



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN**

**Efecto del Extracto Dializable de
Leucocitos y de los Ácidos Grasos
Omega 3, 6 y 9 en la activación de
los Inflamasomas en la Artritis
Inducida por Colágena en el Ratón**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

PRESENTA

PÉREZ MARTÍNEZ PAMELA IZARET

Director de Tesis

Dr. Oscar Rojas Espinosa



Mayo 2019

Differential Anti-Inflammatory Effects of Three Purified Omega Unsaturated Fatty Acids on Collagen-Induced Arthritis in Mouse

Pamela Izaret Pérez-Martínez¹, Víctor Gabriel Hernández², Oscar Rodríguez-Espinosa¹, Patricia Arce-Paredes¹, Oscar Rojas-Espinosa¹

¹Departamentos de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

²Departamentos de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

Email: rojas_espinosa@hotmail.com

Received 16 June 2016; accepted 30 July 2016; published 2 August 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Background: The Mediterranean Diet (MD) has been linked to a reduced risk of developing degenerative diseases, including atherosclerosis, heart stroke, diabetes, arthritis and cancer. However, only a few scientific investigations have attempted to validate this impression. The ingredients of the MD include significant amounts of omega (ω 3, ω 6, and ω 9) unsaturated fatty acids (UFAs). A few studies of these UFAs in the prevention or treatment of arthritis have yielded controversial results, but a general belief regarding their beneficial effects has prevailed. **Objective:** To investigate the effects of three relevant UFAs, namely Docosahexaenoic Acid (DHA), Arachidonic Acid (AA), and Oleic Acid (OA) (ω 3, ω 6, and ω 9, respectively), in the development of arthritis using a murine model of Collagen-Induced Arthritis (CIA). **Methods:** DBA-1 mice were immunized with chicken collagen type II (CII) and were subsequently treated with ω -UFAs for 53 days. Dexamethasone (DEXA) was used as a positive anti-inflammatory agent. The effect of the treatments was evaluated through several parameters: inflammation indices, antibody levels, cell proliferation, and histopathological findings. **Results and Conclusion:** The anti-inflammatory effect of the tested substances was inversely correlated with the histopathological findings: a greater anti-inflammatory effect was associated with less articular damage. Oleic acid (ω 9) was the most efficient anti-inflammatory UFA, followed by DHA and then AA. DEXA completely inhibited the development of arthritis, whereas the untreated CII-immunized mice developed the most severe articular damage. DBA-1 mice with CII-induced arthritis constitute an adequate model for the study of arthritis and its treatment.

Resumen

Introducción: La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter autoinmune que afecta las articulaciones con destrucción gradual de cartílago y hueso; la prevalencia en México es de 1.6%. La enfermedad no tiene cura pero puede controlarse con diversos tratamientos que en su mayoría ocasionan efectos secundarios adversos además de que son de elevado costo. Por esta razón es necesario continuar con la búsqueda de nuevos tratamientos que sean más económicos pero igualmente eficientes. Se ha demostrado que los ácidos grasos omega y los extractos dializables de leucocitos (EDLs) tienen efectos anti-inflamatorios que sugieren que estos compuestos podrían ser utilizados en el tratamiento de la artritis

Objetivo: Probar el efecto anti-inflamatorio y la posible regulación del Inflamasoma NLRP3 de los extractos dializables de leucocitos específico y no específico, así como de los ácidos grasos omega 3 (ácido docosahexaenoico DHA), 6 (ácido araquidónico) y 9 (ácido oleico) en el modelo de artritis inducida por colágena (CIA) en el ratón.

Metodología: Se inmunizaron ratones BABL/c con colágena tipo II (CII) y 4 semanas post inmunización se extrajo el bazo para preparar el EDL específico (EDL-E). El EDL no específico (EDL-NE) se obtuvo de animales no inmunizados. Los EDLs a dosis de 0.1 y 1U, y los tres ácidos grasos (omega 3, 6 y 9), se administraron diariamente en ratones DBA-1 inmunizados con CII (CIA). Se evaluó el efecto de los tratamientos a lo largo de 84 días. Se sacrificaron los animales para la obtención de patas traseras y delanteras para evaluar el daño articular en cortes histológicos y para buscar los componentes del Inflamasoma NLRP3 por inmunofluorescencia.

Resultados: Los ratones DBA-1 inoculados con CII que no recibieron ningún tratamiento tuvieron la máxima expresión de CIA. No se encontraron evidencias de inflamación en los ratones tratados con dexametasona ni con el EDLNE a 0.1 U. El tratamiento con el EDL-E y los ácidos grasos omega tuvo un efecto anti-inflamatorio significativo. A nivel histológico los ratones tratados con los 3 ácidos grasos mostraron signos de reparación y regeneración tisular. La expresión de NFkB y del receptor NLRP3 se encontró disminuida en los ratones tratados con los omega y con el EDL-NE en comparación con los no tratados.

Conclusiones: De los tratamientos utilizados en ratones con CIA, el EDLNE a 0.1U y los ácidos grasos inhibieron la aparición de los signos de la artritis tanto a nivel clínico como a nivel histológico. En todos los casos el efecto anti-inflamatorio se centró en la inhibición de la activación del factor de transcripción NFkB lo que impidió la activación del inflamasoma NLRP3.

Abstract

Background: Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of autoimmune character that affects the joints with gradual destruction of cartilage and bone; the prevalence in Mexico is 1.6%. The disease has no cure but can be controlled with various treatments that mostly cause adverse side effects as well as being expensive. For this reason it is necessary to continue with the search for new treatments that are more economical but equally efficient. It has been shown that omega fatty acids and dialyzable leukocyte extracts (EDLs) have anti-inflammatory effects that suggest that these compounds could be used in the treatment of arthritis

Objective: To probe the anti-inflammatory effect and the possible regulation of the Inflammasome NLRP3 of the dialyzable extracts of specific and non-specific leukocytes, as well as of the omega 3 fatty acids (docosahexaenoic acid DHA), 6 (arachidonic acid) and 9 (oleic acid) in the model of collagen-induced arthritis (CIA) in the mouse.

Methodology: BABL / c mice were immunized with collagen type II (CII) and 4 weeks after immunization the spleen was extracted to prepare the specific EDL (EDL-E). The non-specific EDL (EDL-NE) was obtained from non-immunized animals. The EDLs at doses of 0.1 and 1U, and the three fatty acids (omega 3, 6 and 9), were administered daily in DBA-1 mice immunized with CII (CIA). The effect of the treatments was evaluated over 84 days. The animals were sacrificed to obtain hind and fore paws to evaluate the joint damage in histological sections and to look for the components of the Inflammasome NLRP3 by immunofluorescence.

Results: DBA-1 mice inoculated with CII that did not receive any treatment had the highest expression of CIA. No evidence of inflammation was found in mice treated with dexamethasone or with EDLNE at 0.1 U. Treatment with EDL-E and omega fatty acids had a significant anti-inflammatory effect. Histologically, mice treated with the 3 fatty acids showed signs of tissue repair and regeneration. The expression of NFkB and the NLRP3 receptor was found to be decreased in the mice treated with the omega and with the EDL-NE compared with the untreated mice.

Conclusions: Of the treatments used in mice with CIA, the EDLNE at 0.1U and the fatty acids inhibited the appearance of the signs of arthritis both clinically and histologically. In all cases, the anti-inflammatory effect was focused on the inhibition of the activation of the transcription factor NFkB, which prevented the activation of the NLRP3 inflammasome.

ÍNDICE GENERAL

Listado de Abreviaturas	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	Vi
<u>Introducción</u>	1
1. Artritis Reumatoide	1
2. Incidencia	2
3. AR en México	2
4. Predisposición	3
5. Inmunopatología.....	5
6. Inflamasomas.....	10
7. Regulación en AR.....	15
8. Tratamiento de la AR.....	16
9. Modelos Animales de Artritis	26
10. Antecedentes directos	27
Justificación.....	29
<u>Hipotesis</u>	29
<u>Objetivo General</u>	29
<u>Objetivos Particulares</u>	29
<u>Materiales y Métodos</u>	30
<u>Resultados</u>	35
1. Evaluación clínica.....	35
2. Histología	41
3. Proliferación de Esplenocitos	59
4. Medición de anticuerpos contra CII	60
5. Inflamasoma.....	61
Discusión.....	73
Conclusiones	79
Perspectivas.....	80
Referencias	81
Apendice	91

LISTADO DE ABREVIATURAS

AR	Artritis Reumatoide
AIJ	Artritis Idiopática Juvenil
MHC	Complejo Principal De Histocompatibilidad
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
TNF-α	Factor De Necrosis Tumoral Alfa
NKs	Natural Killers
IFN-γ	Interferón Gama
IL-X	Interleucina "X"
iTreg	T Reguladoras Inducibles
nTreg	T Reguladoras Naturales
TGF-β	Factor De Crecimiento Transformante Beta
Lc B	Linfocitos B
GPI	Glucosa 6-Fosfato Isomerasa
FR	Factor Reumatoide
PMN	Polimorfonucleares
DAMPs	Moléculas De Señales De Daño
PCR	Proteína C Reactiva
FAME	Fármacos Modificadores De La Enfermedad
MTX	Metotrexato
SSA	Sulfasalazina
AINES	Anti inflamatorios no esteroideos
IL-1R	Receptor De IL-1
AcM	Anticuerpo Monoclonal
Fc	Fracción Constante
V	Región Variable
APC	Células Presentadoras De Antígeno
FDA	Food And Drug Asociation
TB	Tuberculosis
EDL	Extracto Dializable De Leucocitos

LPS	Lipopolisacarido
NF-κB	Factor Nuclear Kb
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados A Patógenos
EPA	Ácido Eicosapentanoico
DHA	Ácido Docosahehexanoico
AA	Ácido Araquidónico
AO	Ácido oleico
ROIs	Especies Reactivas De Oxígeno
HMGB1	High-Mobility Group Protein
TRIG	Triacilglicéridos
PL	Fosfolípidos
SatFA	Ácidos Grasos Saturados
PGs	Prostaglandinas
LTs	Leucotrienos
PDs	Protectinas De La Serie D
RvDs	Resolvinas De La Serie D
GPCR	Receptores Acoplados A Proteínas G
CIA	Artritis Inducida Por Colágena
CII	Colágena Tipo II
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado A Enzimas
EDL-E	EDL Específico
EDL-NE	EDL No Específico
Con-A	Concanavalina A
Dexa	Dexametasona
ω-3	Omega 3
ω-6	Omega 6
ω-9	Omega 9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Resumen de las principales células y citocinas que intervienen en la Artritis Reumatoide	9
Figura 2 Estructura de los diferentes inflamomas con sus componentes: Sensores, Adaptadores y Efectores	11
Figura 3. Propagación de la Inflamación por medio de ASC	14
Figura 4. Metabolismo de los UFAS dentro de la célula	24
Figura 5. Daño óseo en ratones DBA-1 inoculados con CII (CIA) bajo diferentes tratamientos	28
Figura 6. Peso de los ratones durante los 84 días de tratamiento	36
Figura 7. Capacidad motora de los ratones-CIA tratados con ácidos grasos omega y EDLs a lo largo del tiempo de tratamiento	37
Figura 8. Imágenes representativas de las patas delanteras de un ratón sano y un ratón con CIA	38
Figura 9. Índice de Inflamación de los ratones tratados con ácidos grasos omega 3, 6 y 9, comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados	39
Figura 10. Índice de Inflamación de los ratones tratados con EDLs comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados	39
Figura 11. Índice de Artritis de los ratones tratados con los ácidos grasos omega 3, 6 y 9 comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados	40
Figura 12. Índice de Artritis de los ratones tratados con los extractos dializables de leucocitos comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados	41
Figura. 13. Anatomía ósea de mano y pata delantera en humano y ratón respectivamente	42
Figura 14. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 sanos teñidos con HE	43
Figura 15. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA teñidos con HE	45

Figura 16. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA teñidos con HE	46
Figura 17. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con dexametasona teñidos con HE	47
Figura 18. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con ω-3 teñidos con HE	48
Figura 19. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con ω-6 teñidos con HE	49
Figura 20. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con ω-9 teñidos con HE	50
Figura 21. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL-E 1U teñidos con HE	51
Figura 22. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL-E 0.1U teñidos con HE	52
Figura 23. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDLNE 1U teñidos con HE	53
Figura 24. Cortes Histológicos de las de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDLNE 0.1 U teñidos con H-E	54
Figura 25. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 teñidos con Masson	55
Figura 26. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA teñidas con Masson	56
Figura 27. Promedio de Daño Óseo y Regeneración en cortes histológicos de las articulaciones de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos	58
Figura 28. Área de infiltrado inflamatorio definida por la intensidad de pixeles obtenida por análisis en Image J de los ratones control y los ratones CIA tratados con los diferentes ácidos omega y EDLs.....	59
Figura 29. Proliferación de esplenocitos de los diferentes grupos estimulados con Concanavalina A y CII	60
Figura 30. Disminución de la proliferación de esplenocitos de los diferentes grupos estimulados con CII en comparación con los ratones con CIA	60

Figura 31. Anticuerpos contra CII en ratones DBA-1	61
Figura 32. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones DBA-1 Sanos.....	62
Figura 33. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA	63
Figura 34. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones DBA-1 tratados con ácidos grasos Omega	64
Figura 35. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL específicos	65
Figura 36. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de CIA tratados con EDL no específico a las dosis de 1.0 y 0.1 U	66
Figura 37. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones DBA-1 Sanos.....	67
Figura 38. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA	68
Figura 39. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones DBA-1 tratados con ácidos grasos Omega	69
Figura 40. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL específicos	70
Figura 41. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de CIA tratados con EDL no específico a las dosis de 1.0 y 0.1 U	71
Figura 42. Expresión de NLRP3 en cortes histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos	72
Figura 43. Expresión de NFκB en cortes histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia y Prevalencia de Artritis Reumatoide en diferentes partes del mundo	2
Tabla 2. Costos médicos directos anuales en dólares por paciente en 2008 .	3
TABLA 3. Grupos y Tratamiento	32
Tabla 4. Parámetros evaluados en los cortes histológicos de las patas delanteras de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos.....	57

INTRODUCCIÓN

1) Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica y compleja de naturaleza autoinmune que afecta principalmente las articulaciones diartrodiales, con destrucción de cartílago y hueso. Es también una enfermedad sistémica y muchos pacientes presentan manifestaciones extra articulares. Las tasas de mortalidad son altas, y las principales causas de muerte son complicaciones cardiovasculares, infecciosas, hematológicas, gastrointestinales y pulmonares.

