

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



REPRODUCCION DEL MODELO DE ARTRITIS
TIPO REUMATOIDE INDUCIDO CON PROTEOGLICANO
EN RATONES Balb/c

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE
TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

SERGIO LUIS BLANCO AYALA

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. SERGIO LUIS BLANCO AYALA
PRESENTE.**

Manifiestamos 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: **"REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE ARTRITIS TIPO REUMATOIDE INDUCIDO CON PROTEOGLICANO EN RATONES BALB/c"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA** y como asesor el **M.C. JORGE PEREGRINA SANDOVAL**

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 11 de febrero del 2004



**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJA LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**


**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA**.-Director del Trabajo
c.c.p. **M.C. JORGE PEREGRINA SANDOVAL**.-Asesor del Trabajo
c.c.p. Archivo

MERL/LHL/mam

**C. DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
 DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 P R E S E N T E.**

Forma F

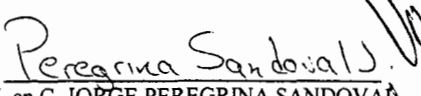
Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES opción TESIS con el título: "REPRODUCCION DEL MODELO DE ARTRITIS TIPO REUMATOIDE INDUCIDO CON PROTEOGLYCANO EN RATONES BALB/c" que realizó el pasante SERGIO LUIS BLANCO AYALA con el número de código 497358117 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.

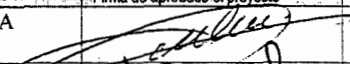
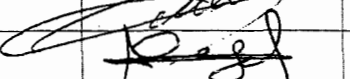
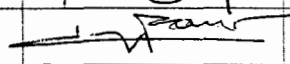
ATENTAMENTE

Las Aguas, Zapopan Jal. a 03 de Diciembre de 2004.


 Dra. GALINA PETROVNA ZAITSEVA
 Directora del Trabajo


 M. en C. JORGE PEREGRINA SANDOVAL
 Asesor del Trabajo

16/12/04

Nombre completo de los Sinodales	Firma de aprobado el proyecto	Fecha de aprobación
Q. F. B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA		15/12/04
M. V. Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA		14/12/2004
M. V. Z. ALBERTO RAMOS MORA		14/dic/2004
Supl. M en C. JORGE PEREGRINA SANDOVAL	Peregrina Sandoval J.	10/Dic/04

**“REPRODUCCION DEL MODELO DE ARTRITIS
TIPO REUMATOIDE INDUCIDO CON
PROTEOGLYCANO
EN RATONES Balb/c”**

PASANTE:

SERGIO LUIS BLANCO AYALA

DIRECTOR:

Dra. GALINA PETROVNA ZAITSEVA

ASESOR:

M. en C. JORGE PEREGRINA SANDOVAL

INSTITUCIÓN:

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

DEDICATORIA

A mis padres por darme la vida y la oportunidad de una Carrera Universitaria. A Galdino Blanco y Ma. Guadalupe Ayala por ser quienes son y por apoyarme indudablemente en todo momento.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida misma, su sabiduría y por haberme permitido nacer en la familia y el puerto donde nací.

A mis hermanos Yuridia Guadalupe y Hugo Antonio, por ser mi apoyo incondicional y mantener a la familia unida.

A la Dra. Galina por creer en mí y por la oportunidad de permitirme desarrollar este trabajo, así como también por todas sus enseñanzas.

A el M en C. Jorge Peregrina por sus constantes observaciones y palabras de aliento para la realización de este trabajo, por demostrarme la buena persona y amigo que es.

A la Dra. Milagros Orozco por su colaboración en la enseñanza de la técnica histológica.

Al Dr. Felipe Cerda por su colaboración en la interpretación histológica.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunobiología, Reyna, Lucía y David por su contribución contundente en el desarrollo de este trabajo de tesis, ya que sin su ayuda incondicional no se hubiese realizado.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera, Enrique, Lupita, Humberto, Julio, Sorel, María, que me brindaron su amistad, apoyo y compañía durante todo momento.

A todos mis maestros que a lo largo de la carrera y mi vida universitaria contribuyeron a mi formación tanto académica como personal.

Y sin olvidar a mi Alma Mater por que gracias a ella ahora estoy donde estoy, soy lo que soy, y quiero llegar a ser lo que quiero ser.

El presente Trabajo de Tesis se realizó bajo la Dirección de la Dra. Galina Petrovna Zaitseva y la asesoría del M. en C. Jorge Peregrina Sandoval en el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara

ABREVIATURAS

Adyuvante Completo de Freund	CFA
Adyuvante Incompleto de Freund	IFA
Antígeno	Ag
Artritis inducida con Adyuvante	AA
Artritis inducida con Colágeno	AIC
Artritis inducida con Proteoglycano	AIPG
Artritis Inducido con Pristan	AIP
Artritis Reumatoide	AR
Cartilago Oligomérico de la Proteína Matriz	COMP
Células T <i>Helper-ayudantes</i> tipo I	TH1
Células T <i>Helper-ayudantes</i> tipo II	TH2
Colágeno Tipo II	CII
Colegio Americano de Reumatología	CAR
Complejo Mayor de Histocompatibilidad Leucocitario Humano	HLA
Complejo Mayor de Histocompatibilidad del Ratón	H2
Complejo Mayor de Histocompatibilidad haploide "p"	H2 ^p
Complejo Mayor de Histocompatibilidad haploide "q"	H2 ^q
Drogas Antiinflamatorias no esteroideas	NSAIDs
Drogas Antirreumáticas Modificadoras de la Enfermedad	DMARDs
Factor de Necrosis Tumoral	TNF
Interferón	IFN
Interleucina	IL
Inyecciones Vía Intraperitoneal	i. p.
Inyecciones Vía Intravenosa	i. v.
No determinado	Nd
Polimorfos Nucleares	PMN
Proteoglycano	PG
Receptores de Inmunoglobulinas	FcR
Registro de Marcas Visuales	RMV
Sistema de hálelos del gen DBR1 en el Complejo Humano MHC II	HLA-DR4
Solución Salina Fisiológica	SSF

RESUMEN

En el presente trabajo se trato de reproducir un modelo murino de Artritis tipo Reumatoide a través cuatro inmunizaciones con proteoglycano del cartilago de pollo emulsionados en adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) en los días 0, 7, 28 y 49 en ratones de la cepa Balb/c hembras mediante inyecciones intraperitoneales.

En dos grupos de ratones, 15 experimentales inmunizados con proteoglycano de pollo y 15 controles, a los que se les administró solución salina fisiológica se les observó la evolución de la artritis mediante un registro de marcas visuales por una persona ajena al proceso experimental, de tal manera que fuera un estudio doble ciego, en donde fueron determinadas la mediciones de los diámetros de las articulaciones de los ratones tanto inmunizados como no inmunizados con la finalidad de comprobar la evolución de signos de inflamación visualmente desde antes de la inmunización (día cero) hasta el día de sacrificio de cada ratón.

Después de dos, tres y cuatro semanas de la última inmunización, en que los ratones fueron sacrificados con el objetivo de obtener así las extremidades delanteras y traseras de los animales, se realizó el procesamiento de tejidos. Los cortes de las articulaciones de los ratones, fueron analizadas por un especialista, el Dr. Felipe Cerda jefe del área de histopatología del Hospital Civil de Guadalajara, como persona ajena al proyecto (estudio doble ciego) con tal de que proporcionara los datos de daño de tejido y presencia de la AR a nivel histológico en los ratones inmunizados en comparación con los ratones controles.

Se encontró como resultado que no existió una diferencia significativa entre las medias de los diámetros de las articulaciones de los ratones controles y las medias de los ratones inmunizados, pero si se presentó una tendencia a inflamación en las extremidades de los ratones inmunizados. Así con tampoco existió a nivel histopatológico diferencia morfológica definitiva que expresara los signos de presencia de AR experimental.

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
II.- ANTECEDENTES	3
III.- JUSTIFICACION	25
IV.- HIPOTESIS	26
V.- OBJETIVOS	26
VI.- MATERIAL Y METODOS	27
VII.- RESULTADOS	38
VIII.- DISCUSION	53
IX.- CONCLUSIONES	56
X.- LITERATURA CITADA	57

CUCB



BIBLIOTECA CEN

I. INTRODUCCIÓN

Consideraciones éticas y de sentido común restringen la investigación biomédica con los humanos. Por esta razón el uso de modelos animales para el estudio de "desórdenes humanos" ha jugado un rol crítico en entender los procesos de enfermedades y, de hecho, han sido de gran valor para el diseño y test de regímenes de tratamiento. Una gran variedad de especies, vertebrados e invertebrados, han sido utilizados con estos fines.

En un modelo biológico se debe reproducir un efecto proveniente del sujeto original, poseer una estructura, una lógica propia y realizar actos determinados cuando se utiliza para extrapolar resultados de una especie animal al hombre.

Sin embargo, no existe un modelo perfecto extrapolable al hombre, aunque hay una infinidad de modelos experimentales, cuyas respuestas fragmentarias incrementan el significado biológico del fenómeno observado (José Carlos Crispín & Varela, 1999).

Para el estudio de la Artritis Reumatoide (AR) se han utilizado modelos animales de rata y ratón, los cuales presentan características clínicas que se parecen a la artritis reumatoide de los humanos, e incluyen características histológicas de la articulación como hiperplasia sinovial con infiltración masiva de células inflamatorias, similar a las anomalías en pacientes con artritis; por lo que estos modelos pueden colaborar en la comprensión de los mecanismos de los procesos patogenéticos de la enfermedad (Steffen, 2000).

Existen reportes de inducción de Artritis Reumatoide por diferentes sustancias y en diferentes cepas de ratones, entre las cuales se encuentran: artritis inducida con colágena (AIC), artritis inducida con pristan (AIP) y la artritis inducida con proteoglycano de diferente origen alogénico (AIPG) (Steffen, 2000)

El uso del modelo en ratón de artritis es menos costoso que el de la rata. La cepa Balb/c es de fácil adquisición y reproducción, por lo que se optó por la inducción de AR con proteoglycano de pollo, el cual está reportado en esta cepa (Glant, Mikecz et al., 1987).

Sin embargo, algunos autores mencionan poca inductividad de AR con proteoglycano de origen bovino (Lindqvist, Bockermann et al., 2002), por lo que se decidió aplicar el proteoglycano de pollo, después de realizar una prueba piloto utilizando proteoglycano de bovino (Agrecan) para observar su eficacia como inductor en esta cepa.

II.- ANTECEDENTES

HISTORIA Y PATOGÉNESIS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

El ser humano cuenta con un desarrollado sistema propio de seguridad ante agentes exógenos y endógenos indeseables que se denomina como el sistema inmune. Este sistema organiza impecablemente las respuestas naturales o innatas mediadas básicamente por macrófagos, neutrofilos, células NK y la activación del complemento. Las respuestas de defensa adquirida o específica son mediadas por anticuerpos, linfocitos e interleucinas. Del equilibrio de estos sistemas depende que se mantengan los mecanismos adecuados de tolerancia inmunológica. Al perderse la tolerancia puede aparecer por diferentes mecanismos la presencia de autoinmunidad y enfermedad en el individuo afectado (Uribe, 1999).

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune y con predisposición genética (Yen, 2001), afecta aproximadamente al 1 % de la población mundial humana adulta (Verhoef, Van Roon J.A.G. et al., 2001; Wipke & Allen, 2001) (Jeffrey M. Otto, Raman Chandrasekeran et al., 2000), las proporciones de predominio son por lo menos superior a tres veces en los países industrializados que en otra parte y normalmente, lleva a una invalidez significativa y una reducción consecuente en la calidad de vida (Smolen, Steiner et al., 2001), afectando a millones de personas en el mundo no solo con sufrimiento humano, sino que también es causa de considerables costos socio-económicos por el tratamiento y la incapacidad (Lindqvist, Bockermann et al., 2002). AR es dos a tres veces más frecuente en las mujeres que en los hombres y puede empezar a cualquier edad (Verhoef, Van Roon J.A.G. et al., 2001), con un índice máximo entre la cuarta y sexta década de vida (Smolen & Steiner, 2003).

La paleopatología de los estudios de especímenes con una antigüedad de varios miles de años atrás, muestra claras evidencias de AR en las tribus americanas Nativas del Norte de América (Firestein, 2003), con un predominio encontrado en los restos extremadamente alto, por encima del

5% de individuos afectados en algunos de los grupos. La evidencia de AR en Europa apareció primero en el siglo XVII, sobre todo en los Reyes Holandeses (Fig.1) y, posteriormente, Sydenham publicó el primer informe del caso en 1676. Aunque el caso no fue totalmente reportado y, como consecuencia, la enfermedad no era totalmente reconocida hasta que se definió por Garrod en 1859, quien la nombró la artritis "reumatoide" para distinguirla de las dos formas muy conocidas de artritis, la fiebre reumática y la gota. Pero no fue hasta 1957, cuando Charles Short describió definitivamente y claramente la Artritis Reumatoide y la puso aparte como una entidad clínica definida distinta del seronegativo el espón-dilo-artropatías, la enfermedad cristal-inducido, la osteoartritis, el lupus sistémico eritmatoso y muchas otras condiciones (Firestein, 2003).



Figura. 1 Pequeña evidencia de AR. Como la enfermedad era nombrada en el arte antes del siglo XVII en Europa. La Familia de Jordaens en un Jardín por Jacob Jordaens (1630).

Las causas de la AR son desconocidas, se han reconocido muchas sendas involucradas en la generación de la enfermedad y algunos de éstas se han identificado inequívocadamente como importantes por las pruebas terapéuticas de estudios principales en sistema inmune y los procesos inflamatorios. Se ha especulado mucho tiempo que la AR pudiera activarse por los agentes infecciosos, pero la prueba de esto aun es desconocida todavía. A su vez, con lo que respecta a esto, los pacientes con AR responden favorablemente a drogas que tienen una actividad antibiótica o se

derivan de anti-bióticos, aunque los mecanismos antibacterianos de acción normalmente no son los implicados en este efecto (Smolen & Steiner, 2003). A medida que aumenta el conocimiento de los procesos de la patogénesis de la AR se abre la puerta a terapias nuevas (Ernest, 2001).

Se han sugerido varios factores como causa de la enfermedad, como son los factores genéticos, factores medioambientales y los agentes infecciosos, hasta ahora la etiopatogénesis no ha sido completamente resuelta (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

Las primeras teorías de la patogénesis de la AR indican a los auto-anticuerpos y los complejos inmunes como principales involucrados, pero respecto a estas se ha evolucionado desde mediados del siglo XX, cuando fueron considerados los primeros conceptos de la hiper-reactividad inmune. La primera pista de que la hiper-reactividad juega un papel importante en AR fue la identificación del factor reumatoide en la sangre de pacientes afectados (Smolen & Steiner, 2003).

