

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VIVO* DEL EXTRACTO
TÍMICO PURIFICADO TACTIVIN, SOBRE
LINFOPROLIFERACIÓN Y LOS NIVELES SÉRICOS DE IL-2, IL-
1 β Y TNF α EN UN MODELO MURINO DE ARTRITIS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TÉSIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

REYNA LUCÍA BARAJAS TORRES

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre del 2004.



C. Reyna Lucía Barajas Torres
Estudiante de la Carrera de Biología.
Presente

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción Tesis con el título: **"Evaluación del efecto *in vivo* del extracto tímico purificado Tactivin sobre linfoproliferación y los niveles séricos de IL-2, IL-1 β y TNF α en un modelo murino de artritis"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada la Dra. Galina Petrovna Zaitseva como directora de la tesis, y el M. en C. Jorge Peregrina Sandoval como asesor.

Sin otro particular, quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
"Piensa y Trabaja"
Las Agujas, Mpio. de Zapopan, Jalisco, 14 de octubre de 2004


Dr. Carlos Alvarez Moya
Presidente del Comité de Titulación ;



RECIBIDO


Dra. Ana Isabel Ramirez Quintana-Carr
Secretario del Comité de Titulación

Dr. Carlos Álvarez Moya

Formato F

Presidente del comité de titulación.

Carrera de Licenciado en Biología.


Presente

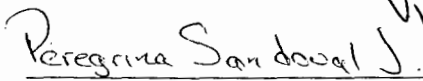
Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES opción TESIS con el título "Evaluación del efecto *in vivo* del extracto tímico purificado Tactivin, sobre linfoproliferación y los niveles séricos de IL-2, IL-1 β y TNF α en un modelo murino de artritis" que realizó la pasante REYNA LUCÍA BARAJAS TORRES con el número de código 396208545 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para su autorización de impresión.

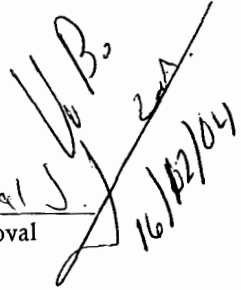
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

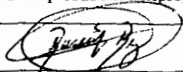
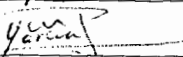


ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan Jal. a 2 de Diciembre de 2004.


Dra Galina P. Zaitseva
Directora del trabajo


M. en C. Jorge Peregrina Sandoval
Asesor


16/12/04

Nombre completo de los Sinodales	Firma de aprobado el anteproyecto	Fecha de aprobación
M. en C. Ramón Reynoso Orozco		02/12/2004
M. en C. Pedro Macedonio García López		02/12/2004
Dr. Carlos Álvarez Moya		16/12/04.
Supl. M.V.Z. Alberto Ramos Mora		02/12/2004

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VIVO* DEL
EXTRACTO TÍMICO PURIFICADO TACTIVIN,
SOBRE LINFOPROLIFERACIÓN Y LOS NIVELES
SÉRICOS DE IL-2, IL-1 β Y TNF α EN UN MODELO
MURINO DE ARTRITIS”**

TESISTA:

REYNA LUCÍA BARAJAS TORRES

DIRECTOR:

DR. EN C. GALINA PETROVNA ZAITSEVA

ASESOR:

M. EN C. JORGE PEREGRINA SANDOVAL

SEDE

**LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

Dedico este trabajo a mis padres Rosa Ma. Torres y Agustín Barajas, quienes me trajeron al mundo y me dieron amor, educación y valores para enfrentar la vida.

Doy gracias a Dios por darme el don de vivir y por siempre iluminar el camino que he de seguir.

Gracias a mi familia, de quienes recibí cariño y apoyo. A David Uribe por estar a mi lado en todo momento.

Agradezco a la Dra. Galina P. Zaitseva quien me abrió las puertas al mundo de la investigación, por darme la oportunidad de tomar este trabajo y por haber compartido su conocimiento tanto profesional como personal.

A mi asesor Jorge Peregrina y a Edgardo Flores agradezco su apoyo durante la realización de éste trabajo y por brindarme sus consejos.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de inmunobiología, en especial a Sergio, Reyna y Dionisio, por brindarme su ayuda y colaboración; a Juan Ramón, Lupita y todos mis compañeros del laboratorio de citogenética, por todos sus conocimientos y consejos que me brindaron.

A mis sinodales y todas las personas que estuvieron conmigo, agradezco sus consejos, apoyo y colaboración.

*Si pude ver más allá que muchos hombres,
Fué porque caminé en hombros de gigantes.*

Isaac Newton

ÍNDICE DEL CONTENIDO

•	Introducción	-----	1
•	Antecedentes	-----	3
▪	Extractos de timo	-----	3
▪	Extracto de timo purificado Tactivin	-----	3
▪	Inflamación	-----	5
▪	Autoinmunidad	-----	5
▪	Artritis reumatoide	-----	6
▪	Panorama epidemiológico de AR en el mundo	-----	7
▪	Panorama epidemiológico de AR en nuestro país	-----	7
▪	Mecanismo de la destrucción de tejido en AR	-----	8
▪	Linfocitos T	-----	9
▪	Monocitos/macrófagos	-----	10
▪	Linfocitos B	-----	10
▪	Citocinas	-----	11
▪	IL-1	-----	12
▪	TNF α	-----	13
▪	IL-2	-----	13
▪	Modelos animales de artritis reumatoide	-----	14
•	Justificación	-----	17
•	Hipótesis	-----	17
•	Objetivos	-----	18
•	Tipo de estudio	-----	18
•	Variables	-----	18
•	Material y métodos	-----	20
▪	Población objeto de estudio	-----	20
▪	Inducción de AR experimental	-----	20
▪	Medición de las articulaciones	-----	21
▪	Esquema de tratamiento	-----	21
▪	Cultivo de esplenocitos	-----	22

▪ Biometría	-----	23
▪ ELISAS	-----	23
• Resultados	-----	25
• Discusión	-----	36
• Conclusiones	-----	40
• Perspectivas	-----	41
• Literatura citada	-----	42

ABREVIATURAS

AIP- Artritis inducida con proteoglicano

AR- Artritis reumatoide

CFA- Adyuvante completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant)

CIBO-IMSS- Centro de Investigación Biomédica de Occidente-Instituto Mexicano del Seguro Social

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IFA- Adyuvante Incompleto de Freund (Incomplete Freund's Adjuvant)

IgA- Inmunoglobulina A

IgE- Inmunoglobulina E

IgG- Inmunoglobulina G

IgM- Inmunoglobulina M

IL-1 β - Interleucina 1-beta

IL-2- Interleucina 2

NK- Célula asesina natural (Natural Killer cell)

OPS- Organización Panamericana de la Salud

RMV- Registro de Marcas Visuales

Th1- Linfocito T cooperador 1 (T helper 1)

Th2- Linfocito T cooperador 2 (T helper 1)

TNF α - Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

RESUMEN

El extracto Tactivin es una preparación de hormonas aisladas de timo de bovino de estructura polipeptídica, cuyo uso inmunomodulador ha sido descrito en algunas enfermedades humanas desde 1989.

La artritis reumatoide (AR) es un desorden inflamatorio crónico, que afecta principalmente las articulaciones y que lleva a su destrucción progresiva. La inmunización de ratones de la cepa BALB/c con proteoglicano induce una progresiva poli artritis y espondilitis en esta cepa (Glant et al, 1992).

En este estudio se evaluaron las medidas del diámetro de las principales articulaciones con los promedios tanto individuales como grupales, los cuales sugieren un aumento en el diámetro de las articulaciones (signo de inflamación) en los ratones con Artritis Inducida con Proteoglicano (AIP) sin tratamiento y una recuperación en los tratados con Tactivin. Éstos resultados son apoyados con los de la biometría hemática que se llevó a cabo, en la que se observó que el porcentaje más alto de neutrófilos se encontró en el ratón con AIP que no recibió ningún tipo de tratamiento en comparación con el grupo de los ratones sanos (sin inducción) que tuvieron el menor porcentaje y el grupo de ratones con AIP que recibieron tratamiento con Tactivin que se asemejaron más a los sanos.

Después de un cultivo de esplenocitos se encontró que Tactivin restableció el índice de proliferación en el grupo de ratones con AIP que recibieron éste tratamiento.

En la cuantificación sérica de interleucinas se encontró que los niveles séricos de $TNF\alpha$, estuvieron bajos en los grupos de ratones con AIP tanto tratados como no tratados con Tactivin. Los niveles más altos de $IL-1\beta$ se encontraron en la mayoría de ratones con AIP sin tratamiento. En los niveles séricos de $IL-2$ se observa un incremento notable en ratones con AIP sin tratamiento y normalización de este parámetro en ratones con AIP tratados con Tactivin.

INTRODUCCIÓN

Los extractos de timo se han utilizado en los últimos años para una amplia variedad de enfermedades, en donde pueden ser, en algún tiempo, un tratamiento efectivo (Wilson, 1999).

El extracto Tactivin es una preparación de hormonas tímicas de estructura polipeptídica, cuyo uso inmunomodulador ha sido descrito en algunas enfermedades humanas desde 1985. Las indicaciones para el uso de Tactivin fueron en parámetros inmunológicos anormales y en la mayoría de los casos, bajo pruebas *in vitro* e *in vivo*, éstos volvían a la normalidad o mostraban tendencias hacia la normalidad bajo la acción de Tactivin (Arion, 1989). Algunos estudios han referido que Tactivin mostraba una inclinación a la normalidad actuando en la producción de IL-2 dependiendo de una regulación en la respuesta proliferativa de células mononucleares (Parnes et al, 1995). El extracto se ha reportado como un tratamiento bien tolerado por los pacientes y sin causar reacciones adversas (Oliunin et al, 1996).

La AR es una de las enfermedades más comunes dentro de los padecimientos autoinmunes. Es un desorden inflamatorio crónico que afecta principalmente las articulaciones y que lleva a su destrucción progresiva. La prevalencia total estimada mundial es aproximadamente del 1% y se presenta con más frecuencia en mujeres que en hombres con una proporción de 2.5 a 1. (Lee y Weinblatt, 2001).

La inmunohistopatología de la sinovia temprana en el curso de la AR representa una respuesta clásica de hipersensibilidad tipo crónica involucrando producción de citocinas proinflamatorias Th1. Esto hace pensar que más tarde, citocinas como IL-1 β y TNF α , median la destrucción en curso de cartílago, hueso subcondral y otros tejidos relacionados con la articulación (Smith y Haynes, 2002).

Los modelos animales de laboratorio tienen gran relevancia para el entendimiento de los mecanismos y condiciones de evolución de la enfermedad, debido a la falta de capacidad para desarrollar procedimientos que por razones éticas o prácticas no se realizan en humanos (Weringer y Gladue, 1998).

La inmunización de ratones BALB/c con proteoglicano induce una poliartritis y espondilitis progresiva en ésta cepa. Los estudios de las características clínicas e

histológicas de las articulaciones de estos ratones revelan muchas similitudes con la AR humana (Finnegan et al, 1999 y Kaplan et al, 2002).