La enfermedad evoluciona en forma gradual; los primeros síntomas son el dolor y la hinchazón de las articulaciones y suelen acompañarse de dolor muscular, cansancio, pérdida de peso, depresión, fiebre y pérdida de apetito. La edad habitual de inicio es de 20 a 40 años pero existe también la artritis idiopática juvenil (AIJ o ARJ) que se presenta en niños menores de 16 años. Si no se diagnostica de manera temprana ni se trata de manera oportuna puede llevar a discapacidad y disminución de la calidad y la esperanza de vida, y puede alcanzar elevados costos para el paciente, su familia y la sociedad (Páez, *et al.* 2006, Parslow *et al.* 2002).

a) Manifestaciones articulares

Los pacientes experimentan rigidez y dolor articular que en general son peores en la mañana y mejoran durante el día; este es un síntoma característico de la enfermedad. La artritis es simétrica y afecta las pequeñas articulaciones de pies y manos. Las articulaciones más grandes (rodillas, caderas, codos, tobillos y hombros) se afectan más tarde en el curso de la enfermedad, mientras que las articulaciones de la columna rara vez se llegan a afectar.

b) Manifestaciones extra articulares

Del 20 al 25% de los pacientes desarrollan nódulos reumatoides subcutáneos o superiósticos conformados por una zona central de necrosis fibrinoide de apariencia irregular rodeada por un margen de células mononucleares, con una zona externa

de tejido de granulación con células plasmáticas y linfocitos. Los nódulos maduros son masas firmes no dolorosas redondas u ovoides que pueden ser móviles o fijas. Con frecuencia los nódulos se forman sobre prominencias óseas, aunque también se pueden desarrollar en órganos internos como las vísceras, el corazón, los pulmones, tejidos sinoviales, etc. (Páez, *et al.* 2006, Sarmiento *et al.* 2012).

2) Incidencia de la AR

La AR tiene una prevalencia del 0.5 al 1% en países industrializados y su incidencia anual es variable (12 a 1,200 por 100,000 habitantes ver Tabla 1) dependiendo de factores como la etnicidad, el sexo y la edad, además de los hábitos de vida (el fumar incrementa el riesgo de desarrollar AR). La enfermedad es tres veces más frecuente en mujeres que en hombres y aunque la razón de esta distribución no se conoce, se supone que las hormonas sexuales femeninas juegan un papel muy importante en esta distribución. (Tobón, *et al.* 2010, Carmona, *et al.* 2002).

Tabla 1. Incidencia y Prevalencia de Artritis Reumatoide en diferentes partes del mundo (Modificada de Carmona, *et al.* 2002)

Población	Incidencia (casos por cada 100 000 habitantes)	Prevalencia (Casos por cada 100 habitantes)
Norte de Europa	29 (24-36)	0.5 (0.44-0.8)
Sur de Europa	16.5 (9-24)	0.33 (0.31-0.5)
Norte América	38 (31-45)	0.5
Países en Desarrollo	Sin datos	0.35(0.24-0.36)

3) AR en México

Las enfermedades reumáticas inflamatorias más frecuentes en la población general, principalmente adultos jóvenes, son la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la gota. Las últimas estadísticas realizadas en el 2011 muestran que en México la incidencia es del 1.6%, mayor al promedio mundial, lo que representa un grave problema de salud pública ya que más de un 1 millón 700 mil personas

de entre 20 y 50 años padecían de AR hasta ese año. De acuerdo a un estudio realizado en 2008 por Skinner *et al.* La AR tuvo un alto costo en la población mexicana; el mayor gasto correspondió a la adquisición de medicamentos y al uso de terapias alternativas. Por otro lado, el gasto médico institucional (IMSS) más importante correspondió al tratamiento ambulatorio de los enfermos seguido de la compra de medicamentos, en ambos casos los artritis reumatoide fue la enfermedad más costosa en comparación con otras enfermedades reumáticas como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Costos médicos directos anuales en dólares por paciente en 2008 (Skinner *et al.* 2008)

	Artritis reumatoide		Espondilitis anquilosante		Gota	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Consultas médicas	1178.7	(68.4)	884.0	(51.7)	589.3	(77.5)
Medicamentos	464.7	(26.9)	396.8	(23.2)	55.2	(7.3)
Pruebas diagnósticas	40.0	(2.3)	29.1	(1.7)	11.2	(1.5)
Hospitalización	40.8	(2.4)	400.9	(23.4)	105.0	(13.8)
Total	1724.2		1710.8		760.7	

4) Predisposición a padecer AR

La liga europea contra el Reumatismo (EULAR) propone que hay 5 etapas anteriores a la presentación clínica de la AR, la primera etapa es la existencia de factores genéticos de riesgo, seguidos de factores ambientales de riesgo que llevan a una autoinmunidad sistémica. En la cuarta etapa el paciente comienza a presentar síntomas pero todavía no hay manifestación clínica de artritis, posteriormente se presenta una artritis indefinida hasta que finalmente el paciente desarrolla la AR. (Raza, *et al.* 2014; Tracy, *et al.* 2017, McInnes y Schett. 2007)

Los factores de riesgo genéticos mejor estudiados para la AR son las variantes específicas en los loci HLA. El descubrimiento de que muchos alelos asociados a la AR dentro del gen HLA-DRB1 comparten una secuencia de aminoácidos conservada llevó a Gregersen y cols. a proponer la teoría del epítipo compartido

(EC), (Gregersen, *et al.* 1987) la presencia de esta secuencia de aminoácidos confiere un mayor riesgo de producir anticuerpos anti-péptidos citrulinados. Algunos trabajos recientes han sugerido que las variantes en las posiciones de los aminoácidos en la región EC explican la mayor parte de la asociación entre los alelos HLA y la seropositividad en los pacientes con AR (Raychaudhuri, *et al.* 2012). Todos están localizados dentro de los surcos de unión a péptidos en moléculas MHC de clase I o II, lo que indica que los polimorfismos pueden tener un impacto funcional en las células CD4+ pero también en las células T CD8+. Además de los loci de HLA, existen otros genes, por ejemplo, PTPN22, CTLA4, STAT4, IL2/IL21 MICA y MICB que también se han relacionado con la AR. (Tobon, *et al.* 2010; López, *et al.* 2008; Tracy, *et al.* 2017).

La interacción de los alelos del EC y el ambiente también favorecen la aparición de AR ya que se ha demostrado una correlación entre el hábito de fumar y estos alelos en cohortes de países como Suiza, Korea y Dinamarca. Otros factores ambientales como la alimentación también influyen. Por ejemplo hay estudios controlados en los que la ingesta de alimentos ricos en ácidos mega como el pescado, ha disminuido el riesgo de presentar AR (Gan, *et al.* 2017).

En etapas tempranas de la AR se han encontrado autoanticuerpos contra péptidos citrulinados hasta 9 años antes de la presentación de los síntomas clínicos lo que lleva a pensar que la pérdida de la tolerancia es un evento temprano en la progresión de la enfermedad. Los péptidos citrulinados pueden provenir de diversas fuentes; el cigarro favorece la citrulinación de ciertas proteínas, y las trampas extracelulares de neutrófilos, NETs (Neeli *et al.* 2008) pueden contener histonas citrulinadas. Se ha encontrado que los sueros de pacientes con AR reconocen la histona H4 presente en las NETs (Pratesi, *et al.* 2014).

El tipo de microbiota en la cavidad bucal y en el intestino también se ha asociado con AR ya que patógenos como *Porphyromonas gingivalis* son capaces de citrulinar péptidos que se vuelven blancos para el sistema inmune (Wegner, *et al.* 2010; Wu, *et al.* 2010).

La AR es una enfermedad multifactorial que resulta de la interacción entre diversos factores, genéticos, dietéticos, y ambientales, es importante estudiar más a fondo

estos factores principalmente los que no dependen de la genética del individuo que pueden modificarse para disminuir el riesgo de presentación de la enfermedad y para disminuir los síntomas.

5) Inmunopatología de la AR

El proceso fisiopatológico en la AR incluye la participación de varios elementos celulares, entre ellos: células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B, y elementos solubles como autoanticuerpos, citocinas y otros mediadores inflamatorios. El consenso es que los linfocitos TCD4+ (Th1 y Th17) son los orquestadores principales de la cascada inflamatoria en la AR. La aseveración se basa en diferentes observaciones: la presencia de linfocitos TCD4+ activados en el tejido sinovial reumático, la dependencia de linfocitos TCD4+ para el desarrollo de artritis en algunos modelos animales, la asociación de la enfermedad con genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, y la efectividad de la terapia con agentes bloqueadores de la presentación de antígeno en pacientes con AR. (McInnes y Schett. 2007)

Por un lado, los linfocitos TCD4+ activados podrían influir sobre las células B auto-reactivas para la producción de anticuerpos incluyendo anticuerpos contra antígenos de la articulación (colágena, proteoglicanas, proteínas de matriz), IgG (factor reumatoide), y péptidos citrulinados. Por otro lado, las células T activadas podrían estimular en varias células (macrófagos, fibroblastos, células endoteliales) la producción y liberación de mediadores inflamatorios adicionales (IL-1, IL-6, TNF, etc.) y el reclutamiento de nuevas células T, células B, células plasmáticas, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas y células citotóxicas naturales (NKs) (Soto, *et al.* 2011)

a. Linfocitos T cooperadores en AR

Tradicionalmente se consideró a la AR como un proceso autoinmune dominado por células Th1 secretoras de interferón- γ (IFN- γ), cuya acción predominaría sobre la de los linfocitos Th2 secretores de IL-4, IL-5 e IL-13, de función predominantemente

reguladora. Sin embargo esta idea tuvo un cambio significativo cuando se encontró, en el modelo de artritis inducida por colágena en el ratón, la presencia de células TCD4+ secretoras de interleucina 17 (IL-17) y dependientes de IL-23 para su expansión. Luego se encontró que esta nueva población celular, denominada Th17, también se encontraba en forma abundante en otros modelos murinos de autoinmunidad como la encefalitis alérgica experimental y la psoriasis. Es probable que ambas poblaciones de células TCD4+ (Th1 y Th17) sean igualmente relevantes en la patología de la artritis (Liao, *et al.* 2012, Gol, *et al.* 2012)

En condiciones normales, la actividad de estas células proinflamatorias se encuentra controlada por otras subpoblaciones de células TCD4+ con actividad reguladora, las células T reguladoras naturales (nTreg) y las células T reguladoras inducibles (las células iTreg) ambas con el fenotipo CD25+ FoxP3+, y similares en su función, además de las células Th2. La actividad reguladora de estas células ocurre principalmente por mediación de las citocinas TGF β e IL-10. En los pacientes con RA activa se ha observado una disminución en el número o en la función de las células Treg, aunque este hallazgo no siempre ha sido consistente (Gol, *et al.* 2012).

b. Linfocitos B en AR

En cuanto a las células B, su participación en la artritis queda de manifiesto por la presencia de anticuerpos auto-reactivos contra la colágena y proteoglicanas articulares, contra inmunoglobulinas IgG (factor reumatoide), contra péptidos citrulinados, y por la presencia de complejos inmunes tanto circulantes como depositados en las estructuras articulares. Las células B también son importantes en la patogenia de la enfermedad por su papel como células presentadoras de antígeno y por su capacidad de producir citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias como el TNF- α que induce la producción de la IL-6 que a su vez estimula a los linfocitos B perpetuando la inflamación (Páez *et al.* 2003, Sarmiento *et al.* 2012).

c. Anticuerpos en la AR

Los anticuerpos producidos por los LcB auto reactivos pueden estar comprometidos directamente en el daño tisular en la AR. Aparte de los auto anticuerpos contra IgG,

proteínas citrulinadas, colágena, proteoglicanas y otros antígenos articulares, se ha visto que los ratones K/BxN (un modelo de artritis espontánea) producen altos niveles de anticuerpos contra la glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI) y que el suero de estos animales inyectado en ratones normales induce en estos una marcada artritis. Aparte de su localización citoplásmica, la GPI también se encuentra presente en la superficie del cartílago y constituye un blanco para los anticuerpos anti-GPI. Un hallazgo frecuente en los pacientes con AR es la presencia de factor reumatoide (FR). El FR reaccionando con su sustrato (IgG) tiene la propiedad de activar al sistema del complemento contribuyendo a la inflamación que lesiona las articulaciones, y sus niveles elevados se asocian con manifestaciones extra-articulares como nódulos subcutáneos, vasculitis, e incremento en la mortalidad (Souto, *et al.* 2009).