El factor reumatoide se observó originalmente por Waaler en 1939 y después fue redescubierto por Rose en 1948 en virtud de su habilidad de aglutinarse en las células rojas de las ovejas, que habían sido cubiertas con el suero del conejo. Estas observaciones llevaron a la suposición lógica de que AR podría ser una enfermedad autoinmune causada por los mismos anticuerpos reactivos. La primera patogénesis potencial del factor reumatoide en AR como un iniciador de enfermedad por complejos-mediadores inmunes se formuló durante los años sesenta y clásicamente fue descrita por Zvaifler en 1973 (Firestein, 2003).

Sin embargo, la Artritis Reumatoide es más probable que no sea una sola enfermedad sino un síndrome clínico causados por una variedad de procesos patológicos diferentes (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

Debido a que la patogénesis de la AR no está muy clara (Verhoef, Roon et al., 2001), el diagnóstico clínico es basado en las descripciones en lugar de una comprensión de los mecanismos de la enfermedad, se han puesto extensos esfuerzos en la unión y la asociación de estudios con pacientes de AR (Peter Olofsson, Jens Holmberg et al., 2003); el desarrollo de drogas modernas (Lindqvist, Bockermann et al., 2002), de terapias alternativas y nuevas (Ernest, 2001).

MECANISMOS Y DAÑOS INVOLUCRADOS EN LA ENFERMEDAD DE AR

La Artritis Reumatoide en los humanos es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por respuestas celulares y humorales (Yuhe Ma, Sherry Thornton et al., 1998), donde existe una inflamación de la membrana sinovial de múltiples articulaciones (Cynthia Driskell, Michael Emery et al., 2003).

El índice de prevalencia de esta enfermedad aumenta con la edad, tanto factores genéticos, como ambientales contribuyen a su etiología (Moreno, 1996), se clasifica como una enfermedad inflamatoria sistémica crónica, mediada por inmunidad celular caracterizada por la presencia de linfocitos T activados y macrófagos, así como por una sinovitis inflamatoria crónica con frecuente compromiso simétrico de las articulaciones periféricas, que pueden progresar hasta la destrucción de los cartílagos, la erosión y la deformidad crónica del hueso (Starkebaum, 2000 y Quattrocchi Emilia, Walmsley Marita et al., 1999). En donde se ha aumentando el volumen del fluido, existe gran infiltración celular de varios tipos (los neutrófilos, los macrófagos, los fibroblastos, las células T, y las células dendríticas) en la membrana sinovial y en las regiones periféricas articulares y numerosas cascadas de señalización que interactúan expresando niveles altos de citocinas proinflamatorias (Wipke & Allen, 2001), quimiocinas y otros mediadores inflamatorios que a una elevada producción de estos, finalmente dan como resultado la destrucción del cartilago, corrosión del hueso y remodelación patológica de las estructuras de la articulación (Steffen, 2000 y Kaplan Charles D, O'Neill Shannon K et al., 2002).

Además de la inflamación en la membrana sinovial, el frente agresivo del tejido llamado *pannus* invade y destruye las estructuras articulares locales. La membrana sinovial normalmente es una estructura celular relativamente delicada (Verhoef, Van Roon J.A.G. et al., 2001). En la AR las células T, las células B, las células CD4⁺ y los macrófagos infiltran la sinovia. La degradación localmente expresada de las enzimas, incluso las metaloproteinazas, las proteasas de la serina y los agregcanes, digieren la matriz extracelular y destruyen las estructuras articulares.

Los neutrófilos en particular aumentan en el fluido de la membrana sinovial, dónde ellos encabezan complejos inmunes y proteo líticos en la liberación de las enzimas (Firestein, 2003).

En las articulaciones afectadas de pacientes con AR, se observa que las células leucocitarias infiltran el torrente sanguíneo en forma extensiva, en tanto que los monocitos y linfocitos permanecen predominantemente dentro de la membrana, los polimorfos nucleares (PMN) migran al líquido sinovial. La membrana sinovial inflamada, denominada *pannus* está caracterizada por hiperplasia y es altamente vascularizada, invade el tejido cartilaginoso e inicia un proceso local destructivo (Fig.2). La liberación de citocinas especialmente $TNF\alpha$ e $IL-1$ causa inflamación sinovial (Ernest. 2001); por lo tanto estas citocinas proinflamatorias juegan un papel vital y evidencias recientes indican claramente que son las responsables de muchas de las manifestaciones de la enfermedad (Starkebaum, 2000).

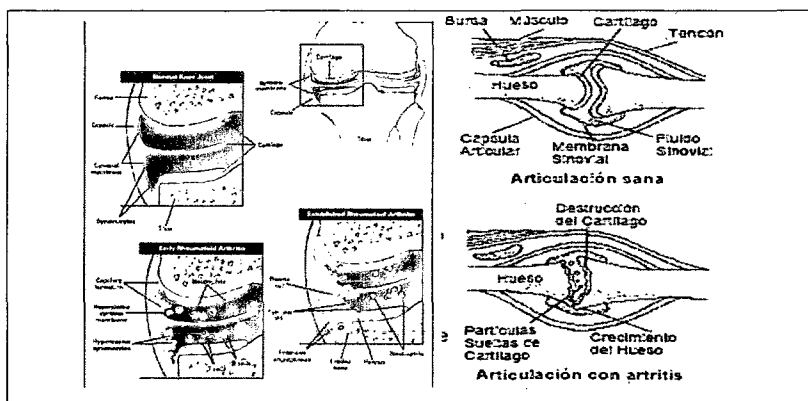


Figura. 2 Infiltración masiva de células en la membrana sinovial inflamada, denominada *Pannus* (derecha). Comparación de una articulación sana vs. articulación artrítica (izquierda)

En la respuesta inflamatoria están involucrados muchos constituyentes que intervienen en la reacción, por ejemplo, el endotelio vascular y moléculas de adhesión que aumentan la afinidad del contacto entre estructuras complementarias expresadas en las superficies celulares durante la reacción inflamatoria y transmisión de señales al interior de las células que permiten

la activación de funciones específicas de células inmunocompetentes y del tejido conectivo. Las citocinas son mensajeros intercelulares con amplio rango de acción, organizan la respuesta inflamatoria, el estado de activación celular y las respuestas sistémicas a la inflamación. La liberación de la histamina guía al aumento de la vasodilatación y permeabilidad (Wang Yi, Kristan Jane et al., 2000; Gil, 2002). Así como también interviene la producción de fibroblastos activados y la matriz extracelular compuesta por proteínas como: colágena, elastina, glucoproteínas adhesivas, fibronectina, la membrana basal, proteoglicanos y moléculas de adhesión. (Kaplan Charles D, O'Neill Shannon K. et al., 2002).

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 estos mecanismos. Actuales aproximaciones clínicas 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 (Sakaguchi, 2000).

ARTRITIS COMO ENFERMEDAD: SINTOMAS Y COMO SE DIAGNOSTICA

La palabra artritis significa literalmente "inflamación de la articulación". La Artritis Reumatoide es una enfermedad crónica que origina dolor, rigidez, inflamación y pérdida de función en las articulaciones y puede también acompañarse de inflamación en otros órganos (incluyendo los pulmones, el corazón, y los vasos sanguíneos).

Es una enfermedad que se da con más frecuencia en las mujeres, pero que afecta también a los hombres. No es una enfermedad propia de la edad avanzada y aunque puede aparecer en ancianos, se presenta con mayor frecuencia de los 45 a los 55 años (Cynthia Driskell, Michael Emery et al. 2003).

La severidad de la artritis reumática varía ampliamente, desde dolores menores e inflamación de las articulaciones, hasta complicaciones que afectan los órganos internos y que ponen en peligro la vida de la persona.

El diagnóstico de la AR puede ser difícil a causa de que puede comenzar gradualmente y por síntomas muy sutiles. Los análisis de sangre y las radiografías pueden ser normales al inicio del proceso. Los síntomas de comienzo, las articulaciones inicialmente afectas y la afección de otros órganos como los ojos, el pulmón o la piel, puede variar entre los distintos individuos. Otras artritis pueden simular las manifestaciones de la AR. En no pocas ocasiones, la destreza y experiencia del médico, son esenciales para establecer un diagnóstico preciso y proponer el tratamiento más apropiado (Cynthia Driskell, Michael Emery et al., 2003). Los síntomas más frecuentes y los criterios de clasificación establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (CAR) se encuentran clasificados en 7 criterios y, como mínimo, el paciente debe presentar 4 criterios durante por lo menos seis meses para ser considerado enfermo de AR. Estos criterios son: rigidez matutina o generalizada, artritis de 3 áreas articulares, artritis en las articulaciones de las manos, artritis simétrica, nódulos reumatoides (Fig.3), factor reumatoide, cambios radiológicos y síntomas constitucionales como debilidad, sensibilidad a la presión en las articulaciones afectadas y tendencia a cansarse fácilmente (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).



Figura. 3 Nódulos reumatoides originados por una infiltración masiva de células inmunes en la membrana y el líquido sinovial

El inicio de los síntomas es insidioso, con menor frecuencia el inicio es agudo o aparentemente desencadenado por una situación estresante como

infección, cirugía, traumatismo, una crisis emocional o el posparto. La rigidez es notable por la mañana y remite durante el día, su duración es un indicador útil de la actividad de la enfermedad, sin embargo, un problema fundamental es su diagnóstico oportuno, ya que se ha encontrado hasta 36 semanas para llevar a cabo el diagnóstico de este padecimiento a partir de la primera consulta por dolor articular (Alpuche, 2003). Las articulaciones más frecuentemente afectadas son las interfalángicas proximales y metacarpofalángicas de los dedos, las muñecas, rodillas, tobillos y cuello (Fig. 4) (Verhoef, Van Roon J.A.G. et al., 2001).

El 20% de los pacientes presenta nódulos subcutáneos, situados en las prominencias óseas, un pequeño número de pacientes muestra esplenomegalia y crecimiento de los ganglios linfáticos (Alpuche, 2003).

Después de meses o años se pueden presentar deformidades, las más comunes: desviación cubital de los dedos; deformidad de abotonador; deformidad de cuello de cisne y la deformidad de valgo de la rodilla. Durante la enfermedad avanzada se puede presentar sequedad de la boca, de los ojos y otras mucosas.

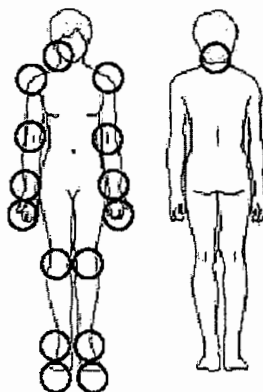


Figura. 4 Articulaciones más afectadas por la Artritis Reumatoide

El dolor en las articulaciones grandes y pequeñas del cuerpo es la queja más frecuente en esta enfermedad. Este dolor es la consecuencia de la

inflamación de las articulaciones y con frecuencia se puede ver la hinchazón a simple vista. Los síntomas principales de este desorden inmune, tales como dolor, enrojecimiento de la piel, calor local y distrofia son comunes en las etapas más avanzadas y se deben a una infiltración masiva de células inmunes en la membrana y el líquido sinovial, principalmente los neutrofilos, los macrófagos, y las células T (Delgado, Abad et al., 2001). Las personas con AR también pueden experimentar períodos extensos de remisión, durante los cuales los síntomas de la enfermedad desaparecen.

TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

El tratamiento para pacientes con AR ha mejorado espectacularmente en los últimos 25 años, pudiéndose ofrecer a la mayoría de los pacientes una considerable mejoría de sus síntomas y el mantenimiento de su capacidad funcional en niveles casi normales. No existe un tratamiento definitivo para la AR, el tratamiento actual solo consigue remisiones o situaciones de casi remisión de los pacientes y el mantenimiento de su capacidad funcional y de su calidad de vida. El éxito del tratamiento de la AR depende de su diagnóstico precoz y de una terapia agresiva antes de que se produzca un deterioro funcional o un daño irreversible en las articulaciones.

El manejo adecuado de la enfermedad incluye medicinas antirreumáticas o anti-inflamatorias. A medida que aumenta el conocimiento de los procesos de la patogénesis de la AR se abre la puerta a terapias definitivas. Existen dos principales líneas en el tratamiento de la enfermedad: los NSAIDs o drogas no esteroideas anti-inflamatorias que interfieren con segmentos de la cascada inflamatoria, pero no retardan la destrucción de la articulación, entre las cuales se encuentran indometacina, ácido salicílico, fenilbutazona e ibuprofén; y la otra línea que son los DMARDs o drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad que modifican o impiden procesos inflamatorios y de destrucción, entre las que se encuentran sales de oro, sulfasalazina, azatioprina, metrotexate y ciclosporina (Smolen & Steiner, 2003); (Verhoef, Roon et al., 2001).

Además de los medicamentos, el ejercicio es importante para mantener la función, así como la aplicación de calor y frío, la protección articular también pueden disminuir el dolor.

El tratamiento óptimo de la enfermedad depende de un abordaje multidisciplinario de la misma, incluyendo educación del paciente y la participación de varios especialistas, tales como reumatólogos, médicos de atención primaria, enfermería, rehabilitadores, psiquiatras y cirujanos ortopédicos (Alpuche, 2003).

Los espectaculares resultados del reemplazamiento articular total (especialmente para cadera y rodilla) puede lograr que pacientes con enfermedad muy avanzada continúen conservando movilidad y capacidad funcional (Clair, 2001).

TECNICAS APLICADAS PARA EL ESTUDIO DE AR

La compleja etiología de AR complica el análisis y reduce la aplicación de sus estudios, compartiendo similitudes en su investigación así con la mayoría de las enfermedades multifactoriales o síndromes en la población humana, tales como la diabetes, enfermedades cardiovasculares o cáncer (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

Las investigaciones epidemiológicas de AR proporcionan el apoyo para una heterogeneidad considerable de la enfermedad para la contribución de reacciones inmunes específicas en por lo menos una subpoblación de casos y para un desenvolvimiento probable de algunos factores medioambientales activados, así que considerando las evidencias de factores genéticos, la existencia de inmunidad específica que contribuyen por lo menos a algunos casos o algunos de los aspectos de la enfermedad, la reproducibilidad de las reacciones autoantígenas del sistema inmune siguen siendo un enigma en la investigación de AR (Klareskog & McDevitt, 1999).

