

GRANDES MONONUCLEARES TIPO LINFOBLASTO EN EL LÍQUIDO SINOVIAL DE LAS ARTROPATÍAS INFLAMATORIAS CRÓNICAS

Carlos Castresana I.*, Pedro Goyenaga H.** y Rodrigo Morera V.***

Key Word Index: Sinovial fluids, cells, electron microscopy, light microscopy arthritis. Rheumatoid, arthritis, juvenile rheumatoid, spondylitis, ankylosing

RESUMEN

El estudio del líquido sinovial mediante microscopía óptica y electrónica, mostró la existencia de grandes células mononucleares tipo linfoblasto en pacientes con artritis reumatoide (81.2%), artritis reumatoide juvenil (75%) y espondiloartropatías seronegativas (60%).

Las características morfológicas de estas células en la microscopía óptica fueron: tamaño aproximado 20 micras, índice núcleo citoplasma 2:1, citoplasma basófilo, patrón leptocromático del núcleo y 2 ó 3 nucleolos.

El análisis de estas células por microscopía electrónica demostró una forma redondeada o ligeramente oval, un núcleo usualmente redondeado que puede presentar invaginaciones, heterocromatina dispuesta en un fino anillo cerca de la membrana nuclear, citoplasma ocupado por mono y polirribosomas y ausencia de aparato de Golgi.

La identificación de las grandes células mononucleares tipo linfoblasto en el líquido sinovial puede ser un dato de importancia diagnóstica de las artropatías inflamatorias crónicas, con probables fenómenos autoinmunes, como la artritis reumatoide y las espondiloartropatías seronegativas. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(2): 163-168].

INTRODUCCIÓN

El análisis del líquido sinovial ha proporcionado importante información en el estudio de las artropatías inflamatorias. Así, mediante el uso de la microscopía de luz polarizada, se describió las artritis producidas por micro-cristales (gota y pseudogota) (9) y el empleo de la microscopía de contraste de fase, demostró la presencia de inclusiones citoplásmicas en los polimorfonu-

cleares de las efusiones sinoviales de los pacientes con artritis reumatoide, lo que ayudó a entender mejor algunos hechos importantes en la patogenia de esta enfermedad (5).

Hasta hace poco tiempo, se había prestado poca atención a la presencia de células mononucleares en los líquidos sinoviales de tipo inflamatorio. Los estudios recientes ultraestructurales han demostrado la presencia de células mononucleares inmaduras (linfoblastos y plasmablastos), en estrecho contacto con los macrófagos, en la membrana sinovial de los pacientes con artritis reumatoide, lo que ha dado apoyo a la hipótesis de un proceso inmunológico en este tipo de sinovitis (7).

El objetivo principal de este trabajo es señalar la existencia frecuente de células mononucleares inmaduras, semejantes a linfoblastos, en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide y otras artropatías de probable origen autoinmune.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo líquido sinovial por aspiración con aguja y bajo técnica aséptica de la articulación de la rodilla de pacientes con los siguientes diagnósticos: artritis reumatoide (32 pacientes), pseudogota (10 pacientes), artritis séptica (9 pacientes), gota (8 pacientes), artritis reumatoide juvenil (4 pacientes), artritis traumática (4 pacientes), espondilitis anquilosante (3 pacientes) y artritis psoriásica (3 pacientes).

Se usó heparina como anticoagulante (5000 unidades por ml) en una proporción de 0.5 ml por 10 ml de líquido sinovial y una solución de citrato formaldehído (citrato de sodio 2H₂O = 3.8 gr. formaldehído, 40 por ciento por volumen = 0.2 gr.; H₂O c.s.p. = 100 ml) para el conteo celular total. El líquido sinovial fue centrifugado luego a 2000 RPM durante 10 minutos para efectuar el conteo diferencial; posteriormente el sedimento se homogenizó y se preparó un frotis secado al aire, que fue coloreado con la tinción

* Servicio de Reumatología, Hospital Calderón Guardia, San José, Costa Rica.

