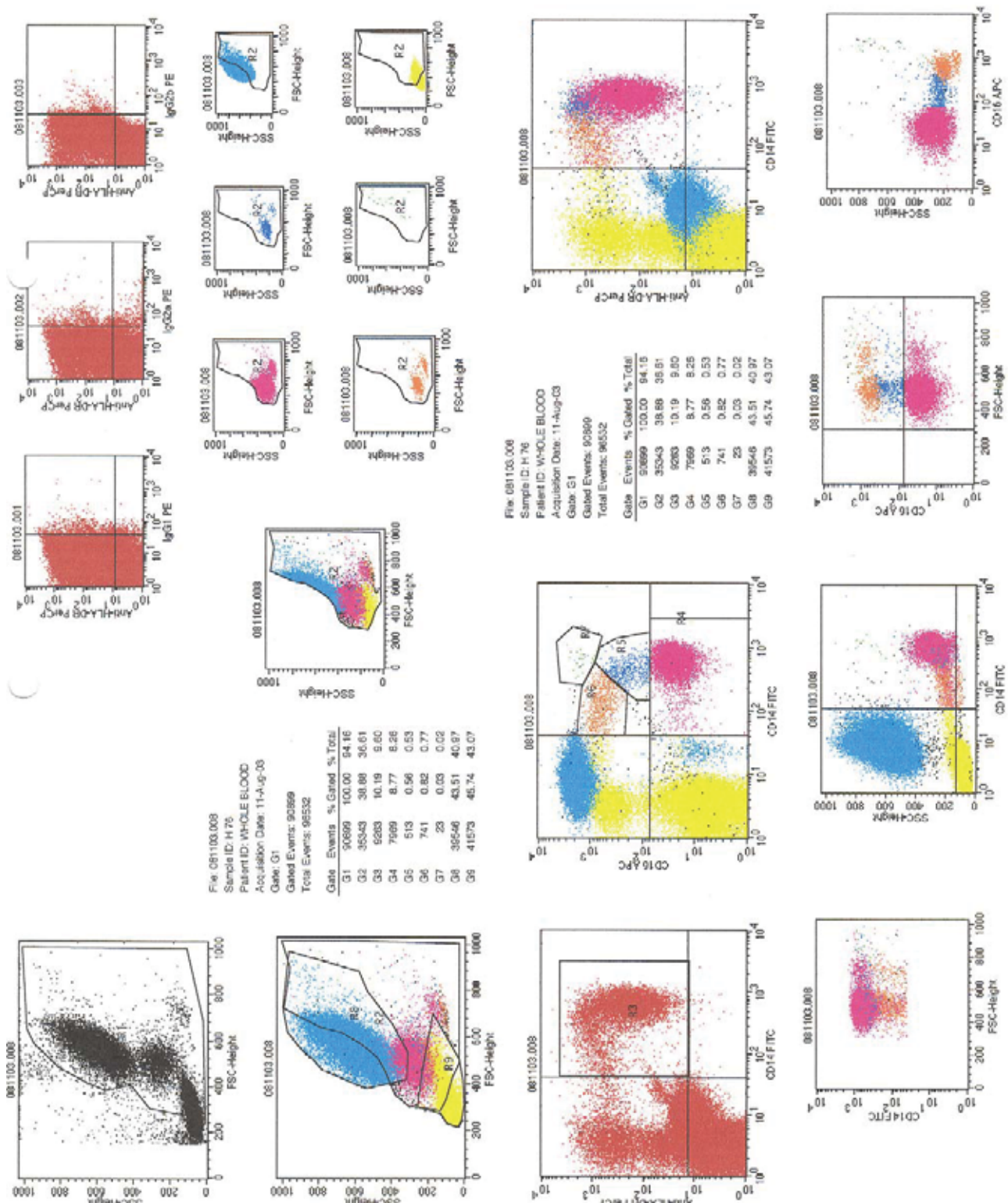
Individuo Sano: H76: CCR4: Valores de CCR4 para los diferentes subtipos celulares



Individuo Sano: H76: CXCR2: Selección de los subtipos celulares

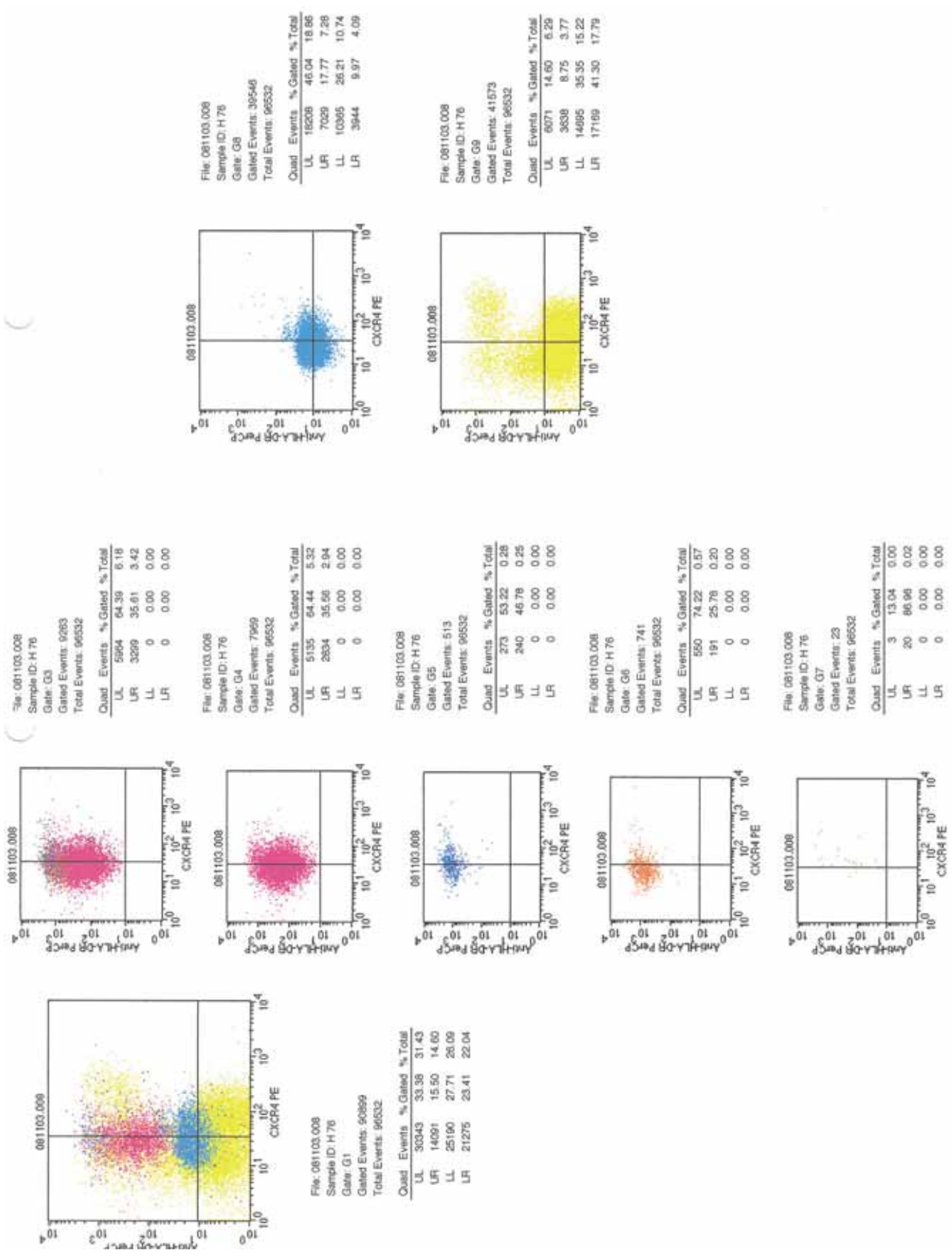


**Individuo Sano: H76: CXCR2:** Valores de CXCR2 para los diferentes subtipos celulares

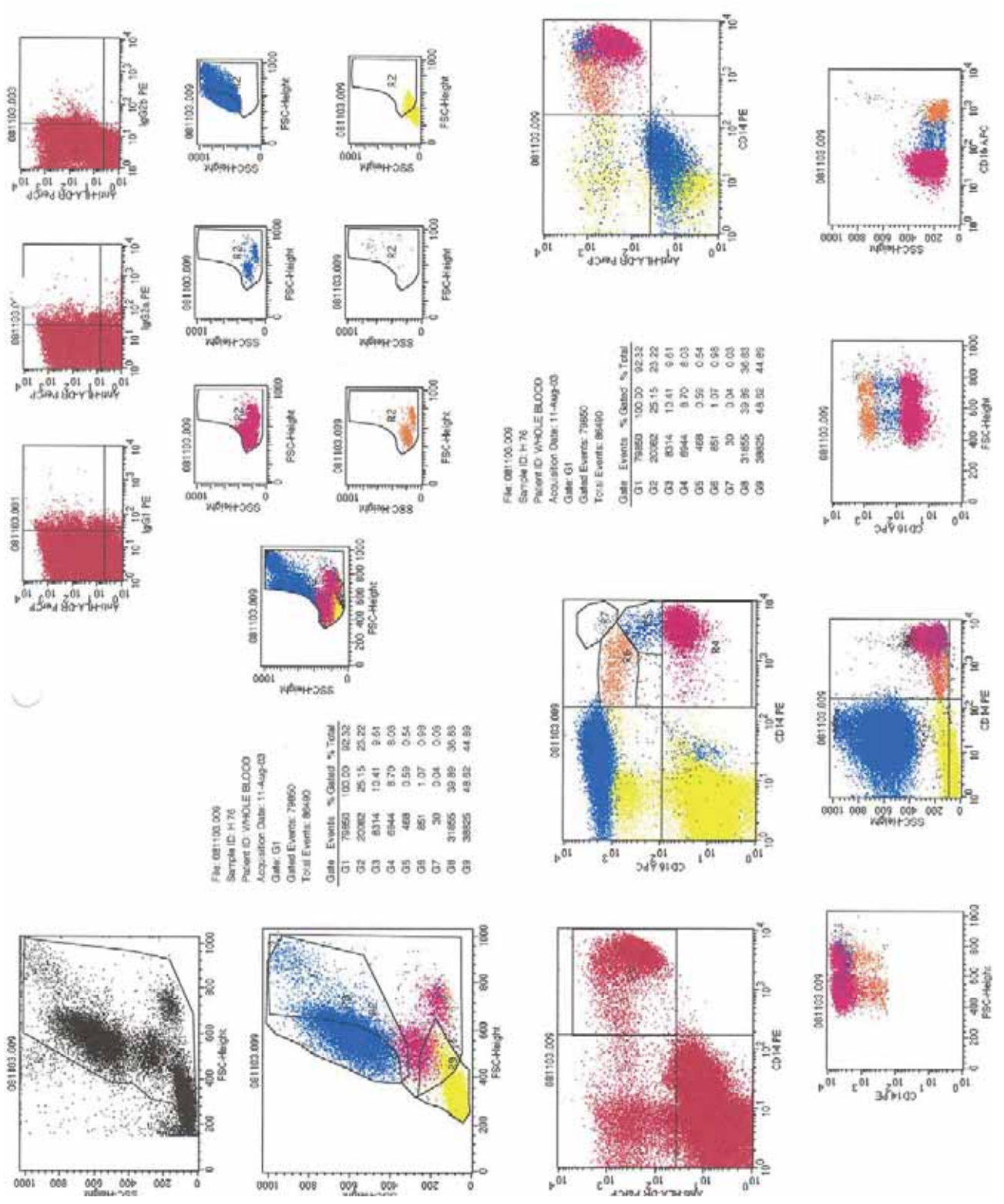


Individuo Sano: H76: CXCR4: Selección de los subtipos celulares

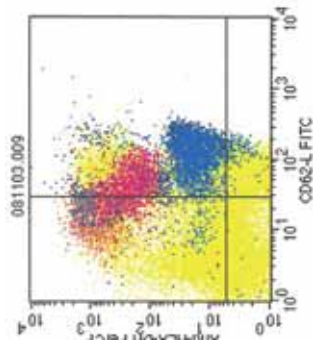




**Individuo Sano: H76: CXCR4:** Valores de CXCR4 para los diferentes subtipos celulares

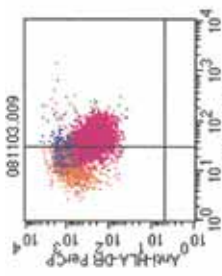


Individuo Sano: H76: CD62-L: Selección de los subtipos celulares



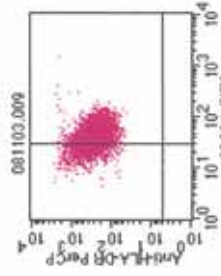
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G1  
 Gated Events: 79850  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	13993	17.40	16.06
UR	45308	56.74	52.39
LL	8255	10.34	9.54
LR	12994	15.52	14.53



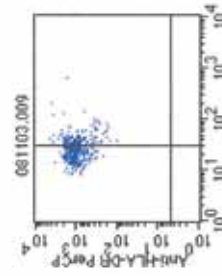
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G3  
 Gated Events: 6314  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2725	32.78	3.15
UR	5569	67.22	6.46
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



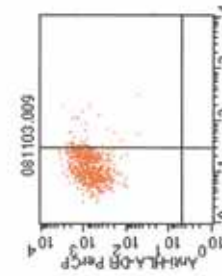
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G4  
 Gated Events: 8944  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1586	22.84	1.83
UR	5358	77.16	6.19
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



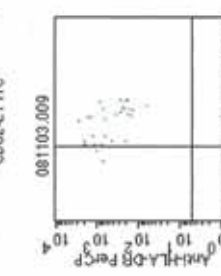
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G5  
 Gated Events: 468  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	307	65.60	0.35
UR	161	34.40	0.19
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



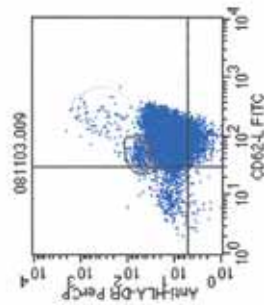
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G6  
 Gated Events: 851  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	812	95.42	0.94
UR	39	4.58	0.05
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



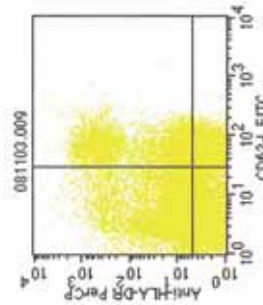
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G7  
 Gated Events: 30  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3	10.00	0.00
UR	27	90.00	0.03
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G8  
 Gated Events: 31855  
 Total Events: 86490

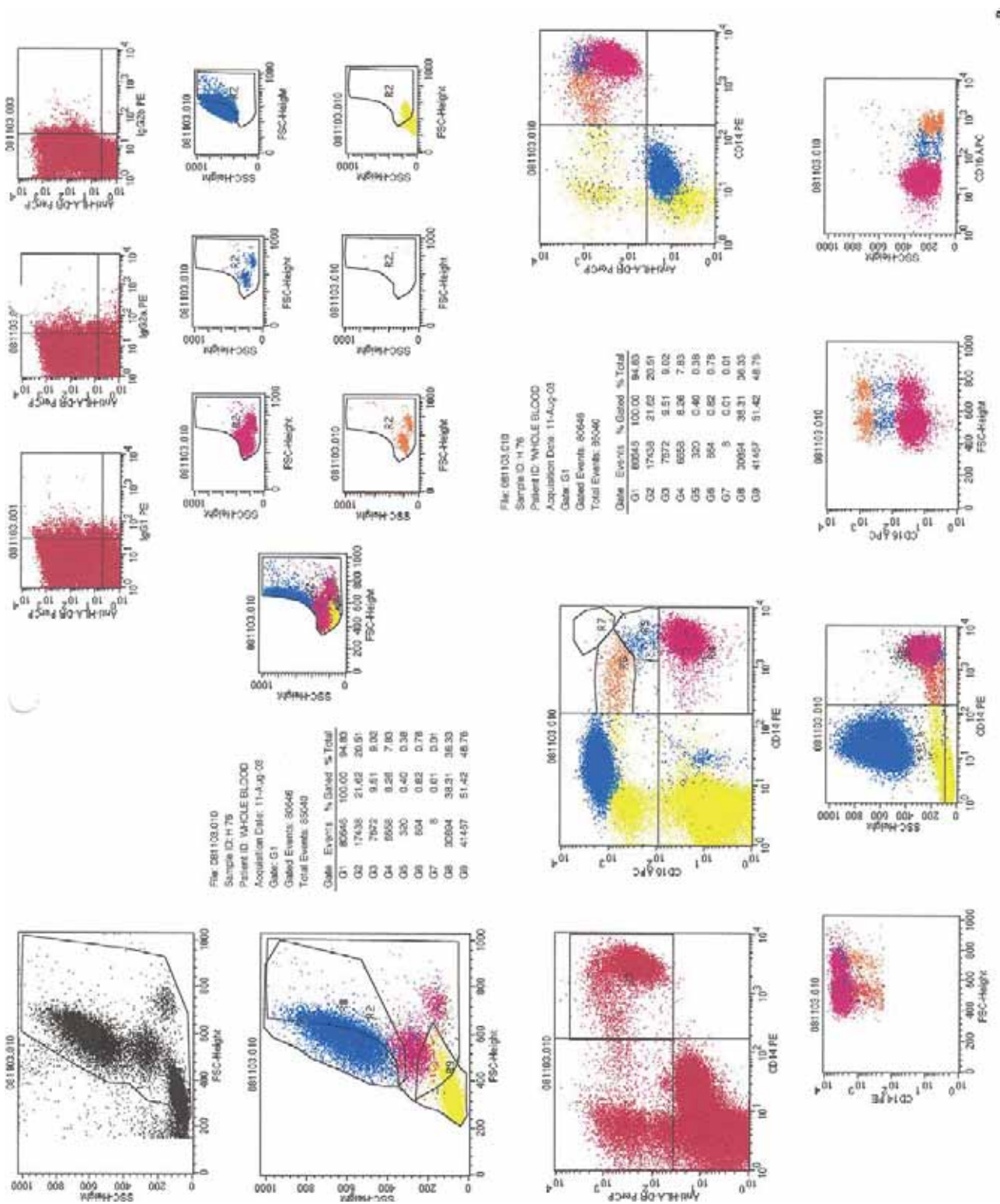
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	440	1.38	0.51
UR	30028	94.26	34.72
LL	37	0.12	0.04
LR	1350	4.24	1.56