El extracto tímico purificado Tactivin se ha estudiado en la modulación de diferentes enfermedades pero, en la actualidad, se desconoce su efecto sobre las interleucinas iniciadoras de la inflamación como lo son la IL-1 β y TNF α en el caso de la AR, así como su efecto en la normalización del índice de proliferación linfocitaria a través de la regulación de IL-2 en condiciones de ésta enfermedad.

La realización del presente trabajo tiene como finalidad estudiar el efecto de Tactivin sobre estas interleucinas y en el índice de linfoproliferación, de manera que al establecer el efecto, Tactivin se considere como alternativa de tratamiento para la enfermedad en un modelo animal que patológicamente es similar en humano.

ANTECEDENTES

EXTRACTOS DE TIMO

La mayoría de las fracciones tímicas comercialmente disponibles son derivadas de timo de bovino.

Muchas de las investigaciones básicas y clínicas de los últimos 15 años se han llevado a cabo en los países de Rusia, Polonia, Italia, España, Alemania y Suiza.

Los datos que aparecen en la literatura sugieren que hay varias diferencias en los productos tímicos líquidos. Sin embargo, los resultados del uso de estas preparaciones líquidas, muestran una efectividad de las fracciones tímicas en la estimulación celular si se administra por inyección o vía oral.

Los extractos de timo han sido mostrados como moduladores de la producción, maduración y activación de linfocitos T y macrófagos y como estimuladores de la conversión de timocitos inmaduros. En los linfocitos T maduros, los extractos tímicos muestran incremento en número y función de linfocitos T cooperadores inducidos y de células supresoras (Wilson, 1999).

EXTRACTO DE TIMO PURIFICADO TACTIVIN

El extracto Tactivin es una preparación que contiene hormonas aisladas de timo de bovino de estructura polipeptídica. Desde 1985 Tactivin se produce por la industria farmacéutica de Rusia con el nombre comercial de Tactivin para la rehabilitación del sistema inmune (Arion y Zaitseva, 1995). Su uso inmunomodulador ha sido descrito en algunas enfermedades humanas desde 1985, por ejemplo linfogranulomatosis, algunas condiciones oncológicas, enfermedades de la piel, sepsis neonatal, inmunodeficiencias primarias, y sólo levemente descrita en esclerosis múltiple (Wilson, 1999). Las indicaciones para el uso de Tactivin fueron en parámetros inmunológicos anormales y en la mayoría de los casos, bajo pruebas *in vitro* e *in vivo*, éstos volvían a la normalidad o mostraban tendencias hacia la normalidad bajo la acción de Tactivin (Arion, 1989). También se reportó como un tratamiento bien tolerado por los pacientes y sin causar reacciones adversas (Oliunin et al, 1996).

El uso de Tactivin y mielolípidos por separado y combinados, fueron capaces de disminuir el rango de mortalidad en ratones infectados con influenza letal, sus efectos inmunológicos se manifestaron por un incremento en la funcionalidad de la inmunidad mediada por linfocitos T (Aleksandrova et al, 1989).

El extracto Tactivin restableció las estructuras membranales en esplenocitos dañados, los cuales fueron cultivados *in vitro* provenientes de ratones timentomizados (Arion, 1990).

Se observó la eficacia de Tactivin en la normalización de algunos parámetros inmunológicos, en pacientes con enfermedades inflamatorias agudas del área maxilofacial (Arion et al, 1996).

A pacientes de 30 años de edad con tuberculosis activa se les dio el extracto tímico Tactivin como parte de un régimen terapéutico multimodal. Los resultados muestran una elevación de linfocitos T cooperadores, aumentando la actividad de los linfocitos y un incremento en la síntesis de IL-2. También se observó incremento en la actividad de las células NK y en la síntesis de IL-1 por macrófagos (Adambekov et al, 1996).

El empleo de Tactivin como medio de corrección inmunológica en el tratamiento complejo de adenocarcinoma en pacientes con carcinoma endometrial, disminuye la frecuencia de complicaciones inducidas por radiación y muestra un pronunciado efecto inmunocorrector. Ésto fue indicado por los niveles incrementados de linfocitos (incluyendo $CD4^+$, $CD8^+$ y $CD19^+$), coeficiente cooperador ($CD4^+/CD8^+$) y la actividad fagocítica de neutrófilos (Venediktova, 2001).

En estudios realizados con modelos animales se han encontrado que la inyección de Tactivin subcutáneamente en dosis de 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso en ratones machos por tres días normaliza la actividad de células NK suprimidas después de una intoxicación aguda con alcoholes y preparaciones colinotrópicas (Zabrodskii et al, 2003).

Los resultados de experimentos en ratones machos mongrel muestran que un tratamiento de tres días con Tactivin con una dosis de 2.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso restauran la actividad de células NK reducida por intoxicación aguda (1DL50) con glycol etileno (EG) metanol (MeOH) y etanol (EtOH) (Zabrodskii et al, 2003).

INFLAMACIÓN

La inflamación puede ser definida como la respuesta normal al vivir una herida o infección en el tejido.

La respuesta inflamatoria representa un proceso biológico y bioquímico complejo que involucra células del sistema inmune y mediadores biológicos (Rankin, 2004).

Las células que participan en la respuesta inflamatoria son los neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los neutrófilos y macrófagos son importantes en las reacciones inflamatorias agudas y los linfocitos en las crónicas (Caballero, 2004).

El proceso inflamatorio crónico, es el mecanismo patogénico básico de reacciones contra fármacos, sustancias tóxicas y enfermedades como la AR. La inflamación, es sobre todo una respuesta protectora, sin embargo los procesos inflamatorios crónicos pueden ser perjudiciales (Gil, 2002). La acumulación persistente y activación de leucocitos son el sello de la inflamación crónica, lo que sugiere una disfunción de éstos mecanismos; las aproximaciones clínicas actuales para el tratamiento de la inflamación, están enfocadas en su mayor parte en la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios y en la supresión del inicio de la respuesta inflamatoria (Toshitatsu y Akihiko, 2002).

AUTOINMUNIDAD

El sistema inmune debe reconocer y erradicar a ciertos antígenos que podrían ser dañinos para el individuo, si no es capaz de hacerlo adecuadamente se habla de una tolerancia inmunológica. Cuando por algún motivo el individuo se vuelve víctima de su propia respuesta inmunitaria nos referimos a la presencia de autoinmunidad. Ésta se considera una falla en la regulación inmune normal de nuestro organismo. Los diferentes mecanismos inmunopatogénicos mediante los cuales pueden ocurrir los fenómenos de autoinmunidad y daño tisular serían:

- Antígenos ocultos que no son reconocidos por el sistema inmune y que al liberarse podrían disparar la respuesta inmune.

- Mimetismo molecular que hace reacción cruzada con constituyentes autólogos del organismo.
- Antígenos de reacción cruzada: inmunización con un antígeno exógeno puede estimular una respuesta a un antígeno autólogo.
- Alteración en la inmunoregulación: con pérdida en la función de las células supresoras y activación de las cooperadoras que puede traer como efecto neto una activación policlonal, en especial de linfocitos B y la producción de múltiples autoanticuerpos como en el lupus eritematoso sistémico.
- Formación de inmunocomplejos: formado por un antígeno exógeno y un anticuerpo específico y son reconocidos por linfocitos B que expresan especificidad para el factor reumatoide.
- Antiidiotipos: autoanticuerpos dirigidos contra una sola cadena de las inmunoglobulinas.
- Penetración de células vivas. Un anticuerpo sería capaz de penetrar una célula viva ocasionando de ésta manera daño celular (Caballero, 2004).

ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades más comunes dentro de los padecimientos autoinmunes. Es un desorden inflamatorio crónico, que afecta principalmente las articulaciones y que lleva a su destrucción progresiva. El daño del cartilago articular y del hueso representa la característica más predominante de la enfermedad y resulta de la interacción de hiperplasia sinovial, de la inflamación crónica y de la autoinmunidad. Su patogénesis aún permanece parcialmente entendida (Lee y Weinblat, 2001).

Las articulaciones son las estructuras que unen los huesos entre sí y permiten la movilidad del cuerpo. Las porciones finales de los huesos están recubiertas por unas superficies lisas que son los cartílagos, los cuales permiten el rozamiento suave entre un hueso y otro. Los cartílagos poseen una membrana que los cubre, los protege y los alimenta, llamada membrana sinovial, ésta es la que se encuentra inflamada durante la

AR y es la responsable del dolor, la hinchazón y de la sensación de rigidez de los miembros afectados. La persistencia de la inflamación de la membrana sinovial lleva consigo que ésta dañe al hueso en el lugar en que se fija al mismo, produciendo pequeñas muescas (erosiones). Además, la inflamación mantenida o frecuente de una articulación puede hacer que el cartilago que permite el rozamiento suave entre los huesos adelgace y desaparezca. (Sociedad Española de Reumatología, 2001)

La AR está caracterizada de un tejido llamado pannus, que se conforma por linfocitos T activados, macrófagos, y células dentro de la membrana sinovial. Dentro de este pannus, la inflamación, la proliferación y las respuestas inmunes humorales y celulares permiten la liberación de metaloproteasas y otros mediadores que degradan el cartilago y el tejido conectivo de las articulaciones.

El síntoma predominante de la AR es la inflamación de las articulaciones periféricas, que producen el dolor característico y la dificultad para el movimiento. El curso clínico de la enfermedad es muy variable y va desde una forma muy suave, a una artritis que puede causar pérdida del movimiento, donde aparece una inflamación multisistémica rápida y progresiva. En general su duración es larga, de ahí que se le considere una enfermedad crónica, con gran morbilidad y mortalidad (Lee y Weinblat, 2001).

Panorama epidemiológico de AR en el mundo

La AR afecta cerca del 1% de la población mundial en una proporción femenino/masculino de 2.5/1. Ésta enfermedad ocurre a cualquier edad, pero es más común entre los 40 y 70 años, ésta incidencia aumenta con la edad. La distribución geográfica de la AR es en todo el mundo (Lee y Weinblatt, 2001).

Panorama epidemiológico de AR en nuestro país

Actualmente en nuestro país hay más de 700 mil personas con AR. Las estadísticas muestran que en México al menos una de cada 200 personas puede padecer esta enfermedad, la incidencia es superior en el sexo femenino que en el masculino en proporción de tres a uno. La AR afecta a individuos de cualquier edad y género, aunque preferentemente se observa en mujeres de 30 a 50 años (Medina et al, 1997). En un

estudio de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) efectuado en diferentes países latinoamericanos, incluido México, se muestra que la AR representa la segunda enfermedad reumática reportada por los especialistas (Pérez y Pérez, 2000).

MECANISMO DE LA DESTRUCCIÓN DE TEJIDO EN AR

Las manifestaciones clínicas de la AR son iniciadas por linfocitos que están localizados en el tejido sinovial, donde, cuando se activan causan dolor e hinchazón. Estos linfocitos producen proteínas mediadoras (citocinas) que inician la inflamación, atraen otras células inmunes al sitio, activan células residentes y causan exceso de producción de fluido sinovial. En éste proceso, los linfocitos T se fijan a las paredes del vaso por moléculas de superficie que reconocen moléculas de adhesión expresadas en células endoteliales. Los linfocitos T llegan por medio de procesos complejos que pasan a través del endotelio vascular y entran al tejido sinovial. Después que los linfocitos T llegan a la sinovia, ellos pueden interactuar con macrófagos residentes, sinoviocitos tipo A que pueden tener antígenos adquiridos no identificados en la superficie. En consecuencia de esta interacción, los linfocitos T son activados y son producidas varias citocinas.