** Departamento de Microscopía Electrónica. Universidad de Costa Rica.

*** Laboratorio Clínico, Hospital Dr. Calderón Guardia. San José, Costa Rica.

de Wright, para efectuar la observación con el microscopio óptico.

Para la microscopía electrónica, se fijó de 0.5 a 1 ml. de líquido sinovial en glutaraldehído al 2.5 por ciento, tamponado con fosfato al 0.1 M a un Ph de 7.2 por 2 horas y media a 4°C. Las células fijadas se lavaron luego en solución tampón de fosfato mediante centrifugación leve (2000 RPM durante 4 minutos), lo que se repitió en 4 ocasiones. La centrifugación fue seguida por un proceso de post-fijación del material en fijador de tetraóxido de osmio al 1 por ciento en la solución tampón citada por 1 hora y media a 4°C; las células fueron luego deshidratadas en series de alcohol de graduación ascendente a temperatura ambiente y embebidas en epoxi-resina de Spurr de baja viscosidad, polimerizada a 70°C por 48 horas. Los cortes fueron efectuados en un ultramicrotomo de Porter-Blum MT-2B con cuchillas de cristal y fueron teñidos en acetato acuoso de uranio y solución de monóxido de plomo. Los especímenes coloreados fueron recubiertos ligeramente con carbono y observados en un microscopio electrónico Hitachi modelo HU-12A con una aceleración de voltaje de 75 Kv.

RESULTADOS

Se encontró células mononucleares con características morfológicas de linfoblastos en el líquido sinovial de 26 pacientes con artritis reumatoide (81.2%), en tres de cuatro pacientes con artritis reumatoide juvenil y en 3 de 5 pacientes con pelvispondilitis seronegativas que incluyeron 2 de 3 pacientes con espondilitis anquilosante y 1 de 2 con artritis psoriásica. Cinco pacientes con artritis reumatoide que presentaban estas células en su líquido sinovial tenían el factor reumatoide negativo. No se encontró células mononucleares tipo linfoblasto en el líquido sinovial de los pacientes con gota, pseudogota, artritis séptica, osteoartritis y artritis traumática.

El porcentaje de estas células en los líquidos sinoviales tuvo las siguientes variaciones: en artritis reumatoide seropositiva, una media de 19.5 (ámbito de 4% a 62%) con una DE de 15.0; en artritis reumatoide seronegativa, una media de 39.4 (ámbito de 16% a 51%) con una DE de 12.4; en artritis reumatoide juvenil, una media de 16.6 (ámbito de 8% a 20%) con una DE de 6.1 y 6 en pelvispondilitis seronegativa, una media de 19 (ámbito de 13% a 22%) con una DE de 4.2 (Figura 1).

Las características morfológicas de estas célu-

las en la microscopía óptica fueron: tamaño alrededor de 20 micras, índice núcleo/citoplasma 2:1, citoplasma basófilo, núcleo con patrón leptocromático y presencia de 2 a 3 nucleolos. Estas características morfológicas corresponden a células del tipo de los linfoblastos (Figura 2).

En la microscopía electrónica estas células presentaron forma redondeada o ligeramente oval, un núcleo redondo que puede mostrar invaginaciones en su superficie; la heterocromatina se dispone cerca de la membrana nuclear formando un anillo muy fino, en el citoplasma se presentan escasas organelas, no hay retículo endoplásmico ni aparato de Golgi y existen mono y polirribosomas (Figura 3).

DISCUSIÓN

El hallazgo de grandes células mononucleares de carácter transicional y de una gran variedad morfológica, en la sangre de pacientes con enfermedades inflamatorias, ha sido mencionado desde 1907, cuando Turk (citado en 2) las describió en un paciente que padecía mononucleosis infecciosa. Posteriormente, estas células fueron descritas en la sangre de los pacientes que presentaban cuadros virales y bacterianos y se les denominó linfocitos atípicos (16).