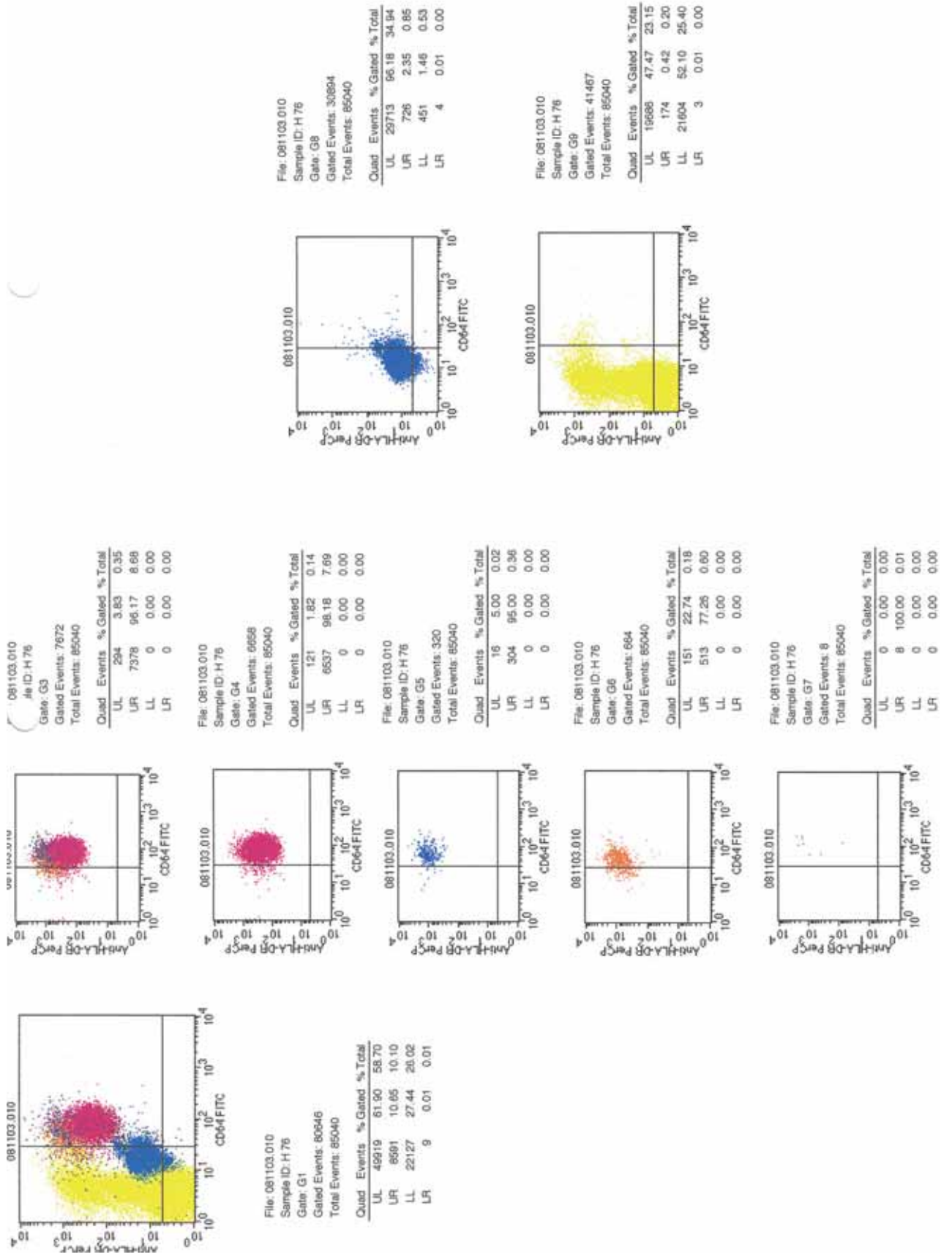
File: 081103.009  
 Sample ID: H 76  
 Gate: G9  
 Gated Events: 36825  
 Total Events: 86490

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	10507	27.06	12.15
UR	9155	23.58	10.59
LL	8173	21.05	9.45
LR	10990	28.31	12.71

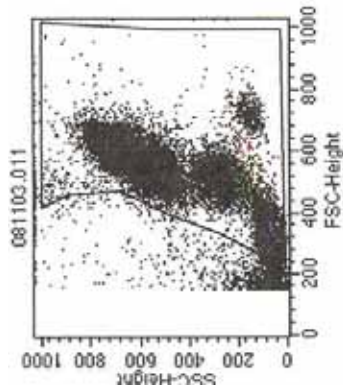
**Individuo Sano: H76: CD62-L:** Valores de CD62-L para los diferentes subtipos celulares



Individuo Sano: H76: CD64: Selección de los subtipos celulares

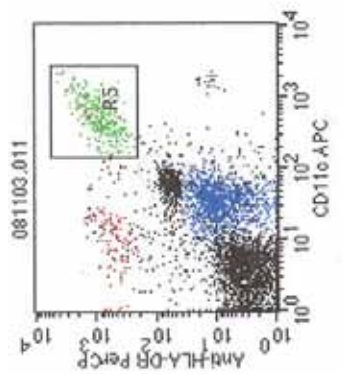
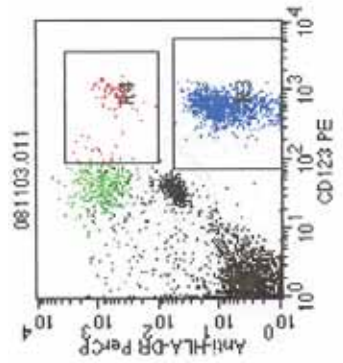
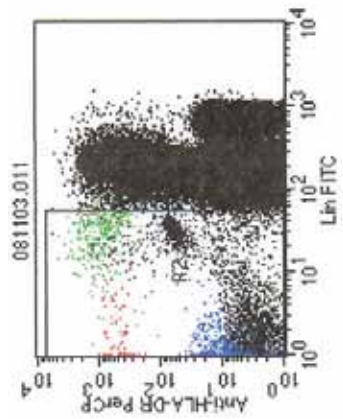


**Individuo Sano: H76: CD64:** Valores de CD64 para los diferentes subtipos celulares



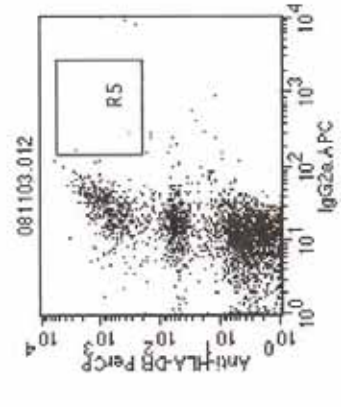
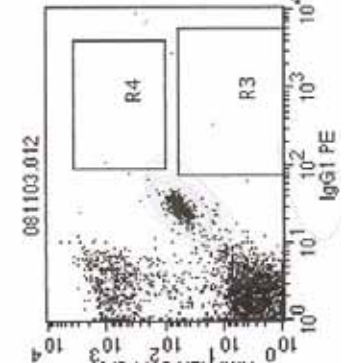
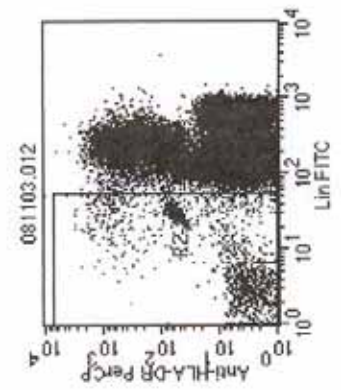
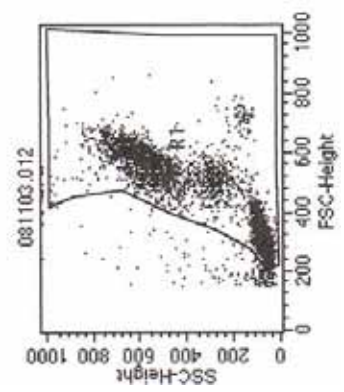
File: 081103.011  
 Sample ID: H 76  
 Acquisition Date: 11-Aug-03  
 Gate: PBMC  
 Gated Events: 84363  
 Total Events: 89003

Gate	Events	% Gated	% Total
PBMC	84363	100.00	94.79
FITC DIM	4525	5.36	5.08
Basophils	1129	1.34	1.27
CD123+ DCs	98	0.12	0.11
CD11c+ DCs	323	0.38	0.36



File: 081103.011  
 Sample ID: H 76  
 Acquisition Date: 11-Aug-03  
 Gate: FITC DIM  
 Gated Events: 4525  
 Total Events: 89003

Gate	Events	% Gated	% Total
PBMC	4525	100.00	5.08
FITC DIM	4525	100.00	5.08
Basophils	1129	24.95	1.27
CD123+ DCs	98	2.17	0.11
CD11c+ DCs	323	7.14	0.36

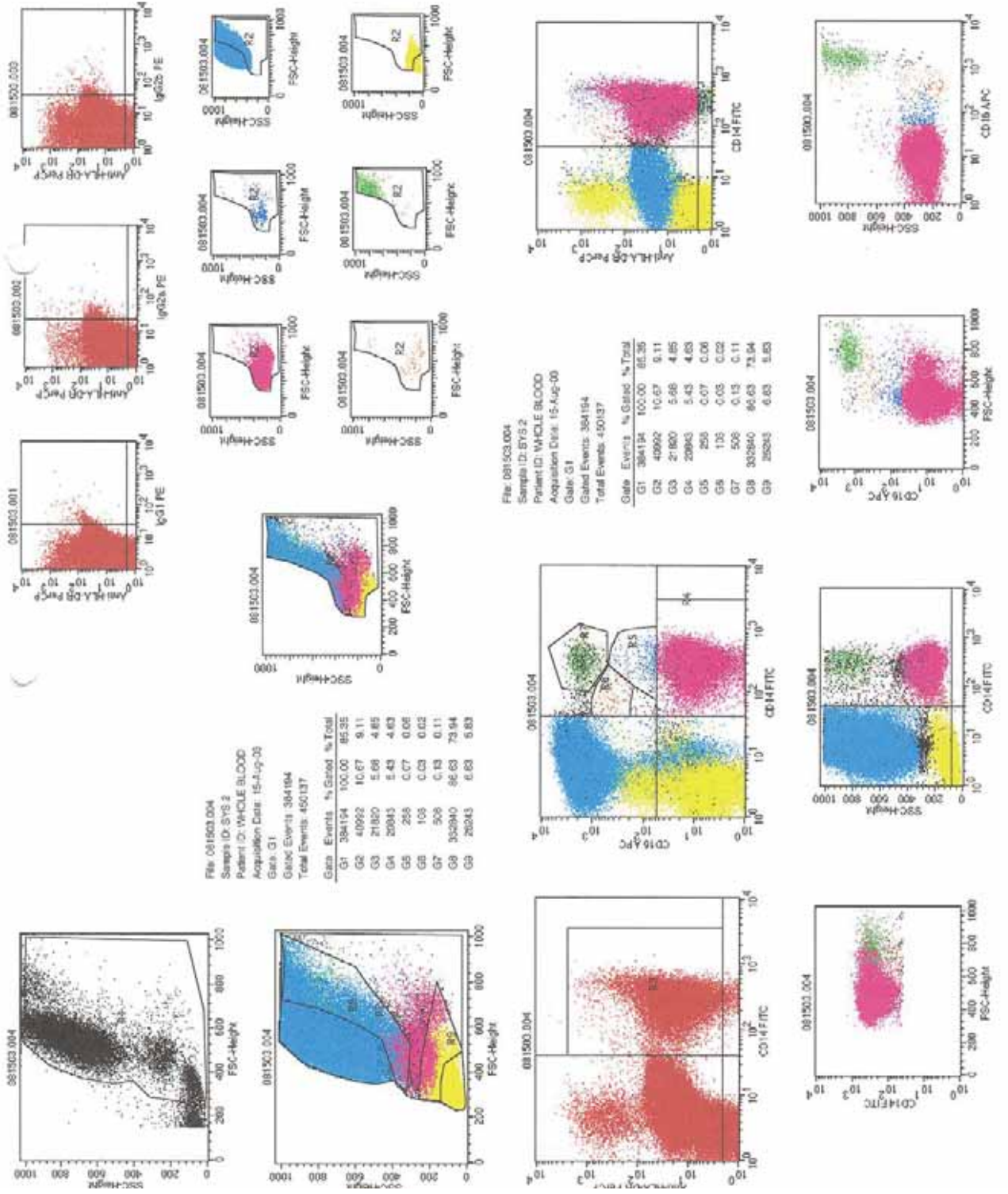


**Individuo Sano: H76:** Selección de poblaciones de células dendríticas

## 10. 2. Anexo II

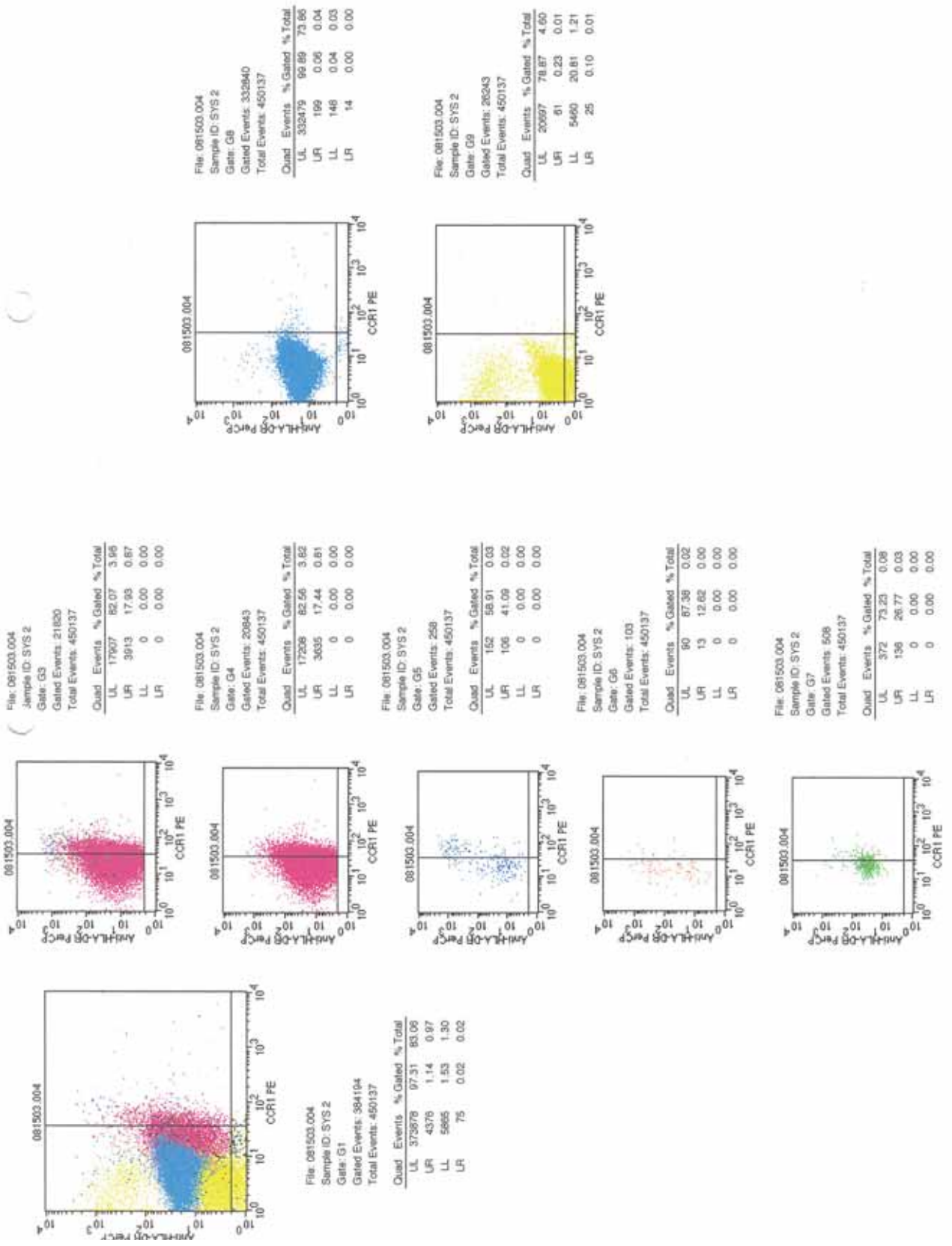
Paciente con AIJiS: SYS2

- Gráficos para CCR1
- Gráficos para CCR2
- Gráficos para CCR4
- Gráficos para CCR5
- Gráficos para CXCR1
- Gráficos para CXCR2
- Gráficos para CXCR4
- Gráficos para CD40
- Gráficos para CD62-L
- Gráficos para CD64
- Gráficos para Células Dendríticas