El mecanismo que previene las infecciones y previene contra transformaciones malignas de las células se destruye en la AR. En la AR el severo proceso destructivo continuo está dirigido por linfocitos T. Este proceso destructivo incluye la producción de citocinas proinflamatorias y activación de linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células que producen metaloproteasas capaces de digerir cartilago.

Los neutrófilos son células predominantes en el fluido sinovial de pacientes con AR, que atacan por medio de radicales libres.

Los linfocitos T y macrófagos en la sinovia de pacientes con AR también producen varias citocinas que dañan el tejido directamente o por efectos consecuentes, tal como inducción de síntesis de enzimas. Las citocinas asociadas a Th1 y Th2 median la inflamación en la sinovia y daños en el tejido de la articulación. La producción de IL-2 por linfocitos Th1CD4+ causa innumerables efectos consecuentes, incluyendo estimulación de macrófagos para producir IL-1 β y TNF α , ambos están envueltos en la

destrucción de tejido, IL-1 β por vía de activación de metaloproteasas y TNF α por vía indirecta en el papel citotóxico.

Se sabe que la apoptosis se incrementa en el tejido sinovial de la AR. La destrucción de condrocitos por apoptosis es un mecanismo de daño de tejido en AR. Sin embargo, la inhibición de la apoptosis puede también jugar un papel en la respuesta inmune en tejido sinovial de la AR. Durante una respuesta inmune, la apoptosis elimina primariamente células que están activadas, estas células tienen que ser programadas para preformar una función específica, tal como la síntesis de enzimas o citocinas. La apoptosis previene la creación irregular de productos celulares (Smith y Haynes, 2002).

LINFOCITOS T

Los linfocitos T constituyen la mayoría de los linfocitos circulantes en el torrente sanguíneo, los cuales se encargan de mediar la inmunidad celular o la inmunidad de las respuestas celulares.

Los linfocitos T son los ordenadores de la respuesta inmunitaria en la inflamación crónica ya que, una vez activados, secretan las citocinas que dirigen y activan específicamente a las células efectoras como los macrófagos; también son capaces de inducir a los linfocitos B a producir anticuerpos con especificidad antigénica (Caballero, 2004).

Varias líneas de evidencia implican la participación de los linfocitos T en la patogénesis de la AR.

Los linfocitos T son parte de la infiltración mononuclear en la sublínea sinovial y, con pequeñas diferencias, éstos linfocitos pueden organizarse en agregaciones similares al origen de los nodos linfoides y placas de Peyer (Lee y Weinblatt, 2001).

Algunas evidencias sugieren que el papel de los linfocitos T en la AR puede ser la de modular las respuestas de la inflamación sinovial; la activación directa de monocitos por linfocitos T puede inducir la producción de TNF α (Jenkins et al, 2002).

MONOCITOS/MACRÓFAGOS

Amplios datos sugieren que los monocitos en la sinovia estimulan la secreción de factores de inflamación local y conducen a un proceso inflamatorio destructivo que transforma fibroblastos sinoviales en células agresivas capaces de destruir cartilago en la ausencia de monocitos o linfocitos. Esta hipótesis da lugar a otros tipos de células diferentes a los linfocitos, en el centro de la patogénesis de la AR e inflamación crónica, pero aún permite un papel por los linfocitos T en la iniciación de un proceso inmune que resulta en conducir a monocitos y fibroblastos a una artritis crónica erosiva (Jenkins et al, 2002).

LINFOCITOS B

Los linfocitos B se producen en la médula ósea y expresan inmunoglobulinas en su superficie. A través de los linfocitos B maduros y los plasmocitos, se producen los anticuerpos que median la respuesta tipo humoral o inmunidad humoral. Estas células producen básicamente cuatro tipos de inmunoglobulinas:

IgG- Tiene concentración máxima en suero y penetración a los tejidos. Cruza la barrera placentaria y fija el complemento.

IgM- Produce la primera respuesta contra antígenos. Fija intensamente el complemento y tiene suma importancia en la defensa del huésped contra antígenos hematógenos.

IgA- Es el anticuerpo más importante en la defensa de las mucosas; su producción es local y puede aparecer en secreciones.

IgE- Se une a la superficie de las células cebadas y basófilos, al entrar en contacto con el antígeno libera los gránulos (principalmente de histamina). Es importante en las reacciones alérgicas y en la defensa del huésped contra parásitos.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas pueden recubrir o neutralizar los microorganismos invasores para impedir el acceso al huésped, también fijan el complemento (IgG e IgM) produciendo quimiotáxis celular, con aumento de la permeabilidad vascular y lisis de las células blanco. Finalmente pueden recubrir a partículas extrañas mediante el proceso de opsonización con lo que aumenta la

capacidad fagocitaria de las células que tienen receptores para inmunoglobulinas en sus superficies (macrófagos y basófilos) (Caballero, 2004).

CITOCINAS

Las citocinas son proteínas solubles producidas por una amplia variedad de células, tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas. Éstas proteínas participan en la regulación del crecimiento, desarrollo y activación de las células del sistema inmune y la mediación de la respuesta inflamatoria (Caballero, 2004).

Por medio de las citocinas, las células del sistema inmune y de otros sistemas pueden comunicarse entre ellas. Las citocinas juegan un papel extremadamente importante en la mediación del proceso de inflamación. Las acciones de las citocinas pueden ser aditivas, sinérgicas o inhibitorias con respecto a la función del sistema inmune.

Las citocinas pueden actuar en las células que las producen y en las que están cerca; ésto es conocido como actividad autócrina y parácrina respectivamente. Aunque poco común, las citocinas también exhiben funciones endocrinas. Son importantes para el funcionamiento e integración de la respuesta inmune.

Un ejemplo de producción de citocinas tales como $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 ocurre en la inflamación de tejido sinovial de pacientes con AR.

Algunas características importantes de las citocinas son:

- Diferentes células del cuerpo pueden producir iguales tipos de citocinas,
- Actúan sobre diferentes tipos de células bajo diferentes circunstancias,
- Diferentes citocinas pueden tener iguales actividades dependiendo de la situación,
- Pueden actuar en combinación con alguna otra citocina produciendo efectos sinérgicos en las células blanco (Rankin, 2004).

Desde el punto de vista de la inmunoregulación podemos dividir las citocinas de la siguiente manera:

- Inmunoregulatorias: Con funciones en la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos y monocitos. Ej. IL-2, IL-4.

- Proinflamatorias: Producidas predominantemente por fagocitos mononucleares en respuesta a agentes infecciosos. Ej. IL-1, IL-6, TNF α .
- Regulatoras del crecimiento y diferenciación de leucocitos inmaduros: Como la IL-3, IL-7 (Caballero, 2004).

IL-1 y TNF α son citocinas producidas principalmente por monocitos y macrófagos tisulares y son las mejores citocinas en la línea inicial de defensa contra patógenos como parte del sistema inmune innato. Los efectos mayores de estas citocinas en enfermedades pueden ser la estimulación para la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y la inducción de la producción y liberación de metaloproteasas de la matriz de fibroblastos, condrocitos, osteoblastos y otras células (Arend, 2003). Las citocinas proinflamatorias, específicamente IL-1 y TNF α , están fuertemente asociadas con la hipertrofia sinovial y destrucción de cartílago y hueso (Rankin, 2004). Son consideradas las citocinas clave en el desarrollo de la AR (Amgen Inc., 2003).

IL-1 (Interleucina 1)

La IL-1 es una citocina producida por monocitos/macrófagos presentes en el tejido y fluido sinovial. Es una potente citocina proinflamatoria que también es el mediador predominante de la diferenciación y activación de osteoclastos (Jenkins et al, 2002). La IL-1 causa síntomas sistémicos incluyendo fiebre y anorexia, activa linfocitos T, estimula células endoteliales para la proliferación y para la expresión de moléculas de adhesión por neutrófilos (Piecyk y Anderson, 2001).

La IL-1 tiene un rango amplio de mecanismos patológicos dentro de la AR (Amgen Inc., 2003).

La citocina IL-1 es producida en respuesta al estímulo inflamatorio y ocurre en procesos fisiopatológicos incluyendo degradación de cartílago y reabsorción de hueso (Rankin, 2004).

La IL-1 α e IL-1 β son producidas principalmente por fagocitos mononucleares, pero también por células endoteliales, fibroblastos y linfocitos T.

La IL-1 β es la citocina con más responsabilidad en la destrucción del cartílago y hueso en la AR. El mecanismo de ésta destrucción incluye la estimulación de células

sinoviales y condrocitos para producir metaloproteasas y prostaglandina E_2 , reducción de la producción de proteoglicanos y colágena de cartilago tipo II y IX, y un incremento de reabsorción de hueso (Piecny y Anderson, 2001).

La IL-1 β tiene varias funciones fisiológicas tales como inducción de la inflamación, modificación de respuesta inmune y activación de osteoclastos (Kagari et al, 2002).

TNF α (Factor de Necrosis Tumoral α)

;

El TNF α está presente en grandes cantidades en el fluido y tejido sinovial (Lee y Weinblatt, 2001) Estudios *in vitro* demuestran que TNF α regula la expresión de otras citocinas proinflamatorias (Feldmann, 2001). Induce a IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, estimula el factor de producción de colonias de macrófagos e induce la expresión de moléculas de adhesión. TNF α también induce la producción de prostaglandina E_2 , colágena tipo I y tipo II y colagenasa de células sinoviales (Piecny y Anderson, 2001).

El TNF α en la AR parece ser responsable primario de dirigir la inflamación. Esta citocina asume una variedad de funciones en el cuerpo humano (Amgen Inc., 2003). También está involucrado en la infamación, diferenciación y proliferación de linfocitos T y B, así como la absorción del hueso (Kagari et al, 2002). Se ha demostrado que niveles elevados de TNF α persisten en pacientes con AR severa (Rankin, 2004).

IL-2 (Interleucina 2)

La IL-2, también llamada factor de crecimiento de linfocitos T, que es producida principalmente por linfocitos T cooperadores cuando son activados por mitógenos o antígenos, y se caracteriza por determinar, fundamentalmente, la expansión clonal de éstas células, también es capaz de provocar diversos efectos en otras células relacionadas con el sistema inmune; puede tener actividad autócrina: diferenciación de células antígeno-específicas y actividad parácrina: activación de linfocitos B y células NK (Rankin, 2004).

Las células que poseen receptores específicos de alta afinidad (IL-2R) son: linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), timocitos y monocitos; pero aunque la IL-2 interactúa con su receptor, solamente los linfocitos T son las que reciben la señal que activa a los genes que codifican a esta citocina para inducir su síntesis. Cuando los linfocitos T son estimulados por antígenos presentados al receptor T por las células accesorias, ellos responden con la proliferación autócrina y con la liberación de otras citocinas: IL-4, 5, 6, además de la IL-2, las cuales actúan a su vez sobre otros linfocitos T, de modo que la expansión clonal de éstas depende de la IL-2 y sus receptores.