La causa de la artritis reumatoide, el papel de activación de las células T y los mecanismos de activación de células sinoviales y su proliferación son

actualmente poco conocidas, por lo que es necesario contar con un modelo animal para estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo de esta patología (Starkebaum, 2000).

Al utilizar modelos animales para el desarrollo de la artritis, es posible identificar genes de susceptibilidad en la artritis y, como consecuencia, abrir nuevos caminos en el estudio de la enfermedad, a través de experimentos genéticos de entrecruzamiento. Estos tipos de estudios son principalmente realizados en los modelos murinos de artritis inducido (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

Varios estudios tienen modelos animales empleados, que contienen la ventaja de un control del ambiente y el fondo genético conocido de estos ha ayudado a definir las relaciones genéticas y las similitudes de los modelos disponibles de AR. El uso de entrecruzamientos genéticos diferentes, los mapas genéticos, y la tensión congénita; así como la complementación de los proyectos del genoma humano y del ratón harán una realidad el problema de la identificación de los genes de la enfermedad responsables (Otto, Chandrasekeran et al., 2000).

En modelos genéticamente manipulados y modelos transgénicos, se evalúa el efecto de un gen específico para su desenvolvimiento en el desarrollo de la artritis. El modelo animal oferta un acercamiento atractivo para diseccionar mecanismos genéticos y moleculares de AR. Además de que los modelos de artritis por consiguiente mantiene las herramientas importantes para el estudio de varios mecanismos celulares y moleculares productores de AR (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

Algún reciente progreso a la interfaz de humano y a la investigación de la artritis animal, con un enfoque especial ha dado un acercamiento comparativo entre el humano y la investigación animal experimental particularmente acertado. En donde la sospecha creciente de que la inmunidad específica es esencial para el desarrollo de la enfermedad en sólo ciertos casos de artritis, que tienen las consecuencias terapéuticas necesarias y es de hecho una línea con experiencia empírica que rápidamente aumenta las opciones terapéuticas que se prueban clínicamente. Este concepto se ha apoyado con los estudios en un mo

animal de AR, donde el posible acercamiento es la terapia del gen, que puede llegar a ser una opción terapéutica eficaz, si ciertos problemas pueden ser superados, entre ellos esta la disponibilidad de eficacia de los vectores para la entrega del gen. Para esto existen dos sistemas virales: los retrovirus que se usan en los procedimientos de experimentos en vivo y los adenovirus, que son un campo más reciente, siendo eficaces para transferir el gen de interés, infectando una gama amplia de células divididas y no divididas. No obstante, esta terapia cuenta con una variedad de agentes de respuesta inmune que pueden reducir a los adenovirus y la expresión del gen puede ser prolongada (Quattrocchi Emilia, Walmsley Marita et al., 1999). Los estudios extensos para esclarecer los mecanismos operatorios exactos ejercidos por la respuesta inmune, que pueden ser grandes propuestas para la intervención farmacológica de otro inflamatorio utilizado en enfermedades como la AR en el humano (Wipke & Allen, 2001), y ayudar mejorar los síntomas de la artritis interrumpiendo la base autoinmune e inflamatoria molecular de la enfermedad (Abad, 2001).

Por estas razones, cualquier plan para continuar la investigación de las causas de la artritis reumatoide, del papel de la activación de las células T, los mecanismos de activación de células sinoviales y su proliferación debe llevarse con gran cautela y supervización cuidadosa, ambas para el desarrollo del conocimiento de su etiología, sendas patológicas involucradas y la creación de drogas modernas y nuevas terapias de tratamiento que puedan reducir los efectos de los síntomas (Klareskog & McDevitt, 1999).

LOS MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS REUMATOIDE

Para el estudio de la AR 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 artritis reumatoide de humanos (cuadro. 1); incluyen características histológicas de la articulación como hiperplasia sinovial con infiltración masiva de células inflamatorias, similar a las anomalías en pacientes con artritis (Bina & Ronald L. Wilder, 1999).

Los modelos de inducción de la enfermedad de artritis son sincronizados y predecibles, de tal manera que permiten a los investigadores determinar las contribuciones de los tipos de células específicas y moléculas, los efectos de los múltiples pasos de la inducción de la enfermedad y la patogénesis (Wipke & Allen, 2001).

Cuadro 1. Comparación de los modelos de la artritis en rata y en ratón con la Artritis Reumatoide (AR) en humanos

MODELO	SIMILITUD CON LA ENFERMEDAD HUMANA	DIFERENCIAS CON LA ENFERMEDAD HUMANA
Colágeno-induce artritis (CIA) en ratas	Implicación común simétrica, empalmes periféricos afectados, inflamación común persistente, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria, erosiones marginales, presencia del factor reumatoide y de anticuerpos anti-colágeno, regulación genética por los genes de MHC y no-MHC, responsable de la mayoría de las terapias eficaces en AR	Respuestas del anti-colágeno no presentes en muchos casos de AR
COMP-induce artritis en ratas	Implicación común simétrica, empalmes periféricos afectados, inflamación común persistente, inmunorespuesta a las proteínas del cartílago, regulación genética por los genes de MHC y no-MHC	Ninguna destrucción permanente de empalmes, enfermedad transitoria
Ayudante- induce artritis (AIA) en ratas	Implicación común simétrica, empalmes periféricos afectados, inflamación común persistente, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria, erosiones marginales, regulación genética por los genes de MHC y no-MHC, responsable de la mayoría de las terapias eficaces en AR	Inicio explosivo rápido de la poliartrosis altamente erosiva, curso monofásico, implicación del esqueleto axial, ningún factor reumatoide, afecta la zona gastrointestinal, genitourinaria y piel, periostitis, anquilosis del hueso y manifestaciones adicionales articulares no típicos de AR
Avdrivine-induce artritis en ratas	Implicación común simétrica, empalmes periféricos afectados, inflamación común persistente, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria, erosiones marginales, mayor incidencia de la enfermedad en las hembras, regulación genética por los genes de MHC y no-MHC	Severidad moderada, poliartrosis monofásica,
Aceite-induce artritis (OIA) en ratas	Implicación común simétrica, empalmes periféricos afectados, inflamación común que persiste suave, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria,	Poliartrosis suave, ausencia del factor reumatoide

		erosiones marginales, mayor incidencia de la enfermedad en las hembras, regulación genética por los genes de MHC y no-MHC	
Pared celular streptococcica - induce artritis en ratas		Implicación común simétrica, inflamación común periférica de los empalmes afectados, persistente y de la recaída, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria , erosiones marginales, mayor incidencia de la enfermedad en las hembras, genético regulada por los genes de MHC y non-MHC	No se detecta Factor Reumatoide
Colágeno-induce artritis (AIC) en ratones		La implicación común simétrica, los empalmes periféricos afectados, la inflamación común persistente, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria, erosiones marginales, remisión de la inflamación común durante el embarazo pero de señalada por medio de luces para arriba en el periodo del posparto, genético regulada por los genes de MHC y no-MHC, responsable de la mayoría de las terapias eficaces en AR exceptuando las NSAIDs	Mayores incidencia y severidad en varones, respuestas pobres a NSAIDs
Pristan-induce artritis (AIP) en ratones		Implicación común simétrica, empalmes periféricos afectados, inflamación común persistente, hiperplasia sinovial, infiltración celular inflamatoria, erosiones marginales, presencia del factor reumatoide, genético regulada por los genes de MHC y non-MHC	Poliartritis suave con último inicio de la enfermedad clínica
Proteoglycano - induce artritis en ratones (AIPG)		La implicación común simétrica, los empalmes periféricos afectados, la inflamación común persistente, la hiperplasia sinovial, , las erosiones marginales, la presencia del factor reumatoide y los autoanticuerpos que circulan al colágeno tipo II, deposición de complejos inmunes, genético regulada por los genes MHC y no MHC	Desarrollo de espondilitis

El ratón modela la oferta de un acercamiento atractivo para conservar mecanismos genéticos y moleculares de AR. A pesar de la distancia evolutiva entre los ratones y el humano, existen rasgos clínicos de artritis en muchos modelos experimentales que se parecen aquéllos de la AR en el humano (cuadro.1) (Bina & Ronald L. Wilder, 1999).

Sin embargo, es improbable que cualquiera de los modelos murinos sea patológicamente idéntico a la enfermedad de la AR en el humano. Para estudiar las sendas patológicas diferentes se necesitan muchos modelos alternativos de artritis en los ratones y las varias manipulaciones genéticas, así, como factores medioambientales, se han mostrado en los ratones experimentales.

Existen varios agentes que pueden inducir genéticamente la artritis experimental en animales (rata y ratón) que a su vez crean un modelo de

investigación de los mecanismos patológicos de la artritis a nivel celular y molecular, como son: los agentes infecciosos, las bacterias vivas o los componentes bacterianos, los aceites, los antígenos ubicuos, las proteínas cartilago-específicas. Aunque la naturaleza de los autoantígenos en la AR no es totalmente comprendida, los antígenos específicos comunes como el colágeno tipo II (CII) y los proteoglycanos son los posibles candidatos (Klareskog & McDevitt, 1999); (Otto, Chandrasekeran et al., 2000).

También existen algunos modelos genéticamente manipulados que espontáneamente desarrollan la artritis (cuadro. 2) (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

La inmunización con CII o con el cartilago proteoglycano mayor, el agregan, activa a los agentes que pueden inducir la artritis genéticamente en algunas cepas de ratones. La artritis inducida con proteoglycano (AIPG) promueve en los ratones el antígeno heterólogo, en donde se tiene una enfermedad mediada y poligenéticamente controlada por células T.

El modelo normalmente usado para AR en las ratas y ratones (DBA/1) es el de la artritis inducida con colágena (AIC) el cual, se ha estudiado extensivamente por más de dos décadas y, se lleva a cabo por inyecciones de CII emulsionadas en adyuvante, que normalmente es CII heteróloga de origen de bovino, pollo o de rata. AIC origina un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) dependiente que se caracteriza por la inflamación erosiva de las articulaciones mediadas por las células T y B.

Los modelos de inducción de artritis pueden agruparse en tres diferentes principios físicos. Primeramente, la patología mediada por células (célula-mediada) basada en Células T *helper-ayudante* tipo 1 (TH1) que llevan a la activación del macrófago y a la formación gránulo matosa en las articulaciones. En segundo lugar, la articulación-específica donde los anticuerpos pueden ligarse directamente al cartilago o al hueso activando el complemento, los neutrófilos y los macrófagos que causan la inflamación del edema y después pueden producir las erosiones. Y en tercer lugar, los complejos inmunes induce las inflamaciones en la membrana sinovial de vascularización y la respuesta, principalmente de células T *helper-ayudante* tipo 2 (TH2), generando con ello una respuesta inflamatoria que produce el

edema y finalmente la destrucción del hueso (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

Cuadro 2. Modelos de Artritis Reumatoide

Tipo de modelo	Nombre de enfermedad	Agente inductor / el gen designado para la manipulación genética	características de la enfermedad	MHC dependiente
Enfermedad Humana	Artritis Reumatoide	Desconocido	Crónico	HLADR4/DR1
Modelos del ratón				
Artritis Inducida	<i>Staphylococcus aureus</i> -induce artritis	El síndrome de shock Tóxico toxina-1-productor <i>S. aureus</i> LS-1 tension	Agudo	H2 ^k > H2 ^p , H2 ^q
Modelos	<i>Borrelia burgdorferi</i> -asociada artritis (modelo para enfermedad-Lyme) La artritis colágeno-inducido La artritis colágeno-inducido	<i>Borrelia burgdorferi</i> Heterólogo colágeno tipo II (CII) Homólogo colágeno tipo II	Agudo Agudo/crónico Crónico	Nd H2 ^q =H2 ^r >H2 ^q H2 ^b
	Proteoglycano - induce artritis Pristan-induce artritis Anticuerpo Anti-CII - induce artritis Anticuerpo de Anti-GPI transferido-induce artritis	Cartilago humano proteoglycano Pristan (2,6,10,14 tetramethylpentadecane) Transferencia de colágeno tipo II anticuerpos específicos Transferencia de GPI- anticuerpos policlonales específicos [37]	Agudo a crónico, Crónico Agudo Agudo	H2 ^d , H2 ^k Nd MHC independiente MHC independiente
Modelos genéticamente manipulados	TNF- α transgenico IL-1Ra HTLV-1 env-pX transgenico K/BxN de TCR el transgenico	Factor de necrosis tumoral Humano IL-1 receptor antagonista Célula T- Virus Humano de Leucemia Tipo 1 env-pX H2 ^k restringe el ribonucleosa bovina (KRN) del péptido TCR específico	Agudo Crónico Crónico Crónico	Nd Nd MHC independiente H2 ^{g7}
Modelo ambiental-induce artritis	Stress-induce artritis	Crónico	Nd	

A su vez se debe tener en cuenta que los modelos del ratón que a menudo se usan tienen una respuesta aguda y limita a la enfermedad, considerando que la AR es caracterizada por una inflamación crónica en las articulaciones (Klareskog & McDevitt, 1999).

Los modelos animales son específicamente las herramientas esenciales para las líneas terapéuticas. En donde se trabaja para identificar al óptimo la patogénesis, así como el desarrollo de nuevas y mejores terapias alternativas, y revelar los caminos controlados por los genes polimórficos asociados con la AR. (Lindqvist, Bockermann et al., 2002).

CARACTERÍSTICAS DEL RATÓN Balb/c

A principios del siglo XVII, el ratón fue utilizado en estudios de anatomía comparada, pero la aceleración de la investigación biológica en el siglo XIX y el renovado interés en la genética en el siglo XX y, así como las necesidades de un mamífero pequeño, económico, de fácil alojamiento y alimentación fueron los motivos para desarrollar el moderno ratón de laboratorio.

Todas las cepas de los ratones de laboratorio se han desarrollado a través de cruzamientos selectivos incluyendo la cepa Balb/c. La mayoría de las cepas de ratones de laboratorio que se ha seleccionado es albina.

Los ratones de laboratorio constituyen entre el 60 % y el 80% de los mamíferos usados en la investigación, esto es debido a su gran prolificidad, a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tienen acerca de su fisiología y anatomía, como también a su fácil manejo.

Un gran número de ratones se utiliza para bioensayos, realización de pruebas de toxicidad, estudios de nuevos fármacos, estudios de microbiología y virología. En la investigación oncológica se emplean principalmente cepas consanguíneas, ya que presentan una alta incidencia de tumores.