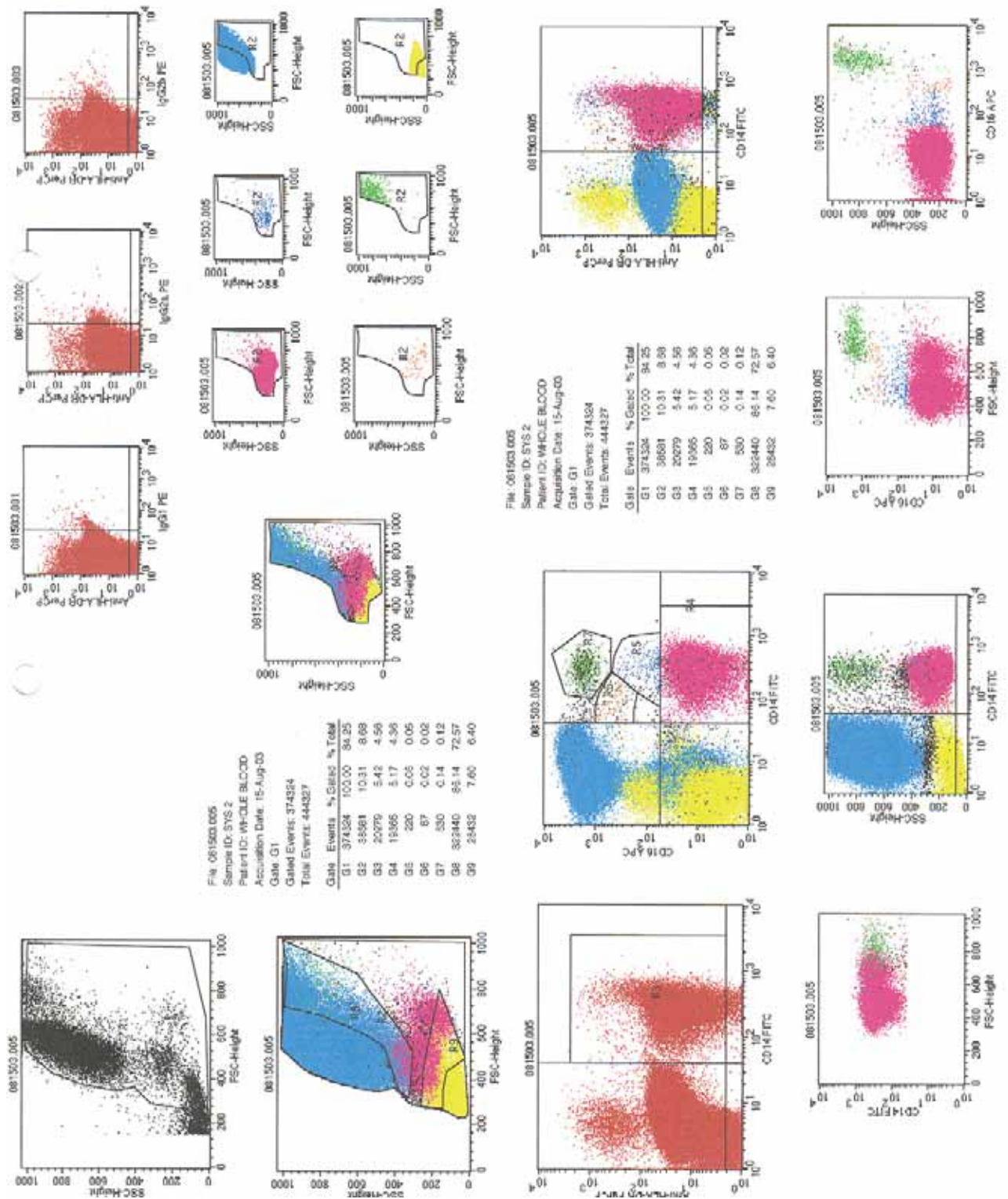


Paciente SYS 2: CCR1: Selección de los subtipos celulares

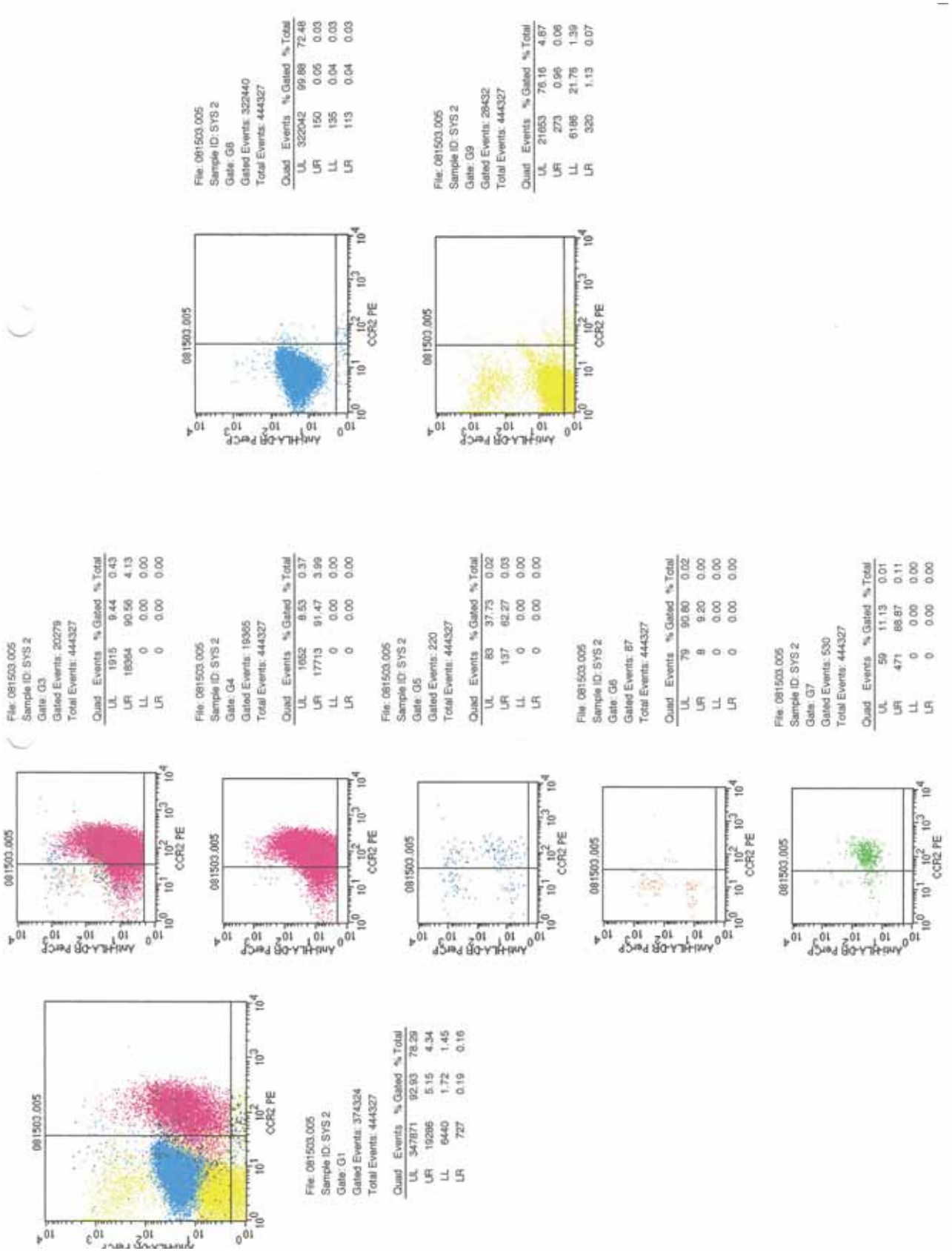




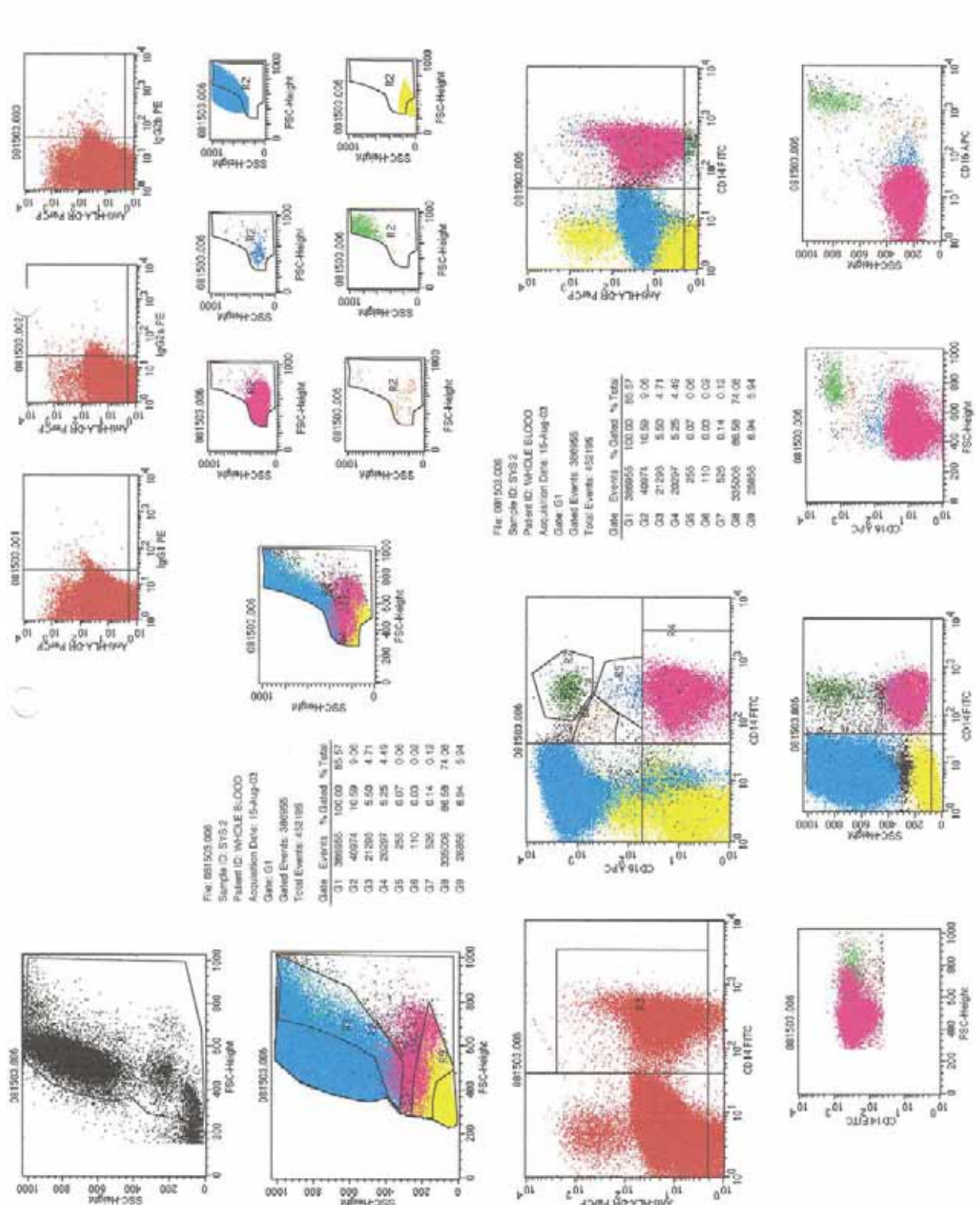
**Paciente SYS 2: CCR1:** Valores de CCR1 para los diferentes subtipos celulares



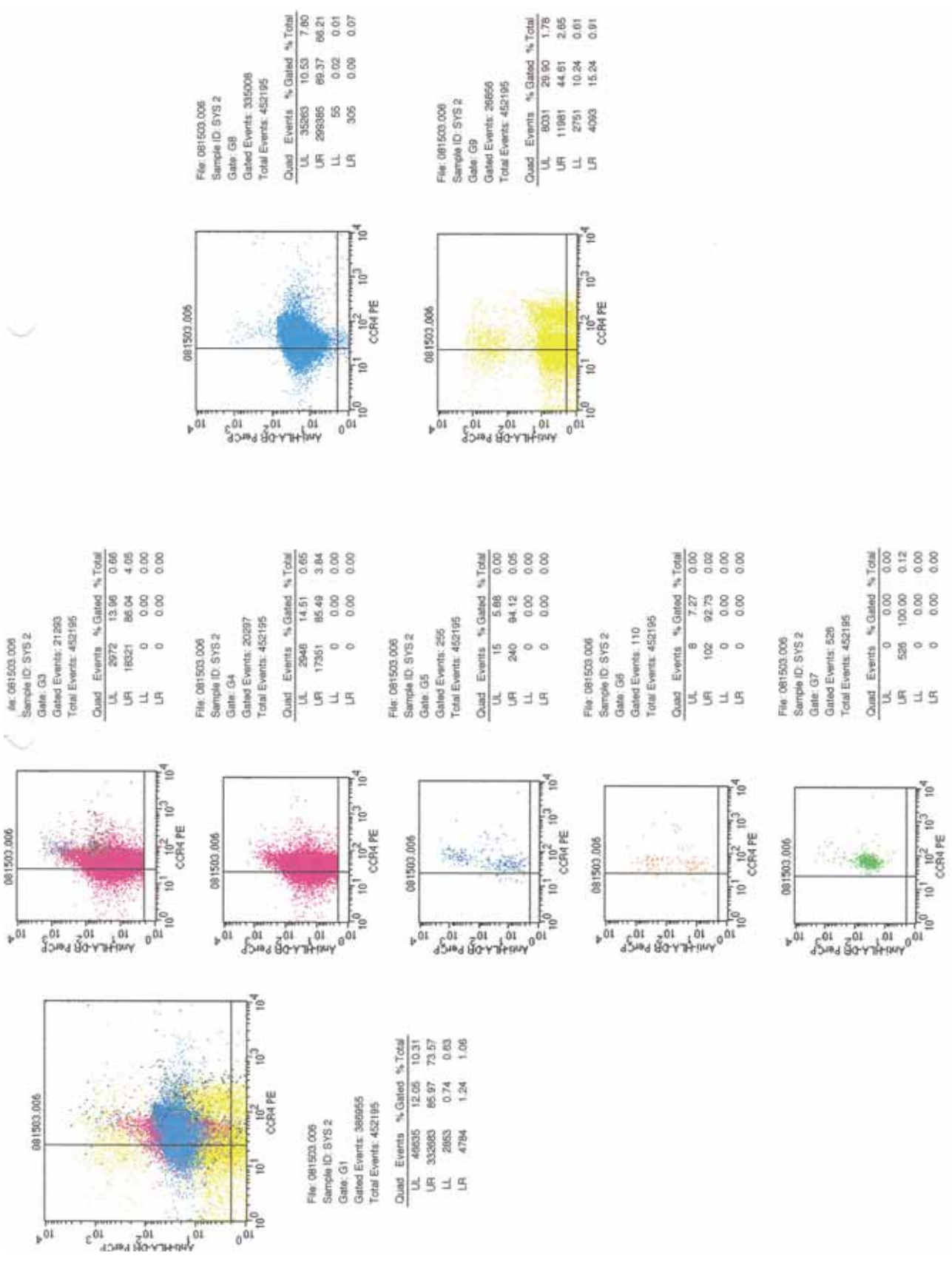
Paciente SYS 2: CCR2: Selección de los subtipos celulares