La IL-2 incrementa, además, la citotoxicidad de las células NK y de los monocitos e induce la proliferación y la diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos (González et al, 1997). Debido a esta acción mitogénica y citotóxica, la IL-2 se ha utilizado en diversos protocolos clínicos con la finalidad de influir en la respuesta inmunológica celular en el tratamiento de neoplasias; desgraciadamente su uso es limitado por ser altamente tóxica al administrarse *in vivo* (Rangel-Corona et al, 2001).

Este factor presenta un marcado interés clínico debido al control que ejerce sobre numerosas reacciones inmunes. Se ha comunicado que un defecto en su producción puede inducir una respuesta inmune anormal en pacientes trasplantados con médula ósea. La disminución de IL-2 se ha encontrado asociada también con la inmunodeficiencia combinada severa, con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, con la diabetes mellitus tipo I, con el lupus eritematoso sistémico y con otras enfermedades autoinmunes; mientras que se ha señalado su aumento en pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC-B) (González et al, 1997).

MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS REUMATOIDE

El entendimiento de los procesos inmunológicos involucrados en la enfermedad mediada por linfocitos T en humanos, se ha visto enormemente beneficiado del estudio de procesos similares en animales.

Los modelos animales de laboratorio tienen gran relevancia para el entendimiento de los mecanismos y condiciones de evolución de la enfermedad, debido a la falta de capacidad para desarrollar procedimientos que por razones éticas o prácticas no pueden ser realizados en humanos (Weringer y Gladue, 1998).

La AR es una enfermedad definida por criterios basados en la clínica. Es común que ésta sea fenotípica y genéticamente heterogénea. No existe entonces un modelo óptimo para AR y hay varios modelos que pueden ser usados para entender las diferentes partes de la patogénesis que conducen a la enfermedad (Holmdahl, 2002).

Para el estudio de la AR está permitido y se han utilizado modelos animales de rata y ratón por su importante colaboración para el entendimiento de los procesos de la enfermedad (Steffen, 2000), ya que presentan características clínicas que se parecen a la AR de humanos. Hay estudios desde 1987 de inmunización con proteoglicano de cartilago fetal humano y adyuvante completo de Freund (por sus siglas en inglés CFA), lo cual indujo poliartritis y espondilitis en ratones BALB/c hembras. Los síntomas externos iniciales de la inflamación articular fue hinchazón y enrojecimiento. Ésta estuvo asociada con edema de la sinovia y tejido periarticular y basta proliferación de células, el cual alcanza su máximo durante las semanas 7-9 del experimento. La infiltración de células mononucleares, con concentración perivascular y oclusión de vasos pequeños, fue común, así como una sinovitis incrementada severamente, erosiones de hueso y de cartilago articular. La espina lumbar y los discos intervertebrales proximales de la cola también exhibieron cambios inflamatorios y degenerativos (Glant et al, 1987).

En ratones, los mejores modelos son artritis inducida con colágena y la artritis inducida con proteoglicano. La poliartritis progresiva inducida con proteoglicano en ratón BALB/c es un modelo animal que desarrolla características similares a la AR humana y una espondilitis anquilosante como indican valores clínicos, parámetros inmunológicos y estudios inmunopatológicos de articulaciones diartrodiales y espinales (Glant et al, 1992)

La artritis inducida con proteoglicano, se lleva a cabo mediante inyecciones intraperitoneales de proteoglicano con CFA y adyuvante incompleto de Freund (por sus siglas en inglés IFA) en ratones de la cepa BALB/c hembras ya que son más susceptibles

que machos; el desarrollo de la poliartritis, la presencia del factor reumatoide y la sedimentación de complejos inmunes en las articulaciones indican que éste modelo presenta características típicas de la artritis humana. La artritis, aparece dos semanas después de la última inmunización y ésta puede ocurrir en cualquiera de las extremidades (Joe y Wilder, 1999).

Sin embargo, debe considerarse que a pesar de la gran cantidad de modelos experimentales disponibles, ninguno mimetiza completamente la enfermedad humana (Weringer y Gladue, 1998).

JUSTIFICACIÓN

La AR es una enfermedad autoinmune que produce un proceso inflamatorio crónico. El tratamiento de ésta enfermedad se basa en la administración de antiinflamatorios no esteroideos y corticoides que reducen la sintomatología del paciente, pero no cambian el curso de la enfermedad. Los fármacos de acción lenta (moduladores) pueden modificar la evolución de la enfermedad, controlando la inflamación y retrasando la progresión de erosomas articulares.

El extracto tímico purificado Tactivin es una preparación que contiene hormonas aisladas de timo de bovino que actúa como inmunomodulador de respuesta inmune alterada, con potencial para modificar la evolución de la AR y así ser una importante alternativa para el tratamiento de ésta enfermedad.

HIPÓTESIS:

El extracto tímico purificado Tactivin administrado en ratones con artritis inducida con proteoglicano normaliza la linfoproliferación a través de regulación de la síntesis de IL-2 y disminuye la inflamación articular, así como el nivel sérico de TNF α e IL-1 β .

OBJETIVOS

GENERAL:

Evaluar el efecto del extracto tímico purificado Tactivin sobre los niveles séricos de IL-1 β , TNF α e IL-2 en un modelo Murino de Artritis Reumatoide.

PARTICULARES:

- Reproducir el Modelo Murino de Artritis Reumatoide inducido con proteoglicano de pollo en ratones hembras de la cepa BALB/c.
- Registrar las marcas visuales (RMV) de la evolución de la artritis bajo el tratamiento con Tactivin en diferentes rangos de administración por vía subcutánea.
- Realizar un cultivo de esplenocitos y evaluar el índice de proliferación.
- Cuantificar los niveles séricos de TNF α , IL-2 e IL-1 β en ratones con AIP tratados con Tactivin.

TIPODE ESTUDIO

Experimental, comparativo y longitudinal.

VARIABLES

Independiente:

Tratamiento de ratones BALB/c con el extracto de timo purificado Tactivin en diferentes tiempos de administración.

Dependientes:

Signos articulares (Mediciones de diámetros).

Porcentaje diferencial de células blancas (leucocitos).

Índice de proliferación.

Niveles séricos de TNF α , IL-1 β e IL-2.

Criterios de inclusión.

Ratones hembras sanas de la cepa BALB/c con peso promedio 20-22 gr.

Criterios de no inclusión.

Ratones machos, otra cepa de ratones que no sean BALB/c, presentación de enfermedades infectocontagiosas, peso mayor al estipulado.

PERÍODO: Noviembre del 2003 a Octubre del 2004.

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN OBJETO DEL ESTUDIO

Se utilizaron 20 ratones singénicos BALB/c hembras, provenientes del Bioterio del CIBO-IMSS de 8 semanas de edad, formados en 8 grupos, alojados en jaulas de acrílico, se mantuvieron en ciclos alternos de iluminación-oscuridad de 12h, alimentados con una dieta balanceada para roedores y agua en consumo voluntario.

INDUCCIÓN DE AR EXPERIMENTAL

La inducción de artritis, en ratones hembras de la cepa BALB/c se llevo a cabo mediante 4 inmunizaciones con proteoglicano de pollo (clave P-5989 de Sigma) emulsificado en CFA.

1a. Inmunización:

Inyección intraperitoneal de 100 μ g de proteoglicano emulsificado en CFA a las 8 semanas de edad de los ratones.

2a. Inmunización:

Inyección intraperitoneal de 100 μ g de proteoglicano emulsificado en IFA a los 7 días posteriores a la primera inmunización.

3a. Inmunización:

Inyección intraperitoneal de 100 μ g de proteoglicano emulsificado en IFA a los 28 días posteriores a la primera inmunización.

4a. Inmunización:

Inyección intraperitoneal de 100 μ g de proteoglicano emulsificado en IFA a los 49 días posteriores a la primera inmunización.

(Finnegan et al, 1999).

Los ratones se mantuvieron en condiciones de bioterio, evaluándose el inicio y seguimiento de la enfermedad a través de los signos clínicos que presentaron, tales como

la inflamación en las articulaciones de las extremidades. Los primeros signos de artritis, aparecieron 2 semanas después de la última inmunización.

Una vez iniciados los primeros síntomas de la enfermedad, se separaron los grupos de ratones de manera aleatoria.

MEDICIÓN DE LAS ARTICULACIONES

La evaluación de la inflamación, se efectuó por el registro de marcas visuales (RMV) antes de la inmunización (día cero) y después, dos veces semanalmente hasta el término del tratamiento, por un observador externo que no tenía información de cuales grupos estaban inducidos con la enfermedad, cuales no o cuales tenían algún tipo de tratamiento. Se utilizó como instrumento de medición un vernier. Las mediciones se hicieron en el codo y muñecas de las patas delanteras y en el metatarso y rodilla de las patas traseras.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA LOS DISTINTOS GRUPOS

Grupo 1: 4 ratones artríticos con tratamiento 1 vez al día. 1 inyección subcutánea diaria vespertina, dosis de 0.1ml de la solución de Tactivin (equivalente a 10 μ g del extracto).

Grupo 2: 4 ratones artríticos con tratamiento 2 veces al día. 1 inyección subcutánea matutina y 1 vespertina, dosis de 0.1ml de la solución de Tactivin (equivalente a 10 μ g del extracto).

Grupo 3: 4 ratones artríticos sin ningún tipo de tratamiento.

Grupo 4: 1 ratón sano con tratamiento 1 vez al día. 1 inyección subcutánea diaria vespertina, dosis de 0.1ml de la solución de Tactivin (equivalente a 10 μ g del extracto).

Grupo 5: 2 ratones sanos con tratamiento 2 veces al día. 1 inyección subcutánea matutina y 1 vespertina, dosis de 0.1ml de la solución de Tactivin (equivalente a 10 μ g del extracto).

Grupo 6: 2 ratones sanos con inyecciones subcutáneas de solución salina fisiológica 1 vez al día.

Grupo 7: 2 ratones sanos con inyecciones subcutáneas de solución salina fisiológica 1 matutina y 1 vespertina.

Grupo 8: 1 ratón sano sin ningún tipo de tratamiento.

15 días después de la última inmunización (tiempo en que se hicieron más evidentes los signos de la enfermedad), todos los grupos recibieron su respectivo tratamiento durante 10 días (del día 64 al día 74).

CULTIVO DE ESPLENOCITOS

Se sacrificaron los ratones en 2 días, tomando mínimo 1 representante de cada grupo.

Se anestesiaron a los ratones por inhalación de éter etílico y por punción cardiaca se extrajo sangre, la cual se centrifugó para tomar el suero y congelarlo.

Extracción de esplenocitos de ratón.

Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia y se extrajo el bazo para obtener los esplenocitos de la siguiente manera:

- Disgregar el bazo hasta disolver las partículas grandes. Lavar, reposar y vaciar el líquido a un tubo cónico con 2ml de histopaque, sin romper el gradiente.
- Centrifugar 30 min. a 1500 rpm. Pasar el anillo celular intermedio entre las dos fases a otro tubo y aforar hasta 12 ml con medio para un primer lavado. Centrifugar 5 min. A 1500 rpm y lavar 2 veces más.
- Después del tercer lavado, resuspender y agregar 1 o 2 ml de medio de cultivo Aim V (L-glutamina, sulfato estreptomina 50µg/ml, sulfato gentamicina 10µg/ml) suplementado con 10% de suero bovino fetal.