El origen de estas células, que han sido denominadas con el nombre genérico de grandes células mononucleares (13), es objeto de controversia en la literatura. Esto se debe principalmente a los datos proporcionados por el mejor conocimiento de la fisiología de la respuesta inmune. En ella participan diversos grupos celulares: macrófagos- monocitos, linfocitos T (inductores, efectores, citotóxicos-supresores), linfocitos B y una nueva categoría de células citotóxicas, diferente en sus características funcionales y fenotípicas a las anteriores y que reciben el nombre de células NK (citotoxicidad natural) (12). Todas estas células forman verdaderos circuitos de comunicación celular que operan mediante la presencia de un grupo de sustancias químicas denominadas citoquinas (1).

Dentro de este marco de referencia se han descrito estas células como precursores de los macrófagos (6), precursores de linfocitos B (2), células blásticas de tipo T (11) o grandes linfocitos granulares con actividad de células NK (12).

La presencia de grandes mononucleares se ha descrito en la membrana celular sinovial de los pacientes con artritis reumatoide donde, por medio de microscopía electrónica, se han observado dos tipos de células: uno, más abundante,

con retículo endoplásmico en el citoplasma, escasas organelas y un anillo denso en la membrana nuclear que parece corresponder a plasmablastos; el otro tipo, menos frecuente (menos del 10%), con abundante citoplasma y una gran cantidad de mono y polirribosomas, que probablemente está formado por linfoblastos T (7).

En 1976, se describió la presencia de grandes células mononucleares en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide (14). El aislamiento de estas células por flotación en Ficoll Hypaque y su incubación con eritrocitos de carnero, mostró que un alto porcentaje formaban rosetas E, lo que sugería que se trataba de linfoblastos T. Estas células se han denominado células mononucleares cerebriformes (3).

Este estudio muestra que es un hecho frecuente en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide y otras artropatías inflamatorias crónicas, en cuya patogenia probablemente están implicados algunos fenómenos de tipo autoinmune, la presencia de células mononucleares con morfología de linfoblastos en la microscopía óptica. Los datos proporcionados por la microscopía electrónica hacen pensar que por sus características estas células son linfoblastos del tipo T.

Estudios recientes en el líquido (3) y membrana sinovial (8) de los pacientes con artritis reumatoide han proporcionado las características principales de los linfoblastos T: tamaño mayor a 10 micras, índice núcleo/citoplasma elevado, condensación de la cromatina alrededor de la membrana nuclear, citoplasma pobre en organelas y ausencia de retículo endoplásmico. Estas características permiten diferenciarlos de los plasmablastos que poseen retículo endoplásmico abundante y de los macrófagos que presentan procesos dendríticos citoplásmicos y abundantes organelas.(7) Se han descrito también grandes linfocitos granulares (células con citotoxicidad natural o NK) en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide (10), pero estas células presentan gránulos intracitoplásmicos y abundantes microvellosidades que no corresponden a las características de las células descritas en este estudio.

Los linfocitos T son básicamente células recirculantes y una fracción de estas células pueden migrar al espacio sinovial (15). Se ha demostrado con tinción celular *in situ* con anticuerpos monoclonales fluoresceinados que, en la artritis reumatoide la mayoría de los linfocitos que infiltran la membrana sinovial es de tipo T (4); aunque en menor porcentaje, los linfocitos del líquido sinovial tienen los mismos receptores de

membrana que su contraparte en la membrana sinovial (17). Estos linfocitos parecen estar activados, ya que expresan antígenos HLA-DR en su superficie, muestran proliferación espontánea y secretan mediadores biológicamente activos (17). Estos hallazgos sugieren que las células que infiltran la membrana sinovial participan de una reacción de hipersensibilidad retardada, que posiblemente lleva a la destrucción de las articulaciones con la intervención de células como los macrófagos, los fibroblastos y los condroblastos que son capaces de liberar mediadores inflamatorios y enzimas que son responsables de este fenómeno (4).

No se logró demostrar células mononucleares tipo linfoblasto en las artropatías por microcristales, artritis séptica, artritis traumática y osteoartritis. Por esa razón creemos que su identificación en el líquido sinovial puede ser un dato de valor diagnóstico en las artropatías inflamatorias crónicas con una patogenia autoinmune probable como la artritis reumatoide y las perviespondilitis seronegativas. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos en otros estudios (3,14).