d. Neutrófilos en AR

Los neutrófilos (PMN) constituyen una población celular que siempre está presente en las lesiones articulares. Son atraídos a los sitios de inflamación por citocinas producidas por células T, B, macrófagos y células dendríticas, o por moléculas de señales de daño (DAMPs), y se activan ejerciendo su función fagocítica al mismo tiempo que liberan componentes preformados (enzimas hidrolíticas y péptidos antimicrobianos) y neo-sintetizados (radicales libres del oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, y diversos metabolitos) que causan inflamación y modulan la función de las otras células linfoides. Con su participación, la reacción inflamatoria articular se amplifica y al mismo tiempo se regula (Cascão, *et al.* 2013).

e. Citocinas en AR

Aunque hay evidencias de la participación de la mayoría de las citocinas conocidas en la inflamación articular de la artritis reumatoide, algunas de ellas tienen particular importancia en la patogénesis de la enfermedad debido a su actividad proinflamatoria, entre ellas, las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN γ y TNF α . Todas estas citocinas forman parte de una red en donde el TNF α es uno de los componente centrales ya que al bloquear su efecto se reduce la inflamación y

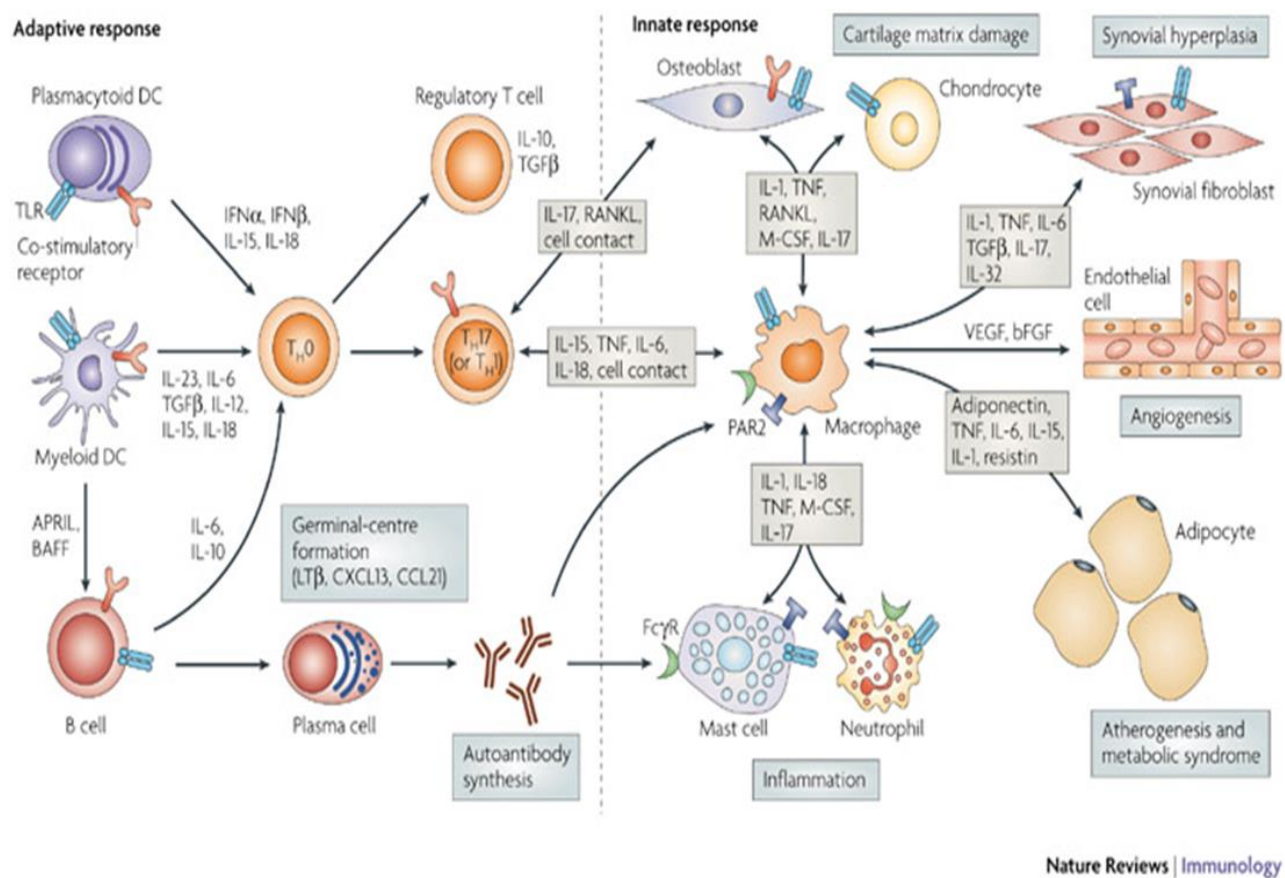
simultáneamente se modifica la expresión de otras citocinas y sus efectos. En conjunto, estas citocinas participan directa o indirectamente en la expresión de moléculas de adhesión en los endotelios vasculares, aumentan la síntesis de metalo proteinasas por los macrófagos sinoviales, los fibroblastos, los osteoclastos y los condrocitos, atraen neutrófilos y otras células a la articulación, estimulan la granulopoyesis, promueven la síntesis de proteínas de fase aguda (PCR), estimulan la angiogénesis, propician la destrucción del cartílago y la erosión ósea, entre otras actividades (McInnes y Schett. 2007).

La IL-6 participa en el proceso degenerativo e inflamatorio observado en AR a través de múltiples mecanismos. Una de las funciones relevantes de la IL-6 en la patogenia de la AR se relaciona con su capacidad para desencadenar procesos inflamatorios a nivel sistémico, como un incremento en la termogénesis y síntesis de proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, fibrinógeno, haptoglobina y amiloide A sérico), lo que se traduce en manifestaciones como fiebre, astenia y anemia. Por otra parte, la IL-6 promueve la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Soto *et al* 2011).

En cuanto a la IL-17, cada vez es más el peso que se le da a esta citocina ya que ha sido detectada en niveles altos dentro de las articulaciones de pacientes con AR comparados con los niveles en sangre o con pacientes con osteoartritis. Su receptor IL-17RA está extensamente expresado en células epiteliales, linfocitos T y B, células mielomonocíticas, células estromales de médula ósea, fibroblastos sinoviales, células de endotelio vascular y condrocitos. El efecto pleiotrópico de la IL-17 en células efectoras del sistema inmune innato contribuye al daño al cartílago y hueso observado en la AR. Además, la IL-17 también puede actuar junto con la IL-1 y el TNF- α induciendo la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas para monocitos y neutrófilos en la articulación. Una vez que inicia la artritis, la IL-17 es capaz de mantener la enfermedad independientemente de TNF- α (Nistala, K. y Wedderburn, L. 2009).

La IL-1 β , una citocina proinflamatoria que se eleva anormalmente en varias condiciones patológicas y por desregulación de su expresión, ha sido implicada en la patogénesis de la osteoporosis posmenopáusica y en la pérdida ósea en la AR y en la periodontitis. La IL-1 β induce la pérdida de hueso porque estimula la

producción, supervivencia y función de los osteoclastos. Todos estos cambios se ilustran en la Figura 1.



Nature Reviews | Immunology

Figura 1. Resumen de las principales células y citocinas que intervienen en la Artritis Reumatoide. (McInnes y Schett, 2007)

f. Pannus en AR

El resultado final de la reacción inflamatoria es la formación de *pannus*. El pannus reumatoide es el infiltrado inflamatorio en el tejido sinovial que llega a destruir el cartilago articular y el hueso, provocando la destrucción irreversible de la articulación y la pérdida de su función. EL pannus está compuesto principalmente por fibroblastos en proliferación, células linfoides (linfocitos, macrófagos, monocitos y granulocitos) y es rico en vasos sanguíneos. La angiogénesis es un evento clave en la formación y mantenimiento del pannus invasivo en la AR y es promovido por el factor tisular (TF) que se sobreexpresa en las articulaciones inflamadas (Chen *et al.* 2013).

6) Inflamasomas

La inflamación es una respuesta protectora del sistema inmune innato en respuesta a estímulos dañinos, y se encuentra altamente regulada. Un exceso en la inflamación puede causar enfermedades inflamatorias crónicas o sistémicas.

Los miembros de la familia de la interleucina 1 (IL-1) se asocian con inflamación aguda y crónica. Carentes de un péptido señal, los miembros de la familia de la IL-1 se producen como precursores proteicos que son procesados por hidrólisis enzimática. La escisión de IL-1 β e IL-18, por ejemplo, depende de la activación de la caspasa 1, que, a su vez, depende de la activación del Inflamasoma NLRP3 (Netea, *et al.* 2015).

Los inflamasomas son complejos multiproteicos compuestos por a) Un sensor, que puede ser un receptor tipo NOD que contiene dominios pirina (NLRP) o un receptor tipo AIM (ALR), b) Un adaptador, la molécula adaptadora asociada a apoptosis que contiene CARD (ASC) y c) un efector, la caspasa-1. Los sensores que generalmente dan el nombre al Inflamasoma son NLRP1, NLRP3, NLRC4 y la proteína ausente en el melanoma 2 (AIM2) (Fig. 2). Estos se denominan inflamasomas clásicos o canónicos. Además de los inflamasomas clásicos que activan a la caspasa-1, se ha descubierto un nuevo modelo de inflamasoma no canónico en el cual participa la caspasa 11 (Netea, *et al.* 2015, Lu, *et al.* 2014). Otros sensores innatos como NLRC5, NLRP6, NLRP7, NLRP12, RIG-I, Pirina e IFI16 se han propuesto como formadores de Inflamasomas, pero se necesita más trabajo para confirmarlo (Elliott y Sutterwala 2015).

Los sensores detectan señales de daño y reclutan adaptadores que a su vez reclutan y activan las caspasas efectoras. Los tres componentes contienen dominios de muerte (DD) como el dominio Pirina (PYD) o CARD, que participan en el auto ensamblaje del inflamasoma.

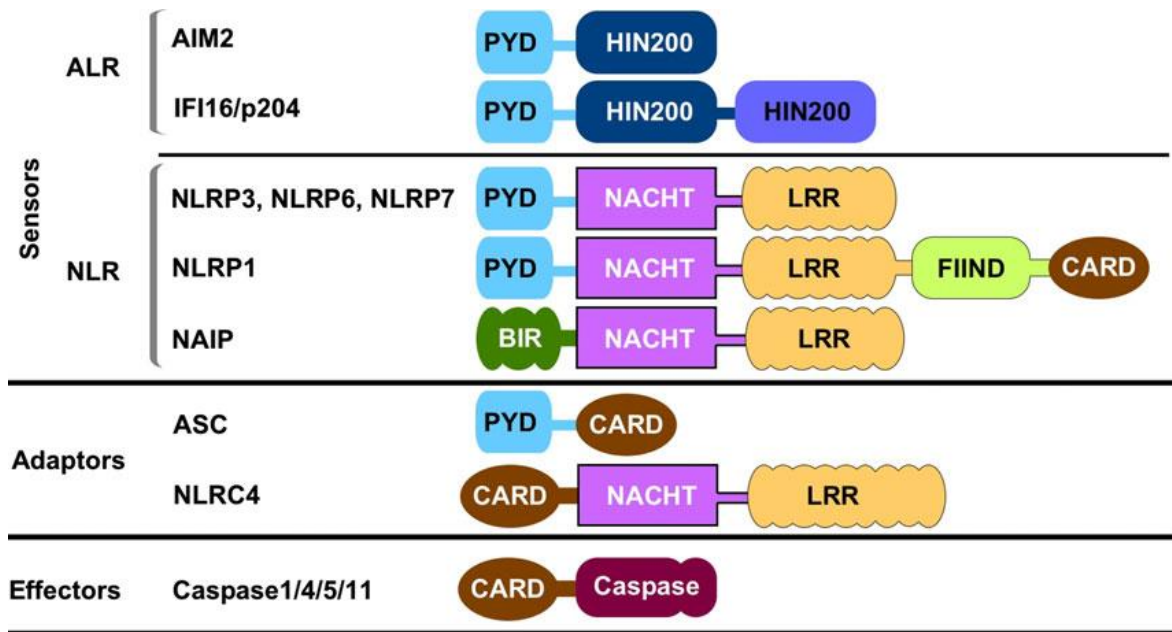


Figura 2. Estructura de los diferentes inflamasomas con sus componentes: Sensores, Adaptadores y Efectores. (Lu, et al. 2014)

a. Activación del Inflamasoma

A pesar de recibir mucha atención e investigación, el mecanismo de activación del inflammasoma (sobre todo NLRP3) sigue siendo controvertido, los ligandos directos siguen siendo enigmáticos, y la relación entre complejo, montaje y activación no está clara del todo.

La activación del Inflamasoma NLRP3 en los macrófagos es un proceso de dos pasos que requiere de un evento de "priming" que coincida con una señal activadora del NLRP3. El priming puede lograrse mediante la activación de receptores que señalizan a través de MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88)/TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) u otras vías activadoras de NF κ B, TLRs, IL-1R, TNFR y NOD2. (Elliott y Sutterwala, 2015).

El inflammasoma NLRP3 se activa en respuesta a diversos estímulos como variaciones en el flujo de calcio y potasio, la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS), la translocación de NLRP3 a la mitocondria, la salida de DNA mitocondrial, y la salida de catepsinas lisosomales al citosol. En la mayoría de las células debe ocurrir primero una activación (por ejemplo vía TLRs) que aumente la expresión de NLRP3, vía la activación de NF- κ B. Una vez activada la célula, NLRP3

puede responder a su estímulo y formar el inflamasoma. Algunos estímulos agonistas que inducen el inflamasoma NLRP3 incluyen el ATP, toxinas formadoras de poros, sustancias cristalinas, ácidos nucleicos y hongos, bacterias y virus patógenos. Estos estímulos pueden encontrarse durante infecciones o liberarse por células dañadas. Adicionalmente, algunas condiciones patológicas en el cuerpo pueden promover la formación de estos estímulos en ausencia de infección como en el caso de la formación de cristales de colesterol y ácido úrico.