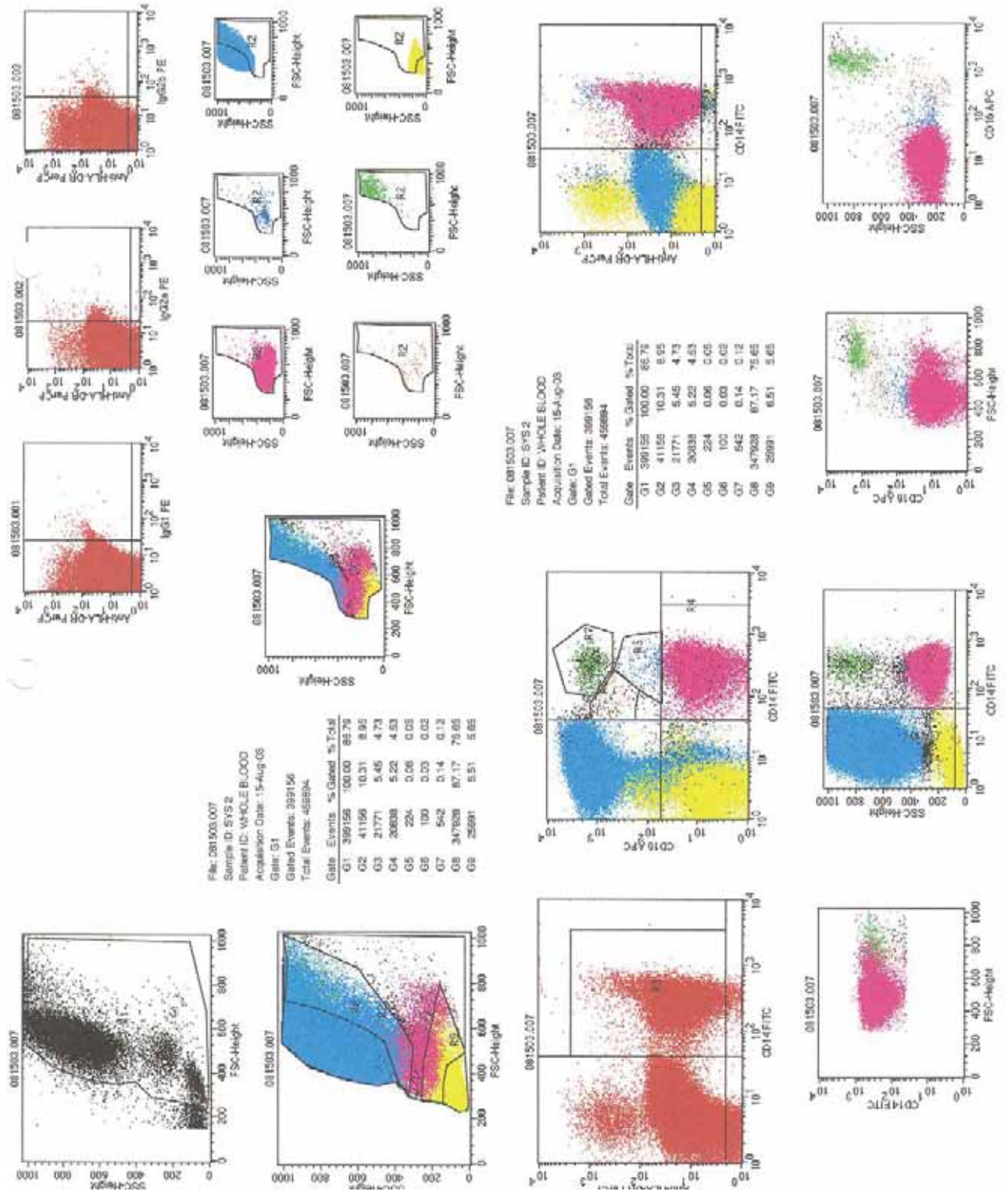
**Paciente SYS 2: CCR2: Valores de CCR2 para los diferentes subtipos celulares**



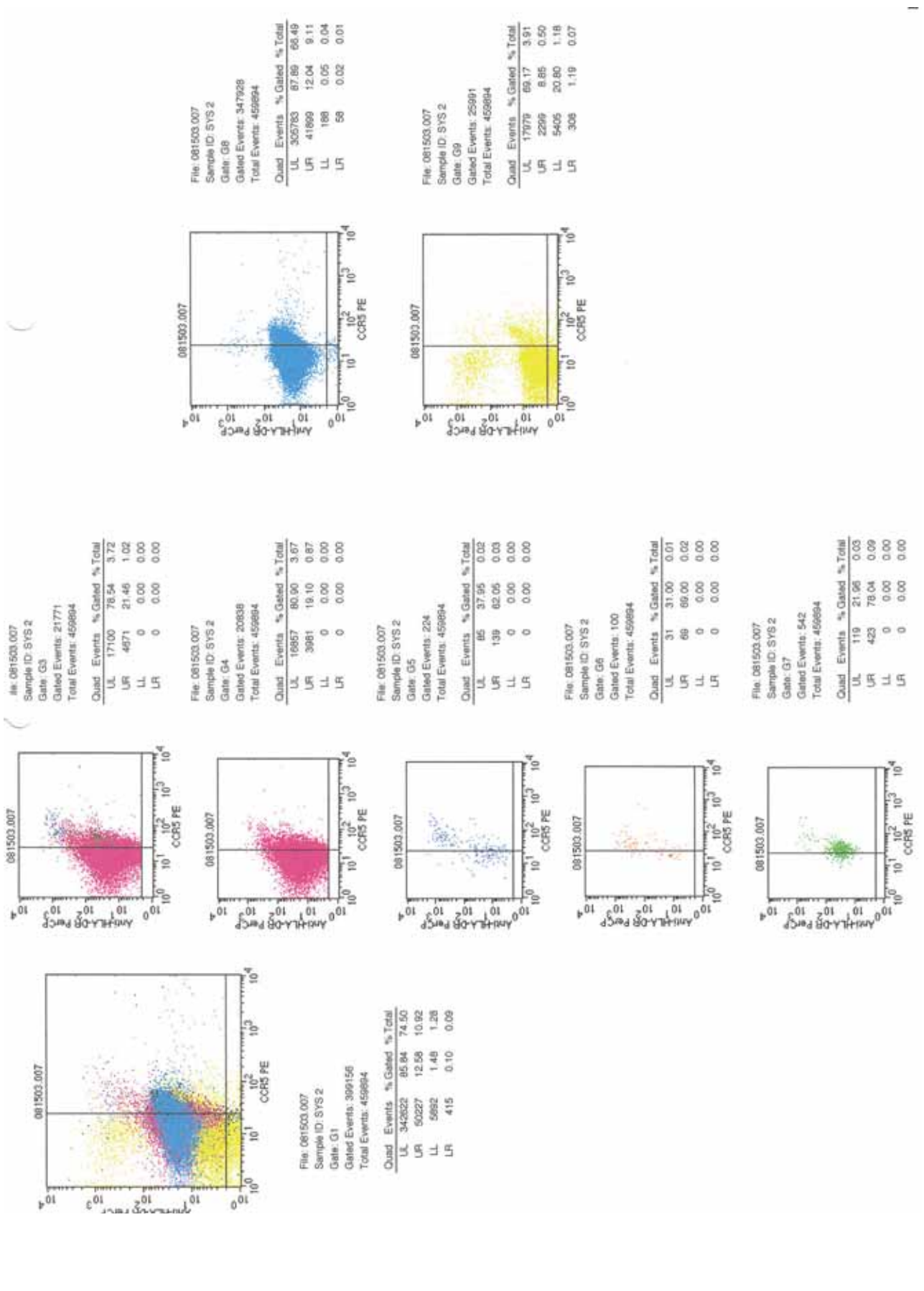
Paciente SYS 2: CCR4: Selección de los subtipos celulares



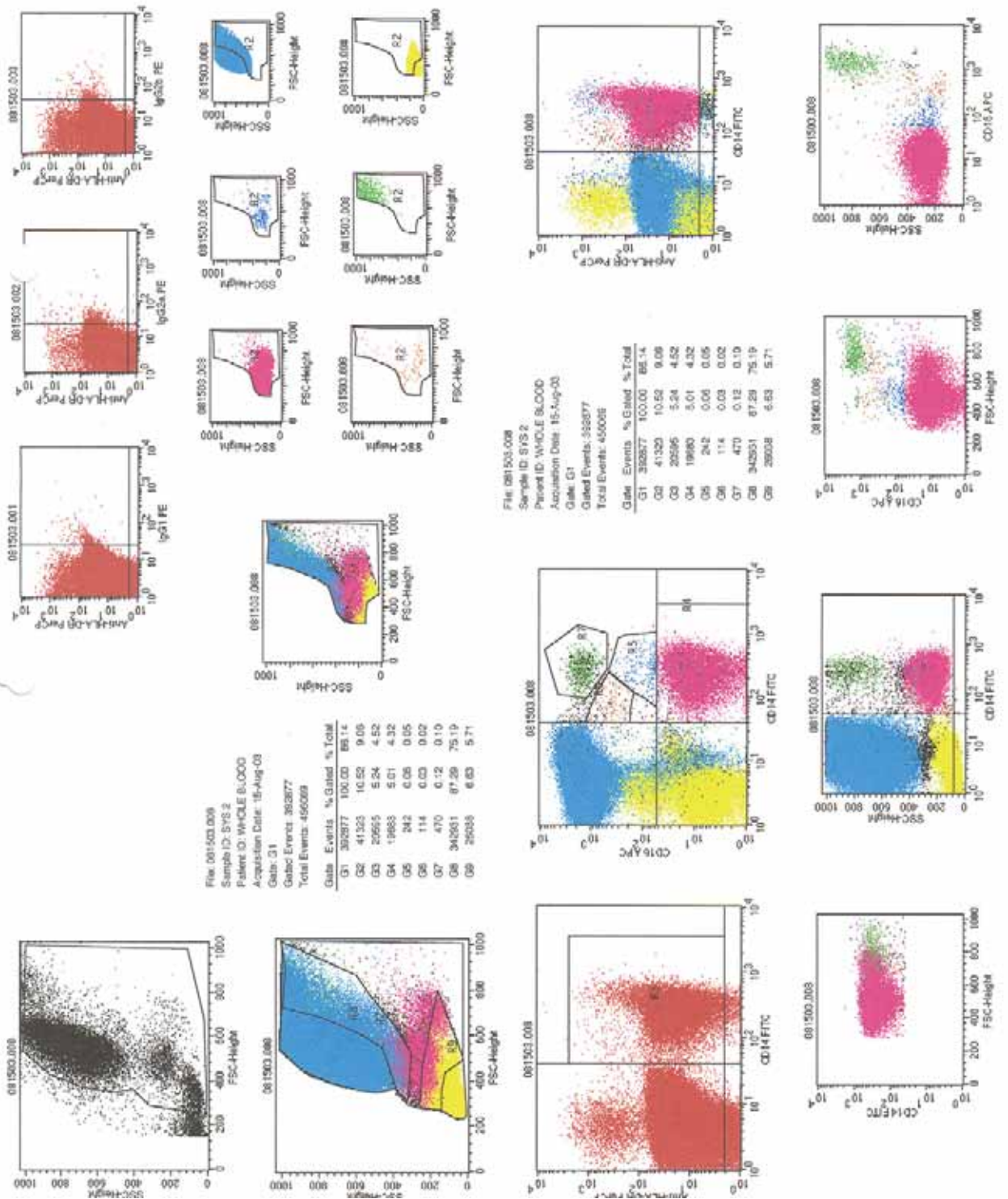
Paciente SYS 2: CCR4: Valores de CCR4 para los diferentes subtipos celulares