ABSTRACT

The analysis of synovial fluid by means of light and electronic microscopy, shows lymphoblastlike cells in patients with rheumatoid arthritis (81.2%), juvenil rheumatoid arthritis (75%) and seronegative spondyloarthritis (60%).

The morphologic characteristics of these cells viewed under light microscopy were: size of approximately 20 micra, nuclear/cytoplasmic ratio of 2.1, basophilic cytoplasm, leptocromatic pattern of the nucleus, 2 or 3 nucleoli.

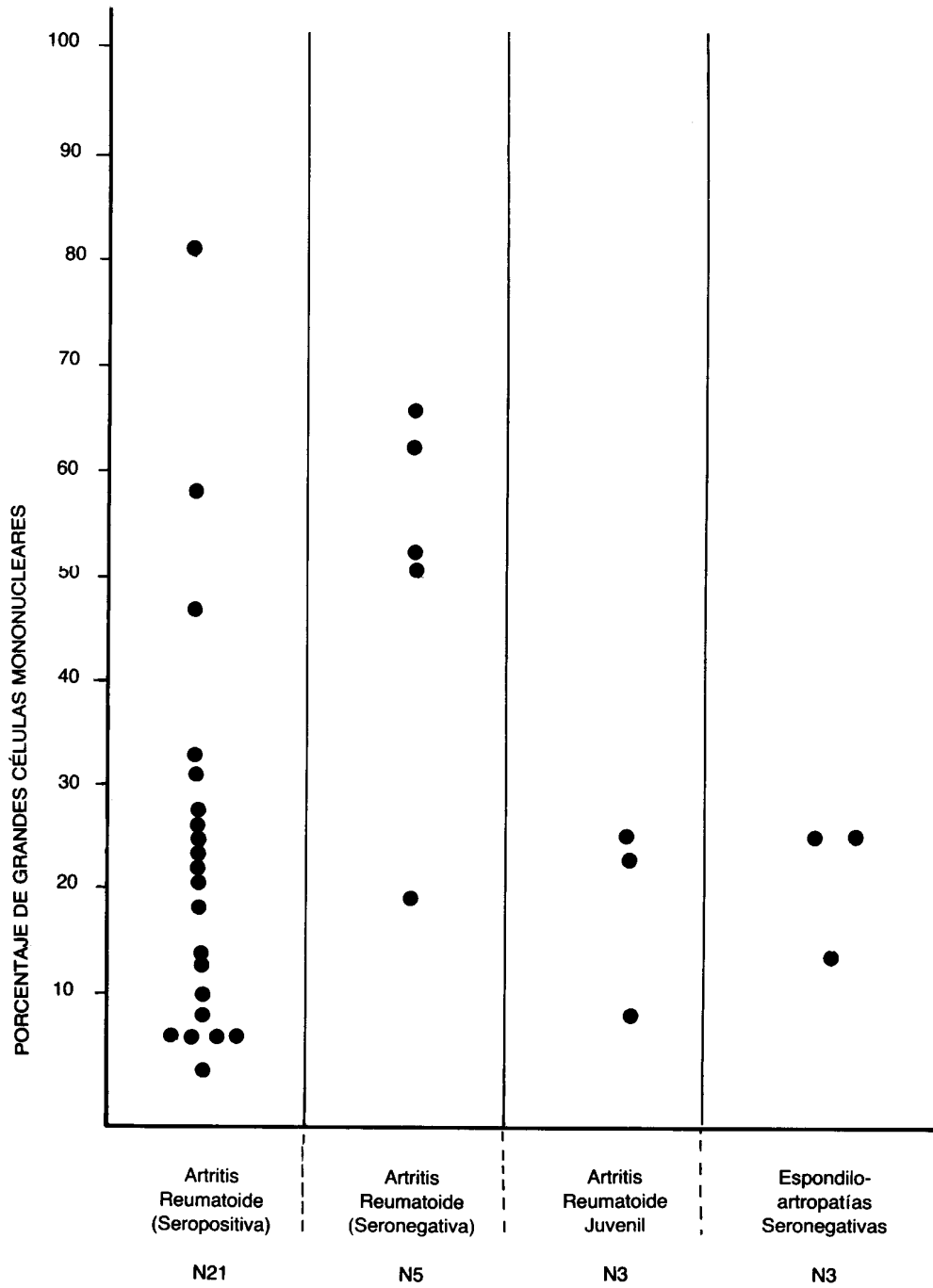
The analysis of these cells viewed under the electron microscopy shows: round or slightly oval form, usually a round nucleus, with or without surface indentations, the heterochromatin arranged as a thin rim near the nuclear membrane, the cytoplasm occupied by mono and polyribosomes, and a Golgi apparatus was not seen.