Recientes estudios muestran que NLRP3 se oligomeriza a través del dominio PYD, que a su vez sirve como sitio de incorporación de proteínas ASC a través de interacciones PYD-PYD. Lo anterior causa que ASC adopte una forma tipo prion y genere largos filamentos de ASC con forma helicoidal que son importantes en la formación del Inflamasoma. Después, la procaspasa 1 interacciona con ASC por interacciones CARD-CARD y forma su propia estructura tipo prion con filamentos que se ramifican de los filamentos de ASC. El acercamiento de los filamentos de la pro-caspasa 1 induce la maduración autoproteolítica de la pro-caspasa 1 a caspasa 1 activada. La activación de la caspasa 1 induce la escisión y activación de los precursores de citocinas pro-IL-1 β y pro-IL-18. Además de la participación de la caspasa 1, la IL-1 β puede ser activada por otras proteasas como la caspasa 8, proteinasa 3 y granzima A (Vande Walle, *et al.* 2014, Lu, *et al.* 2010).

b. Piroptosis

La activación excesiva de los inflamasomas lleva a una forma de muerte celular mediada por caspasa-1 llamada Piroptosis. En este proceso la membrana plasmática se lesiona al formarse poros de 1-2 nm en tiempos tempranos, el flujo de iones resultante puede explicar los cambios característicos de las células piroptóticas como son el hinchamiento del citoplasma, la lisis osmótica y la salida del contenido intracelular al medio extracelular. Tomando en cuenta que la activación de la caspasa 1 está ligada a la producción de IL-1 β e IL-18, y a la salida de otras citocinas y DAMPs (como HMGB1 y proteínas S100), la piroptosis representa otro tipo de muerte pro-inflamatorio. Por otro lado, la piroptosis y la apoptosis comparten algunas características morfológicas y bioquímicas entre las

que destacan la condensación nuclear, la fragmentación del DNA, la inactivación de PARP1 (*poly ADP ribose polymerase 1*) y la maduración de las caspasas 3 y 7 (Netea, *et al.* 2015).

c. Propagación de la inflamación por ASC

Tras la activación del inflamasoma, la ASC se desplaza desde el núcleo hasta el citosol y forma un gran agregado perinuclear que luego se secreta por las células piropticas. Los inflamasomas pueden actuar como señales endógenas de daño para amplificar la inflamación promoviendo la activación de la caspasa 1 fuera de las células o en macrófagos que se encuentren alrededor, lo que sugiere la propagación de la inflamación de célula a célula (Figura 3). *In vivo*, la inoculación de filamentos de ASC purificados en ratones propaga la inflamación. También se han encontrado filamentos en lavados pulmonares de pacientes con obstrucción crónica pulmonar. La acumulación de los filamentos en sitios de inflamación tiene serias implicaciones en las enfermedades inflamatorias ya que la actividad extracelular de ASC puede conducir a la perpetuación crónica de inflamación mediada por NLRP3 (Netea, *et al.* 2015, Shaw, *et al.* 2011).

d. Inflamasomas en AR

Es claro el papel que juegan las proteínas del Inflamasoma en enfermedades inflamatorias ya que mutaciones en sus genes se asocian a síndromes autoinflamatorios o cryopirinopatías (como Síndrome de Muckle-Wells, Síndrome inflamatorio familiar del frío y la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal) y a otros trastornos inmunes y metabólicos donde existe una producción aberrante de IL-1 β (Choulaki *et al.* 2015, Elliott y Sutterwala 2015). Entre los más relevantes se encuentran AR, Vitiligo, enfermedad de Crohn, Isquemia cardiaca y renal, Psoriasis, Lupus Eritematoso Sistémico, Enfermedad de Addison, Diabetes y Obesidad. Numerosos estudios genéticos han asociado mutaciones en NLRP3 y CARD8 con la susceptibilidad y severidad de AR en algunas etnias (Choulaki *et al.* 2015, Kastbom *et al.* 2008, Hamad *et al.* 2012).

Un estudio realizado por Choulaki *et al.* 2015 reveló que, comparando con individuos sanos, la sangre de pacientes con AR contiene una mayor cantidad de proteínas relacionadas con el inflamasoma NLRP3. Ciertos estudios en modelos murinos de artritis han demostrado que al inhibir la activación de NLRP3 se observa tanto una mejoría clínica (menor inflamación) como una mejoría histológica en los ratones, así como una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias (Vande Walle, *et al.* 2014). Por otro lado, utilizando el modelo de artritis inducida por colágena (CIA), Li y cols. encontraron que al inhibir la activación de NLRP1 se reducía significativamente la inflamación del tejido sinovial, la destrucción del tejido y la severidad de la artritis. A pesar de que la mayoría de los estudios se enfocan al papel del Inflamasoma NLRP3, los estudios de Li y cols. demuestran que el inflamasoma NLRP1 también puede tener un papel importante en la patología de la AR.

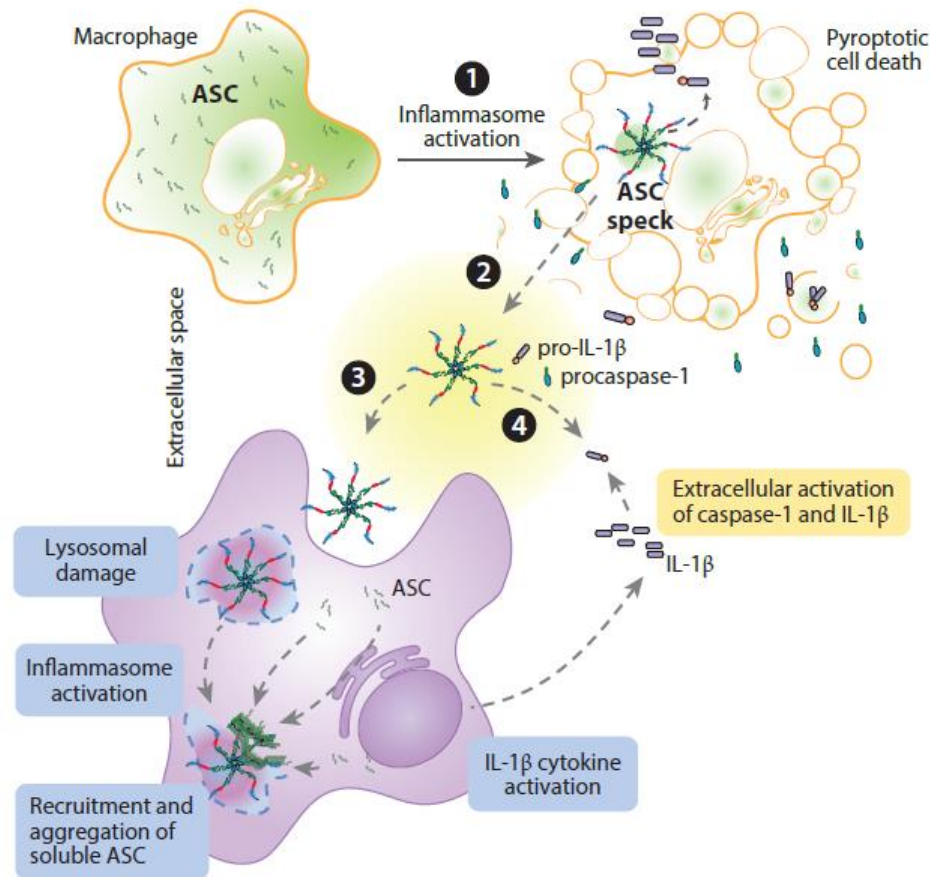


Figura 3. Propagación de la Inflamación por medio de ASC (Netea, *et al.* 2015).

7) Regulación de la AR

a) IL-4

Recientemente se ha demostrado un papel fundamental de la IL-4 en la inflamación. La IL-4 puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 y prostaglandina E2 (PGE2). Además, también puede regular positivamente la expresión de mediadores anti-inflamatorios tales como los antagonistas del receptor de IL-1 y los receptores de IL-1 tipo II (Ursaciuc, *et al.* 2010; Dong, *et al.* 2018).

En un modelo de artritis, los ratones sin IL-4 desarrollan una enfermedad más severa que los controles y el tratamiento con IL-4 disminuye los signos (Finnegan, *et al.* 2002). También se ha reportado que en cultivos de tejido sinovial de pacientes con AR y osteoartritis la IL-4 puede inhibir los niveles de TNF α e IL-1 (Bendrup, *et al.* 1993). La IL-4 actúa directamente sobre el tejido sinovial y las células sinoviales adherentes al interferir con el factor de crecimiento sinovial, además de inhibir la producción de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y la angiogénesis (Hemmerle, *et al.* 2014; Dong, *et al.* 2018).

A pesar de que hay numerosos estudios que muestran el posible efecto anti-inflamatorio de IL-4 en la AR también hay otros que demuestran lo contrario por lo que todavía no hay un consenso sobre su efecto pero lo que sí es seguro es su participación (Dong, *et al.* 2018).

b) Linfocitos T Reguladores en AR

Las células T reguladoras (Treg) son necesarias para mantener la tolerancia contra componentes autólogos. Se ha reportado que una disminución en el número de Treg o en su función lleva a una respuesta anormal contra auto-antígenos lo que resulta en enfermedad. Desde el descubrimiento de las células Treg su disfunción se ha asociado a muchas enfermedades autoinmunes como AR, LES, enfermedad inflamatoria de intestino y espondilitis anquilosante, entre otras (Miao, *et al.* 2018). En los pacientes con AR aún no está claro si el número de células Treg está alterado o no; algunos reportes señalan que el porcentaje de Treg en sangre periférica es menor que en controles sanos, mientras que otros informan porcentajes similares o

incluso mayores (Cao, 2004, Jiao 2007), y lo mismo es cierto para lupus eritematoso sistémico. Paradójicamente, se ha encontrado un mayor número de células Treg en el líquido sinovial de pacientes con RA y también se ha demostrado que las células Treg no suprimen efectivamente las respuestas de células Th1 y B (Kawashi, 2011; Niu, 2012). Una supuesta explicación del defecto es que las Treg de pacientes con RA no expresan CTLA-4, una molécula inductora de supresión (Walker, 2013). En respuesta al tratamiento con anti-TNF tanto el número como la función de Treg parece restaurarse lo que las vuelve un posible biomarcador de la efectividad de una terapia (Flores, *et al.* 2008 Miao, *et al.* 2018).

8) Tratamiento de la AR

El principal objetivo del tratamiento en la AR es la remisión de la enfermedad, o por lo menos la disminución del nivel de actividad clínica. La meta obligatoria en todo paciente es controlar la actividad de la enfermedad con el fin de mejorar los síntomas, disminuir el daño articular, prevenir la limitación funcional y mejorar la calidad de vida (Cardiela, 2014). La terapia farmacológica incluye el uso secuencial de agentes anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), de corticosteroides, y de fármacos modificadores de la enfermedad (FAME). La interconsulta con médicos rehabilitadores y la consideración de tratamiento quirúrgico en algunos casos, son elementos importantes y a veces fundamentales en el tratamiento de los pacientes con AR.

a. Fármacos modificadores de la enfermedad (FAME)

Aunque todos los FAME han demostrado en mayor o menor grado su eficacia en estudios controlados, los FAME más eficaces incluyen al metotrexato (MTX), la sulfasalazina y la leflunomida, entre los cuales el metotrexato sigue siendo el más usado debido a su efecto inmunosupresor (antagonista del ácido fólico que interfiere en procesos de síntesis de ADN, reparación y replicación celular). La terapia combinada de estos FAME debe ser considerada en pacientes con enfermedad temprana, con persistencia de sintomatología y en presencia de factores de mal pronóstico. El uso de dichos FAME retrasa la progresión radiológica y disminuye la

mortalidad. Los efectos secundarios más relevantes son la toxicidad hepática, pulmonar, gastrointestinal, neurológica y hematológica así como también efectos adversos gastrointestinales (diarrea, náusea y dolor abdominal) y del aparato respiratorio (infección de vías aéreas superiores y bronquitis) además de la posibilidad de cáncer (Mulero, J. 2004). Es muy importante que el médico tratante vigile periódicamente la posible aparición de dichos efectos adversos para poder contrarrestarlos.

Otros FAME muy utilizados son los antipalúdicos sintéticos como la Cloroquina y la Hidroxicloroquina que producen alivio sintomático, sobre todo en pacientes con enfermedad inicial con pocos datos predictores de agresividad.

b. Anti-inflamatorios no Esteroideos (AINES)

Los AINE son de utilidad para tratar el dolor y la inflamación. Sin embargo no modifican el curso de la enfermedad. Se utilizan al inicio de la enfermedad y deben ser prescritos junto con los FAME. Existe una gran variedad de ácidos orgánicos, incluyendo derivados del ácido propílico (ibuprofeno y naproxeno), derivados del ácido acético (indometacina) y ácidos enólicos (piroxicam), todos competidores con el ácido araquidónico por el sitio activo de la ciclooxigenasa.