Paciente SYS 2: CCR5: Selección de los subtipos celulares

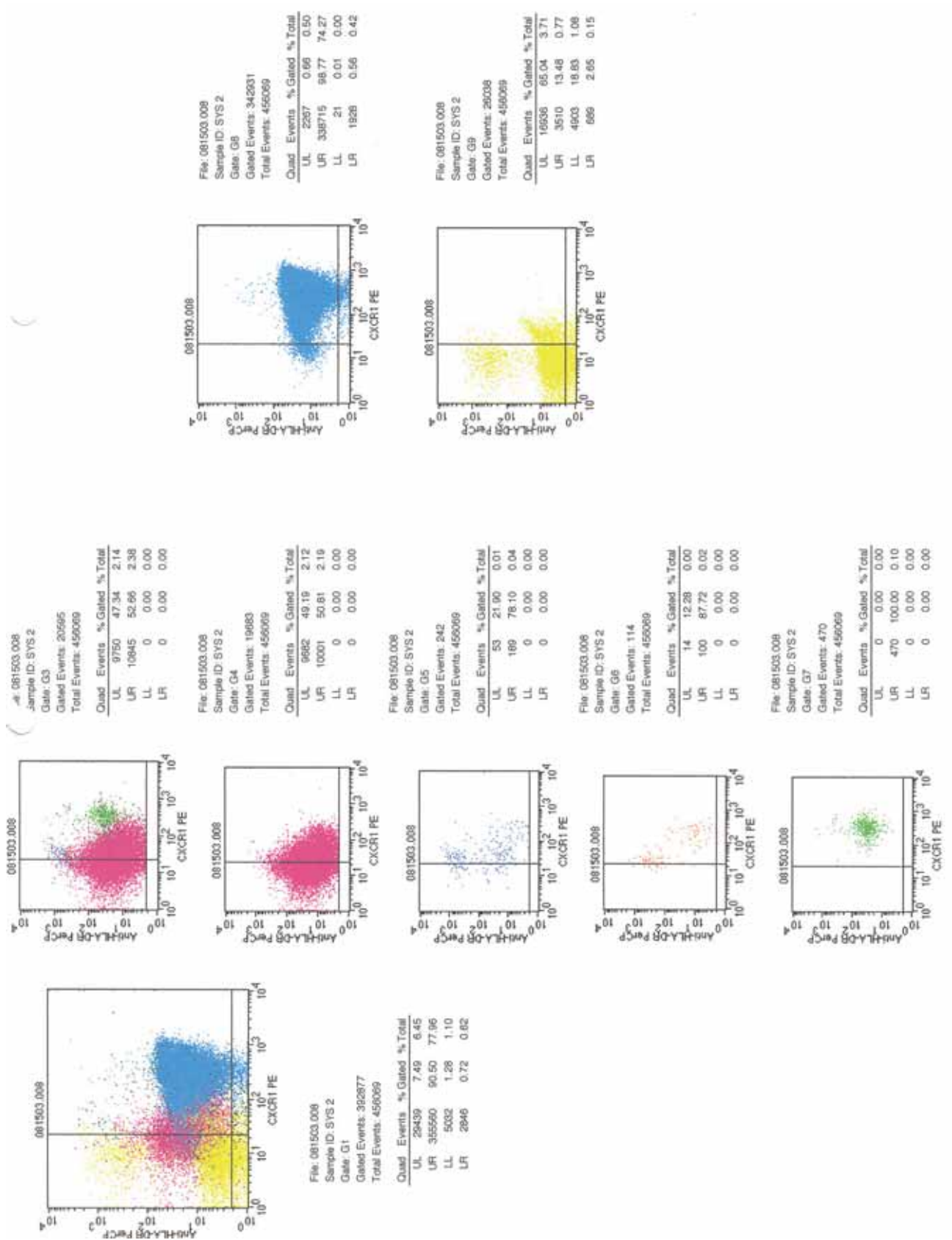


Paciente SYS 2: CCR5: Valores de CCR5 para los diferentes subtipos celulares

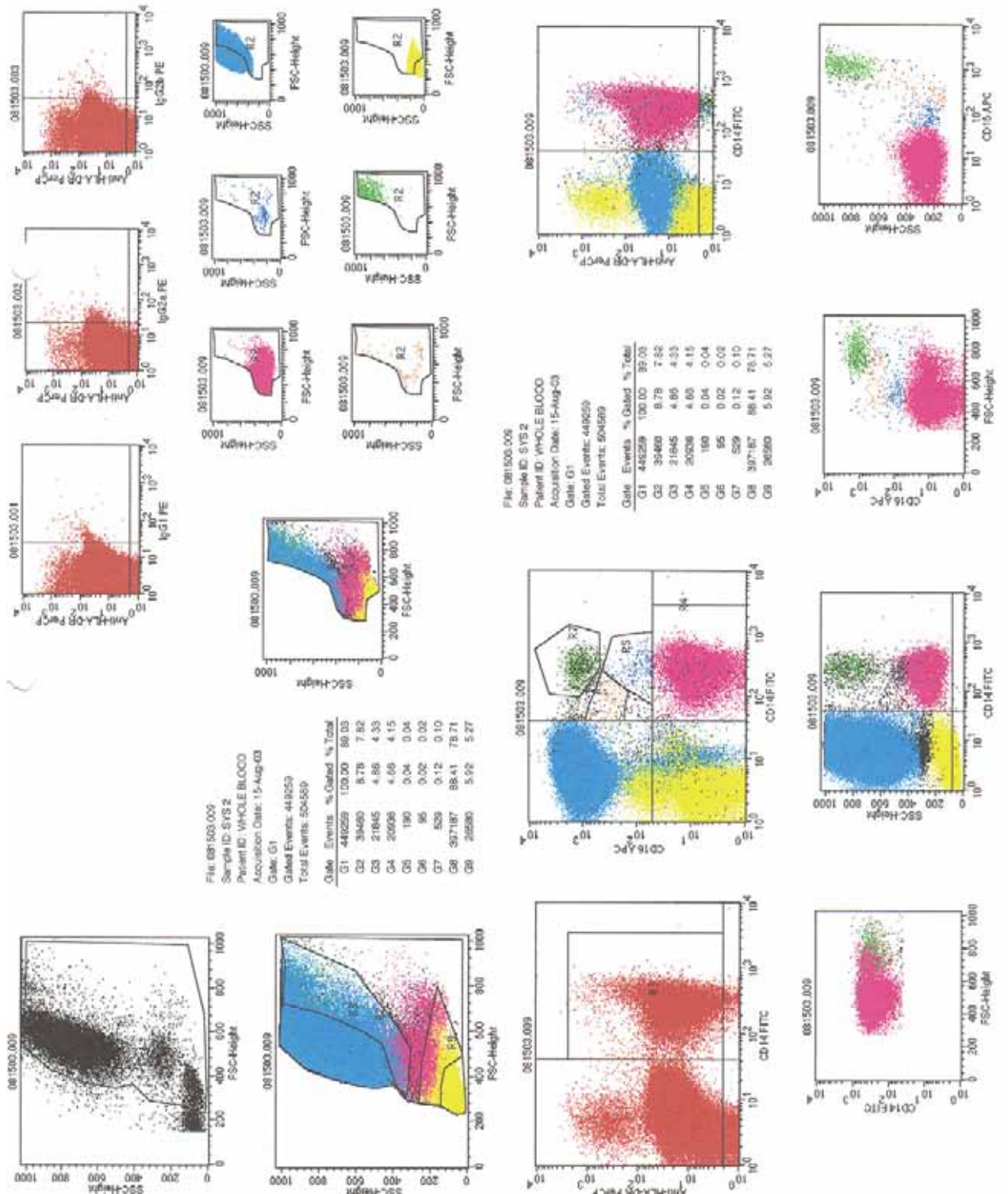


Paciente SYS 2: CXCR1: Selección de los subtipos celulares

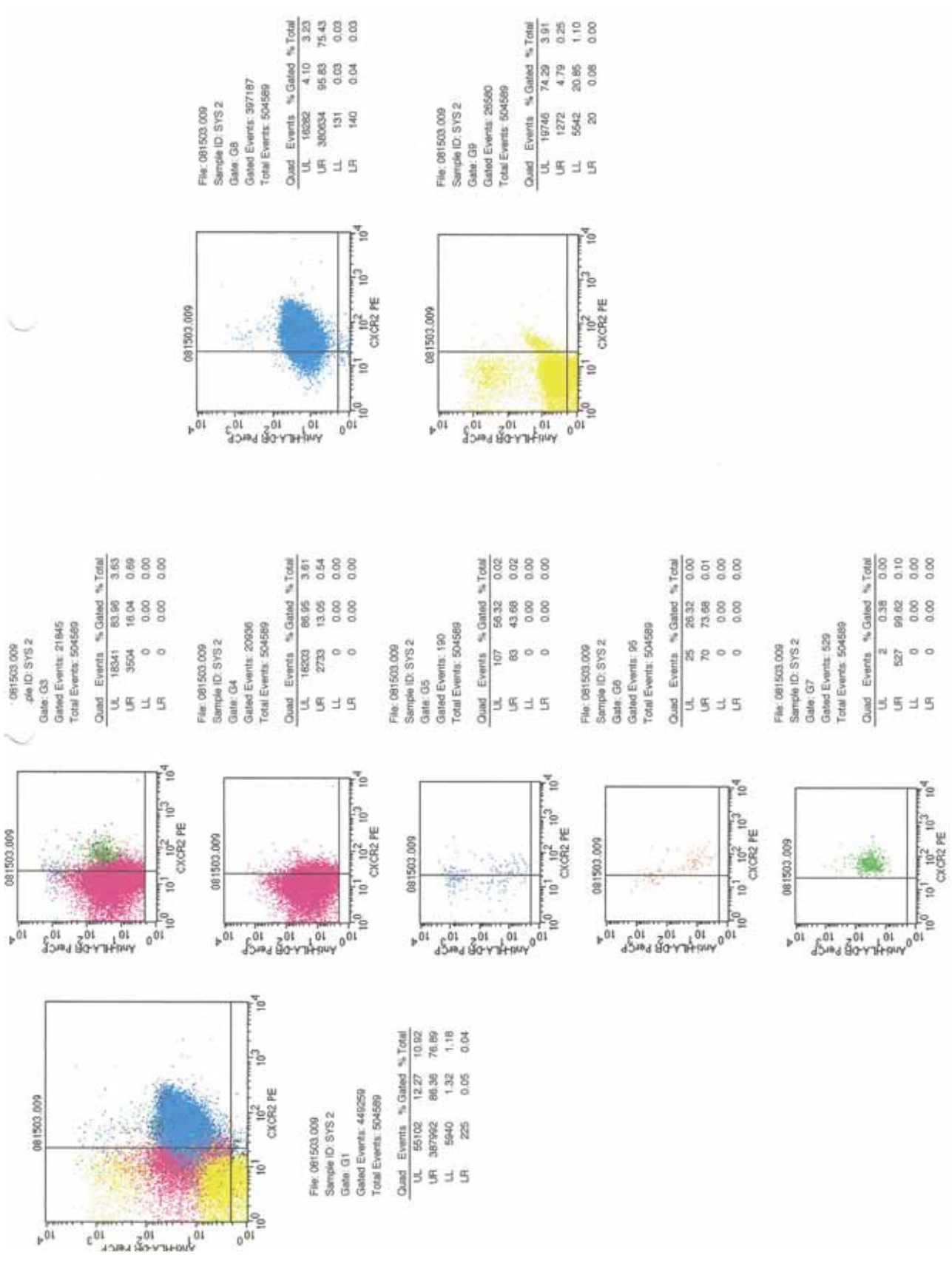




**Paciente SYS 2: CXCR1:** Valores de CXCR1 para los diferentes subtipos celulares

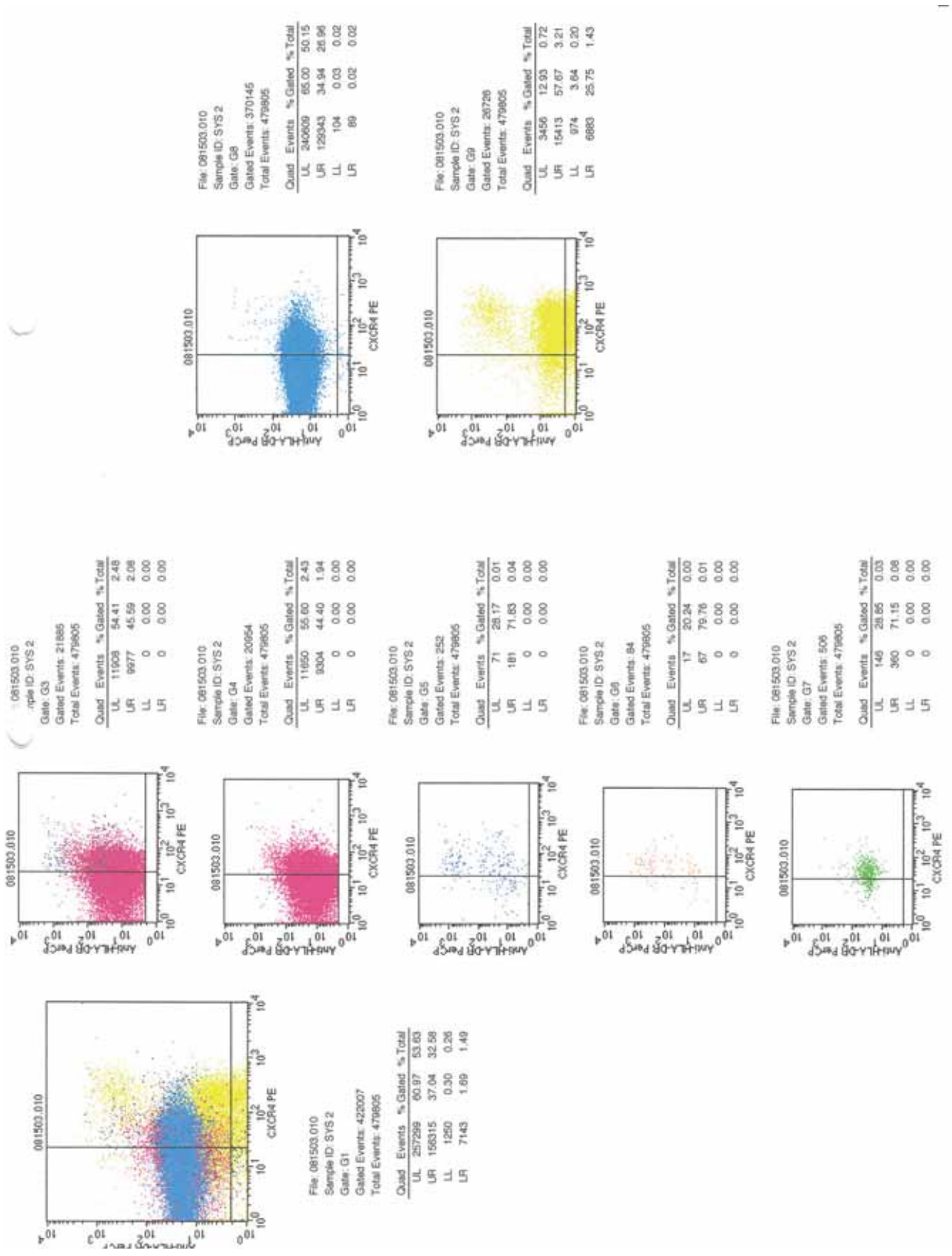


Paciente SYS 2: CXCR2: Selección de los subtipos celulares

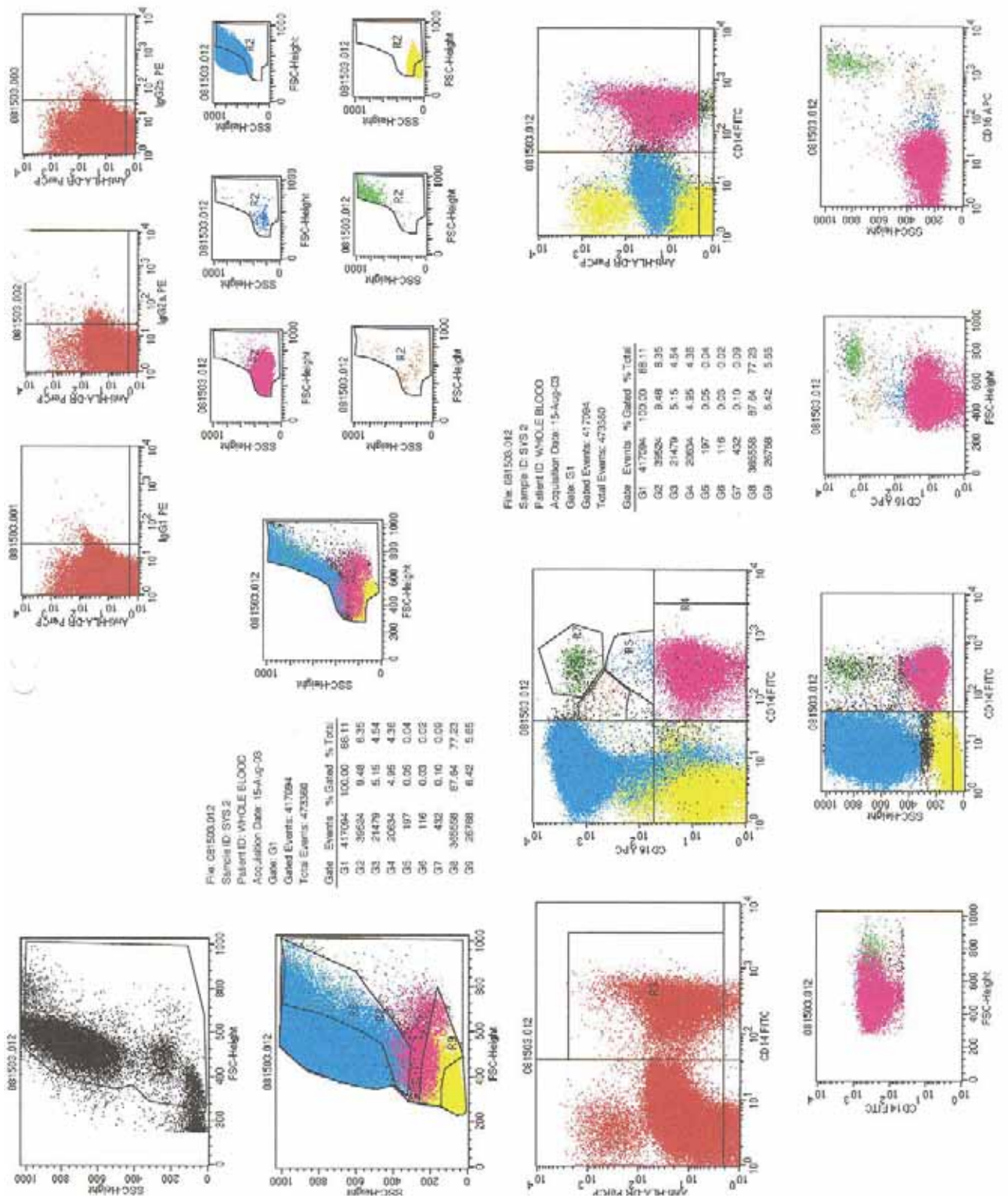


Paciente SYS 2: CXCR2: Valores de CXCR2 para los diferentes subtipos celulares

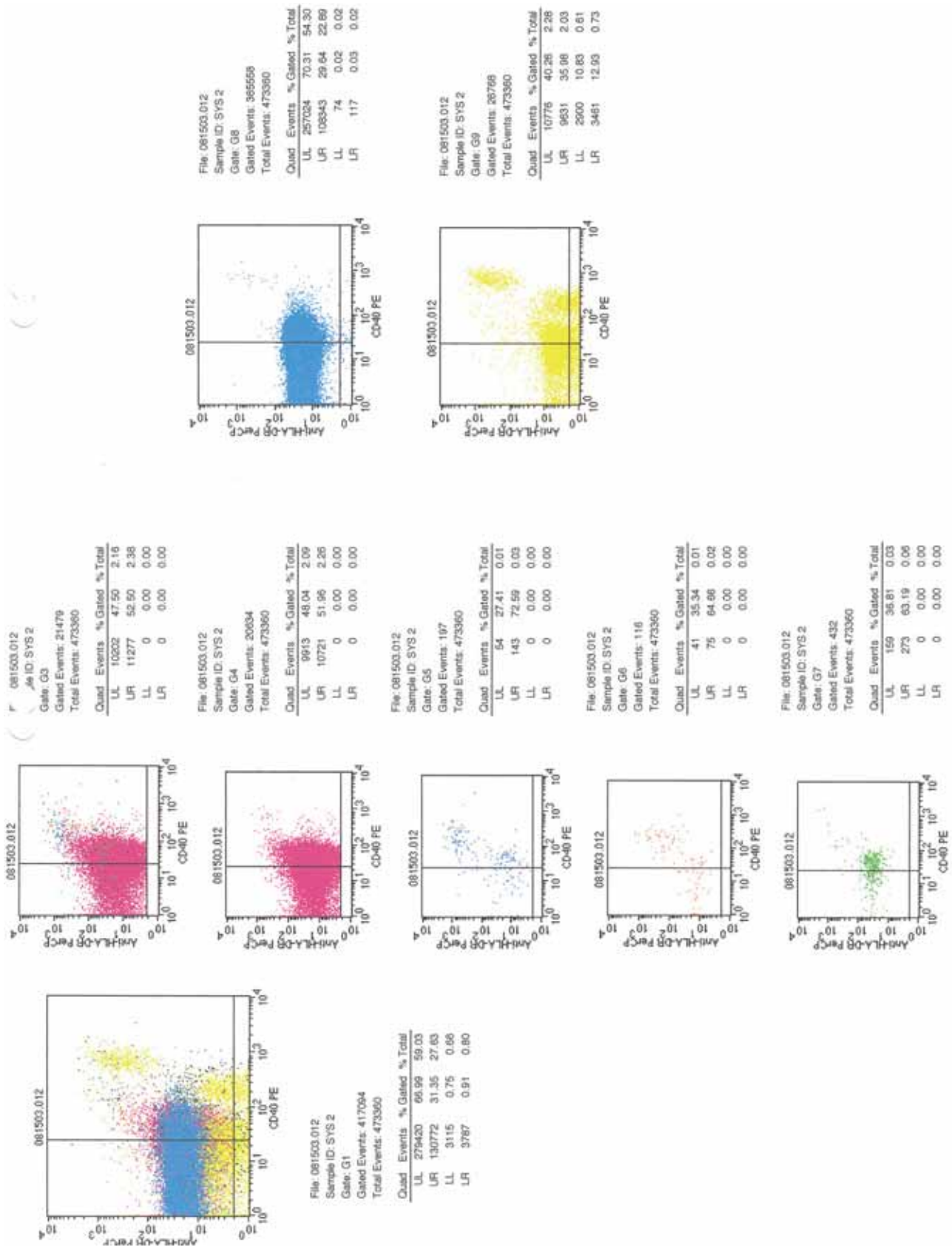




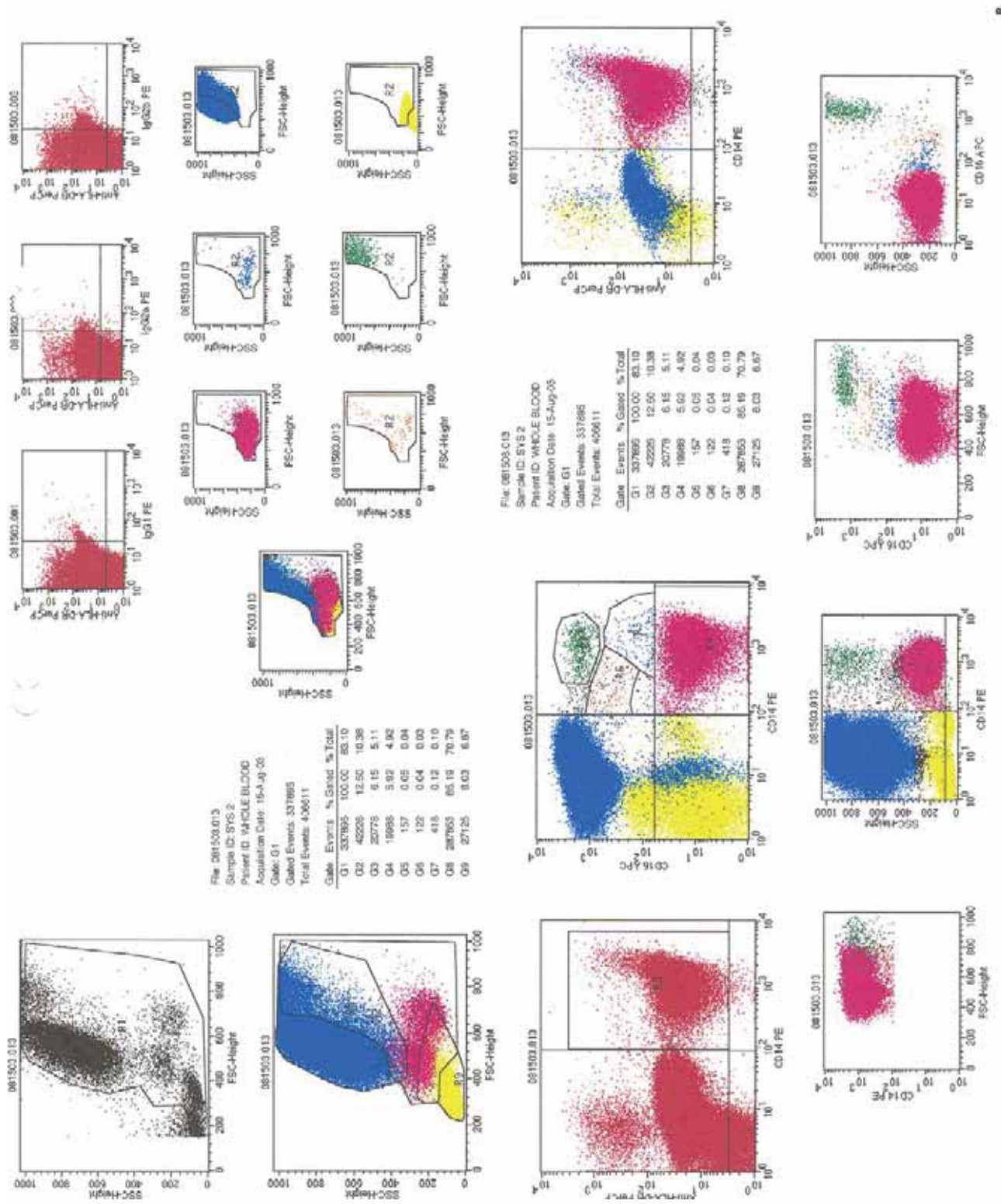
Paciente SYS 2: CXCR4: Valores de CXCR4 para los diferentes subtipos celulares



Paciente SYS 2: CD40: Selección de los subtipos celulares

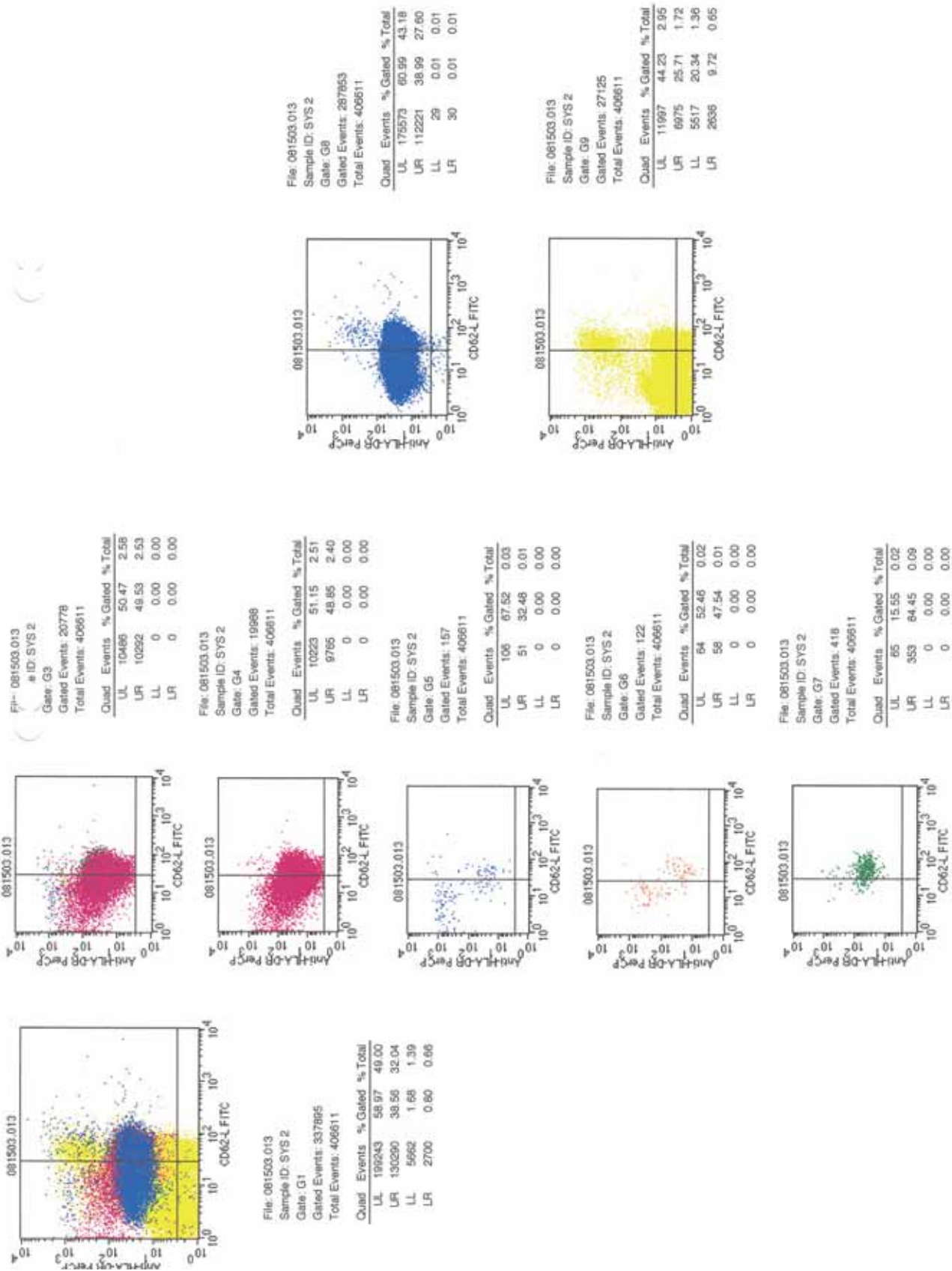


Paciente SYS 2: CD40: Valores de CD40 para los diferentes subtipos celulares

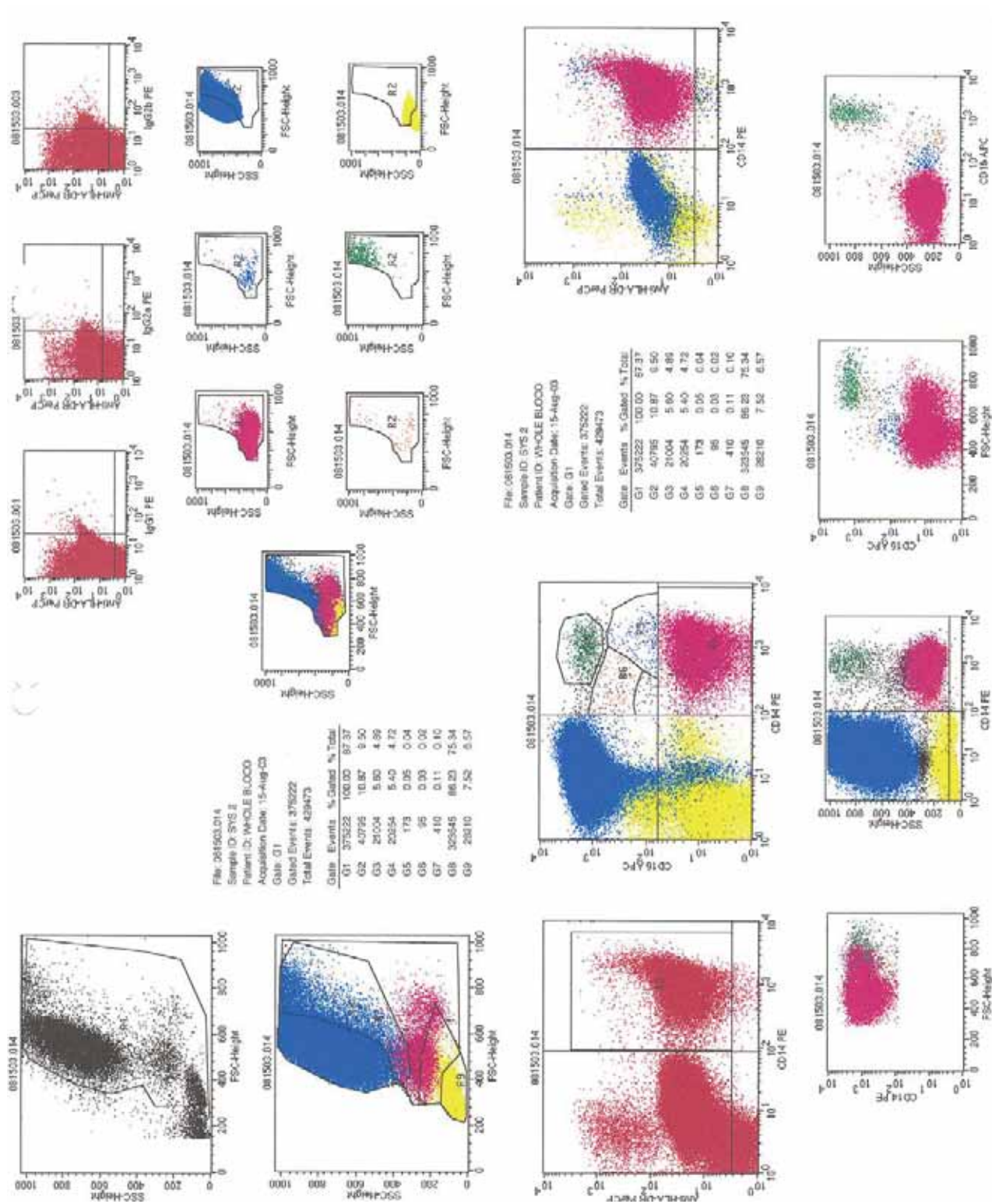


Paciente SYS 2: CD62-L: Selección de los subtipos celulares

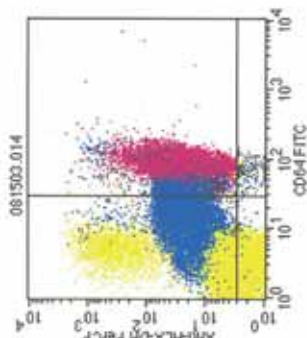




Paciente SYS 2: CD62-L: Valores de CD62-L para los diferentes subtipos celulares

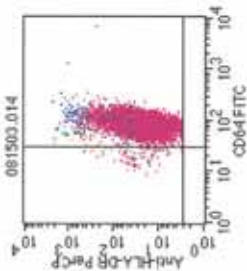