Cuantificación y viabilidad

Para sacar el porcentaje del total de células vivas extraídas se hace el siguiente procedimiento:

- Poner en un vial 990 μ l de líquido de Turck (Ácido acético al 3%) y agregar 10 μ l de la muestra o de las células resuspendidas en Aim V y mezclar.
- Se cuantificaron las células en cámara de Neubauer.
- Se determinó la viabilidad utilizando el colorante azul tripano.
-

Cultivo de esplenocitos

Una vez obtenidos el conteo y la viabilidad de las células se procedió a cultivarlas.

Se utilizaron placas de cultivo de 96 pozos en los cuales se colocó, en las primeras tres columnas, células en medio de cultivo y en las segundas tres columnas se colocó células en medio de cultivo y adicionando el mitógeno concanavalina.

Después de llenar las placas se procedió a incubar a 37⁰C con 5% de CO₂ por 72 horas.

La lectura fue con espectrofotometría con una longitud de onda de 570 y con un blanco de reactivo, midiendo la absorbancia.

El índice de proliferación se calculó dividiendo el promedio de estimulados con concanavalina entre el promedio de no estimulados.

BIOMETRÍA

Se hizo una biometría con esplenocitos en suspensión mediante un análisis mecanizado con el equipo de citometría Celldyn de la marca Abbot.

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TNF α EN SUERO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

Este ensayo se efectuó de acuerdo al protocolo del proveedor (Pierce Endogen). Es una técnica cuantitativa tipo “sandwich” que se basa en una fase sólida, la cuál utiliza un anticuerpo para el TNF α de ratón unido a los pozos de una microplaca, el cuál se une específicamente al TNF α que se encuentre presente en las muestras del suero. Para hacer evidente la reacción antígeno-anticuerpo, se utiliza otro anticuerpo anti-TNF α de ratón

marcado con la enzima biotina, que se une al $\text{TNF}\alpha$ y se inmoviliza por estar unido al primer anticuerpo anti- $\text{TNF}\alpha$ fijado en la placa. Además utiliza un reactivo amplificador de la reacción, que se une al anticuerpo inmovilizado y al anticuerpo biotinilado para aumentar la sensibilidad de la prueba. Enseguida se adiciona a los pozos un sustrato (avidina), sobre el que actúa la enzima biotina y desarrolla un color proporcional a la cantidad de $\text{TNF}\alpha$ presente en el suero de las muestras experimentales.

Las unidades utilizadas fueron pg/ml.

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-1 β EN SUERO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

Este ensayo se efectuó de acuerdo al protocolo del proveedor (Quantikine).

Es una técnica cuantitativa tipo “sandwich” cuyas bases están descritas en la técnica de ELISA para $\text{TNF}\alpha$.

MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IL-2 EN SUERO A TRAVÉS DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA:

Este ensayo se efectuó de acuerdo al protocolo del proveedor (Pierce Endogen).

Es una técnica cuantitativa tipo “sandwich” cuyas bases están descritas en la Técnica de ELISA para $\text{TNF}\alpha$

RESULTADOS:

Las gráficas siguientes (Fig. 1 a 5) muestran los resultados de las mediciones del diámetro de las articulaciones que se les hicieron a los grupos de ratones del presente estudio, en donde, en el eje de las X se encuentran graficado los días en que se midieron las articulaciones (0 al 76), y en el eje de las Y los milímetros que midieron.

Del día cero (0) al día 60 los ratones recibieron las inmunizaciones requeridas para inducir la artritis experimental y los sanos solo estuvieron en observación; ambos grupos tuvieron 15 días de sólo mediciones, para que en el momento de la aparición de signos (Enrojecimiento e inflamación principalmente) tuvieran 10 días de tratamiento. A partir del día 64 los ratones experimentales recibieron su tratamiento, cada uno sus respectivas soluciones. Los días 75 y 76 fueron los días de sacrificio para obtener suero y proceder al cultivo de esplenocitos.

A partir de la segunda semana después de la última inmunización, los ratones comenzaron a mostrar las señales de la artritis a través del RMV y en su conducta: enrojecimiento y aumento de tamaño de articulaciones, molestia al momento del manejo y alteración de movilidad.

Los resultados de la primer gráfica muestra la comparación del grupo de ratones con artritis inducida con proteoglicano (AIP) que no recibieron ningún tipo de tratamiento (Control artrítico) con el grupo de sanos (sin inducción) que no recibieron ningún tipo de tratamiento (Control sano), en donde el grupo de ratones con AIP muestran medidas amplias, lo cual sugiere que hubo un aumento en el tamaño de la articulación por la AIP en comparación a los sanos.

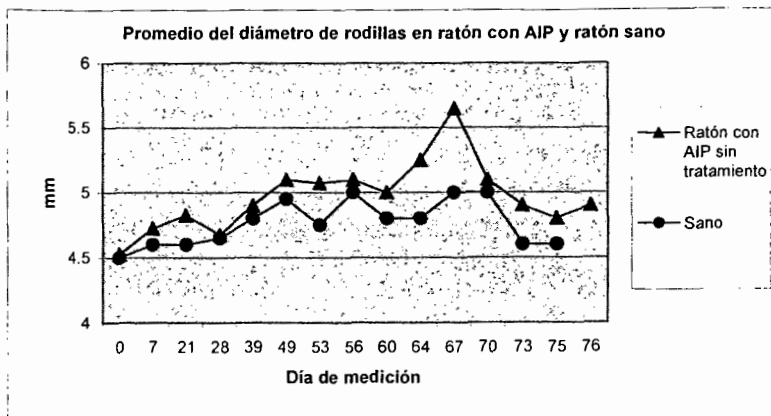


Fig. 1. Comparación de medidas en rodillas de los controles sanos y con AIP.

En las siguientes gráficas (Fig. 2 a la 4) se muestran los resultados de las mediciones de diámetros que tuvieron una diferencia significativa en la prueba estadística “T de student” entre los grupos de ratones que después de inducirles la artritis con proteoglicano se les dio tratamiento por 10 días y ratones con AIP que no recibieron ningún tipo de tratamiento (Controles).

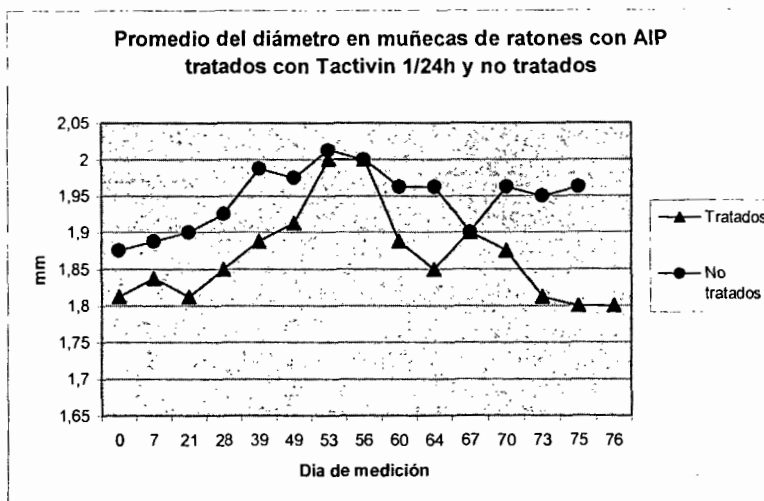


Fig. 2. Comparación de muñecas de ratones con AIP controles y ratones tratados con Tactivin 1 vez al día.

La prueba estadística para gráfica de la figura 2 fue con la hipótesis nula de que la media del diámetro de ambas muestras era igual ($\mu_x = \mu_y$) y la hipótesis alternativa fue que, la media del diámetro de la muestra 1 (μ_x - Ratones con AIP sin tratamiento) era mayor que la media de la muestra 2 (μ_y - Ratones con AIP tratados con Tactivin). La $t_{\alpha 0.1} = 1.44$ y se obtuvo una t para estas dos muestras de $t=1.4555$. Por lo que se dice que, es rechazada la hipótesis nula en donde las medias son iguales y se acepta la hipótesis alternativa, la cual dice que la media del diámetro de los ratones con AIP sin tratamiento es mayor que los ratones tratados con Tactivin.

H_0 - $\mu_x = \mu_y$ – Rechazada

H_a - $\mu_x > \mu_y$ – Aceptada con un 90 % de confiabilidad

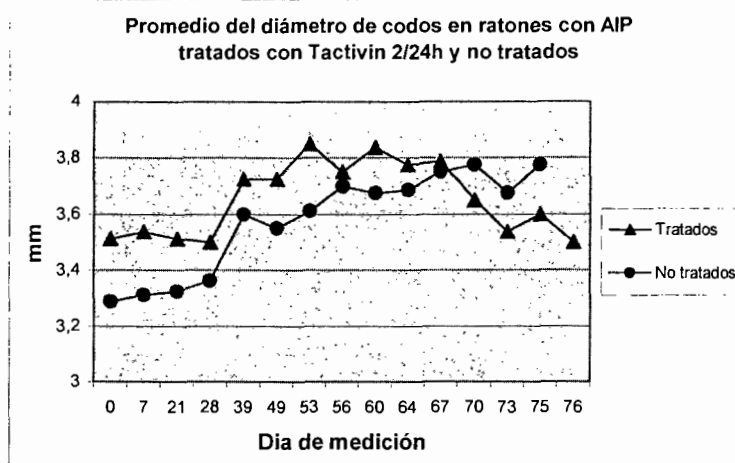


Fig. 3. Comparación del diámetro de codos de ratones con AIP controles y ratones tratados con Tactivin 2 veces al día.

La prueba estadística para la gráfica de la figura 3 fue con la hipótesis nula de que la media del diámetro de ambas muestras era igual ($\mu_x = \mu_y$) y la hipótesis alternativa fue que la media del diámetro de la muestra 1 (μ_x - Ratones con AIP sin tratamiento) era mayor que la media de la muestra 2 (μ_y - Ratones con AIP tratados con Tactivin). La $t_{\alpha 0.05} = 1.943$ y se obtuvo una t para éstas dos muestras de $t= 2.0116$. Por lo que se dice que, es rechazada la hipótesis nula en donde las medias de las mediciones

en diámetros son iguales y se acepta la hipótesis alternativa, la cual dice que la media de las mediciones de diámetro de los ratones artríticos es mayor que los ratones con AIP tratados con Tactivin.

$H_0. \mu_x = \mu_y$ – Rechazada

$H_a. \mu_x > \mu_y$ – Aceptada con un 95 % de confiabilidad

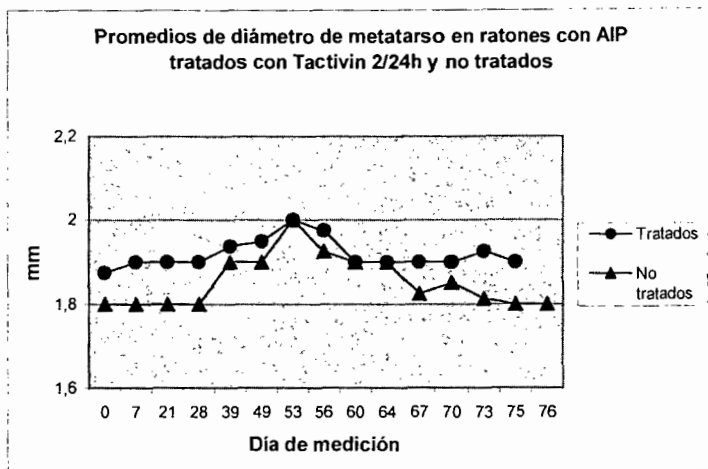


Fig. 4. Comparación de las medidas de diámetro del metatarso de ratones con AIP controles y ratones con AIP tratados con Tactivin 2 veces al día.