El periodo de vida del ratón es de 1 ½ a 3 años. Existen algunas diferencias de longevidad entre cepas como consecuencia básicamente a su distinta susceptibilidad ante procesos patológicos.

Los ratones nacen sin pelo, con los ojos y oídos cerrados, vocalizan y son muy activos. Al tercer día, el pelo comienza a crecer, al décimo día el pelaje ha cubierto el cuerpo y el meato auditivo externo esta completamente abierto. A los doce días de edad, abren los ojos. Los ratones comienzan a comer cualquier alimento sólido y al mismo tiempo aprenden a beber agua del pezón de la botella por imitación de otros a los 13 – 14 días de edad.

Los ratones se podrán destetar entre los 19 y los 28 días de edad con un peso de 10 a 12 gramos cuando ya son capaces de comer de manera independiente.

El ratón posee una superficie relativamente grande por gramo de peso corporal. Esto trae como consecuencia cambios fisiológicos drásticos en respuesta a las fluctuaciones de temperatura del medio. Un ratón en descanso, aclimatado al frío, genera el calor equivalente al triple de su metabolismo basal. Un ratón debe generar cerca de 46 kcal/m/24 horas para mantener su temperatura corporal por cada grado centígrado que descienda la temperatura del medio.

En la investigación animal, es necesario el sacrificio de los animales para la obtención de tejidos o bien, realizar estudios *in vitro* durante el estudio o en la fase final de éste. Por lo que es indispensable que los investigadores o el personal que trabaja con los animales, tenga conocimiento de los métodos o técnicas de eutanasia y estén capacitados para realizarlos.

El termino eutanasia significa muerte sin dolor y es el proceso mediante el cual se sacrifica a los animales, utilizando técnicas humanitarias reconocidas y aceptadas como lo son: el aturdimiento con desangrado, dislocación cervical, agentes anestésicos inhalados y la aplicación de gases no anestésicos, realizándose de manera silenciosa sin dolor (o el menor posible) y, sin producir signos de miedo o ansiedad en el manejador y/o en el animal (Bautista, 1994).

MODELOS MURINOS DE INDUCCION DE AR CON PROTEOGLYCANO (AIPG)

En ratones los mejores modelos son artritis inducida con colágena y la artritis inducida con proteoglycano. La artritis inducida con proteoglycano se lleva a cabo mediante inyecciones intraperitoneales de proteoglycano emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (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 este modelo presenta características típicas de la artritis humana (Bina & Ronald L. Wilder, 1999). La artritis aparece dos semanas después de la última inmunización y puede ocurrir en cualquiera de las extremidades delanteras, traseras o ambas.

La artritis inducida con proteoglycano (AIPG) es un modelo murino de la Artritis Reumatoide, donde se estudia la patogénesis e inmuno genética de este padecimiento.

El proteoglycano (agrecan)-induce artritis (AIPG) con un 100% de incidencia en las extremidades de Balb/c. Los ratones de Balb/c son susceptibles a AIPG. La AIPG sólo puede inducirse en las extremidades del ratón susceptibles y su descendencia de F2. Brevemente relatamos la metodología según Otto (2000): se inmuniza a los ratones con proteoglycano del cartílago (agrecan) con 100 µg de proteína emulsionada en el adyuvante (100 µl) y se inyecta vía intraperitoneal (i.p.) en los días 0, 7, 28, y 49. En las primeras y cuartas inyecciones se aplica con Adyuvante Completo de Freund (CFA), considerando que la segunda y tercer inmunización contienen antígeno (Ag) en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) (Otto, Chandrasekeran et al., 2000).

La artritis puede ser inducida en ratones Balb/c inmunizados con proteoglycano del cartílago humano (AIPG). El estudio del cuadro clínico e histológico y las articulaciones afectadas en los ratones de este modelo pretenden revelar una respuesta inflamatoria que desarrolla y comparte muchas similitudes a la AR humana.

Existen reportes de artritis inducida inyectando PG en los ratones hembras Balb/c con 100 µg PG humano moderado, como la proteína en la presencia de CFA, en donde la primera inyección se hizo con IFA, y el segunda con CFA a los Ratones a 3 y 6 semanas con 100 µg de hPG. Los ratones desarrollaron la artritis en las articulaciones 2 y 4 semanas después de la tercera inmunización. Los estudios histológicos que determinaron la magnitud de la inflamación de los empalmes y el daño del tejido se llevaron a cabo por un histólogo especialista, que examinó el daño y anotó los cambios artríticos como normales (ninguno), apacible y moderado (Kaplan Charles D, O'Neill Shannon K. et al., 2002).

Otros autores mencionan que la inmunización con cartílago humano fetal proteoglycano y el adyuvante completo de Freund induce poliartritis y espondilitis anquilosa en ratones hembras Balb/c, presentando síntomas externos iniciales de la inflamación común como eran hinchazón y enrojecimiento. Asociada al edema de la sinovia y de la proliferación periarticular del tejido fino y grueso de las células, que alcanzaron un pico durante 7-9 semanas del experimento. El desarrollo de esta artritis fue acompañado por la expresión de la inmunidad celular y humoral transmitida por el antígeno de inmunización. Sin embargo, los ratones que recibieron el proteoglycano intacto sin el adyuvante generalmente no desarrollaron artritis, al igual que los ratones controles que recibieron solamente ayudante (Giant, Mikecz et al., 1987).

También existen antecedentes de hiperinmunización con condrocitos sulfato-saturados del proteoglycano del cartílago humano fetal (HFPG) conduce al desarrollo de la artritis y espondilitis periférica en ratones Balb/c. El cartílago humano Condrocito-sulfato-agotado del adulto proteoglycano (HAPG) es mucho menos eficaz en inducir artritis (Leroux, Poole et al., 1992).

Se ha sugerido que la autoinmunidad del componente cartílago proteoglycano (PG) desempeña un papel importante en la etiología de la artritis inducida con ayudante (AA), que ocurre en ratas, pero no en ratones, después de la inyección del CFA. La inmunización de ratas o en ratones con la PG por sí mismo no induce artritis. Sin embargo, en ratas, una sola inyección de vía intravenosa (i.v.) de PG soluble, dada 1 semana antes de

la inyección del CFA, da lugar a un aumento significativo en incidencia y a la severidad de la artritis inducida. Los resultados apoyan la hipótesis que la inmunidad a la PG es de importancia en la AA, aunque bajo condiciones de la inmunidad de estos experimentos inducidos con PG solamente, no es suficiente para la inducción de la artritis (Vollenhoven, Soriano et al., 1998).

En un modelo de artritis autoinmune en que los ratones de Balb/c son inmunizados con el cartílago, humano proteoglycano se desarrolla la enfermedad de la AR. Este modelo muestra muchas similitudes con la artritis reumatoide humana y se mide Th1; Además que la predisposición de los ratones Balb/c hacia un fenotipo de Th2 hace este modelo ideal por estudiar IL-4 y la regulación de la respuesta de Th1 en el vivo. Aunque una respuesta tipo Th2 en ratones de Balb/c es perjudicial con respecto a parásitos, puede ser protectora en el caso de la autoinmunidad. Hace varios años demostraron que inmunizaciones en los ratones de BALB/c (H-2d) con proteoglycano del cartílago humano (PG) induce poliartritis y espondilitis progresiva. Los resultados obtenidos en investigaciones con AIPG indican que la inmunización con proteoglycano emulsionado en el CFA es un suficiente estímulo Th1 para superar la tendencia genética hacia el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 en ratones de Balb/c (Finnegan, Mikecz et al., 1999).

El proteoglycano (Agrecan) del cartílago de bovino de alta densidad, se ha demostrado que induce poliartritis progresiva y espondilitis anquilosante en ratones genético susceptibles de Balb/c. Uno de los hibridomas PG-específicos de la célula de T (5/4E8), cuando estaba siendo inyectado en ratones irradiados susceptibles de Balb/c, era capaz de inducir muestras clínicas e histopatológicas de la artritis. En donde la hinchazón y enrojecimiento masivo de las patas dominaron el cuadro clínico. La pérdida de PG en la capa superficial del cartílago articular, y la erosión de la superficie articular eran muestras histopatológicas contundentes (El Buzas, FR Brennan et al., 1995).

En base a los antecedentes del proteoglycano del cartílago que induce AR en ratones Balb/c y que la artritis inducida con proteoglycano (AIPG) se lleva a cabo mediante inyecciones intraperitoneales de proteoglycano emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) en ratones de la cepa Balb/c hembras, ya que son más susceptibles que machos (Giant, Mikecz. et al., 1987) se realizara este estudio; en donde el desarrollo de la poliartritis, la presencia del factor reumatoide y la sedimentación de complejos inmunes en las articulaciones, indican que este modelo presenta características típicas de la artritis humana (Bina & Ronald L. Wilder, 1999).

III.- JUSTIFICACION

Basándonos en el antecedente de que el proteoglycano del cartilago induce AR en ratones Balb/c y que la artritis inducida con proteoglycano (AIPG), se lleva a cabo mediante inyecciones intraperitoneales de proteoglycano emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) en ratones de la cepa Balb/c hembras ya que son más susceptibles que machos (Glant, Mikecz. et al. 1987) en donde el desarrollo de la poliartritis, la presencia del factor reumatoide y la sedimentación de complejos inmunes en las articulaciones, indican que este modelo presenta características típicas de la artritis humana (Bina & Ronald L. Wilder, 1999).

Se llevó a cabo la inducción de la Artritis Reumatoide con proteoglycano de pollo, haciendo previamente una prueba piloto con el proteoglycano de bovino (agrecan) para comprobar su eficacia de inducción y tomar en cuenta el inductor mas eficiente en el desarrollo de los síntomas para la reproducción del modelo murino, comprobando el desarrollo de los síntomas, daños histológicos y evolución de la enfermedad experimental, así como también con el objetivo de estandarizar la técnica en el Laboratorio de Inmunobiología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Creando con este trabajo una alternativa de estudio para diferentes caminos patológicos relacionados con enfermedades autoinmunes y el uso de inmunomoduladores para el tratamiento de las mismas. De manera que al establecer un modelo murino en donde se puede reproducir una enfermedad patológicamente similar a la del humano, ayude al estudio de la misma y a la prueba de fármacos, inmunoreguladores o nuevas terapias alternativas.

IV.- HIPOTESIS

La inmunización con proteoglycano de pollo es capaz de inducir artritis tipo reumatoide (AR) en ratones hembras Balb/c.

V.- OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Reproducir el modelo de Artritis Reumatoide (AR) en ratones hembras Balb/c con inmunizaciones de proteoglycano de pollo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Inmunizar los ratones Balb/c con proteoglycano de pollo con cuatro inmunizaciones durante 49 días.
- Registrar las marcas visuales (RMV) de las articulaciones de los ratones hembras Balb/c para visualizar la evolución de la artritis durante el periodo de inicio de la inducción hasta el sacrificio de los animales en experimentación
- Determinar la evolución de la artritis tipo reumatoide a nivel histopatológico durante su inducción por proteoglycano.

VI.- MATERIAL Y METODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

SEDE

Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

TIPO DE ESTUDIO

Experimental, comparativo y longitudinal

TAMAÑO MÍNIMO DE LA MUESTRA

3 Grupos de 10 ratones cada uno.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se expresaron como promedios \pm DS de cada grupo de ratones. Las diferencias entre los grupos se analizaron con la prueba de t de student y una $p < 0.05$ se considero como significativa.

VARIABLES

Independiente:

- Inmunizaciones vía intraperitoneal de proteoglicano

Dependiente:

- Signos articulares.

Criterios de inclusión:

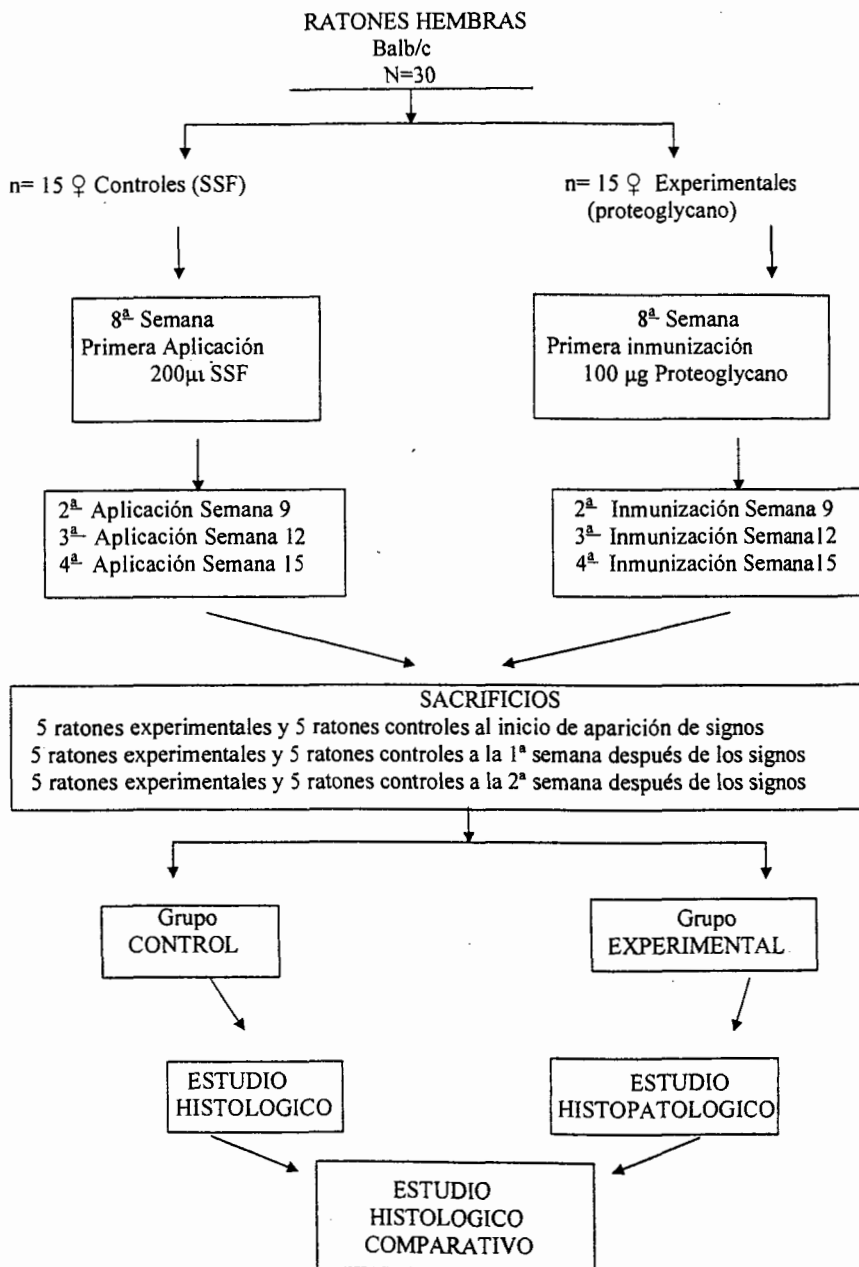
- Ratones hembras sanas de la cepa Balb/c con peso promedio 18-22gr.