Cualquier AINE debe utilizarse a dosis máxima durante al menos una semana y una vez controlados los síntomas, debe utilizarse a la dosis mínima eficaz, y sólo durante el tiempo necesario ya que los efectos adversos son dependientes de la dosis y de la duración de tratamiento (Cardiela, 2014, Vivar, 2014).

c. Terapias Biológicas

Hoy en día existen diversas terapias biológicas para el tratamiento de AR como son los anticuerpos monoclonales, inmunomoduladores y moléculas pequeñas. Es importante mencionar que el uso de los mismos está indicado en pacientes con falla o intolerancia a un FAME en los primeros tres meses de tratamiento. La principal ventaja de estos tratamientos sobre los FAME es el rápido efecto y la prevención de la progresión radiográfica.

d. Inmunoterapia

Se han elaborado medicamentos que bloquean las citocinas que participan en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la AR con el propósito de detener o retardar la progresión de la enfermedad (Mulero, 2004). El TNF- α y la IL-1 β participan activamente en los procesos inflamatorios relacionados con artropatías inflamatorias por lo que han sido blanco importante en el tratamiento de la AR. Algunos medicamentos disponibles en el mercado son el Etanercept (inhibidor competitivo de la unión del TNF a su receptor) y Anakinra (agonista competitivo del receptor de IL-1 β) (Berbera, 2004, Romero, 2005).

e. Anticuerpos monoclonales (AcM)

Cada vez son más los anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento de la AR y la mayoría tienen como blanco diversas citocinas que intervienen en la patología de la enfermedad como TNF- α (Adalimumab, Infliximab, Golimumab, Certolizumab-pegol), IL-6 (Tocilizumab) e IL-15 (HuMax IL-15). Han surgido nuevos blancos terapéuticos como IL-17 e IL-20 y se han diseñado AcM contra ellos entre los que destacan Secukinumab e Ixekizumabde (Anti IL-17), Brodalumab (contra el receptor de IL-17) y NNC0109-0012 (Anti IL-20) los tres anticuerpos han mostrado resultados prometedores en estudios clínicos de fase II y III. También existen AcM dirigidos contra los linfocitos B (Rituximab) y lifocitosT (Abatacept) (Nishimoto, 2009 Vivar, 2014).

Los AcM han mostrado una alta selectividad y eficacia clínica en los pacientes con AR. El efecto de dichos anticuerpos ocurre por activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), apoptosis y neutralización (Vivar, 2014).

f. Moléculas pequeñas

Se han desarrollado nuevas terapias que inhiben cascadas de señalización de cinasas. En comparación con los biológicos, los inhibidores de cinasas son pequeños fármacos que pueden administrarse oralmente. Las proteínas cinasas que pueden ser bloqueadas selectivamente son esenciales para la transducción de

señales y la activación de genes. Las cinasas que se han relacionado con la AR son las MAPK, JAK, Syk o Btk y algunos factores de transcripción que se han considerado como futuros blancos para el tratamiento de la AR.

Una de las primeras cinasas estudiadas en AR es la MAPK p38 cuya inhibición en modelos murinos ha mostrado efectos protectores, aunque en pruebas clínicas no ha resultado benéfico. El Tofacitinib es el primer inhibidor de las cinasas de Janus (JAK) aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) que ha demostrado resultados alentadores similares a los obtenidos con anti-TNF (Vivar, 2014, Bonilla, 2011).

El Fostamatinib (R788) es un pro-fármaco que al administrarse oralmente se transforma en R406 un potente inhibidor de la Syk cinasa. En modelos murinos como CIA se ha demostrado que disminuye la inflamación y la erosión del hueso. En estudios clínicos se han obtenido buenos resultados en comparación con el placebo aunque ya se han identificado algunos efectos secundarios después de tres meses de tratamiento (Bonilla, 2011, Meier, 2013).

Existe cierta preocupación entre las sociedades mundiales de reumatólogos sobre la seguridad en el uso de las terapias biológicas en especial de los anticuerpos monoclonales, ya que numerosos estudios han demostrado que existe un alto riesgo a contraer infecciones virales y bacterianas tras su uso.

Los pacientes tratados con anti-TNF y Rituximab tienen un riesgo mayor de contraer tuberculosis (TB) e infecciones por Herpes Zoster. Otros estudios recientes también muestran que existe mayor riesgo de padecer enfermedades neoplásicas como Melanoma (Bonilla, 2011, Mould, 2008).

g. Inmunomoduladores

1. Extracto Dializable de Leucocitos (EDL)

Se ha publicado una amplia cantidad de artículos que señalan los efectos benéficos del EDL en diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas; los resultados incluyen desde la conversión en las intradermorreacciones (de negativas a positivas) hasta la mejoría clínica en muchos casos. Los resultados positivos de su efecto han sido claros en algunas enfermedades infecciosas, notablemente en

virosis como el herpes y en micosis como la candidiasis; en algunas enfermedades no infecciosas, como el asma, los resultados también han sido convincentes (Berron, 2007). De observaciones de este tipo (en enfermedades no infecciosas) ha surgido la idea de que el EDL actúa como un modulador de la respuesta inmune y sobre esta base se ha aplicado en pacientes con diversos padecimientos tanto autoinmunes como neoplásicos. *In vitro*, Buurman y cols. demostraron que el EDL es capaz de inhibir la producción de TNF- α en leucocitos estimulados con Lipopolisacáridos (LPS) al modular la actividad del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Ojeda, 2005), otro estudio que sugiere la modulación de este factor de transcripción es el de Padilla en el que se trataron linfocitos TCD4 con EDL lo que redujo significativamente la secreción de citocinas proinflamatorias (Lara, 2011), aún se desconoce el mecanismo por el cual el EDL pueda modular la respuesta inmune a nivel de la cascada del NF- κ B.

Los reportes sobre el efecto del EDL en diversas enfermedades autoinmunes son bastos y en la mayoría de los casos se mencionan efectos benéficos aunque no siempre curación de la enfermedad. En el caso de la artritis reumatoide en particular, los reportes científicos sobre el uso del EDL en el tratamiento de la enfermedad son escasos y los resultados no siempre han sido positivos.

El primer estudio sobre AR y EDL fue publicado por Kass y cols. en 1974. En el estudio, 3 pacientes con ARJ grave se trataron con 10 inyecciones de EDL durante 5 meses. Los resultados fueron alentadores ya que el EDL no tuvo efectos colaterales, la enfermedad no mostró ninguna progresión durante el tratamiento, hubo mejoría clínica general, disminuyeron la parálisis y el dolor, y en dos casos se notó mejoría en la función articular (Froland, 1974). Debido a los resultados obtenidos, años después Kass junto con Hjort y cols. (1978), realizaron un estudio donde trataron 12 pacientes con EDL obtenido de personas sanas, y 12 pacientes con placebo. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de leucocitos en general ni cambios en la positividad de las pruebas de hipersensibilidad retardada. Y aunque no se observaron efectos secundarios del tratamiento con EDL, tampoco se observaron diferencias significativas en la evolución clínica de los pacientes. Los autores de dichos estudios concluyen que

el EDL preparado de donadores sanos no tiene un efecto terapéutico en pacientes con AR y que probablemente se requiere la preparación de un EDL más específico (Hoyeraal, 1978).

El primero en evaluar una terapia conjunta con el EDL fue Georgescu quien en 1985 describe el tratamiento de 50 mujeres con AR con una terapia no esterooidal combinada con EDL. Los resultados se evaluaron a los 6 y a los 12 meses de tratamiento donde se encontró que el 30% de los pacientes no respondieron al tratamiento y que el 70% restante respondió positivamente, aunque en forma variable. Se concluyó que el EDL es útil cuando se usa como adyuvante en la terapia contra la AR (Georgescu, 1985).

Los pocos estudios adicionales sobre el uso del EDL en la AR reportan resultados igualmente divergentes, de manera que el tema permanece controversial y por esto es necesario ampliar el número de estudios clínicos, y simultáneamente recurrir a modelos animales de artritis donde todas las condiciones puedan ser controladas y los resultados de sus efectos puedan ser valorados de manera más objetiva.

2. Ácidos Grasos Poliinsaturados (PUFA)

La ingestión de una *dieta Mediterránea*, rica en pescado, en aceite de oliva, y fibra vegetal en países europeos, se ha relacionado con una baja incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (ateroesclerosis, enfermedad coronaria, artritis reumatoide, hipertensión, diabetes e incluso cáncer). El efecto “protector” se ha adscrito al alto contenido en ácidos grasos omega-3, que tienen efectos opuestos a los de los ácidos omega-6 cuya actividad es principalmente pro-inflamatoria. La ingesta crónica de alimentos con ácidos poli-insaturados omega-6 (PUFA-6) como las carnes, las grasas y los alimentos carentes de fibra vegetal, facilita el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónico-degenerativas, principalmente por el efecto acumulativo de especies reactivas del oxígeno sobre muchos tejidos incluyendo el sistema nervioso (Wardhana, 2011).

El conocimiento, basado en la observación, de baja incidencia de enfermedades degenerativas asociada a un alto consumo de aceite de oliva, ha llevado a profundizar en el estudio de sus componentes y de sus propiedades biológicas. Así

se encontró que los componentes predominantes del aceite son ácido oleico, componentes fenólicos y esqualeno. Los principales compuestos fenólicos incluyen hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína, todos ellos con fuerte actividad anti-oxidante. El ácido oleico, un ácido graso poliinsaturado, tiene actividad anti-oxidante y anti-inflamatoria y se ha visto que reduce el riesgo de enfermedad coronaria, alteraciones en la presión sanguínea y la concentración de lipoproteínas de baja densidad asociadas con colesterol. (Waterman, 2007)

Recientemente Gan y cols. realizaron un estudio controlado en el que obtuvieron suero y glóbulos rojos de pacientes con AR; buscaron anticuerpos anti péptidos citrulinados y factor reumatoide, además cuantificaron el omega 3 presente en la membrana de los glóbulos rojos encontrando que mientras mayor era la cantidad del ácido graso menor era la cantidad de auto anticuerpos asociando el consumo de suplementos de omega 3 con una menor prevalencia de anticuerpos (Gan, *et al.* 2017).

En el único estudio reportado realizado con un componente aislado del aceite de oliva, se investigó el efecto de la oleuropeina-aglicon sobre la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria en ratones con artritis inducida con colágena tipo II (CIA). Los animales desarrollaron artritis erosiva en las patas traseras, iniciando con eritema y edema peri-articular en las mismas. El tratamiento con aceite de oliva iniciado en el día 25 aminoró los síntomas clínicos entre el día 26 y 35 mejorando el estado histológico de la articulación y la pata. Además se redujo el daño oxidativo y nitrosativo, así como los niveles de citocinas pro-inflamatorias que en el plasma también se redujeron considerablemente. También se confirmó el efecto benéfico del aceite de oliva en un modelo de CIA iniciando el tratamiento en el día 28 demostrando que el aceite de oliva ejerce un efecto anti-inflamatorio durante la inflamación crónica (Impellizzeri, 2011).

Monir y cols. en 2012 realizaron un estudio sobre el efecto de suplementos con ácidos grasos omega-3 en pacientes con artritis reumatoide juvenil a los que se administró una dosis de 4 g por día durante doce semanas, encontrando que se redujo el número de articulaciones inflamadas y los niveles de TNF- α e IL-1 en el

92.5% de los pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados, y también redujeron el consumo de AINES (Gheita, 2012).

Por su parte, Aquino-Vega y cols. (2013) al utilizar aceite de oliva para administrar la droga alfa asarona en ratones con CIA observaron una significativa disminución ($\approx 50\%$) en los niveles de anticuerpos anti-colágena tipo II con respecto al control lo que indicó que los efectos de los UFAS pueden ir más allá de la inmunidad celular. (Yanik, 2013)

Efecto Anti-inflamatorio de los PUFA

En algunos estudios se ha demostrado que los ω -3 UFAS (ácido eicosapentaenoico [EPA] y docosahexaenoico [DHA]) encontrados en el aceite de pescado disminuyen los niveles de ácido araquidónico (ARA) en las células inmunitarias, disminuyendo la producción de eicosanoides derivados del ARA (Miles, 2012). Una vez dentro de la célula (Figura 4), el EPA y el DHA, mediante reacciones de oxidación, dan origen a mediadores eicosanoides que son menos inflamatorios que los derivados de ARA, por la misma vía también se producen resolvinas que tienen actividad antiinflamatoria al reducir el infiltrado celular y disminuir la activación de NF- κ B (Singer, 2008; Rustan, 2005; Da Silva Borgesi, 2013). Además, los UFAS ω -3 de pescado pueden afectar positivamente otros aspectos de la inmunidad e inflamación en la AR, incluyendo la función de las DC y las células T, así como la producción de citocinas y especies reactivas del oxígeno (ROIs), aunque los resultados no han sido consistentes y claramente el tema requiere más trabajo experimental (Singer, 2008, Rustan, 2005, Da Silva Borgesi, 2013). Se ha visto que el aceite de pescado retarda el desarrollo de artritis en modelos animales y reduce su severidad (Miles, 2012).