Identification of large monocuclear cells-like lymphoblasts - in the synovial fluid may be a fact of diagnostic value in inflammatory arthropathies with probable autoimmune phenomena like rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthritis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cantor H, Gershon RK. Immunological circuits- cellular composition. *Fed. Proc* 1979; 38:2058-2064.

2. Delbarre F, LeGo A, Kahan A. Hyperbasophilic immunoblasts in circulating blood in chronic inflammatory rheumatic and collagen diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 1975; 34:422-430.
3. DeVries E, VanBuijsen AC, VaderWeij JP, Haasnoot CJP, Meijer CJL, Cats A. Morphometric analysis of peripheral blood and synovial fluid lymphocytes of patients with rheumatic disease. *J. Rheum.* 1983; 10:12-19.
4. Haraoui B. Phenotypic characterization of peripheral blood mononuclear cells. pp 812-813 in: Decker JL, moderator. Rheumatoid arthritis: evolving concepts of pathogenesis and treatment. *Ann. Int. Med.* 1984; 101:810-824.
5. Hollander JL, McCarty DJ, Astorga G, Castro-Murillo E. Studies in the pathogenesis of rheumatic joint inflammation. I "R.A. cell" and a working hypothesis. *Ann. Int. Med.* 1965; 62:271-279.
6. Horwitz DA, Steagall RV. The development of macrophages from large mononuclear cells in the blood of patients with inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 1972; 51:760-767.
7. Ishikawa H, Ziff M. Electron microscopic observations of immunoreactive cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 1976; 19:1-14.
8. Kobayashi I, Ziff M. Electron Microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 1973; 16:471-486.
9. Mc Carty DJ, Hollander JL. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann. Int. Med.* 1961; 54:452-460.
10. Reinitz E, Neighbour PA, Grayzel AI. Natural killer cell activity of mononuclear cells for rheumatoid patients measured by a conjugate binding cytotoxicity assay. *Arthritis Rheum.* 1982; 25:1440-1444.
11. Sheldon PJ, Papamichail M, Hemsted EH, Holborow EJ. Thymic origin of atypical lymphoid cells in infectious mononucleosis. *Lancet* 1973; 1:1153-1155.
12. Sibbit WL, Bankhurst, AD. Natural Killer cells in connective tissue diseases. *Clin. Rheum. Dis.* 1985; 11:507-521.
13. Takasugi E, Hollingsworth JW. Morphologic studies of mononuclear cells of human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 1967; 10:495-501.
14. Traycoff RB, Pascual E, Schumacher HR. Mononuclear cells in human synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 1976; 19:743-748.
15. Utsinger PD. Synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1975; 18:595-602.
16. Wood TA, Frenkel EP. The atypical Lymphocyte. *Amer. J. Med.* 1967; 10:495-501.
17. Zvaifler NJ. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis in: Mc Carty JD ed. *Arthritis and Allied Conditions*. 10 th ed. Philadelphia: Lea & Febiger: 1985; 557-570.