Criterios de no inclusión:

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

Criterios de exclusión:

- Ratones que no desarrollen artritis y que durante el período de experimento desarrollen alguna enfermedad.



ANIMALES

Los ratones Balb/c hembras de 8-9 semanas de la edad fueron obtenidos en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO-IMSS), estos fueron formados en grupos de 15 y alojados en jaulas de policarbonato, manteniéndose en ciclos alternos de luz-oscuridad de 12 hrs. alimentados con una dieta balanceada para roedores y agua a consumo voluntario, a una temperatura de 20 a 27 °C en el Bioterio del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

PROTEOGLYCANO

El proteoglycano de pollo, al igual que el de bovino fue adquirido mediante un distribuidor de reactivos y productos Químicos (clave P-5989 y P-5864 de Sigma).

INDUCCIÓN DE ARTRITIS REUMATOIDE CON PROTEOGLYCANO (PGIA)

La artritis inducida con proteoglycano (Glant, Mikecz. et al. 1987) se llevó a cabo mediante cuatro inmunizaciones vía Intrapentoneal, en 30 ratones hembras de la cepa Balb/c debido a que son más susceptibles que los machos (Kaplan Charles D, O'Neill Shannon K. et al. 2002), 15 experimentales inmunizados con Proteoglycano de pollo y 15 controles a los que se les administró Solución Salina Fisiológica (SSF), como a continuación se explica:

1^{era} Inmunización:

- Inducido por inyección intrapentoneales (i.p) con 100 µg de proteoglycano emulsificado en 200 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) a las 8-9 semanas de edad de los ratones (día cero).

2^{da} Inmunización:

- Inducido por vía i.p. 100 µg de proteoglycano a los 7 días posteriores a la primera inmunización emulsificado en 200 µl de Adyuvante Incompleto de Freund (IFA).

3^{era} Inmunización:

- Inducido por vía i.p. 100 µg de proteoglycano a los 28 días posteriores a la primera inmunización emulsificado en 200 µl de IFA.

4^{ta} Inmunización:

- Inducido por i.p. 100 µg de proteoglycano a los 49 días posteriores a la primera inmunización emulsificado en 200 µl IFA.

A los ratones controles se les administro SSF de igual manera en los mismos días de inmunización, con tal de aplicar el mismo estímulo (stress), pero obviamente esperando una reacción diferente.

GRUPOS DE RATONES

Se organizaron tres Grupos de ratones (A, B y C), de 10 ratones por grupo teniendo en cada uno de ellos 5 ratones inmunizados y 5 controles ordenados por día de sacrificio; dos semanas después de la última inmunización, tres semanas después y cuatro semanas después. Quedando de la siguiente manera:

Grupo A: 5 ratones experimentales inmunizados y 5 ratones controles con sacrificio al inicio de signos de inflamación (tumor), principalmente el aumento del diámetro de la articulación dos semanas después de la última inmunización.

Grupo B: 5 ratones experimentales inmunizados y 5 ratones controles con sacrificio una semana después del inicio de los signos de inflamación; es decir, tres semanas después de la última inmunización.

Grupo C: 5 ratones experimentales inmunizados y 5 ratones controles con sacrificio dos semanas después del inicio de signos de

inflamación; es decir cuatro semanas después de la última inmunización.

REGISTRO DE MARCAS VISUALES

Con tal de observar la evolución de la artritis se llevó a cabo un registro de las marcas visuales por una persona (estudiante de Maestría en Inmunología) ajena al estudio, de tal manera que fuera un estudio doble ciego; ya que en las dos primeras semanas después de la última inmunización aparecieron signos de inflamación en las extremidades delanteras, traseras o ambas de los ratones inmunizados. Signos tales como edema, enrojecimiento, sensibilidad al manejo y en algunos pequeña disfunción motora.

Este registro de marcas visuales (RMV) fue determinado por la medición del diámetro de las articulaciones de los ratones, tanto inmunizados como no inmunizados por el observador con un Vernier (Pie de Rey); llevando las anotaciones correspondientes a cada ratón de cada grupo en una bitácora de mediciones, registrando signos de enrojecimiento (rubor), sensibilidad al manejo, aumento del diámetro de las articulaciones (tumor) y disfunción motora de las extremidades de los ratones, con la finalidad de comprobar la evolución de la artritis visualmente desde antes de la inmunización (día cero) hasta su día de sacrificio, haciendo con esto una comparación entre los ratones controles y los ratones inmunizados para comprobar si hubo posible inflamación en estos últimos.

ANALISIS ESTADISTICO

Los valores se expresan como promedios \pm DS de cada grupo de ratones. La diferencia entre los grupos se analizo con la prueba de t de student, que es una prueba para variables dependientes y una $p < 0.05$ será considerada como significativa.

SACRIFICIO

Basándonos en los grupos formados se pasó al sacrificio de los ratones, el cual se hizo a las dos (Grupo A), tres (Grupo B) y las cuatro (Grupo C) semanas de la última inmunización por dislocación cervical; la cual consiste en interrumpir la comunicación del cerebro y la médula espinal mediante la separación de las vértebras cervicales (Bautista 1994).

HISTOLOGÍA

Después de dos, tres y cuatro semanas de la última inmunización en que los ratones fueron sacrificados, con la finalidad de obtener así las extremidades delanteras y traseras de los animales se realizó el procesamiento de tejidos para su análisis histológico e histopatológico.

Las extremidades fueron fijadas con formalina neutra y estabilizada al 10%, descalcificadas en ácido fórmico al 15% durante diez días y procesadas para ser incluidas en parafina.

Se hicieron cortes histológicos de 10 micras de las articulaciones que fueron teñidas mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina (Prophet, Mills. et al. 1995) para hacer analizados por un histopatólogo especializado y se realizó el estudio comparativo entre los ratones controles e inmunizados a nivel histológico.

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Para aumentar el contraste de las estructuras tisulares y preservarlas a través del tiempo (Prophet, Mills. et al. 1995) (Burck, 1969), se deben realizar los siguientes procedimientos:

- Fijación
- Descalcificación
- Deshidratación
- Aclaración
- Inclusión

- Corte
- Tinción

I) Fijación: Su función es preservar el tejido en la forma más parecida a la de su estado natural. Los constituyentes celulares son tratados químicamente y físicamente, quedando en un estado que impide una distorsión celular significativa, previniendo la difusión de las sustancias intra y extracelulares, desnaturalizando las enzimas lisosomales que tienden a hidrolizar los constituyentes celulares, y permitiendo el tratamiento posterior con diversos reactivos. Idealmente un buen fijador debe penetrar el tejido rápidamente, desarrollar una acción instantánea, ser isotónico, estable, de fácil manejo y de bajo costo. Y por último debe presentar un mínimo de difusión y causar las mínimas alteraciones de los componentes celulares. Uno de uso generalizado es el Formaldehído al 10%.

II) Descalcificación: Los tejidos contienen sustancias más o menos duras que no se pueden cortar, o si se cortan deterioran las cuchillas. Esta se lleva a cabo mediante el tratamiento de ácidos fuertes como el ácido fórmico y el ácido acético, entre otros.

III) Deshidratación: Extraer y reemplazar paulatinamente el contenido de agua, con sustancias que tengan una cierta afinidad con el medio acuoso en que están las células. Utilice el alcohol etílico.

IV) Líquido intermediario y aclarante: El líquido intermediario es miscible con el alcohol y el medio de inclusión. Y su misión es aumentar la transparencia del tejido, que evite la presencia de opacidades que posteriormente dificultan la observación de los cortes histológicos. Entre los que se utilizan están el Xilol, Benceno y Acetato de butilo.

IV) Inclusión: Consiste en el reemplazo, en el material biológico, del último solvente usado en la deshidratación, por un material que dé suficiente consistencia al tejido, como para permitir cortes delgados que no distorsionen ni alteren la disposición de sus elementos celulares.

El tejido ya deshidratado y aclarado, se sumerge en el medio de inclusión a una temperatura elevada a la de su punto de fusión, 50 – 55 °C, y después del tiempo requerido para que el solvente haya sido en su mayor parte reemplazado por el material de inclusión, se deja solidificar a temperatura ambiente, para permitir realizar los cortes histológicos.

V) Corte histológico: El bloque de tejido incluido en parafina (paraplast), se corta en unas tiras muy finas de tejido, 10 micras en un micrótopo.

VI) Tinción: Permite estudiar las características morfológicas del tejido y sus constituyentes celulares. Los componentes tisulares presentan diferentes afinidades por los colorantes, y debido a la variada estructura y composición fisicoquímica de las diferentes células y tejidos.

En general, los colorantes que se usan son sustancias químicas orgánicas complejas. Existen de tipo morfológico / topográfico sin una base química definida, más que su afinidad y uniones moleculares. Siendo la más usada, por excelencia la Hematoxilina / Eosina.

La Hematoxilina es un colorante natural que se extrae de la corteza del Campeche. Y ésta debe ser transformada en una taca colorante con la adición de un mordiente, sustancia que tiene por objeto ayudar a la unión del colorante a la estructura del tejido. El colorante es básico. La estructura a teñir es el núcleo de la célula que tiene afinidad por los colorantes básicos (basófilo), y da un color azul.

La Eosina es un colorante ácido y de buen contraste con la Hematoxilina. Tíñe el citoplasma en general, que es acidófila ya que tiene afinidad por el colorante ácido. Y da un color rosado pálido. Y de tal manera que el propósito fundamental de la coloración/tinción es: "inducir diferencias de absorción de luz entre las distintas estructuras, de modo de poder diferenciarlas según sus características tintoriales" (José Carlos Crispín & Varela 1999), (Burck, 1969), (Prophet, Mills et al. 1995).

PROCESAMIENTO DE EXTREMIDADES

Una vez obtenidas las extremidades, se colocaron en formalina neutralizada al 10% por diez días, posteriormente se descalcificaron en Ac. Fórmico al 15 % durante 10 días, para que después recibieran los tres pasos del procesamiento de tejidos -deshidratación, aclaración e infiltración- que como lo ya descrito son pasos secuenciales, designados para remover toda el agua que se pueda extraer de los tejidos y reemplazarla con un medio que se solidifique para así permitir el corte de estos tejidos.

Ya descalcificadas las extremidades se pasaron a un tren de procesamiento manual de tejidos donde se aplicaron los tres pasos del procesamiento, llevado mediante el siguiente esquema:

Alcohol al 50 %.....	1 hora
Alcohol al 70 %.....	1 hora
Alcohol al 80 %.....	1 hora
Alcohol al 96 %.....	1 hora
Alcohol al 96 %.....	1 hora
Alcohol absoluto.....	1 hora
Alcohol absoluto, 2 cambios.....	1 hora c/u.
Xileno, 2 cambios.....	1 hora c/u.
Parafina 2 cambios.....	1.30 hrs. c/u.

Incluir en parafina.

La inclusión es el proceso de rodear un tejido con una sustancia firme, tal como la parafina para poder obtener secciones delgadas sin que pierdan su estructura. Después de tener las piezas incluidas en parafina se cortaron en micrótopo a 10 micras montándolas en portaobjetos gelatinizados con grenetina.

Posteriormente las placas se desparafinaron en el horno a 60 °C y se hidrataron para retirar el exceso de parafina, para después pasarlas al tren de tinción mediante el siguiente esquema:

Procesamiento de Hematoxilina y Eosina de Harris:

Se desparafinaron las láminas e hidrate.

Xilol	50''
Alcohol al 100 %	5-10 baños de 4'' c/u
Alcohol al 96 %	5-10 baños de 4'' c/u
Alcohol 70 %	5-10 baños de 4'' c/u
Se lavaron con agua corriente.....	5-10 baños de 4'' c/u
Se tiñeron con Hematoxilina	45'' - 1'
Se lavaron con agua corriente	5-10 baños de 4'' c/u
Se azularon las láminas en una solución débil de agua amoniacal o en una solución saturada de carbonato de litio	Entrada por salida
Se lavo con agua corriente	5-10 baños 4'' c/u
Alcohol al 96 %	5-10 baños 4'' c/u
Se contrastaron con Eosina	45'' - 1'
Alcohol al 96 %	5-10 baños 4'' c/u
Alcohol al 96 %	5-10 baños 4'' c/u
Alcohol al 96 %	5-10 baños 4'' c/u
Alcohol al 100 %	5-10 baños 4'' c/u
Alcohol al 100 %	5-10 baños 4'' c/u
Xilol	5 baños 4'' c/u
Xilol	5 baños 4'' c/u

Se montaron con resina sintética y se dejaron secar.

Se observaron al microscopio para su análisis histológico e histopatológico

EXÁMEN E INTERPRETACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Se debe comenzar el estudio de la placa histológica a través del microscopio óptico desde el aumento menor (objetivo 5X), ya que revelará una zona de mucha mayor observación del tejido que los objetivos de mayor aumento del microscopio, moviendo la laminilla, es posible examinar con rapidez todo el corte histológico.

Después de esta observación general, se puede seleccionar la zona de mayor interés, que demuestre un cambio o una característica nueva o que

falte en el tejido en estudio, para que sea colocada en el centro y ser observada a mayor aumento.

Hay que tener en cuenta que al tener un campo visual y usar aumentos menores de 1.500 micras ó 0.015 mm, se va disminuyendo en forma directa al usar los objetivos de mayores aumentos, llegando a aproximadamente 100 micras ó 0.010 mm. Además al estudiar los cortes histológicos es importante hacer una reconstrucción mental tridimensional de las células, tejidos y órganos, ya que por razones prácticas los cortes no tienen profundidad. A este respecto se debe tener en cuenta que un órgano puede dar una falsa impresión de su arquitectura, por ello es importante usar varios cortes hechos en distintos planos para poder interpretar la estructura de órganos complejos (José Carlos Crispín & Varela 1999).