Paciente SYS 2: CD64: Selección de los subtipos celulares



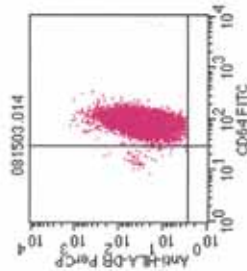
File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G1  
 Gated Events: 375222  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	333584	88.90	77.67
UR	32519	8.67	7.57
LL	8873	2.38	2.07
LR	246	0.07	0.06



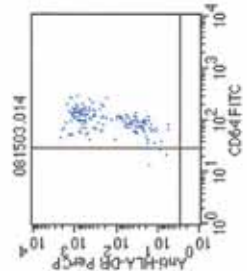
File: 081503.014  
 ID: SYS 2  
 Gate: G3  
 Gated Events: 21004  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	115	0.55	0.03
UR	20889	99.45	4.86
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



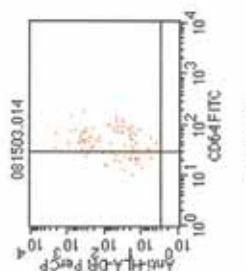
File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G4  
 Gated Events: 20254  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	65	0.32	0.02
UR	20189	99.68	4.70
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



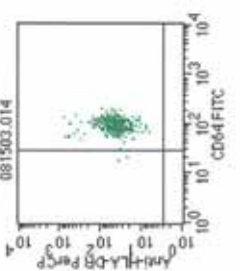
File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G5  
 Gated Events: 173  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3	1.73	0.00
UR	170	98.27	0.04
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G6  
 Gated Events: 95  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	29	30.53	0.01
UR	66	69.47	0.02
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