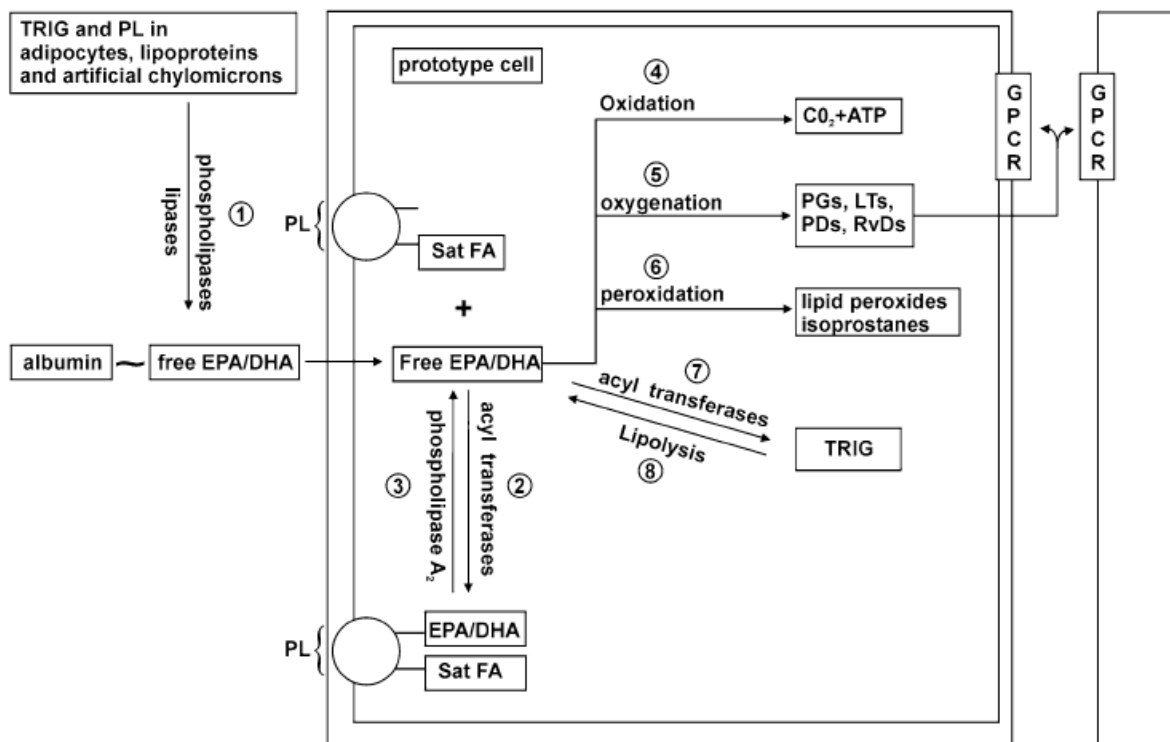


Figura 4. Metabolismo de los UFAS dentro de la célula (EPA= ácido eicosapentaenoico, DHA= Ácido docosahexaenoico TRIG= Triacilglicéridos, PL= Fosfolípidos, SatFA= ácidos grasos saturados, PGs= Prostaglandinas, LTs= Leucotrienos, PDs= Protectinas de la serie D, RvDs= Resolvinas de la serie D, GPCR= Receptores acoplados a proteínas G) (Singer *et al*, 2008)

Otro mecanismo que se propone por el cual los UFAS modulan la inflamación es a través de TLRs. El TLR4 posee regiones que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a agonistas endógenos como las alarminas (proteínas de choque térmico y la proteína de cromatina HMGB1 (high-mobility group protein-1), que son liberadas por células necróticas y macrófagos, lo que contribuye a la inflamación y daño del tejido.

En varios estudios se ha demostrado que los ácidos grasos libres son ligandos del TLR4. Los ácidos grasos saturados (SatFAs) como los presentes en el Lipido A activan una cascada de señalización que resulta en la activación de NF- κ B mientras que los UFAS actúan como antagonistas bloqueando la cascada a nivel del receptor. De la misma manera, los UFAS son capaces de inhibir la activación de los dímeros de TLR2–TLR1, TLR2–TLR6 y TLR4–TLR4 por sus respectivos PAMPs.

Además, los UFAS EPA y DHA son capaces de regular negativamente la cascada del NF- κ B a nivel intracelular mediante la inhibición de la fosforilación de I κ B α y la unión del NF- κ B al DNA (Singer *et al*, 2008).

En conclusión, se han probado diversas sustancias, diferentes a los fármacos convencionales en el tratamiento de la artritis reumatoide y los resultados han sido variables, a veces controversiales. Dos de estas sustancias, de potencial utilidad en el tratamiento de la artritis, son el factor de transferencia contenido en los extractos dializables de leucocitos por su efecto inmunomodulador, y los ácidos grasos poliinsaturados, por su efecto anti-inflamatorio.

El contar con el modelo de artritis inducida por colágena tipo II en el ratón, que semeja a la artritis reumatoide en el humano, permite explorar de manera controlada el efecto de estos y otros compuestos sobre el desarrollo, la evolución y el tratamiento de la enfermedad articular.

Inflamasomas y Ácidos Grasos Insaturados

Los ácidos grasos insaturados (UFAs) como los omegas 3, 6 y 9 tienen un potencial papel anti-inflamatorio en una variedad de enfermedades (AR, diabetes, etc.) y cada vez son más los estudios que intentan dilucidar su mecanismo de acción. Uno de los mecanismos por los cuales estos ácidos regulan la inflamación es inhibiendo la activación de los inflamasomas. Yan en 2013 trató macrófagos derivados de médula ósea con ácidos omega 3, DHA y EPA, observando una disminución en la secreción de IL-1 β y de IL-18, y en la expresión de los componentes del inflamasoma NLRP3. En un estudio similar, L'homme y cols. utilizaron los ácidos omega 9, oleico y linoleico, obteniendo resultados similares e incluso se observó que estos ácidos son capaces de contrarrestar el efecto de los ácidos grasos saturados (ácido esteárico) que se sabe son altamente inflamatorios.

9) Modelo de Artritis Inducida por Colágena

La Artritis inducida por colágena (CIA del inglés Collagen induced arthritis) es una enfermedad autoinmune experimental que es ampliamente usada como modelo de AR. La CIA se induce en cepas susceptibles de roedores (ratones y ratas) y primates no humanos por la inmunización con Colágena tipo II (CII), la principal proteína constituyente del cartílago articular. Posterior a la inmunización estos animales desarrollan poli-artritis autoinmune, que comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas con la AR en humanos.

Al igual que con la artritis reumatoide, la susceptibilidad a la CIA en los roedores está relacionada con las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La respuesta inmune a la CII se caracteriza tanto por la estimulación de las células T específicas para la colágena y la producción de títulos elevados de anticuerpos específicos tanto para el inmunógeno heterólogo (CII) como para el autólogo (ratón o rata CII). Histológicamente, los modelos de CIA en rata y ratón se caracterizan por una sinovitis intensa que coincide precisamente con la aparición clínica de la artritis. A los pocos días del inicio, la erosión del cartílago y del hueso subcondral por pannus es evidente, y luego sigue la regeneración por fibrosis y anquilosis de las articulaciones involucradas (Rosloniec, 2010).

a) Descripción del modelo

La CIA se desarrolla en ratones con haplotipos H-2^q o H-2^r del MHC, siendo la región de la clase II (I-A) del MHC la que determina esta asociación. En la mayoría de los estudios se emplea la cepa DBA/1 (H-2^q) y más raramente ratones B10.RIII (H-2^r). Dos a cuatro semanas después de la inmunización comienzan a inflamarse las articulaciones de las patas. Posteriormente un edema y enrojecimiento intensos se extienden al carpo o tarso, pudiéndose llegar a la anquilosis a partir de la décima semana. Es frecuente el hallazgo de infiltrado sinovial por células T activadas, el aumento de moléculas de MHC de clase II por células sinoviales y el desarrollo de pannus que contiene macrófagos activados, linfocitos y polimorfonucleares. En la zona de conjunción del cartílago con la sinovial, el pannus produce erosiones óseas, identificables por rayos X (Rosloniec, 2010, Blanco, 2007).

10) Antecedentes directos

Recientemente en el laboratorio se realizó un estudio donde ratones con CIA se trataron con ácidos grasos omega 3, 6 y 9 (DHA, ácido araquidónico y ácido oleico, respectivamente) a dosis diaria de 1 mg. Se encontró que los ácidos omega 3 y 9 tuvieron un efecto anti-inflamatorio significativo en la inflamación de las patas y disminuyeron los daños en el tejido articular (hueso y cartílago) (Figura 5). Además se utilizaron extractos dializables de leucocitos (EDLs) obtenidos de ratones inmunizados con CII, 2 semanas post inmunización (pico máximo de respuesta inmune celular), y de ratones sanos. Solo se observó un efecto benéfico en los ratones tratados con el EDL de ratones sanos por lo que se especuló que si se elaboraba el EDL de ratones igualmente inmunizados con CII pero a las 4 semanas post inmunización, cuando la respuesta proliferativa hacia la CII ha disminuido, se podrían obtener los resultados benéficos buscados.

No se conoce cuál es el mecanismo de acción de las sustancias que tuvieron un efecto anti-inflamatorio en el modelo de la CIA pero se propone que tiene que ver con la inhibición de la activación del inflammasoma.

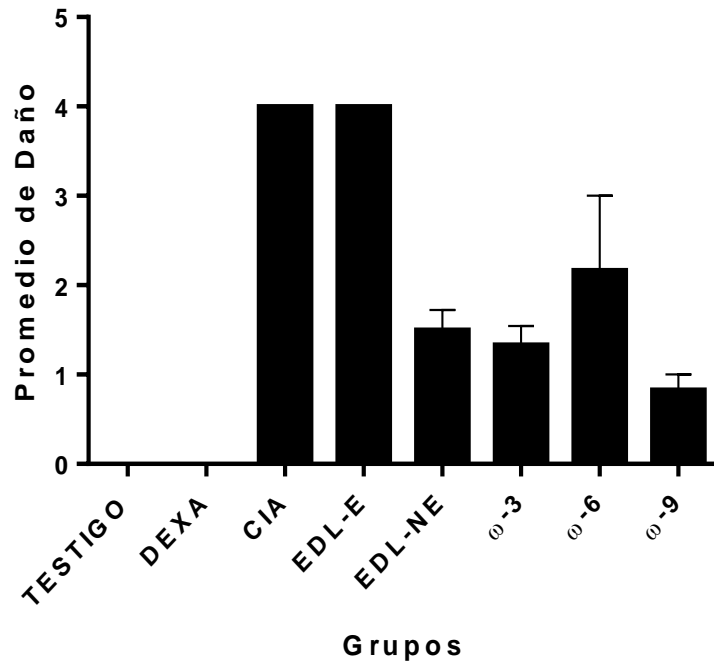


Figura 5. Daño óseo en ratones DBA-1 inoculados con CII (CIA) bajo diferentes tratamientos. Sin tratamiento (CIA), Tratados con dexametasona (DEXA), extracto dializable de leucocitos específico (EDL-E), EDL no específico (EDL-NE), y ácidos grasos omega 3, 6 y 9.

JUSTIFICACIÓN

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, común en México, que aunque puede ser controlada con diversos fármacos estos pueden ocasionar efectos secundarios severos a largo plazo. La búsqueda de nuevos tratamientos, menos dañinos y de menor costo, es un trabajo de mucha importancia en beneficio de los pacientes. El modelo murino de la artritis inducida por colágena en el ratón ofrece la posibilidad de estudiar diversos ácidos grasos no saturados omega y extractos dializables de leucocitos como tratamientos alternativos de la artritis.

HIPÓTESIS

1. Por sus efectos anti-inflamatorios, probados en diversas enfermedades, los ácidos grasos omega 3, 6 y 9, tendrán un efecto anti-inflamatorio benéfico en la artritis inducida por colágena en el ratón, y sus efectos podrán estar relacionados con la inhibición de la función del inflamasoma.
2. Por sus efectos anti-inflamatorios, probados en diversas enfermedades, los extractos dializables de leucocitos tendrán un efecto anti-inflamatorio benéfico en la artritis inducida por colágena en el ratón, y sus efectos podrán estar relacionados con la inhibición de la función del inflamasoma.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto anti-inflamatorio de tres ácidos grasos omega (3, 6 y 9) y del extracto dializable de leucocitos en la evolución de la artritis inducida con colágena tipo II en el ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Estudiar los cambios histopatológicos en las articulaciones de las patas de ratones con artritis inducida por colágena (CIA) en el ratón.

2.-Evaluar el efecto del tratamiento con los ácidos omega DHA, AA y OA y con EDL sobre la respuesta inflamatoria y sobre la formación y activación del inflamasoma NLRP3 en el modelo de la CIA.

MATERIALES y METODOS

Reactivos

- Concanavalina A, ácido docosohexaenóico, ácido araquidónico, ácido oleico, adyuvante incompleto de Freund, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), acrilamida, bis-acrilamida y otros, de Sigma-Aldrich Chemical Company (Estados Unidos).
- Adyuvante completo de Freund de MD Biosciences (Estados Unidos).
- Solventes (etanol, xilol, cloroformo) de Merck (México).
- Alamar azul de AbD Serotec (Estados Unidos).
- Anticuerpos para Inmunofluorescencia: α -NLRP3 y α -NF κ B (Novus Biologicals, Estados Unidos).
- Parafina Paraplast de McCormick Scientific (Estados Unidos).

Material Biológico

Ratones hembra adultas de seis semanas de edad de las cepas BALB/c (H-2d) (donativo de la Escuela Superior de Medicina, IPN) y DBA-1(H-2q) (adquiridas de HARLAN, Estados Unidos).

a) Preparación de los extractos dializables de leucocitos (EDL)

Se inocularon 10 ratones de la cepa BALB/c con 100 μ L de una emulsión (1:1) de CII (4 mg/mL) y adyuvante completo de Freund con *M. bovis* a la concentración de 6 mg/mL en la base de la cola. Cuatro semanas después se obtuvieron los bazos de los animales inoculados con CII y de animales no inoculados (sanos), con los que se prepararon suspensiones celulares.