La prueba estadística para la gráfica de la figura 4 fue con la hipótesis nula de que la media de las medidas del diámetro de ambas muestras era igual ($\mu_x = \mu_y$) y la hipótesis alternativa fue que, la media de las medidas del diámetro de la muestra 1 (μ_x -Ratones con AIP sin tratamiento) era mayor que la media de las medidas de diámetro de la muestra 2 (μ_y -Ratones con AIP tratados con Tactivin). La $t_{\alpha 0.05} = 1.943$ y se obtuvo una t para éstas dos muestras de $t = 5.0495$. Por lo que se dice que, es rechazada la hipótesis nula de que las medias de diámetros son iguales y se acepta la hipótesis alternativa, la cual dice que la media de la medida de diámetros de los ratones artríticos es mayor que los ratones tratados con Tactivin.

$H_0. \mu_x = \mu_y$ – Rechazada

$H_a. \mu_x > \mu_y$ – Aceptada con un 95 % de confiabilidad

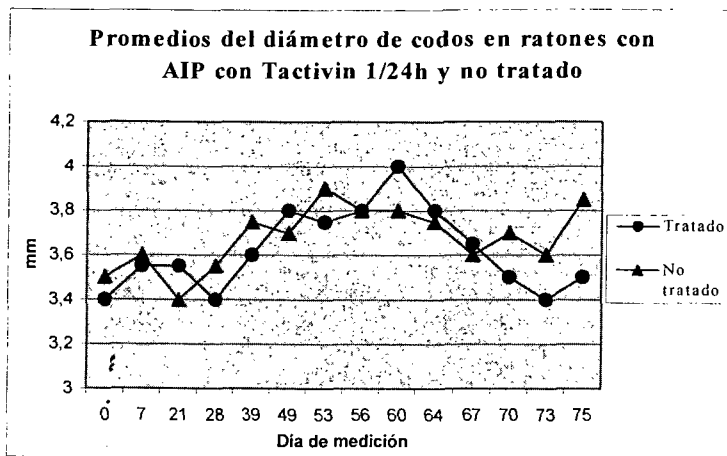


Fig. 5. Comparación del diámetro de codos de ratones con AIP controles y ratones con AIP tratados con Tactivin 1 vez al día.

En la figura 5 se muestra una gráfica en donde se ve la comparación del grupo de ratones con artritis inducida con proteoglicano sin tratamiento y ratones con AIP tratados con Tactivin en donde se ve una diferencia de mediciones de los diámetros pero que no hubo una diferencia estadística significativa en la prueba estadística, por lo que solo muestra una tendencia.

Los resultados de la biometría se muestran en las siguientes gráficas (Fig. 6 a la 8) en donde se encuentra el porcentaje diferencial de cada uno de los tipos celulares.

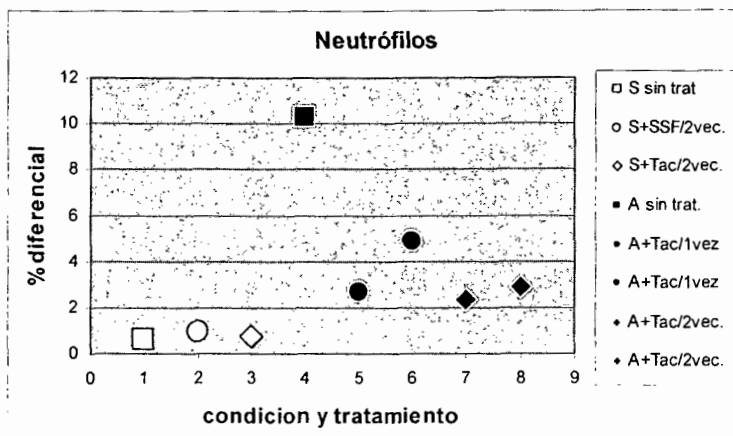


Fig. 6. Porcentaje diferencial de neutrófilos en los diferentes grupos experimentales.

En la gráfica de la figura 6 están representados los ratones sanos con figuras blancas y los ratones con AIP con figuras negras, cada uno con sus diferentes tratamientos. En donde, por la concentración, se ve un porcentaje alto en los neutrófilos del ratón con AIP sin tratamiento, mientras que en los que fueron tratados con Tactivin se nota una disminución, acercándose al porcentaje que mostraron los sanos (no inducidos).

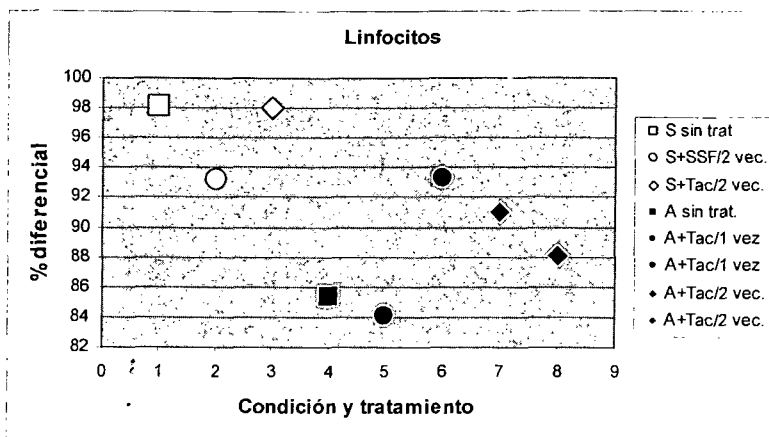


Fig. 7. Porcentaje diferencial de linfocitos en los diferentes grupos experimentales.

Los porcentajes de linfocitos tuvieron una baja en los ratones con AIP sin tratamiento y un tratado con Tactivin, mientras que los sanos mantuvieron con porcentajes altos y la mayoría de los tratados tienen una tendencia a alcanzar los porcentajes de los sanos.

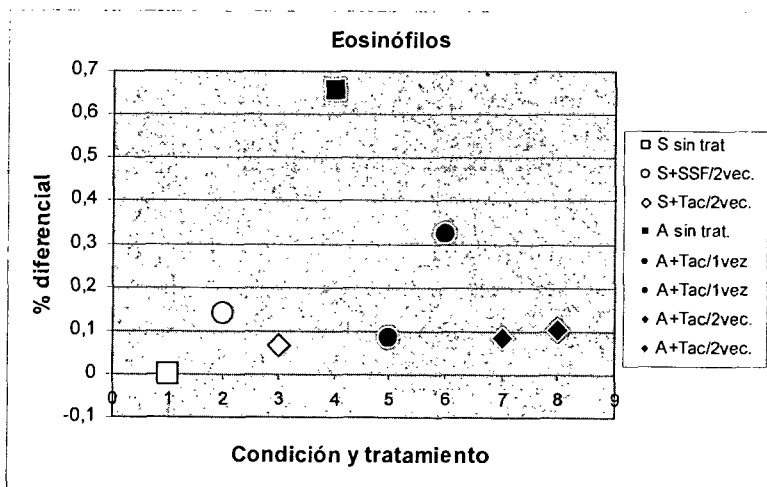


Fig. 8. Porcentaje diferencial de eosinófilos en los diferentes grupos experimentales.

La gráfica de la figura 8 muestra resultados similares a la de neutrófilos con un alto porcentaje en el ratón con AIP sin tratamiento y con bajos porcentajes en los sanos, y en donde el grupo de ratones con AIP tratados con Tactivin disminuyeron su porcentaje acercándose al grupo de sanos.

La figura 9 contiene la gráfica del índice de proliferación de esplenocitos. La gráfica reporta a los ratones representantes de cada uno de los grupos de tratamiento que se sacrificaron el día 75.

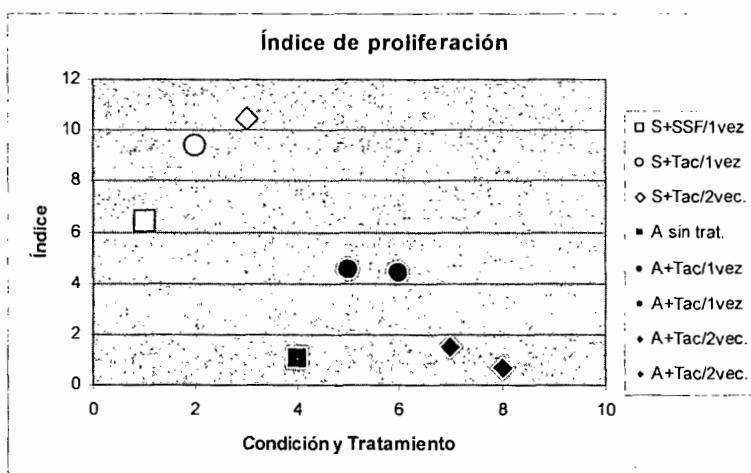


Fig. 9. Índice de proliferación de esplenocitos por ratón/tratamiento.

En la gráfica de la figura 9 se nota un alto índice en el grupo de ratones sanos, y en el ratón con AIP sin tratamiento un bajo índice de proliferación, y 3 de los 4 ratones con AIP tratados tendieron a recuperar el índice siendo éste más alto que el AIP sin tratamiento, de los cuales los 2 más cercanos a los sanos son los que recibieron tratamiento con Tactivin una vez al día.

Las figuras 10, 11 y 12 grafican los niveles séricos de las interleucinas que se pusieron a prueba en cada uno de los grupos de ratones tanto inducidos como no inducidos y con sus respectivos tratamientos.

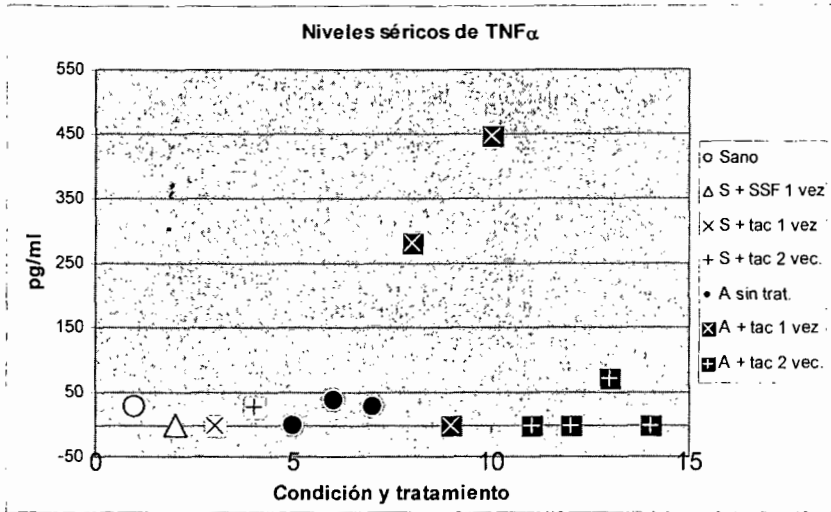


Fig. 10. Niveles séricos de $TNF\alpha$ por ratón/tratamiento.