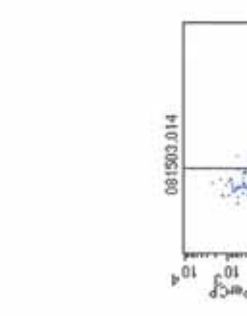
File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G7  
 Gated Events: 410  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2	0.49	0.00
UR	408	99.51	0.10
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00



File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G8  
 Gated Events: 323545  
 Total Events: 429473

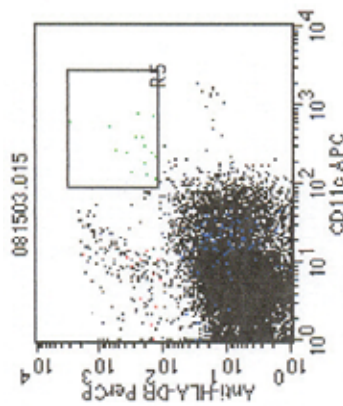
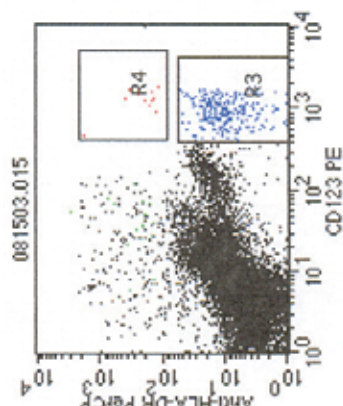
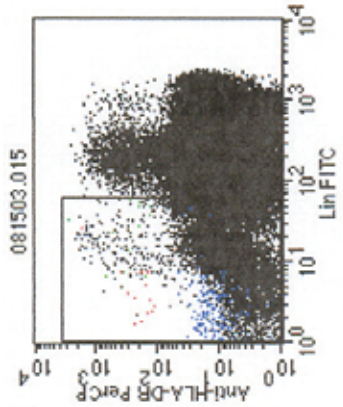
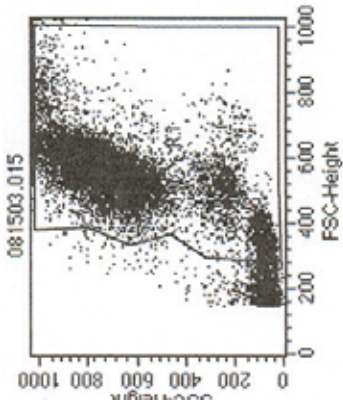
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	312940	96.72	72.87
UR	10485	3.24	2.44
LL	42	0.01	0.01
LR	78	0.02	0.02



File: 081503.014  
 Sample ID: SYS 2  
 Gate: G9  
 Gated Events: 26210  
 Total Events: 429473

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	19281	68.35	4.49
UR	107	0.38	0.02
LL	8759	31.05	2.04
LR	63	0.22	0.01

Paciente SYS 2: CD64: Valores de CD64 para los diferentes subtipos celulares

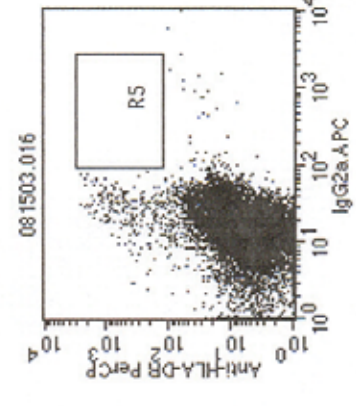
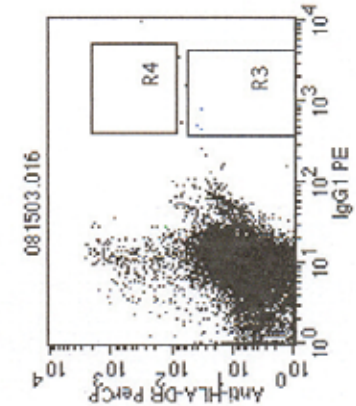
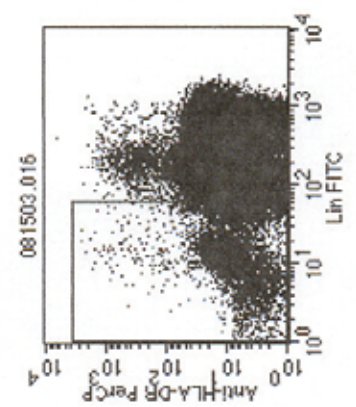
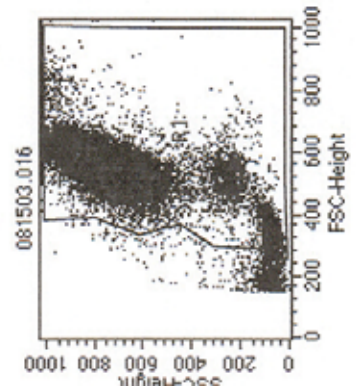


File: 081503.015  
 Sample ID: SYS 2  
 Acquisition Date: 15-Aug-03  
 Gate: PBMC  
 Gated Events: 235846  
 Total Events: 294954

Gate	Events	% Gated	% Total
PBMC	235846	100.00	79.96
FTIC DIM	13118	5.56	4.45
Basophils	286	0.12	0.10
CD123+ DCs	13	0.01	0.00
CD11c+ DCs	15	0.01	0.01

File: 081503.015  
 Sample ID: SYS 2  
 Acquisition Date: 15-Aug-03  
 Gate: FITC DIM  
 Gated Events: 13118  
 Total Events: 294954

Gate	Events	% Gated	% Total
PBMC	13118	100.00	4.45
FTIC DIM	13118	100.00	4.45
Basophils	286	2.18	0.10
CD123+ DCs	13	0.10	0.00
CD11c+ DCs	15	0.11	0.01

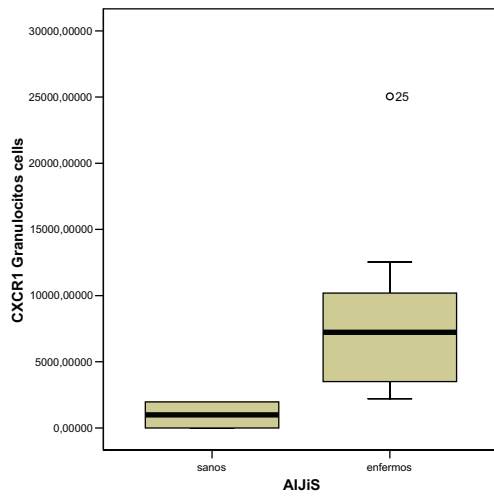


Paciente SYS 2: Selección de poblaciones de células dendríticas

### 10.3 Anexo 3: Gráficos accesorios

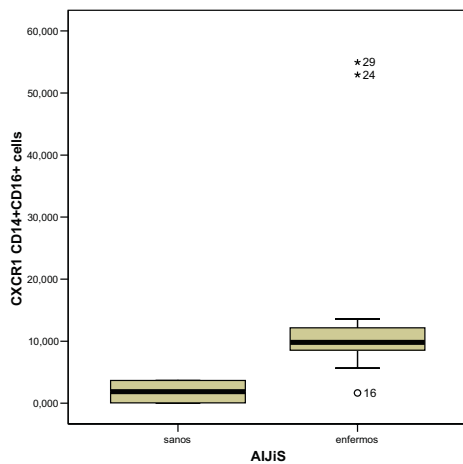
Sanos vs AIJIS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR1 Granulocitos cells	sanos	2	0,55	1969,03	0,41	984,79	1478,51	,030
	enfermos	11	2215,69	25052,32	2566,77	7224,50	10232,06	

Gráfico I



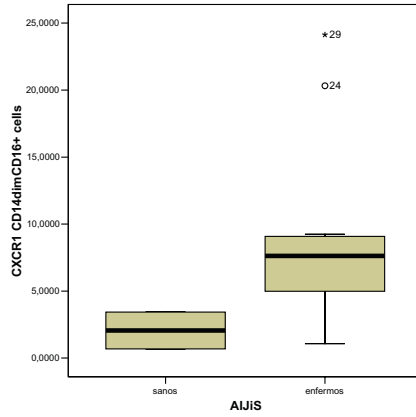
Sanos vs AIJIS		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR1 CD14+CD16+ cells	sanos	2	0,06	3,67	0,04	1,86	4,49	,048
	enfermos	11	1,65	54,95	8,31	9,81	13,59	

Gráfico II



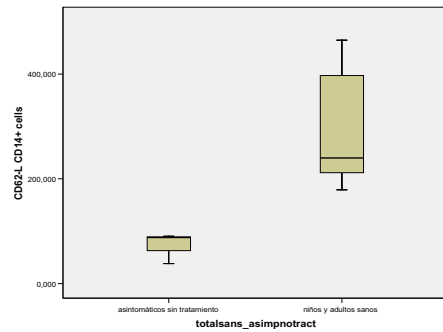
Sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CXCR1 CD14dimCD16+ cells	sanos	2	0,68	3,43	0,51	2,06	4,31	,048
	enfermos	11	1,08	24,13	4,65	7,63	9,23	

Gráfico III



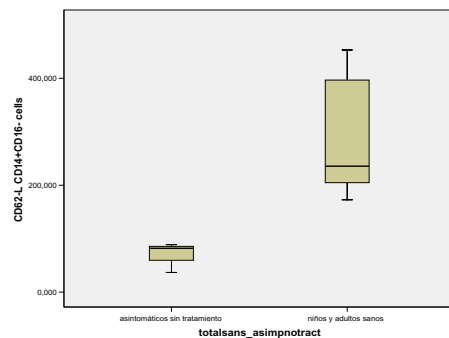
Total sanos vs AIJiS Asintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14+ cells	AIJiS Asintom No Tx	3	38,22	90,56	38,22	87,88	90,56	,025
	Total sanos	5	179,06	464,73	195,35	239,81	430,96	

Gráfico IV



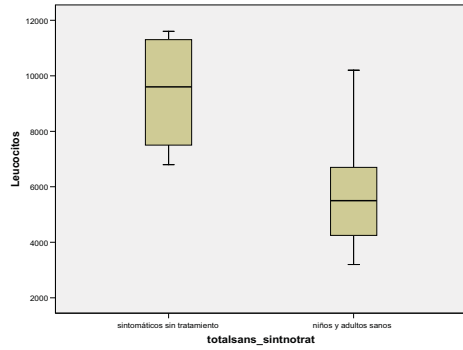
Total sanos vs AIJiS Asintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14+CD16- cells	AIJiS Asintom No Tx	3	36,90	88,97	36,90	82,07	88,97	,025
	Total sanos	5	172,57	452,98	188,68	235,55	424,76	

Gráfico V



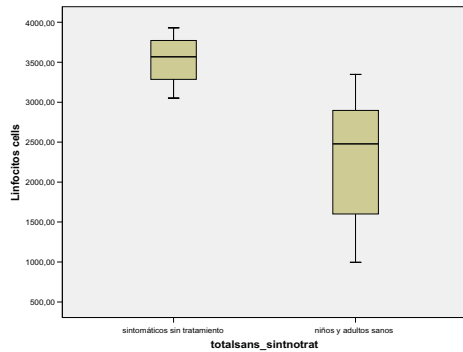
Total sanos vs AIJIS Sintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	AIJIS Sintom No Tx	4	6800	11600	7150	9600	11450	,015
	Total sanos	12	3200	10200	4075	5500	6800	

Gráfico VI



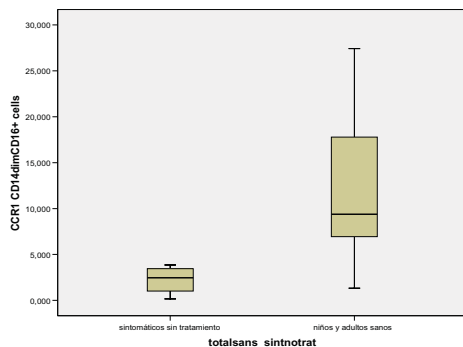
Total sanos vs AIJIS Sintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Linfocitos cells	AIJIS Sintom No Tx	4	3050,40	3930,08	3167,80	3567,78	3851,45	,006
	Total sanos	11	996,16	3348,45	1481,22	2478,75	2942,85	

Gráfico VII



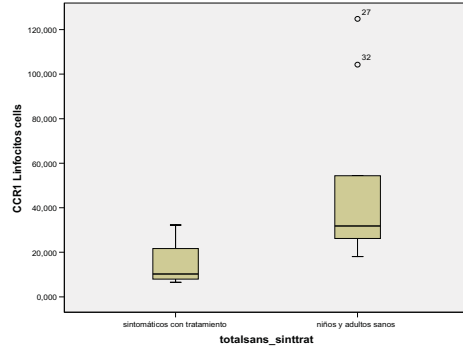
Total sanos vs AIJIS Sintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR1 CD14dimCD16+ cells	AIJIS Sintom No Tx	4	0,17	3,86	0,59	2,46	3,65	,024
	Total sanos	10	1,33	27,41	6,11	9,38	19,42	

Gráfico VIII



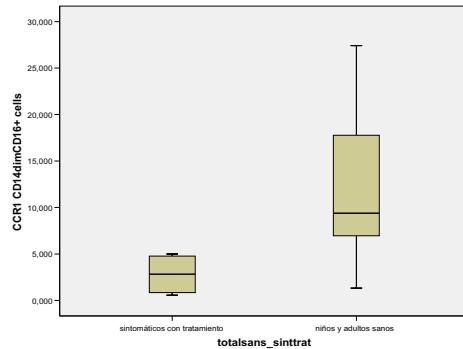
Total sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 Linfocitos cells	AIJIS Sintom Tx	4	6,54	32,21	7,24	10,25	26,94	,034
	Total sanos	10	18,09	124,85	24,67	31,85	66,86	

Gráfico IX



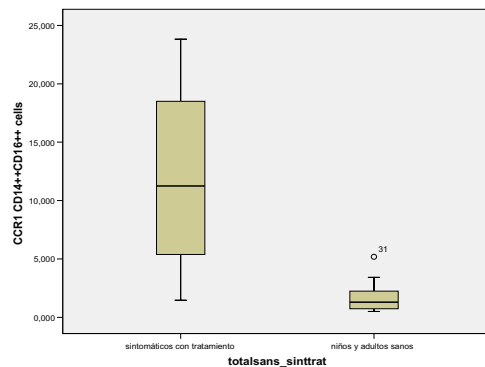
Total sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14dimCD16+ cells	AIJIS Sintom Tx	4	0,57	4,99	0,70	2,82	4,87	,024
	Total sanos	10	1,33	27,41	6,11	9,38	19,42	

Gráfico X



Total sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14++CD16++ cells	AIJIS Sintom Tx	4	1,46	23,82	3,42	11,25	21,16	,024
	Total sanos	10	0,50	5,19	0,68	1,29	2,54	

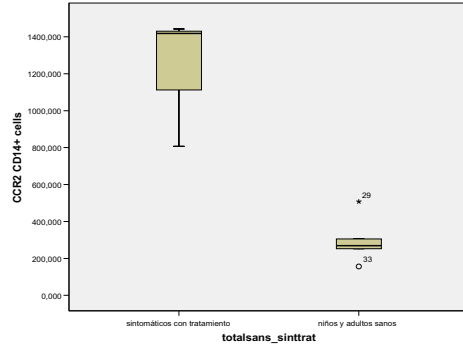
Gráfico XI





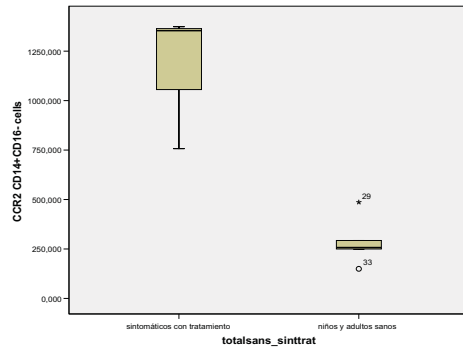
Total sanos vs ALJIS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14+ cells	ALJIS Sintom Tx	3	807,35	1443,03	807,35	1418,17	1443,03	,025
	Total sanos	5	156,45	507,76	204,35	268,82	406,42	