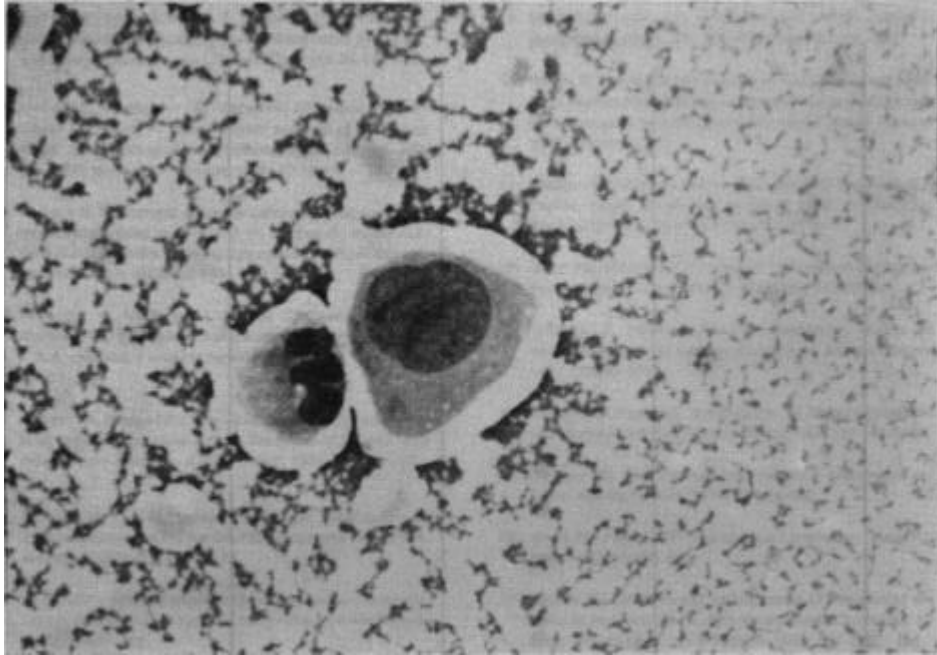


FIG. 2: Grandes nonucleares tipo linfoblasto en líquido sinovial (tinción de Wright; X 1000) Ver descripción en el texto.

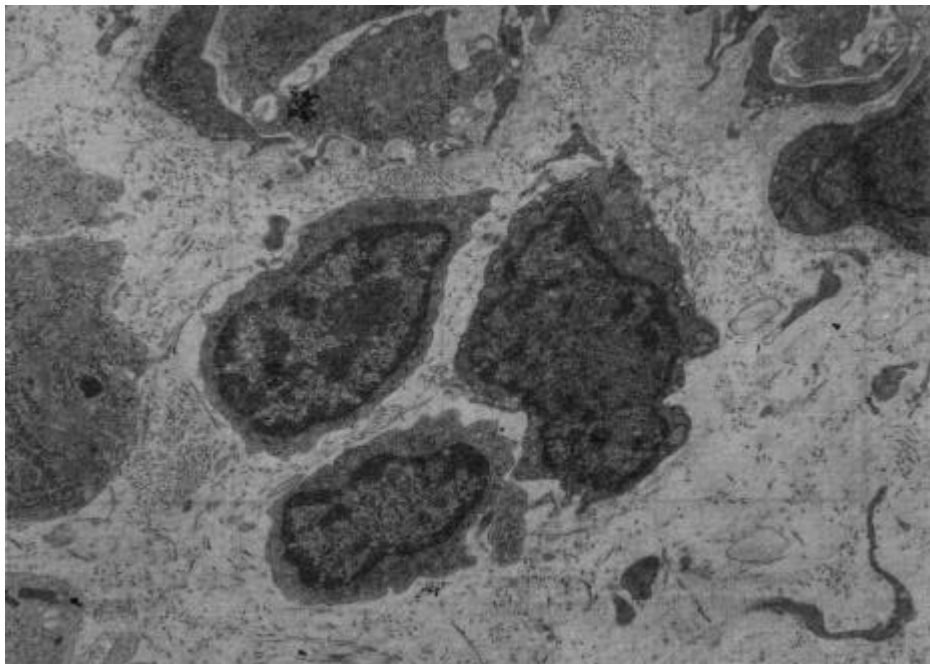


FIG. 3: Micrografía electrónica de grandes mononucleares del líquido sinovial; células de tipo linfoblasto (magnificación original X 6000).