Tomado una muestra aleatoria de los cortes de los ratones, conforme a los tres grupos formados respecto al sacrificio, a las dos, tres y cuatro semanas después de la última inmunización, fueron analizados por el Dr. Felipe Cerda jefe del área de histopatología en el Hospital Civil de Guadalajara, como persona ajena al proyecto (estudio doble ciego) con tal de proporcionar los datos de daño de tejido y presencia de la AR en los ratones.

VII.- RESULTADOS

La prueba piloto que se realizó al inicio con una $n = 5$ por grupo; donde se tenían dos grupos, los controles y los experimentales inmunizados, fue el principal punto de partida para inducir artritis en ratones Balb/c, esta con proteoglycano de pollo para comprobar su eficacia como inductor y posteriormente acrecentar el tamaño de la muestra.

Pero a su vez se realizó también una prueba piloto con 10 ratones (5 Controles y 5 experimentales inmunizados) inducidos con Proteoglycano de bovino, con la finalidad de encontrar cual inductor presentaba mejores resultados en la expresión de signos de inflamación como lo eran visualmente, el incremento de las articulaciones (tumor), enrojecimiento (rubor) y sensibilidad al manejo y movimiento. De estas pruebas piloto cabe destacar que se encontraron mejores resultados con el proteoglycano de pollo, ya que los ratones inmunizados presentaban estos signos de inflamación en comparación con los controles después de dos semanas de la última inmunización. En contraste con el proteoglycano de bovino que no produjo inflamación alguna en las articulaciones pero si presentaron hepatoesplenomegalia (Fig. 5) (crecimiento de hígado y bazo) los ratones inmunizados. Basados en estas pruebas piloto, se procedió a incrementar la muestra, formando grupos más significativos para inducir la artritis con proteoglycano de pollo.



Figura. 5 Comparación de órganos (hígado y bazo) de los ratones inmunizados (derecha) contra los ratones controles (izquierda)

RESULTADOS DEL REGISTRO DE LAS MARCAS VISUALES

Los primeros signos de inflamación, aparecieron 2 semanas después de la cuarta inmunización en las articulaciones de las extremidades delanteras, posteriormente también se observaron en algunas articulaciones de las extremidades traseras.

Como se mencionó anteriormente en la metodología, el registro de marcas visuales (RMV) se tomó en el día cero, durante cada inmunización y después de la aparición de signos de inflamación dos veces por semana para observar la evolución de estos. Las mediciones de los diámetros de las articulaciones fueron representadas en milímetros (mm) tomadas de las muñecas, los codos, los tobillos, los tarsos y las rodillas de cada ratón, tanto de los ratones controles como de los experimentales inmunizados; encontrando que los codos y las rodillas fueron las más afectadas que presentaron un incremento en el diámetro, aunque cabe señalar que algunas de las muñecas también tenían ligero aumento, esto solo en aquellos ratones inmunizados con proteoglycano de pollo, los controles permanecieron normales. Tomando en cuenta que los sacrificios fueron hechos para obtener las extremidades anteriores y posteriores de los ratones para comprobar la evolución de los signos de inflamación y la posible presencia de AR a nivel histológico se realizaron tres sacrificios.

1er. Sacrificio se llevó a cabo dos semanas después de la última inmunización (Grupo A).

2do. Sacrificio se llevó a cabo tres semanas después de la última inmunización (Grupo B).

3er. Sacrificio se llevó a cabo cuatro semanas después de la última inmunización (Grupo C).

Los resultados se presentan por promedios de las mediciones tomadas el día cero comparados con los promedios de las mediciones de la última inmunización y de cada día de sacrificio. Esto considerando que el incremento del diámetro se dio en los codos, las rodillas de manera marcada; las graficas (cuadro. 3-5) incluyen los promedios de las mediciones

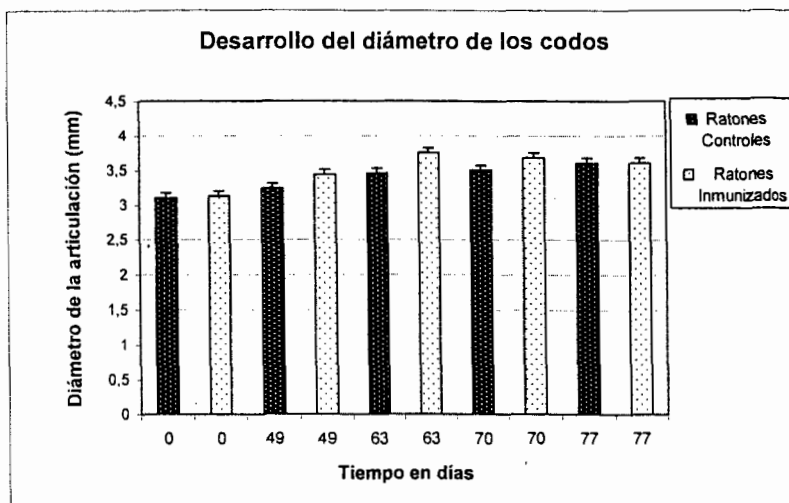
de codos y rodillas de los ratones controles e inmunizados, observando con ello su evolución y comparación entre estos, desde el día cero hasta el día de sacrificio de cada grupo.

Se realizó una prueba estadística de diferencia significativa (t de student con una $p < 0.05$) para observar las comparaciones significativas entre las mediciones de los codos y rodillas del ratón control comparado con la medición del ratón inmunizado. En donde la hipótesis nula dice que las medias del diámetro de ambas muestras eran iguales ($\mu_x = \mu_y$) y la hipótesis alternativa menciona que, la media del diámetro de la muestra 1 (μ_x - ratones controles) era mayor que la media de la muestra 2 (μ_y - ratones experimentales inmunizados).

H_0 - $\mu_x < \mu_y$ – Rechazada

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

La grafica (cuadro. 3) siguiente representa el desarrollo del diámetro de las articulaciones, de los codos de los ratones controles (barras negras) comparado con el diámetro de las articulaciones de los codos de los ratones inmunizados (barras blancas) medidos desde el día cero hasta la última inmunización. Teniendo una muestra de 30 ratones (15 controles y 15 inmunizados), que como se mencionó en la metodología fueron sacrificados 5 controles y 5 inmunizados desde que presentaron los signos de inflamación.



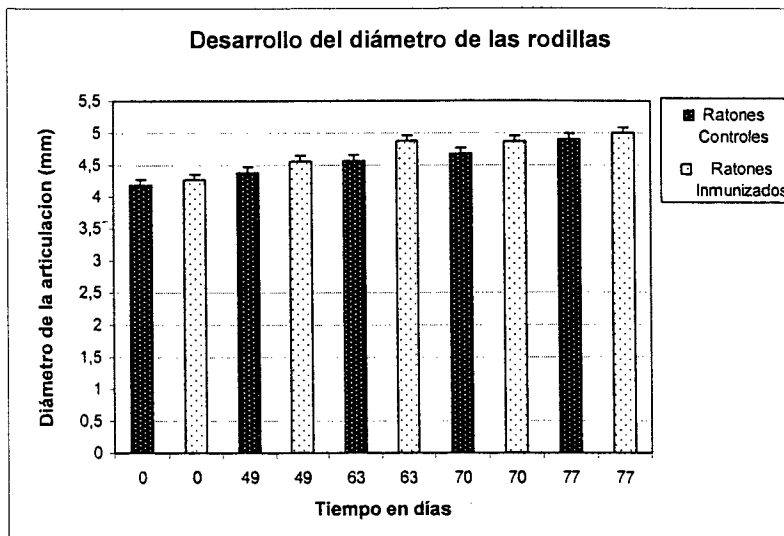
Cuadro. 3 Grafica del desarrollo del diámetro de las articulaciones de los codos de los ratones controles (Cn) comparados con los de ratones inmunizados (In) desde de el día cero hasta el día de su sacrificio.

Encontramos como resultado un aumento en el diámetro de las articulaciones de los codos de los ratones inmunizados como punto máximo en el primer sacrificio (grupo A). Esto expresado mediante la prueba estadística de diferencia significativa, como se muestra de la siguiente manera:

Se realizó la prueba t estadística de comparaciones significativas de los promedios de los diámetros de las articulaciones de los codos de ratones controles comparados con los promedios de los diámetros de las articulaciones de los codos de los ratones inmunizados en el 1^{er} sacrificio, que fue donde se observó el punto máximo de incremento; la hipótesis nula menciona que ambos diámetros son iguales.

Se encontró como resultado que existe una diferencia en $p < 0.05$, donde se obtuvo una t calculada = 3,0536 y la $t_{0,05} = 1,6707$ rechazándose así la hipótesis nula. Por lo que se acepta la hipótesis alternativa que menciona que existe diferencia entre ambos promedios de diámetros de articulaciones comparados.

La siguiente grafica (cuadro. 4) representa el desarrollo que muestra el diámetro de las articulaciones de las rodillas de los ratones controles (barras negras) comparado con el diámetro de las articulaciones de las rodillas de los ratones inmunizados (barras blancas) medidos desde el día cero hasta la ultima inmunización.



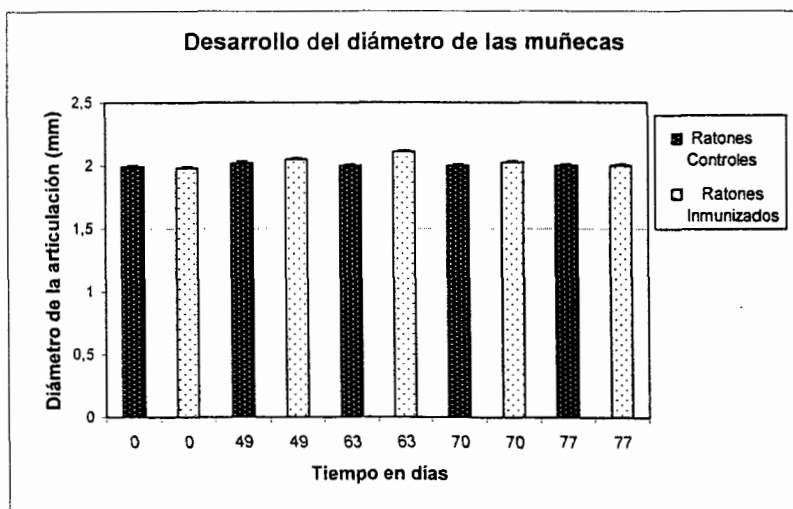
Cuadro. 4 Grafica del desarrollo del diámetro de las articulaciones de rodillas de los ratones controles (Cn) comparados con las de ratones inmunizados (In) desde el día cero hasta el día de su sacrificio.

En esta grafica (cuadro. 4) de comparación del diámetro de las articulaciones de rodilla se obtuvo como resultado un aumento en el diámetro de las articulaciones de las rodillas de los ratones inmunizados como punto máximo tres semana después de la ultima inmunización que corresponde al tercer sacrificio (grupo C). Que expresado mediante la prueba t estadística de diferencia significativa, se menciona:

En la comparación significativas de los promedios de los diámetros de las articulaciones de las rodillas de los ratones controles comparados con los promedios de los diámetros de las articulaciones de las rodillas de los ratones inmunizados en el 3^{er} sacrificio, donde la hipótesis nula menciona

que existe igualdad en ambos promedios y la hipótesis alternativa expresa que existe diferencia; se obtuvo una t calculada para estas dos muestras de $t = 0.0738$ y la t de tablas fue $t_{0,05} = 1,7341$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Expresando que existe diferencia en la comparación de promedios de articulaciones entre las de los ratones controles contra las de los ratones inmunizados en el 3^{er} sacrificio.

También se encontró un pequeño aumento del diámetro de las articulaciones de las muñecas de los ratones, como se representa en la siguiente grafica (cuadro. 5), donde están expresados los promedios de los grupos

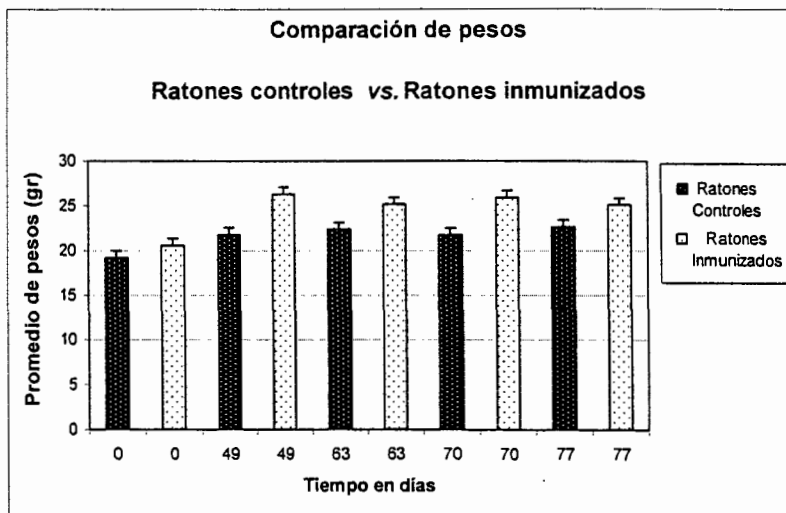


Cuadro. 5 Grafica del desarrollo del diámetro de las articulaciones de las muñecas de los ratones controles (Cn) comparados con las de ratones inmunizados (In) desde el día cero hasta el día de su sacrificio.

Se realizó la prueba t para observar diferencias en la comparación de promedios del diámetro de las articulaciones de las muñecas de los ratones controles en el día cero contra los promedios de los ratones inmunizados en el 1^{er} sacrificio (punto máximo), donde la hipótesis nula expresaba que no existe diferencia significativa en ambos promedios y la hipótesis alternativa que si existe una diferencia significativa en ambos. Encontrando como resultado una t calculada para la comparación de promedios de $t =$

0,0001387 y el valor crítico encontrado fue $t_{0,05} = 1,6707$ en donde se expresa que la hipótesis nula fue rechazada y aceptada la hipótesis alternativa encontrando diferencias en los promedios del diámetro de las articulaciones comparadas.

Otro parámetro tomado en cuenta fue el peso mostrado en la grafica (cuadro. 6) que muestra la comparación de pesos (gr) de los ratones controles (barras negras) y experimentales inmunizados (barras blancas) en el día cero hasta el día de sacrificio. Encontrando como resultado un aumento de peso en los ratones que fueron inmunizados con proteoglycano de pollo desde el primero al ultimo sacrificio. Al contrario de los ratones controles que se les aplicó solución salina fisiológica que si incrementaron su peso, pero no como los inmunizados.



Cuadro. 6 Grafica de la evolución de los pesos los ratones controles (Cn) comparados con las de ratones inmunizados (In) desde de el día cero hasta el día de su sacrificio.