En los niveles séricos de $TNF\alpha$ no hubo diferencias significantes entre los grupos, ya que tanto sanos, como ratones con AIP sin tratamiento y la mayoría de los ratones con AIP tratados con Tactivin se encuentran dentro del mismo rango.

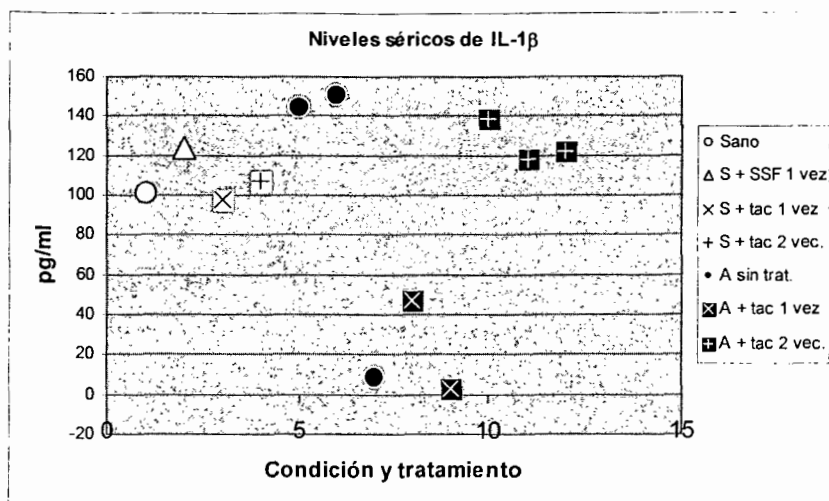


Fig. 11. Niveles séricos de Interleucina 1- β por ratón/tratamiento.

Los niveles séricos de IL-1 β en los ratones no inducidos (sanos) fueron más bajos que los de la mayoría de los ratones con AIP y los niveles de los tratados se asemejó más a los sanos e incluso llegan a tener niveles mucho menores.

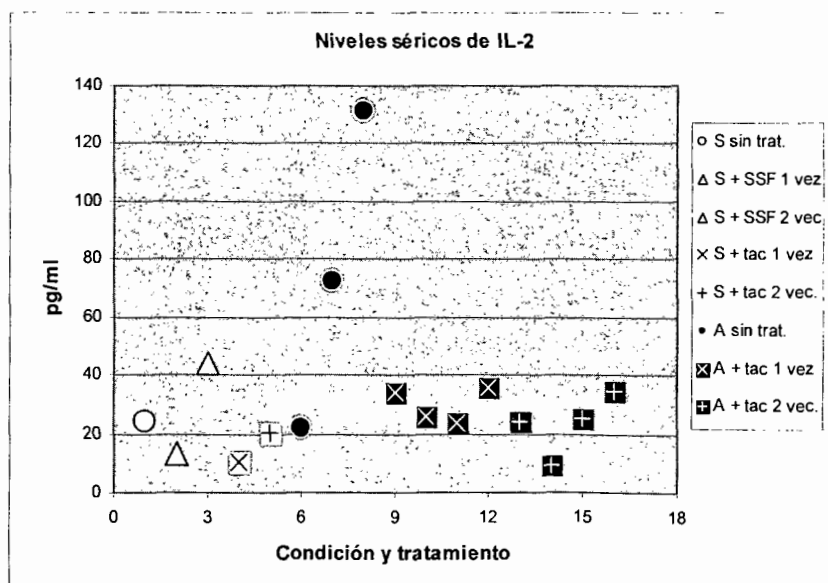


Fig. 12. Niveles séricos de Interleucina 2 por ratón/tratamiento.

Los niveles de IL-2 muestran un incremento notable en la mayoría de los ratones con AIP. Los grupos de sanos y los tratados se encuentran en el mismo rango, no siendo así los ratones con AIP sin tratamiento que presentan niveles más altos.

DISCUSIÓN

Nuestro trabajo demostró que la administración en cuatro ocasiones, durante 49 días de 100 μg de proteoglicano de pollo (clave P-5989 de Sigma), emulsificado en CFA e IFA induce el desarrollo de artritis en ratones hembras de la cepa BALB/c. Éstos datos concuerdan con los reportes de Finnegan (1999) y de Joe y Wilder (1999).

Desde el inicio del experimento de la inducción de artritis con proteoglicano hasta el momento del sacrificio de ratones, se realizó la medición del diámetro de las principales articulaciones de las extremidades, las cuales fueron evaluadas con los promedios del diámetro de las articulaciones, tanto individuales como grupales. Con estos datos promedio, se aplicó la prueba estadística de “t de student”, en la que se observó (Fig. 2) una diferencia significativa entre los grupos de ratones artríticos con 0.1 de probabilidad de error para aceptar la hipótesis alternativa, que propone que las articulaciones de los ratones con AIP no tratados con Tactivin tuvieron mayor la media de diámetros que los ratones con AIP tratados con Tactivin, lo que sugiere un aumento en el diámetro de las articulaciones (signo de inflamación) en los ratones con AIP sin tratamiento y una recuperación en los tratados con Tactivin. Las siguientes dos gráficas (Fig. 3 y 4) muestran el mismo comportamiento pero con una significancia de 0.05, que le da más confiabilidad.

Éstos resultados del registro de marcas visuales, que muestran la presencia de artritis experimental, se apoyan con los resultados de la biometría hemática, realizada en equipo de citometría con un análisis mecanizado, donde se observó el porcentaje más alto de neutrófilos en el ratón con AIP que no recibió ningún tipo de tratamiento en comparación con el ratón control sano (Fig 6). Éste dato concuerda con los trabajos de varios autores que reportan neutrófilos como células predominantes en el proceso inflamatorio (Smith y Haynes, 2002 y Caballero, 2004). El resultado de la medición del porcentaje de eosinófilos fue similar, donde este parámetro más elevado en el ratón con AIP no tratado en comparación con ratón sano (Fig. 8). Éste tipo de células aparece en la corriente sanguínea después de un lapso de tiempo cerca de dos semanas desde el inicio de la inflamación aguda (Palomo et al, 1997) como reacción del organismo para contrarrestar los efectos nocivos de la inflamación. Ambas poblaciones celulares se ven

normalizadas en los ratones con AIP tratados con Tactivin, se observó un mejor efecto en los ratones que recibieron el tratamiento dos veces al día. El porcentaje diferencial de linfocitos en sangre periférica del ratón con AIP sin tratamiento se ve notablemente disminuido en comparación con los ratones artríticos tratados con Tactivin (Fig. 7); ésto se explica tomando en cuenta los altos porcentajes de otras poblaciones de leucocitos como neutrófilos y eosinófilos. Por lo que, se sugiere con base en el análisis de la biometría hemática la presencia de la inflamación aguda en los ratones con AIP y la disminución de ésta en los ratones AIP tratados con Tactivin.

En cuanto a la proliferación linfocitaria, se observó la disminución significativa de índice de estimulación de esplenocitos ante estímulo mitogénico de concanavalina A de ratones con AIP en comparación con los grupos de ratones sanos (Fig. 9). Tactivin restableció el índice de proliferación en el grupo de ratones con AIP que recibieron el tratamiento, lo que coincide con otros estudios que han revelado el incremento del índice de estimulación linfocitario bajo el tratamiento con Tactivin (Arion et al, 1990). Así mismo, algunos autores han reportado que Tactivin aumenta los niveles de linfocitos facilitando su proliferación (Venediktova, 2001).

Los niveles séricos de $TNF\alpha$ fueron muy bajos y no mostraron las diferencias entre los grupos experimentales, excepto el grupo con AIP tratado con Tactivin una vez al día, aunque algunos autores mencionan el incremento en la producción de ésta interleucina en ratones con la inflamación (Rankin, 2004). Nuestro resultado de bajo nivel de $TNF\alpha$ en ratones con artritis se debe probablemente a que los ratones fueron sacrificados hasta el día 25 después de la última inmunización, cuando la inflamación ya empezaba a disminuir, siendo que ésta interleucina se presenta en mayores cantidades en el inicio de la inflamación regulando la expresión de las otras citocinas que más tarde llegan al sitio de inflamación (Feedelman, 2001). No queda claro por qué se observó el incremento de $TNF\alpha$ en dos ratones con AIP tratados con Tactivin una vez al día.

En el caso de la cuantificación de los niveles séricos de $IL-1\beta$, se observó que los niveles más altos de $IL-1\beta$ se encontraron en la mayoría de los ratones con AIP sin tratamiento, lo que concuerda con los datos publicados por Jenkins (2002) y Amgen Inc. (2003), que muestran el aumento de ésta interleucina proinflamatoria en los individuos con artritis reumatoide y su papel en el desarrollo de síntomas de ésta enfermedad. Los

ratones con AIP tratados con Tactivin mostraron normalización de los niveles séricos de IL-1 β a la par con la disminución de signos de la inflamación articular.

Los niveles séricos de IL-2 mostraron un incremento notable en la mayoría de los ratones con AIP, lo que concuerda con la importancia de ésta interleucina en la respuesta inmune reportada por Rangel-Corona (2001). Así mismo, observamos el restablecimiento de éste parámetro inmunológico después del tratamiento con Tactivin, igual que lo mencionan otros estudios donde se encontró el aumento de los niveles de IL-2 por Tactivin (Adambekov, 1996).

Con respecto al extracto tímico, los ratones sanos (sin inducción de artritis) que recibieron tratamiento con Tactivin, y que durante el transcurso del experimento estuvieron en las mismas condiciones de bioterio, régimen de alimentación y de manejo que los ratones de otros grupos experimentales, mostraron los mismos niveles de parámetros inmunológicos que los ratones sanos que recibieron la administración de solución salina fisiológica (vehículo que usamos para la dilución de Tactivin). Ésto coincide con otros estudios (Arion, 1989) que afirman que Tactivin no modifica los parámetros inmunológicos normales.

Dentro de los grupos de ratones con AIP que recibieron tratamiento con Tactivin, el grupo que recibió Tactivin dos veces al día, mostró mejor tendencia a recuperarse como se ve en la figura 2 de los promedios del diámetro, en las figura 6 y 8 de porcentaje diferencial de neutrófilos y eosinófilos respectivamente, en los parámetros relacionados con la inflamación articular, que los ratones que recibieron tratamiento con Tactivin una vez al día. En relación al índice de proliferación, los ratones que fueron tratados con Tactivin una vez al día, mostraron mejor recuperación, cerca de los niveles que presentaron los grupos de ratones sanos, en comparación con los ratones artríticos que recibieron el tratamiento dos veces al día.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que Tactivin es un verdadero inmunomodulador, el cual sin afectar los parámetros inmunológicos normales, normaliza aquellos que fueron alterados por el proceso inflamatorio producido por la inducción de artritis experimental con proteoglicano en ratones hembras de la cepa BALB/c. La administración de éste extracto tímico puede ser sujeta al grado de alteración de parámetros inmunológicos, que puede sugerir una aplicación por día.

Los mecanismos de acción de Tactivin sobre el proceso inflamatorio de artritis inducida con proteoglicano no quedan claros, es conveniente realizar otro estudio con un tamaño de muestra mayor para dar más confiabilidad a los datos presentados.