Para preparar los EDL específico (EDL-E ratones inoculados con CII) y no específico (EDLNE ratones sanos), se partió de una suspensión de esplenocitos ajustada a 10×10^6 células por ml, las células se rompieron por 10 ciclos de congelación y descongelación. La suspensión obtenida se dializo (1 volumen) contra 9 volúmenes de solución salina libre de pirógenos durante 48 horas, el dializado se recuperó para cuantificar proteína (Nanodrop) y ajustar a valores equivalentes ambos extractos. Finalmente los extractos se esterilizaron por filtración en membranas Millipore ($0.22 \mu\text{m}$), y se hicieron alícuotas que se conservaron congeladas (-20°C) hasta su uso.

b) Modelo de Artritis Inducida por Colágena (CIA)

a. Inmunización

Cuarenta ratones de la cepa DBA-1 se dividieron en 10 grupos de 4 ratones cada uno como se describe más adelante. A excepción del grupo sano (ratones no inoculados), los ratones se inmunizaron de la misma manera que los ratones de la cepa BALB/c (Ver preparación de los EDLs). Catorce días después se dio un refuerzo con una emulsión 1:1 de CII (6 mg/mL) y adyuvante incompleto de Freund, inoculando 0.1mL en el peritoneo.

b. Tratamiento

Se inició el tratamiento desde la primera inmunización con CII, administrando diariamente 0.1 mL de los EDLs y de los ácidos grasos omega 3, 6 y 9 por la vía oral, de acuerdo a la tabla 3.

TABLA 3. Grupos Y Tratamiento

Grupo n=4	Tratamiento (Tx) Diario, Oral	Inicio del Tx
Sano	S/T	S/T
CIA	S/T	S/T
DEXA	Dexametasona 1.0 mg/kg	Día 0
ω3	ω3 DHA 3 mg	Día 0
ω6	ω6 ARA 3 mg	Día 0
ω9	ω9 AO 3 mg	Día 0
EDL-E 1U	EDL-E 1U	Día 0
EDL-E 0.1U	EDL-E 0.1U	Día 0
EDL-NE 1U	EDLNE 1U	Día 0
EDL-NE 0.1U	EDLNE 0.1U	Día 0

c) Evaluación de Artritis en Ratones DBA-1**1. Evaluación clínica**

Una vez por semana se midió el peso de los ratones para evaluar su estado general de salud.

Cada tercer día se registraron los signos de inflamación: edema, eritema e hinchazón, y se calculó el índice de inflamación de acuerdo a la siguiente escala:

Cada dedo inflamado = 1 punto (máximo 5 puntos)

Cada nudillo inflamado = 1 punto (máximo 5 puntos)

Cada muñeca o tobillo inflamado = 5 puntos (máximo 5 puntos)

Total de puntos en la escala por pata: 0-15

Total de puntos por ratón: 0-60

Se midió el grosor de las patas traseras y delanteras cada tercer día y se calculó el índice de artritis con la siguiente fórmula:

$$IA = \frac{\text{Grosor pata día } x - \text{Grosor pata día } 0}{\text{Grosor pata día } 0} \times 100$$

Donde:

IA= Índice de Artritis

IA_{TX}= Índice de Artritis en el grupo con tratamiento x

IA_S= Índice de Artritis en el grupo control sano

IA_{CIA}= Índice de Artritis en el grupo sin tratamiento (CIA)

Con el fin de evaluar la capacidad motora de los ratones se registró el número de veces que se paraban sobre sus patas traseras dentro de un espacio reducido (recipiente circular de 15 cm de diámetro por 15 cm de alto), en 5 min.

d) Sacrificio y Obtención de muestras

Transcurridos 84 días de tratamiento se sacrificaron los ratones de los diferentes grupos por inhalación de cloroformo y se extrajo sangre por punción cardiaca de la cual se obtuvo suero para la medición de anticuerpos anti-CII. Se extirparon los bazo para preparar suspensiones celulares para ensayos de linfoproliferación y se amputaron las patas.

e) Cortes Histológicos

Las patas se descalcificaron con EDTA al 10 % y posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 0.5µm en un Microtomo (Leica RM2125RT). Para analizar los cambios histológicos se tiñeron los cortes con Hematoxilina-Eosina y Masson, además se almacenaron algunos cortes blancos para inmunofluorescencias (Ver Apéndice).

f) Evaluación de la proliferación celular

Se cultivaron esplenocitos (5×10^5 células por pozo) y se incubaron a 37° C en un ambiente de 5% de CO₂ por 72 horas en presencia de: Medio de cultivo DMEM (suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina G y 50µg /ml de gentamicina), y Concanavalina A: 0.50 µg por pozo en DMEM o CII: 4 µg por pozo en DMEM.

Después de 72 horas se agregaron 20 µl de MTT (7.5mg/ml de PBS) por pozo y se incubo nuevamente por 12 horas a 37° C en un ambiente de 5% de CO₂. La placa de cultivo se centrifugó 7 minutos a 700 x g (Centrífuga Biosan LMC-3000), y por último se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se adicionaron 200 µl de SDS

10% en NaOH 0.1N a las monocapas celulares, se incubó por 24 horas a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 540nm (Labsystems Multiskan® Plus, Finlandia).

g) Medición de Anticuerpos contra CII

Los anticuerpos contra CII se determinaron por un ensayo de ELISA en el que se forraron las placas de 96 pozos con 10 µg de CII en Tris-HCL (Sigma Aldrich RES3098T-B7) por 12 horas a temperatura ambiente para después bloquear con 0.2 ml de leche descremada al 3% en solución salina boratos por 2 horas a 37° C y posteriormente se incubó la placa con 0.1ml de suero problema diluido 1:100 en PBS, por 2 horas a 37° C.

Después de 3 lavados con PBS, se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario (anti inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa de rábano) diluido 1:1000 en PBS y se incubó por 1 hora a 37° C, se lavó 6 veces con PBS y se agregó 0.1ml de sustrato-cromógeno (3 mg de orto-fenilén daimina y 10 µl de H₂O₂ al 30% en PBS, pH 7.4) por 20 min en oscuridad. Transcurrido el tiempo se adicionaron 20 µl de H₂SO₄ 4N a cada pozo para detener la reacción y se leyó la absorbancia a 492nm en un lector de ELISA.

h) Detección de los componentes del Inflamasoma NLRP3

Se fijaron los cortes histológicos de patas traseras y delanteras con acetona por 10 minutos, se secaron y lavaron con PBS por 5 min. Se realizó la recuperación antigénica con el reactivo Histo Reveal (Abcam ab103720, USA) por 5 minutos y se lavó con PBS por 5 minutos. Posteriormente se bloqueó con BSA al 3% en SSB por 30 minutos y se agregaron los anticuerpos primarios (anti NFκB y NLRP3) diluidos en BSA al 1.5% según el inserto del fabricante y se incubaron las laminillas 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se adicionó el anticuerpo secundario anti ratón marcado con TRITC a una dilución 1:1000 por una hora a 37°C. Finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI por 10 minutos y se montaron las laminillas con propilgalato.

RESULTADOS

Desde la inoculación con CII en los ratones DBA-1 se comenzó a administrar el tratamiento por 84 días en los que se evaluó el efecto de los mismos tanto a nivel clínico como histológico. Debido a la diferente naturaleza de los tratamientos utilizados y con fines prácticos se agruparon los resultados en dos subgrupos los correspondientes a los tratados con los ácidos grasos (Omegas 3, 6 y 9) y los tratados con los EDLs (Específico y No específico a las diferentes dosis). A excepción de los ratones sanos a todos los grupos se les indujo la Artritis (CIA).

Se le dio el nombre al grupo de ratones según el tratamiento que recibieron como se explica a continuación: Sanos (Sin tratamiento), CIA (Sin tratamiento), DEXA (Tratados con Dexametasona), DHA (Tratados con Omega 3), AA (Tratados con Omega 6), AO (Tratados con Omega 9), EDL-E (Tratados con EDL Específico) y EDL-NE (Tratados con EDL No específico).

1.- Evaluación Clínica

A partir de la inmunización con CII se observaron los ratones DBA-1 por 84 días. Se midió el peso de cada animal una vez por semana para evidenciar su estado general de salud. En la figura 6 se puede observar que la mayoría de los ratones mantuvieron un peso equiparable, aunque el peso de los ratones en general tendió a aumentar de manera proporcional a su edad. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos de tratamiento.

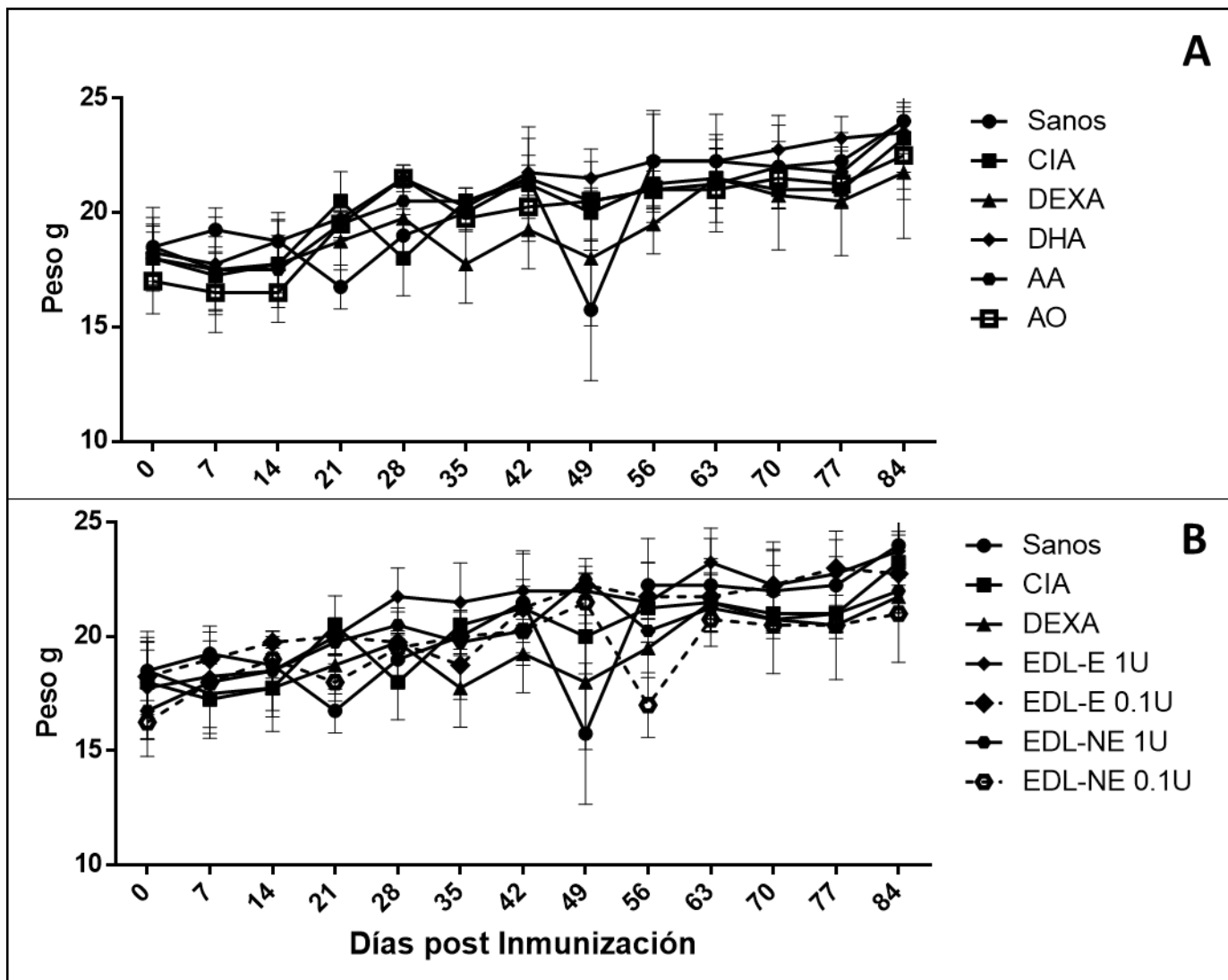


Figura 6. Peso de los ratones durante los 84 días de tratamiento. Los 4 ratones de cada grupo se pesaron una vez por semana y el resultado se expresa en gramos, A, tratamiento con ácidos grasos y B, tratamiento con EDLs. CIA: ratones sin tratamiento, DEXA: ratones tratados con Dexametasona, DHA: Ácido docosahexaenoico (ω -3), AA: Ácido araquidónico (ω -6), AO: Ácido oleico (ω 9), EDL-E: Extracto dializable específico, EDL-NE: Extracto dializable no específico.

Actividad motora

La actividad motora de los ratones (de cada grupo) se evaluó colocando a los ratones en un contenedor durante 5 minutos registrando el número de veces que se levantaban sobre sus patas traseras.

Los resultados obtenidos fueron muy variables y no permitieron distinguir entre los grupos, aunque en general todos los grupos experimentales tuvieron menos eventos de movilidad que los controles sanos (Figura 7).