Encontrando como resultado en esta grafica (cuadro. 6) que los ratones inmunizados aumentaron de peso considerablemente en la ultima inmunización con un peso promedio de 26 gr. en comparación de los ratones controles que mantuvieron su peso durante todo el estudio en un promedio de 19 a 22 gr.

INTERPRETACION DE LOS CORTES HISTOLOGICOS

Con el objetivo de determinar la evolución de la AR a nivel histológico para observar la presencia de posible daño de tejido, se realizaron los cortes histológicos del material parafinado (10 μ m) de las extremidades y fueron analizadas por el Dr. Felipe Cerda, jefe de la unidad de histopatología del Hospital Civil de Guadalajara.

El estudio histológico comparativo se realizó entre los ratones controles contra los experimentales inmunizados en el día de sacrificio de cada grupo, como se mencionó anteriormente en la metodología. Encontrando que no existió una diferencia morfológica en la comparación de las articulaciones de los ratones controles con las articulaciones de los ratones inmunizados sacrificados dos, tres y cuatro semanas después de la última inmunización.

Para hacerlo más representativo se tomaron microfotográficas de las articulaciones (Fig. 6-11) con un objetivo de 5x y 10x como se muestran a continuación:

La figura 6 muestra las comparaciones de los cortes de las articulaciones de los codos del ratón control, contra las articulaciones del ratón inmunizado del 1^{er} sacrificio (grupo A). Realizado mediante cortes de 10 micras teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina, observado en un analizador de imágenes AxioCam MRc versión 4 y microscopio de la marca Carl Zeiss, con objetivo 5x y 10x. En donde se indica en la parte superior derecha (50x) e izquierda (100x) la articulación humeroradiocubital del ratón control y en comparación con la parte inferior derecha (50x) e izquierdo (100x) la articulación humeroradiocubital del ratón inmunizado.

COMPARACION HISTOLOGICA DE CODOS DEL 1^{er} SACRIFICIO
Ratones Controles (Cn) vs. Ratones Inmunizados (In)

GRUPO A

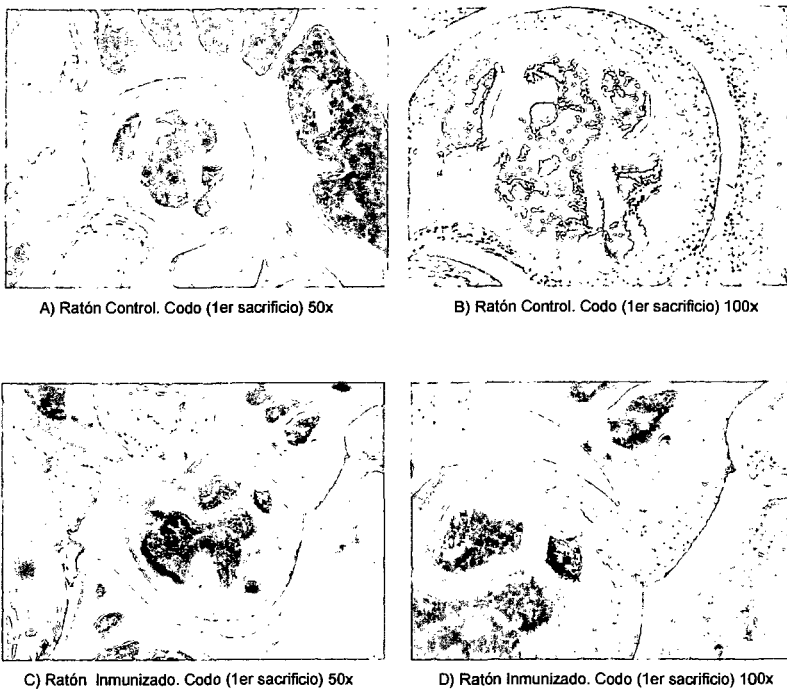


Figura. 6 Comparación histológica de la articulación humeroradiocubital del ratón control (A, B) contra la articulación humeroradiocubital del ratón inmunizado (C, D) del grupo A (1^{er} sacrificio). Con objetivo 5x y 10x.

En la figura 7 se muestran las comparaciones de los cortes de las articulaciones de las rodillas del ratón control contra las articulaciones del ratón inmunizado del 1^{er} sacrificio (grupo A). En donde se observa en la parte superior derecha (50x) izquierda (100x) la articulación femorotibiorotuliana del ratón control y en comparación con la parte inferior derecha (50x) e izquierda (100x) la articulación femorotibiorotuliana del ratón inmunizado.

COMPARACION HISTOLOGICA DE RODILLAS DEL 1^{er} SACRIFICIO
Ratones Controles (Cn) vs. Ratones Inmunizados (In)

GRUPO A

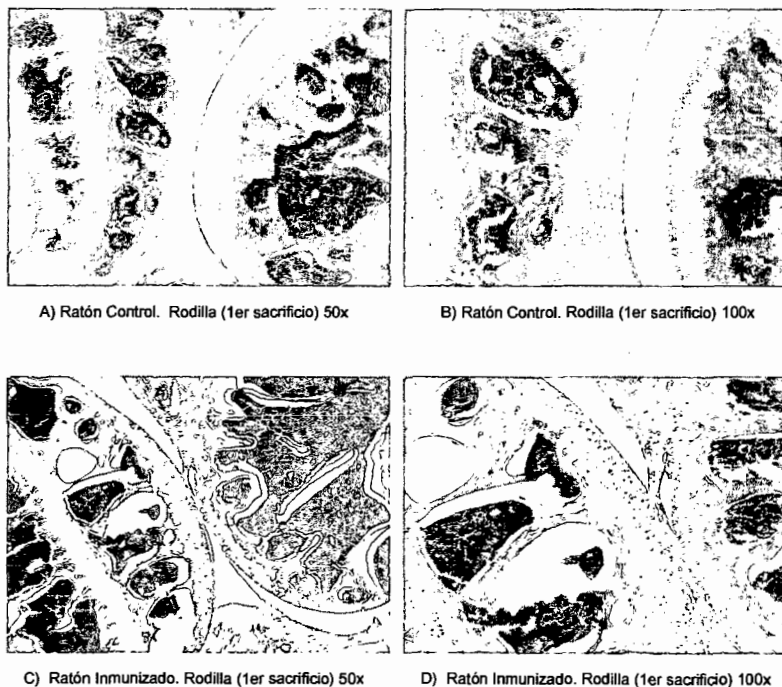


Figura. 7 Comparación histológica de la articulación femorotibiorotuliana del ratón control (A, B) contra la articulación femorotibiorotuliana del ratón inmunizado (C, D) del grupo A (1^{er} sacrificio). Con objetivo 5x y 10x.

La figura 8 muestra las comparaciones de los cortes de las articulaciones de los codos del ratón control contra las articulaciones del ratón inmunizado del 2^{do} sacrificio (grupo B). En donde se puede observar en la parte superior derecha (50x) e izquierda (100x) la articulación humeroradiocubital del ratón control en comparación con la parte inferior derecha (50x) e izquierdo (100x) la articulación humeroradiocubital del ratón inmunizado.

COMPARACION HISTOLOGICA DE CODOS DEL 2^{do} SACRIFICIO
Ratones Controles (Cn) vs. Ratones Inmunizados (In)

GRUPO B



A) Ratón Control. Codo (2do. sacrificio) 50x



B) Ratón Control. Codo (2do. sacrificio) 100x



C) Ratón Inmunizado. Codo (2do. sacrificio) 50x



D) Ratón Inmunizado. Codo (2do. sacrificio) 100x

Figura. 8 Comparación histológica de la articulación humeroradiocubital del ratón control (A, B) contra la articulación humeroradiocubital del ratón inmunizado (C, D) del grupo B (2^{do} Sacrificio). Con objetivo 5x y 10x.

La siguiente figura 9 muestra las comparaciones de los cortes de las articulaciones de las rodillas del ratón control, contra las articulaciones del ratón inmunizado del 2^{do} sacrificio (grupo B). En donde se observa en la parte superior derecha (50x) izquierda (100x) la articulación femorotibiorotuliana del ratón control en comparación con la parte inferior derecha (50x) e izquierda (100x) la articulación femorotibiorotuliana del ratón inmunizado.

COMPARACION HISTOLOGICA DE RODILLAS DEL 2^{do} SACRIFICIO
Ratones Controles (Cn) vs. Ratones Inmunizados (In)

GRUPO B



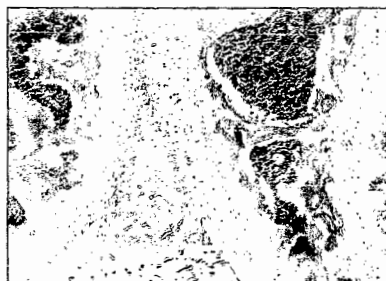
A) Ratón Control. Rodilla (2do. sacrificio) 50x



B) Ratón Control. Rodilla (2do. sacrificio) 100x



C) Ratón Inmunizado. Rodilla (2do. sacrificio) 50x



D) Ratón Inmunizado. Rodilla (2do. sacrificio) 100x

Figura. 9 Comparación histológica de la articulación femorotibiorotuliana del ratón control (A, B) contra la articulación femorotibiorotuliana del ratón inmunizado (C, D) del grupo A (1^{er} sacrificio). Con objetivo 5x y 10x.

La figura 10 muestra las comparaciones de los cortes de las articulaciones de los codos del ratón control, contra las articulaciones del ratón inmunizado del 3^{er} sacrificio (grupo C). En donde se muestra en la parte superior derecha (50x) e izquierda (100x) la articulación humeroradiocubital del ratón control y en comparación con la parte inferior derecha (50x) e izquierdo (100x) la articulación humeroradiocubital del ratón inmunizado.

COMPARACION HISTOLOGICA DE CODOS DEL 3^{er} SACRIFICIO
Ratones Controles (Cn) vs. Ratones Inmunizados (In)

GRUPO C

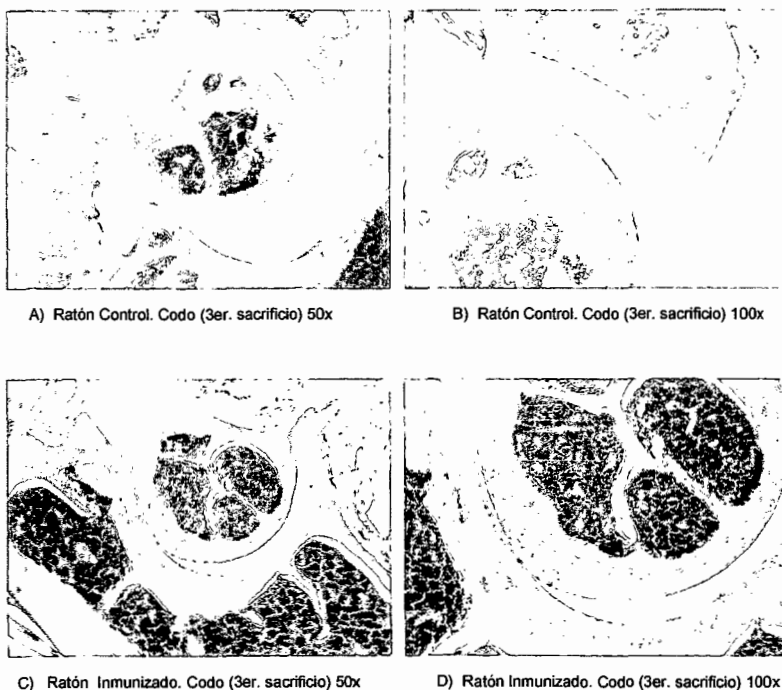


Figura. 10 Comparación histológica de la articulación humeroradiocubital del ratón control (A, B) contra la articulación humeroradiocubital del ratón inmunizado (C, D) del grupo C (3^{er} Sacrificio). Con objetivo 5x y 10x.

La última imagen (Fig. 10) muestra las comparaciones de los cortes de las articulaciones de las rodillas del ratón control, contra las articulaciones del ratón inmunizado del 3^{er} sacrificio (grupo C). Donde se puede observar en la parte superior derecha (50x) izquierda (100x) la articulación femorotibiorotuliana del ratón control en comparación con la parte inferior derecha (50x) e izquierda (100x) la articulación fémortibiorotuliana del ratón inmunizado.

COMPARACION HISTOLOGICA DE RODILLAS DEL 3^{er} SACRIFICIO
Ratones Controles (Cn) vs. Ratones Inmunizados (In)

GRUPO C

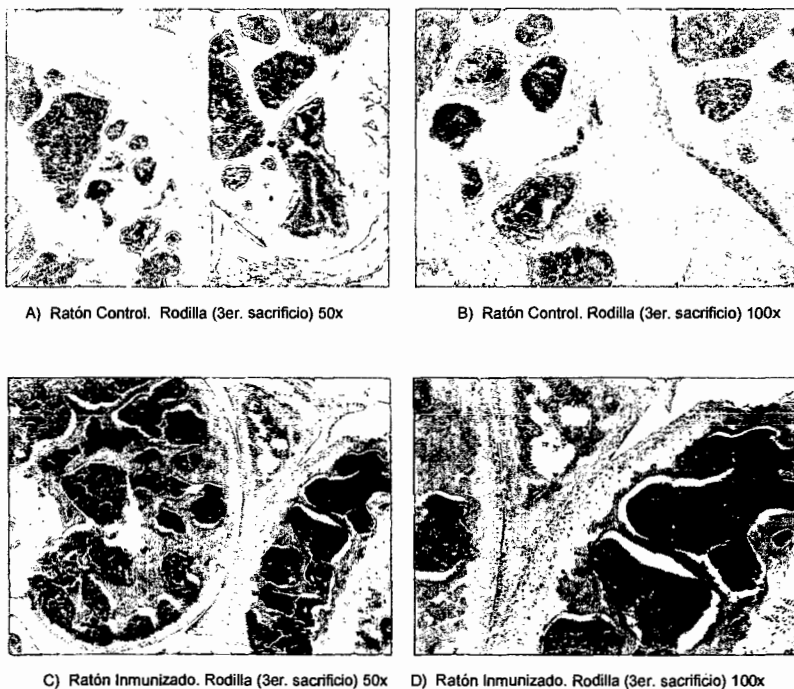


Figura. 11 Comparación histológica de la articulación femorotibiorotuliana del ratón control (A, B) contra la articulación femorotibiorotuliana del ratón inmunizado (C, D) del grupo C (3^{er} sacrificio). Con objetivo 5x y 10x.