CONCLUSIONES

1. La artritis tipo reumatoide se induce en ratón hembra de la cepa BALB/c por inyección intraperitoneal de proteoglicano de pollo con dosis de 100 μ g en 4 inmunizaciones con aparición de signos de inflamación articular en 15 días posteriores a la última inmunización.
2. El registro de las marcas visuales de las articulaciones de ratones muestran un incremento significativo en el diámetro de rodillas en el grupo con AIP en los días 60-70 después de la primera inmunización con proteoglicano en comparación con el grupo control, así como, la disminución significativa del diámetro de muñecas y codos en ratones artríticos tratados con Tactivin en comparación con ratones AIP no tratados.
3. La biometría hemática referente al porcentaje diferencial leucocitario muestra el incremento significativo de los neutrófilos y eosinófilos en ratones con AIP que no recibieron tratamiento con Tactivin, lo que confirma un proceso inflamatorio y una normalización de éstos parámetros en el grupo de ratones con AIP tratados con Tactivin.
4. El índice de proliferación de esplenocitos ante estímulo mitogénico de concanavalina A mostró una disminución significativa en ratones del grupo con AIP, en comparación al control de ratones sanos y recuperación parcial de éste parámetro en ratones del grupo con AIP que recibieron Tactivin una vez al día.
5. Los niveles séricos de TNF α fueron muy bajos y no mostraron las diferencias entre los grupos experimentales, excepto el grupo con AIP tratado con Tactivin una vez al día, donde se observó un incremento de este parámetro.
6. Los niveles séricos de IL-1 β mostraron notable dispersión en ratones con AIP independientemente del tratamiento, con una tendencia de incremento en ratones con AIP no tratados y la disminución significativa en ratones con AIP tratados con Tactivin una vez al día.
7. En los niveles séricos de IL-2 se observó un incremento notable en ratones con AIP sin tratamiento y normalización de este parámetro en ratones con AIP tratados con Tactivin.

8. El extracto tímico Tactivin no alteró los parámetros inmunológicos en ratones sanos, aunque mostró un ligero efecto sinérgico con el mitógeno concanavalina A.
9. El extracto tímico Tactivin es un inmunomodulador, el cual normaliza los parámetros inmunológicos alterados por la inflamación en ratones con artritis reumatoide inducida con proteoglicano.

PERSPECTIVAS

Para poder confirmar los resultados sugeridos en este trabajo es necesario tener en cuenta la posibilidad de realizar un trabajo que sea similar al presente, ya que este trabajo por limitaciones presupuestales puede ser considerado como prueba piloto.

LITERATURA CITADA

1. Adambekov DA, Litvinov VI, Mambetov KB, Sabyrbekova TS, Koshmuratov AG, Chubakov TCh. 1996. **Immune status of middle-aged and aged patients with tuberculosis.** Probl Tuberk. Vol. 2, pp. 22-4.
2. Aleksandrova NN, Arion V Ya, Slobodeniuk AV, Sanina IV. 1989. **Immunotherapy with taktivin and myelolipid in experimental influenzal infection.** Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. Vol.7, pp. 89-92.
3. Amgen Inc. 2003. **The role of cytokines in the developmen of AR.**
4. Arend, William P. 2003. **Cytokines in rheumatoid arthritis.** Arthritis-Symptom.com. En: <http://www.arthritis-symptom.com/Rheumatoid-arthritis-symptoms/citokines.htm>
5. Arion, V. Ya. 1989. Institute for Physicochemical Medicine Moscow. Volume 2, part 3.
6. Arion, V. Ya, Moshkovskaia Elu, Azizova OA, Zimina IV. 1990. **Restoration by T-activin and its subfractions of splenocyte membrane structures in thymectomized animals.** Biull Eksp Biol Med. Vol. 110 No. 7, pp 53-6.
7. Arion, V. Ya.; Svetlana N. Moskvina; Irina V. Zimina; Yuri M. Lopuchin. 2001. **Evaluation of Thymus Functional State by Non-Invasive Method.** Russian Journal of immunology. Vol. 6, Number 1, pp 77-80
8. Arion, V. Ya. Y Zaitseva, Galina. 1995. Papel de inmunología en ciencias biológicas. Memorias de segundas jornadas de biología. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UDG.
9. Bazhanov NN, Arion VIa, Syssoeva OP, Krugliakova EP. 1996. **Taktivin in the combined treatment of acute inflammatory diseases of the maxillofacial area.** Stomatologiya (Mosk). Vol. 75, No. 2, pp. 31-3.
10. Caballero Uribe, Carlo V. 2004. **Artritis reumatoidea.** Fundamentos de reumatología en la clínica. Capítulo X. Inmunopatogenia de las enfermedades reumáticas.

11. Feldmann, Marc. 2001. **Rheumatoid arthritis affects millions of individuals worldwide. Luckily it is the autoimmune disease with the most promising clinical results.** *Nature immunology*. Vol. 2, No. 9, pp. 771-773.
12. Finnegan A, Mikecz K, Tao P, Glant TT. 1999. **Proteoglycan (Agrecan)-Induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th-2 cytokines.** *The journal of immunology*. Vol. 163, pp 5383-5390.
13. Gil, A. 2002. **Polysaturated fatty acids and inflammatory diseases.** *Biomedicine& Pharmacoterapy*. Vol. 56, pp. 388-396.
14. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. 1987. **Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopatology.** *Arthritis rheum*. Vol. 30, No. 2, pp. 201-12.
15. Glant TT, Mikecz K, Bartlett RR, Deak F, Thonar EJMA, Williams JM, Mattar T, Kuettner KE, Schleyerbach R. 1992. **Immunomodulation of proteoglycan-induced progressive polyarthritis by leflunomide.** *Immunopharmacology*. Vol. 23, pp 105-116.
16. González Sampedro, René; Rivero Jiménez, René; Martínez Solís, Marta; Cabrera Roja, Humberto; Wade Mateo, Maura y Hernández Ramírez, Porfirio. 1997. **Interleucina-2 en pacientes con síndromes linfoproliferativos.** *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. Vol. 13, No. 1, pp. 19-26
17. Holmdahl, R. 1998. **Lessons for animal models for rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases*. Vol. 57, No. 3, pp. 180.
18. Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J, Pettersson U. 2001. **Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis.** *Immunological reviews*. Vol. 184, pp 184-202.
19. Jenkins JK, Hardy KJ, McMurray RW. 2002. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis: a guide to therapy.** *The American journal of medical sciences*. Vol. 323. N. 4, pp 171-180.
20. Joe, Bina and Wilder, Ronal L. 1999. **Animal models of rheumatoid arthritis.** *Molecular Medicine Today*. Vol. 5, No. 8, pp 367-369.

21. Kagari T, Doi H, Shimozato T. 2002. **The importance of IL-1 β and TNF α , and the noninvolvement of IL-6 in the development of monoclonal antibody-induced arthritis.** The journal of immunology. Vol. 169, pp. 1459-1466.
22. Kaplan Ch D, O'Neill SK, Koreny T, Czipri M, Finnegan A. 2002. **Development of inflammation in proteoglycan-induced arthritis is dependent on Fc γ R regulation of the cytokine/chemokine environment.** The journal of immunology. Vol. 169, pp 5851-5859.
23. Kaplan Charles, Valdez Juan C, Chandrasekaran Raman, Eibel Hermann, Mikecz Katalin, Glant Tibor T. 2002. **Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis.** Arthritis Research. Vol. 4, pp 54-58.
24. Lee, David M and Weinblatt, Michael E. 2001. **Rheumatoid arthritis.** Lancet. Vol. 358, pp. 903-11.
25. Medina-Rodríguez F, Cervera-Castillo H. 1997. Artritis Infecciosas. En: Martínez-Elizondo P (Ed.) Introducción a la Reumatología. Segunda Edición. Sociedad Mexicana de Reumatología; pp. 186-97.
26. Oliunin IuA, Balabanova RM. 1996. **Combined immuomodulating therapy in rheumatoid arthritis.** Ter. Arkh. Vol. 68, No. 5, p.p. 13-16.
27. Palomo I., Ferreira A., Sepúlveda C., Rosemblatt M., Vergara U. 1998. Fundamentos de inmunología. Editorial Universidad de Talca, Chile.
28. Parnes EIa, Alikhanov BA, Tkomachev IuK, Muromtsev AV. 1995. **Effect of T-activin and irradiation with a helium-neon laser on the status of the interleukin-2-dependent component of the proliferative response of mononuclear cells in rheumatoid arthritis.** Fiziol Cheloveka. Vol. 21, No. 4, pp 143-9.
29. Pérez Sánchez, Ulises; Pérez, Adái. 2000. **El papel de la eritropoyetina humana recombinante en la anemia de la artritis reumatoide.** Revista de la Facultad de Medicina, UNAM, Vol.43 No.5, pp 176-179.
30. Piecyk M and Anderson P. 2001. **Signal transduction in rheumatoid arthritis.** Best practice & research clinical rheumatology. Vol. 15, No. 5, pp. 789-803.

31. Rangel-Corona, R; Corona-Ortega, MT; Soto-Cruz, I; Penichet, M y Weiss-Steider, B. 2001. **Inducción a la proliferación y citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica por anticuerpos biespecíficos.** Revista de Hematología Vol. 2, No.3, pp. 92- 97.
32. Rankin JA, 2004. **Biological mediators of acute inflammation.** AACN Clinical issues. Vol. 15, No. 1, pp. 3-17.
33. Smith, J. Bruce and Haynes, Mark K. 2002. **Rheumatoid arthritis- A molecular understanding.** *Annals of internal medicine.* Vol. 136. No. 12 pp. 908-922.
34. Sociedad española de reumatología. 2001. **¿Qué es la artritis reumatoide?.**
En: <http://www.reuma.org/archivosDESCARGABLES/02.pdf>
35. Toshitatsu Hanada, Akihiko Yoshimura. 2002. **Regulation of cytokine signaling and inflammation.** *Cytokina & Growth Factor Reviews.* Vol. 13, pp. 413-421.
36. Venediktova MG. 2001. **Use of Tactivin and Imunofan for the treatment of patients with endometrial carcinoma.** *Eksp. Kin. Farmakol.* Vol. 64, No. 5, pp. 46-9.
37. Weringer E.J and Gladue R.P. 1998. **Progress in Inflammation Research.** (M.J. Parnham, Ed)
38. Wilson, James L. 1999. **Thymus extracts: an international literature review of clinical studies.** Foundation for immunology and nutrition, development, education and research. En: http://www.hepatitisfree.com/thymus_article2.html
39. Zabrodskii PF, Germanchuk VG, Kirichuk VF, Molotkov AO, Maltseva GM, Osipov OV, Nodel' ML. 2003. **Effect T-activin on the activity of the natural killer cells after acute intoxication by toxic chemical substances.** *Eksp Klin Farmakol.* Vol. 66, No. 3, pp. 47-49.
40. Zabrodskii PF, Kirichuk VF, Germanchuk VG, Nodel' ML, Rush ML, Molotkov AO, Mal'tseva GM, Osipov OV. 2003. **Suppression of natural killer cells after acute intoxication with alcohols and cholinotropic preparations and their reactivation with T-activin.** *Bull Exp. Biol. Med.* Vol. 135, No. 1, pp. 59-61.