Gráfico XII



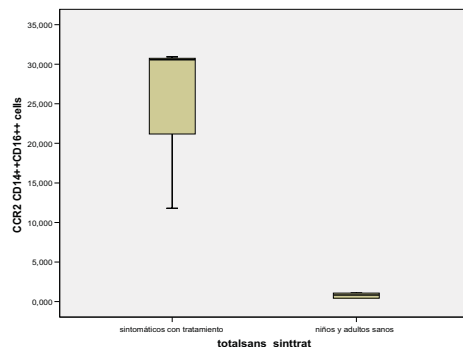
Total sanos vs ALJIS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14+CD16- cells	ALJIS Sintom Tx	3	757,72	1374,06	757,72	1353,67	1374,06	,025
	Total sanos	5	149,66	486,45	200,18	257,23	389,70	

Gráfico XIII



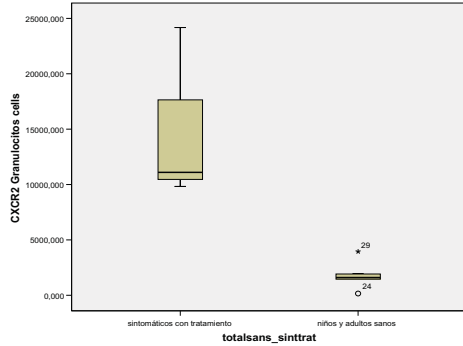
Total sanos vs ALJIS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14++CD16++ cells	ALJIS Sintom Tx	3	11,79	30,93	11,79	30,58	30,93	,025
	Total sanos	5	0,44	1,08	0,44	0,83	1,08	

Gráfico XIV



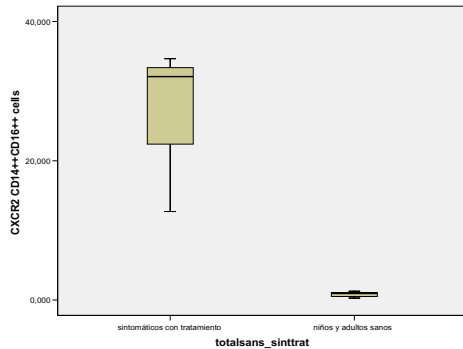
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR2 Granulocitos cells	AIJiS Sintom Tx	3	9832,51	24179,66	9832,51	11104,28	24179,66	,025
	Total sanos	5	167,21	3952,96	814,10	1616,49	2941,18	

Gráfico XV



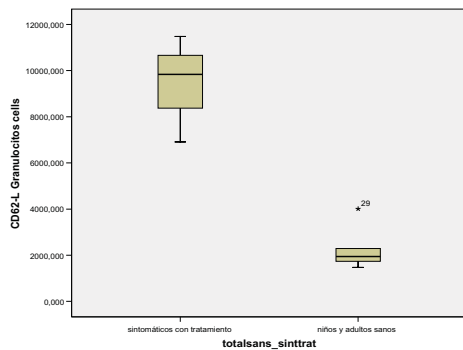
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CXCR2 CD14++CD16++ cells	AIJiS Sintom Tx	3	12,70	34,67	12,70	32,10	34,67	,025
	Total sanos	5	0,27	1,26	0,38	0,93	1,17	

Gráfico XVI



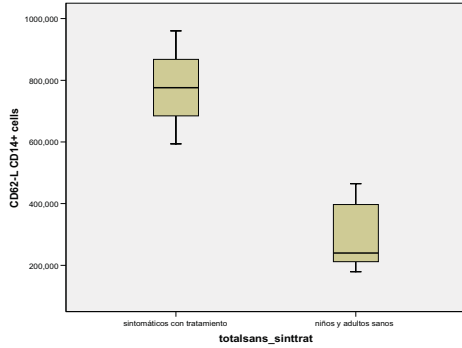
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD62-L Granulocitos cells	AIJiS Sintom Tx	3	6910,32	11479,61	6910,32	9836,31	11479,61	,025
	Total sanos	5	1472,65	4009,93	1605,27	1944,19	3151,58	

Gráfico XVII



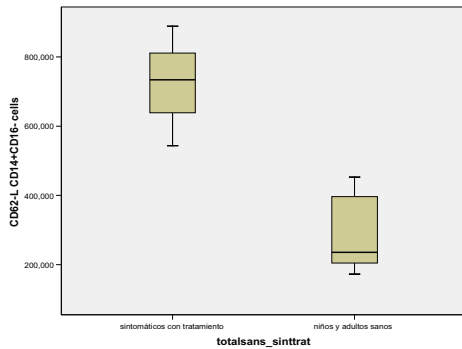
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14+ cells	AIJiS Sintom Tx	3	593,63	960,18	593,63	775,64	960,18	,025
	Total sanos	5	179,06	464,73	195,35	239,81	430,96	

Gráfico XVIII



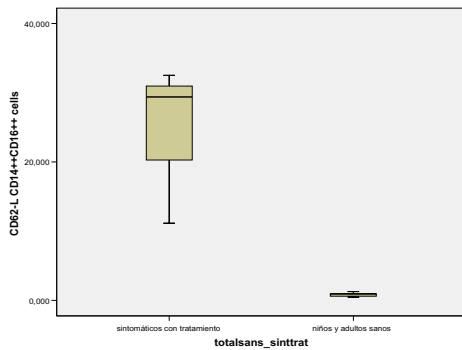
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14+CD16- cells	AIJiS Sintom Tx	3	543,50	888,86	543,50	733,82	888,86	,025
	Total sanos	5	172,57	452,98	188,68	235,55	424,76	

Gráfico XIX



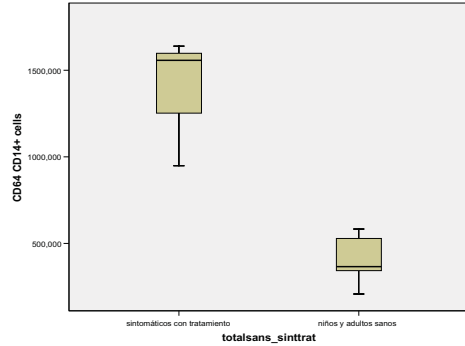
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L CD14++CD16++ cells	AIJiS Sintom Tx	3	11,15	32,51	11,15	29,39	32,51	,025
	Total sanos	5	0,50	1,28	0,55	0,94	1,12	

Gráfico XX



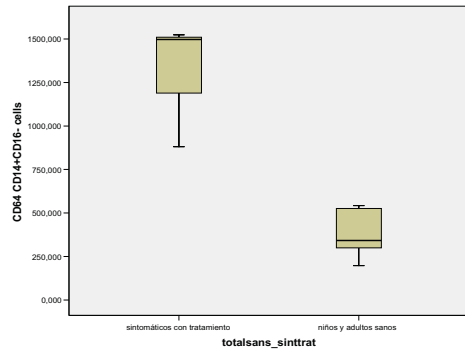
Total sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD64 CD14+ cells	AIJIS Sintom Tx	3	948,37	1639,59	948,37	1557,39	1639,59	,025
	Total sanos	5	207,40	583,01	275,25	366,11	555,70	

Gráfico XXI



Total sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD64 CD14+CD16- cells	AIJIS Sintom Tx	3	881,15	1523,78	881,15	1497,39	1523,78	,025
	Total sanos	5	197,31	542,26	248,51	341,49	534,08	

Gráfico XXII



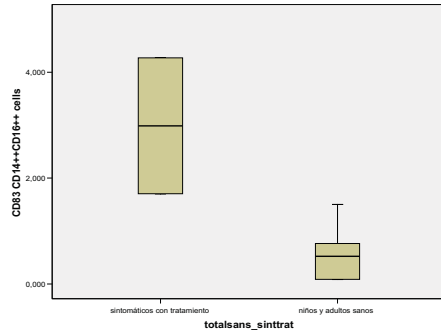
Total sanos vs AIJIS Sintom Tx		N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
					25	50 Mediana	75	
CD64 CD14++CD16++ cells	AIJIS Sintom Tx	3	13,76	34,63	13,76	32,57	34,63	,025
	Total sanos	5	0,50	1,30	0,56	0,96	1,19	

Gráfico XXIII



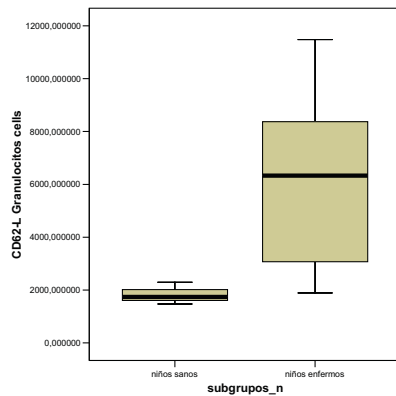
Total sanos vs AIJiS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD83 CD14++CD16++ cells	AIJiS Sintom Tx	2	1,70	4,27	1,28	2,99	8,70	,046
	Total sanos	6	0,08	1,50	0,08	0,52	0,95	

Gráfico XXIV



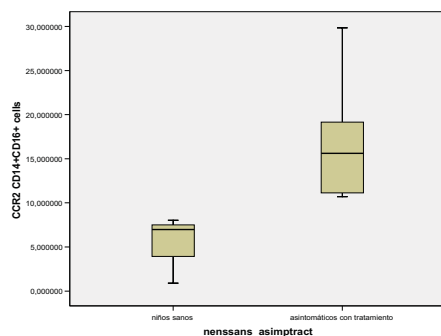
Niños sanos vs AIJiS	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CD62-L Granulocitos cells	Niños sanos	3	1472,65	2293,23	1472,65	1737,88	2293,23	,016
	AIJiS	11	1891,15	11479,61	2321,37	6332,28	9836,31	

Gráfico XXV



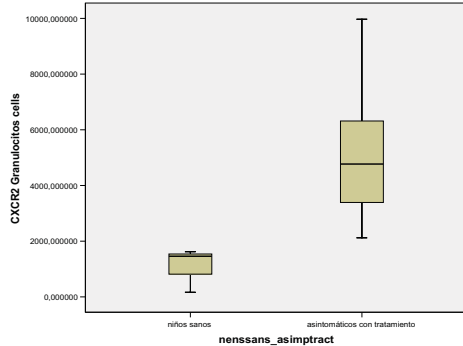
Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CCR2 CD14+CD16+ cells	Niños sanos	3	0,89	8,02	0,89	6,98	8,02	,025
	AIJiS Asintom Tx	5	10,69	29,84	10,92	15,61	24,50	

Gráfico XXVI



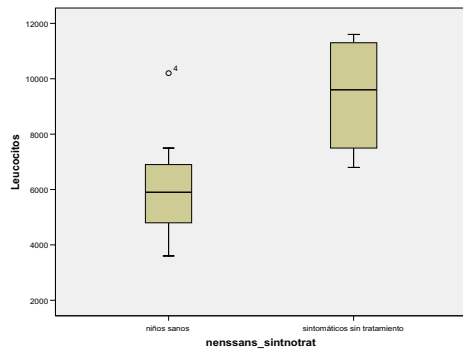
Niños sanos vs AIJiS Asintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CXCR2 Granulocitos cells	Niños sanos	3	167,21	1616,49	167,21	1460,99	1616,49	,025
	AIJiS Asintom Tx	5	2117,79	9974,48	2754,61	4772,92	8145,94	

Gráfico XXVII



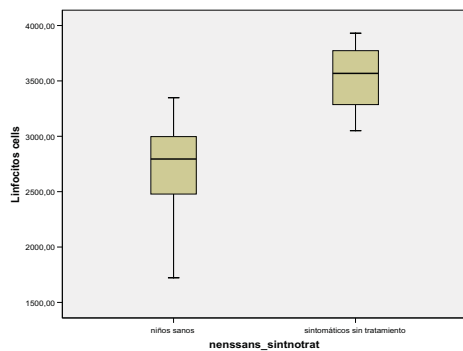
Niños sanos vs AIJiS Sintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Leucocitos	Niños sanos	7	3600	10200	4600	5900	7500	,038
	AIJiS Sintom No Tx	4	6800	11600	7150	9600	11450	

Gráfico XXVIII



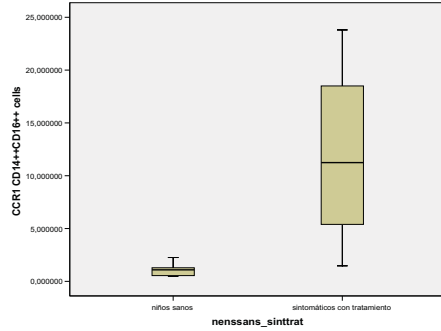
Niños sanos vs AIJiS Sintom No Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
Linfocitos cells	Niños sanos	6	1722,96	3348,45	2289,80	2795,03	3085,45	,019
	AIJiS Sintom No Tx	4	3050,40	3930,08	3167,80	3567,78	3851,45	

Gráfico XXIX



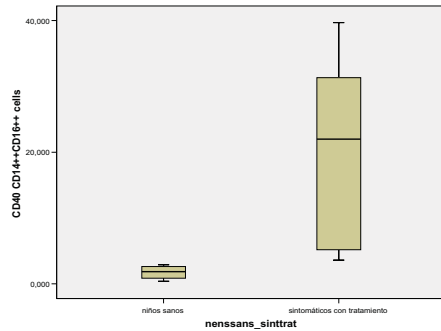
Niños sanos vs AIJIS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
CCR1 CD14++CD16++ cells	Niños sanos	5	0,50	2,24	0,52	1,08	,027
	AIJIS Sintom Tx	4	1,46	23,82	3,42	11,25	

Gráfico XXX



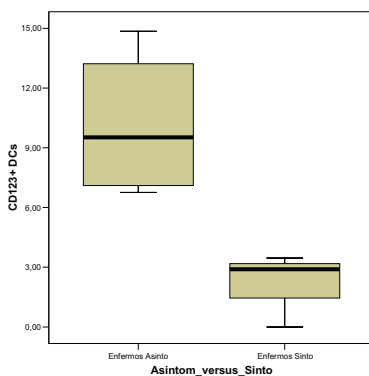
Niños sanos vs AIJIS Sintom Tx	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
CD40 CD14++CD16++ cells	Niños sanos	4	0,40	2,91	0,64	1,85	,014
	AIJIS Sintom Tx	5	3,61	39,68	4,40	21,99	

Gráfico XXXI



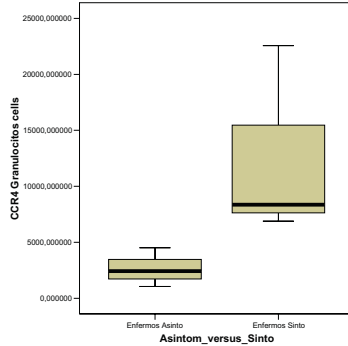
AIJIS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
CD123+ DCs	Asintomat.	4	6,76	14,85	6,93	9,52	,034
	Sintomat.	3	0	3,46	0	2,90	

Gráfico XXXII



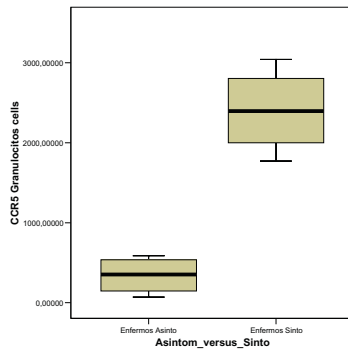
AIJiS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
CCR4 Granulocitos cells	Asintomat.	4	1059,34	4515,55	1399,72	2428,72	,034
	Sintomat.	3	6885,72	22562,97	6885,72	8369,01	

Gráfico XXXIII



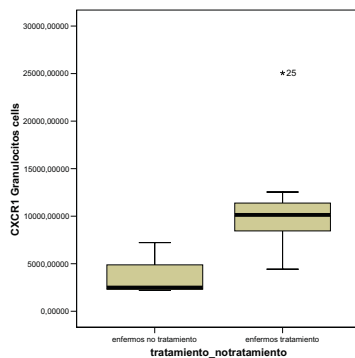
AIJiS Asintomat. vs Sintomat.	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
CCR5 Granulocitos cells	Asintomat.	4	71,43	587,93	108,85	354,14	,021
	Sintomat.	4	1772,95	3041,69	1886,44	2397,00	

Gráfico XXXIV



AIJiS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.
				25	50 Mediana	75	
CXCR1 Granulocitos cells	En Tratamiento	7	4428,30	25052,32	6986,80	10139,86	,023
	No Tratamiento	4	2215,69	7224,50	2270,66	2501,18	

Gráfico XXXV





AlJIS Tratamiento vs No Tratamiento	N	Mín.	Máx.	Percentiles			Signif.	
				25	50 Mediana	75		
CXCR1 CD14dimCD16+ cells	En Tratamiento	7	5,33	24,13	5,73	8,94	20,32	,038
	No Tratamiento	4	1,08	8,73	1,90	4,51	7,71	

Gráfico XXXVI