En las imágenes anteriores (Fig. 9–11) se mostraron las articulaciones humeroradiocubital y femorotibiorotuliana, indicándose una porción del empalme de las articulaciones donde se mostraban las superficies articulares, la membrana sinovial, el cartílago y las articulaciones intermetacarpales de los ratones que en el registro de marcas visuales obtuvieron un incremento en el diámetro, sacrificados dos semanas después de la última inmunización (grupo A), fecha que fue cuando presentaron signos de inflamación; posteriormente tres y cuatro semanas después de la última inmunización (grupo B y C) para observar su evolución y presencia de AR experimental a nivel histopatológico.

Encontrando como resultado que no se encontraron diferencias morfológicas significativas en la comparación de los cortes de las articulaciones, diferencias, tales como; degradación de cartílago, hiperplasia sinovial con infiltración masiva de células inflamatorias o erosiones del hueso en los ratones inmunizados, que son los signos mas aparentes en la Artritis Reumatoide experimental.

Pero cabe destacar que si se observó un reclutamiento de células, como son los polimorfos nucleares, macrófagos y linfocitos mostrado en las microfotografías.

VIII.- DISCUSION

Durante el experimento de la inducción de artritis con proteoglycano hasta el momento del sacrificio se les tomó un registro de marcas visuales a medidas del diámetro de las articulaciones posteriores y anteriores de los ratones Balb/c, que posteriormente se evaluaron sacando los promedios y se les hizo una prueba estadística de diferencias significativas "t de student", donde se encontró que los ratones inmunizados presentaron un aumento en el diámetro de las articulaciones en comparaciones con los de los ratones controles, que si aumentaron probablemente por el crecimiento, ya que pasaron 49 días desde la primera hasta la última inmunización, y además fueron 28 días mas hasta el último grupo sacrificado.

Se encontró como resultado que existió un punto máximo de aumento del diámetro de las articulaciones (codos y muñecas) de los ratones sacrificados dos semanas después de la última inmunización y en las articulaciones (rodillas) de los que fueron sacrificados cuatro semanas después de la última inmunización (3^{er} sacrificio). Concluyendo con esto que los codos y muñecas presentaron un incremento del diámetro dos semanas después de la última inmunización (grupo A) y las rodillas tuvieron un incremento del diámetro cuatro semanas después de la última inmunización, teniendo como punto máximo el 3^{er} sacrificio (grupo C).

Cabe recalcar que como los ratones fueron sacrificados dos semanas después de la última inmunización (grupo A) fecha que fue cuando presentaron un aumento en el diámetro, posteriormente tres y cuatro semanas después (grupo B y C) para medir su desarrollo y observar la presencia de AR experimental en las articulaciones de los ratones inmunizados.

Otro aspecto fue que los ratones inmunizados aumentaron de peso probablemente por la inflamación y el crecimiento de órganos (hígado y bazo) encontrado al momento del sacrificio, producto de la inducción de la inflamación provocada por el proteoglycano, por lo que es recomendable hacer una biometría para el análisis de proliferación de células inflamatorias. Aunque a nivel histológico no encontramos cambios morfológicos, ni presencia contundente de AR experimental, sin embargo se observó la

inflamación en las articulaciones anteriores y posteriores de los ratones inmunizados en comparación con los ratones controles como el enrojecimiento, la sensibilidad al manejo y disminución del movimiento de extremidades de los ratones inmunizados con proteoglycano de pollo. Probablemente sea necesario incrementar el tiempo de observación después de la última inmunización hasta 3-4 meses con la finalidad de mayor evolución de AR o aplicar en la 4^{ta} inmunización el proteoglycano emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA), ya que en este estudio solo se aplicó en la primera inmunización y algunos autores lo reportan en su metodología (Finnegan, Mikecz et al. 1999) que a su vez van acompañadas conjuntamente con inmunizaciones con agentes infecciosos como lo es *Leishmania*, *espiroquetas de Borrelia burdogeni* (Lindqvist, Bockermann. et al. 2002).

Por lo que sería indispensable tomarlo en cuenta para obtener mejores resultados en la inducción de AR y en la representación de los signos en el modelo murino de Balb/c inducido con proteoglycano de pollo.

Otra de las consideraciones es que algunos autores (Otto Jeffrey M., Chandrasekeran Raman et al., 2000); (Kaplan Charles D., O'Neill Shannon K. et al., 2002) reportan en su metodología el uso de proteoglycano de cartílago de humano. Pero en este estudio no se usó proteoglycano de humano, ya que la técnica de extracción es una técnica especializada llevada a cabo a la hora de la cirugía de transplante de cartílago, la cual comprende un procedimiento específico con el cual no se contaba.

Cabe destacar que es recomendable hacer el análisis de suero, en donde se compruebe mediante técnicas de ELISA los niveles séricos de $TNF\alpha$, IL-1, IL-2 e IL-1 β que son las citocinas proinflamatorias que juegan un papel vital y son responsables de muchas manifestaciones de la enfermedad (Gil. 2002) para comprobar con ello la presencia del proceso inflamatorio en el desarrollo de AR experimental.

Es necesario discutir que la elaboración de este trabajo conllevó a la reproducción de un modelo murino de inducción de artritis tipo reumatoide en la cepa Balb/c con proteoglycano de pollo con el objetivo de estandarizarlo en el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y

Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, para poder probar en el algún inmunoregulador o inmunosupresor en esta enfermedad inmune experimental. Y que aunque los resultados no presentaron concluyentemente la presencia de AR experimental en los ratones inmunizados, ni se encontró un proceso inflamatorio significativo, pero si una tendencia de inflamación en las articulaciones de los ratones inmunizados; en estudios posteriores (datos no publicados) se realizaron técnicas de ELISA y biometría, en donde si se observaron niveles altos de citocinas proinflamatorias, indicándonos la presencia de un proceso inflamatorio (tesis de licenciatura) sirviendo con esto como modelo de inducción de proceso inflamatorio en el cual si se pueda tratar de utilizar para probar algún antiinflamatorio. Pero sin dejar de tomar en cuenta el registro de los signos cardinales de la inflamación: rubor, enrojecimiento, dolor, tumor y disfunción; que en este estudio si se tomaron en cuenta pero no fueron presentados, ya que se esperaba que existiera un cambio a nivel histológico contundente que indicara la presencia de AR experimental. Pero cabe destacar que si se observó un reclutamiento de células, como son los polimorfos nucleares, macrófagos y linfocitos. Indicando con esto que falta tiempo de desarrollo de los signos y otra inmunización de proteoglycano de pollo emulsionada en adyuvante completo de Freund que reforzara la inducción y expresión de signos de inflamación. Ya que en el humano son años para desarrollarse la AR como tal y en este estudio solo fueron meses.

IX.- CONCLUSIONES

- El registro de marcas visuales de las articulaciones de los ratones hembras Balb/c inmunizados con proteoglycano de pollo con una dosis de 100 μ g emulsificado en 100 μ l de adyuvante completo de Freund (1^{era} inmunización) y adyuvante incompleto de Freund (tres inmunizaciones restantes) por vía i.p. en un tiempo de 0, 7, 28 y 49 días mostró un incremento no significativo del diámetro de las articulaciones en comparación con las articulaciones de los ratones del grupo control.
- La inducción de la inflamación de las articulaciones de los ratones de los grupos experimentales se observó dos y cuatro semanas después de la última inmunización como el enrojecimiento, la sensibilidad al manejo, disminución del movimiento de extremidades y una tendencia en el incremento del diámetro de las articulaciones.
- No se encontró a nivel histopatológico diferencia morfológica significativa entre los grupos experimentales y los grupos controles, debido al poco tiempo de evolución del proceso inflamatorio en las articulaciones de ratones hembras Balb/c inmunizados con proteoglycano de pollo.

X.- LITERATURA CITADA

- Abad, C. (2001). "Pituitary Adenylate Cyclase- Activating Polypeptide Inhibits Collagen- Induced Arthritis: An Experimental Immunomodulatory Therapy." The Journal of Immunology 167: 3182-3189.
- Alpuche, R. H. (2003). <http://www.arrakis.es/~arvreuma/artri.htm>.
- Bautista, A. A. (1994). Manual para manejo de animales de laboratorio. México D.F., Facultad de Estudios Superiores *Zaragoza* UNAM.
- Bina, J. & Ronald L. Wilder (1999). "Animals models of rheumatoid arthritis." Molecular Medicine Today, 5: 267-269.
- Burck, H. C. (1969). TECNICA HISTOLOGICA. Manual para la realización de preparaciones microscópicas de Laboratorio. Madrid España, Ed. Paz Montavo.
- C. M. Weyand, Y.-M. Kang, et al. (2003). "The power of the third dimension: tissue architecture and autoimmunity in rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol 15: 259-266.
- Clair, E. W. S. (2001). "Radiographic Joint Damage in Rheumatoid Arthritis: A community-Based perspective." Arthritis & Rheumatism 44(6): 1231-1233.
- Cynthia Driskell, Michael Emery, et al. (2003). Asociación Americana de Terapia Física Lo Que Usted Necesita Saber Sobre la Artritis Una Perspectiva del Fisioterapeuta, www.apta.org. 2004.
- Delgado, M., C. Abad et al. (2001). "Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease." Nature Medicine, 7(5): 563-568.
- El Buzas, FR Brennan et al. (1995). "A proteoglycan (aggrecan)-specific T cell hybridoma induces arthritis in BALB/c mice." The Journal of Immunology 155(5): 2679-2687.
- Ernest, H. S. (2001). "Cytokine Pathways and Joint inflammation in Rheumatoid Arthritis." N Eng Journal Medicine 344(12).
- Finnegan, A., K. Mikecz, et al. (1999). "Proteoglycan (Aggrecan)-Induced Arthritis in BALB/c Mice Is a Th1-Type Disease Regulated by Th2 Cytokines." The Journal of Immunology 163: 5383-5390.
- Firestein., G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." Nature 423: 356-361.

- Gil, A. (2002). "Polysaturated fatty acids and inflammatory diseases." Biomed Pharmacother.Review 56(8): 96-388.
- Glant, T. T., K. Mikecz et al. (1987). "Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology." Arthritis Rheumatoid 30(2): 201-212.
- Jeffrey M. Otto, Raman Chandrasekeran et al. (2000). "A Genome Scan Using a Novel Genetic Cross Identifies New Susceptibility Loci and Traits in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis." The Journal of Immunology 165: 5278-5286.
- José Carlos Crispín & J. A. Varela (1999). Tratado Iberomericano de Reumatología. Inmunorregulación en Reumatología., Sociedad Española de Reumatología.
- Kaplan Charles D., O'Neill Shannon K. et al. (2002.). "Development of Inflammation in Proteoglycan-Induced Arthritis Is Dependent on FcR Regulation of the Cytokine/ Chemokine Environment." The Journal of Immunology. 169:: 5851-5859.
- Klareskog L. & H. McDevitt. (1999). "Rheumatoid arthritis and its animal models: The role of TNF- α and the possible absence of specific immune reactions." Current Opinion in Immunology 11: 657-662.
- Leroux J. A., Poole et al. (1992). "Caracterización de las líneas y de los hibridomas proteoglycan-reactivos de la célula de T de ratones con la artritis proteoglycan-inducida." The Journal of Immunology 148(7): 2090-2096.
- Lindqvist A.-K. B., R. Bockermann et al. (2002). "Mouse Models of Human Diseases." Trend in Genetics. 02: s7-s13.
- Moreno R. J. (1996). Respuesta Inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. México, D.F., Ed. Ogata A.
- Otto J. M., R. Chandrasekeran et al. (2000). "A Genome Scan Using a Novel Genetic Cross Identifies New Susceptibility Loci and Traits in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis." The Journal of Immunology. 2000, 165: 5278-5286. 165: 5278-5286.
- Peter Olofsson, Jens Holmberg et al. (2003). "Identification and Isolation of Dominant Susceptibility Loci for Pristane-Induced Arthritis." The Journal of Immunology 171: 407-416.
- Prophet E. B., B. Mills et al. (1995). Métodos Histotecnológicos. Washington D.C., Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y el instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).

- Quattrocchi Emilia, Walmsley Marita et al. (1999). "Paradoxical Effects of Adenovirus-Mediated Blockade of TNF Activity in Murine Collagen-Induced Arthritis." The Journal of Immunology 163: 1000–1009.
- Sakaguchi S. (2000). "Animal Models of autoimmunity and their relevance to human diseases." Current Opinion in Immunology 12: 684-690.
- Smolen J. S., Steiner et al. (2001). "Rheumatoid Arthritis is more than Cytokines: Autoimmunity and Rheumatoid Arthritis." Arthritis Rheumatoid 44.
- Smolen J. S. & G. Steiner. (2003). "Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis." Nature Reviews. Drug Discovery 2: 473-488.
- Starkebaum G. M. (2000). "Leukemia of League Granular Lymphocytes and Rheumatoid Arthritis." American Journal of Medicine. 108(9): 744-745.
- Steffen G. (2000). "Rheumatoid Arthritis: editorial overview." Current Opinion in Rheumatology 12(3): 179-180.
- Uribe C. v. C. (1999). Inmunopatogenia de las Enfermedades Reumaticas. Fundamentos de Reumatología en la Clínica. S. E. d. Reumatología. España: 52-67.
- Verhoef C. M., Van Roon J.A.G et al. (2001). "T1/T2 Cell balance in rheumatoid arthritis." Elsevier Science. Clinical and Applied Immunology Reviews. 1: 153-161.
- Vollenhoven V. R., A. Soriano et al. (1998). "The role of immunity to cartilage proteoglycan in adjuvant arthritis. Intravenous injection of bovine proteoglycan enhances adjuvant arthritis." The Journal of Immunology 141(4): 1168-1173.
- Wang Yi, Kristan Jane et al. (2000). "A Role for Complement in Antibody-Mediated Inflammation: C5-Deficient DBA/1 Mice Are Resistant to Collagen-Induced Arthritis." The Journal of Immunology 164: 4340–4347.
- Wipke B. T. & P. M. Allen. (2001). "Essential Role of Neutrophils in the Initiation and Progression of a Murine Model of Rheumatoid Arthritis." The Journal of Immunology. 167: 1601-1608.
- Yen J.-H. (2001). "Tumor Necrosis Factor promoter polymorphisms in patients with Rheumatoid arthritis in Taiwan." The journal of Rheumatology 28(8).
- Yuhe Ma, Sherry Thornton et al. (1998). "Inhibition of Collagen-Induced Arthritis in Mice by Viral IL-10 Gene Transfer." The Journal of Immunology 161: 1516–1524.