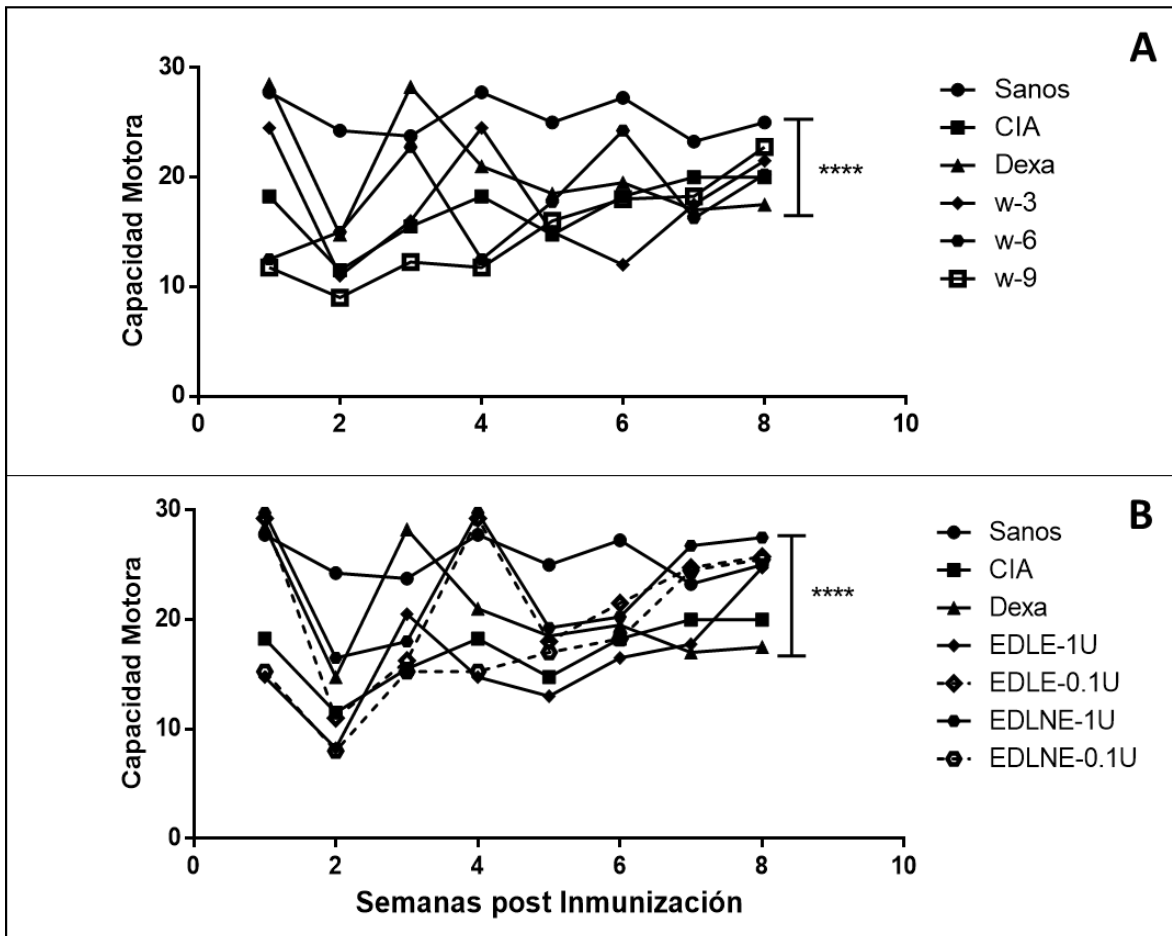


Figura 7. Capacidad motora de los ratones-CIA tratados con ácidos grasos omega y EDLs_a lo largo del tiempo de tratamiento. Cada punto es el promedio de la medición en los 4 ratones de cada grupo, Anova de dos vías $p < 0.0001$. CIA: ratones sin tratamiento, DEXA: ratones tratados con Dexametasona, DHA: Ácido docosaheptaenoico (ω -3), AA: Ácido araquidónico (ω -6), AO: Ácido oleico (ω 9), EDL-E: Extracto dializable específico, EDL-NE: Extracto dializable no específico.

Inflamación

El grado de inflamación se registró observando los signos de inflamación (edema y eritema) característicos en los ratones con CIA. Los resultados se expresan como índice de inflamación según el puntaje asignado (ver metodología 2.1). En la figura 8 se muestra una pata de un ratón sano y una pata de un ratón CIA sin tratamiento. Los animales sometidos a tratamiento con las diferentes sustancias presentaron grados de alteración intermedios según el efecto del tratamiento.

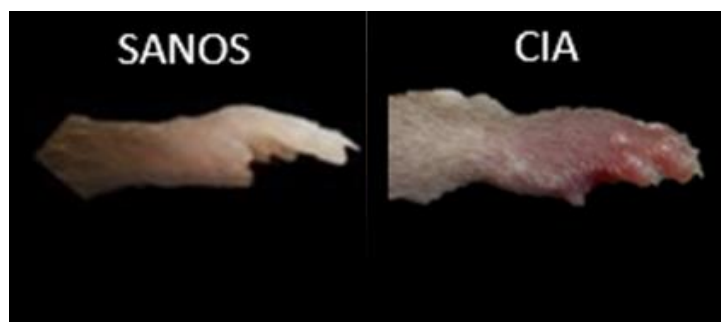


Figura 8. Imágenes representativas de las patas delanteras de un ratón sano y un ratón con CIA. Los animales tratados con las diferentes sustancias desarrollaron grados de inflamación intermedios entre estos dos extremos, según la eficacia del tratamiento.

Los ratones con CIA que no recibieron ningún tratamiento presentaron los puntajes clínicos de inflamación más altos, mientras que los tratados con dexametasona no presentaron signos clínicos de CIA y se comportaron como los ratones sanos (no inmunizados). En las figuras 9 y 10 se observa que a pesar de que los ratones tratados con los ácidos grasos y los EDLs presentaron inflamación en las patas, el puntaje alcanzado fue menor en comparación con los ratones que no recibieron tratamiento. En ambos grupos de tratamientos se alcanzó la diferencia estadística (<0.0001) tanto en la ANOVA de dos vías como en la comparación múltiple de Tukey donde todos los grupos son diferentes al grupo CIA no tratado. Lo anterior demuestra el claro efecto antiinflamatorio de todos los tratamientos utilizados.

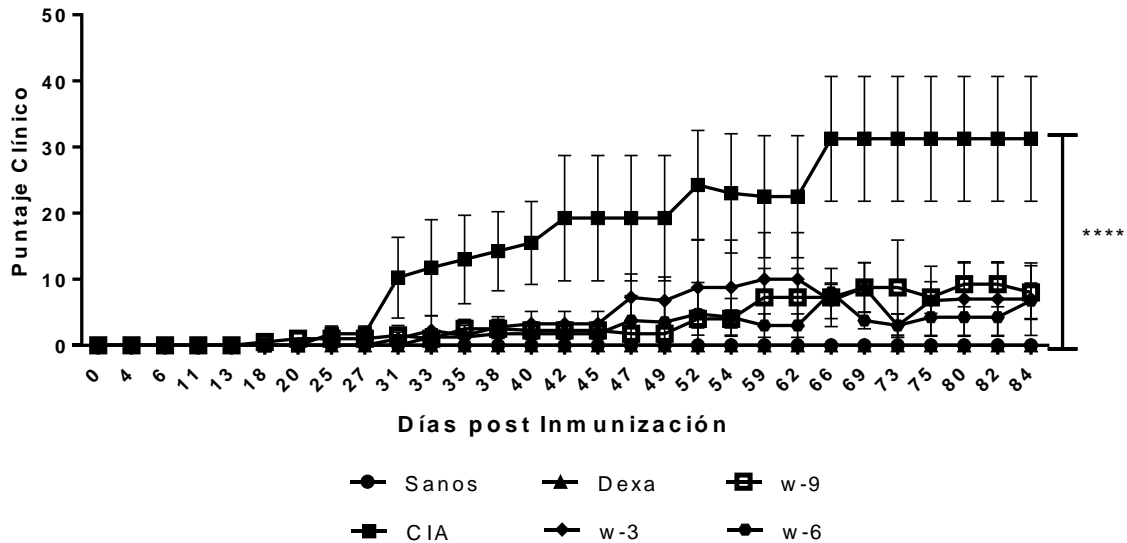


Figura 9. Índice de Inflamación de los ratones tratados con ácidos grasos omega 3, 6 y 9, comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados. Evaluación realizada por la observación, cada tercer día, de signos de inflamación en los 4 ratones de cada grupo. (ANOVA dos vías y Comparación múltiple de Tukey, $p < 0.0001$ ****). CIA: ratones sin tratamiento, DEXA: ratones tratados con Dexametasona, DHA: Ácido docosahexaenoico (ω -3), AA: Ácido araquidónico (ω -6), AO: Ácido oleico (ω 9)

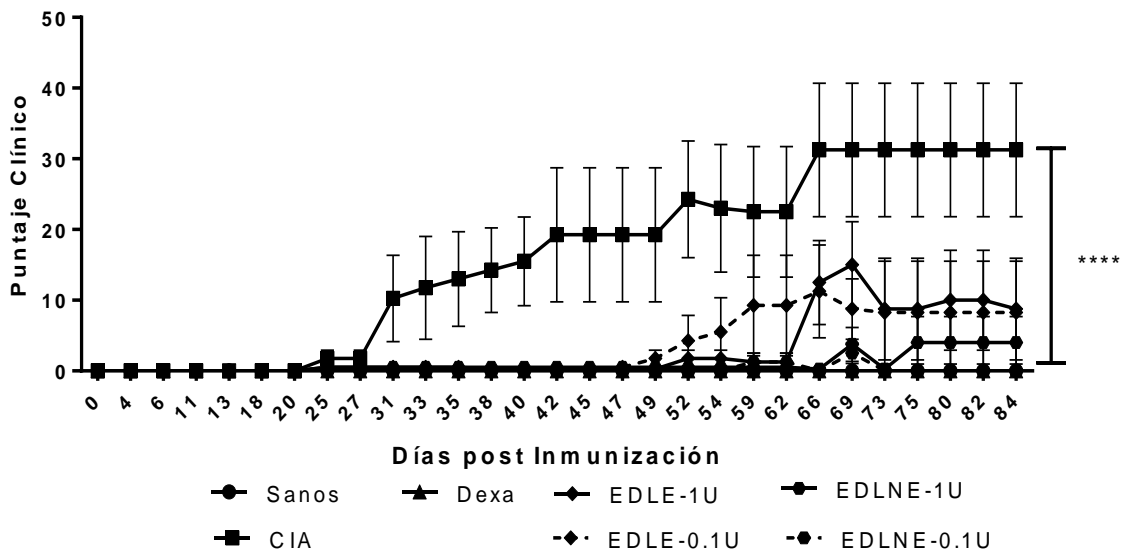


Figura 10. Índice de Inflamación de los ratones tratados con EDLs comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados. Evaluación realizada por la observación, cada tercer día, de signos de inflamación en los 4 ratones de cada grupo. (ANOVA dos vías y Comparación múltiple de Tukey $p < 0.0001$ ****). CIA: ratones sin tratamiento, DEXA: ratones tratados con Dexametasona, EDL-E: Extracto dializable específico, EDL-NE: Extracto dializable no específico.

Otra forma de evaluar la inflamación en los ratones fue midiendo el grosor de las patas traseras y delanteras de los diferentes grupos. A partir de dichas medidas se calculó el Índice de Artritis.

En las figuras 11 y 12 se muestra el índice de inflamación obtenido a lo largo del estudio. Como se puede observar, los resultados del Índice de Artritis correlacionan con los resultados del puntaje clínico. Nuevamente todos los grupos que recibieron tratamiento presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) con respecto a los no tratados, es claro el efecto positivo que tuvieron tanto los ácidos grasos como los EDLs en los ratones y es sobresaliente el efecto del EDLNE a 0.1 donde se encontraron los mismos resultados que en el grupo tratado con dexametasona.

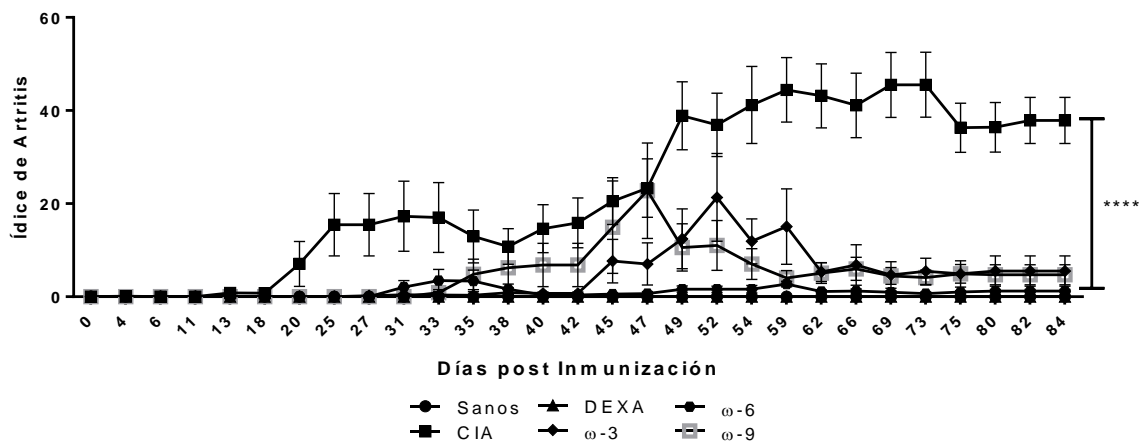


Figura 11. Índice de Artritis de los ratones tratados con los ácidos grasos omega 3, 6 y 9 comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados. Índice calculado a partir de las mediciones de los 4 ratones de cada grupo (ANOVA dos vías y Comparación múltiple de Tukey, $p < 0.0001$ ****). CIA: ratones sin tratamiento, DEXA: ratones tratados con Dexametasona, DHA: Ácido docosaheptaenoico (ω -3), AA: Ácido araquidónico (ω -6), AO: Ácido oleico (ω 9)

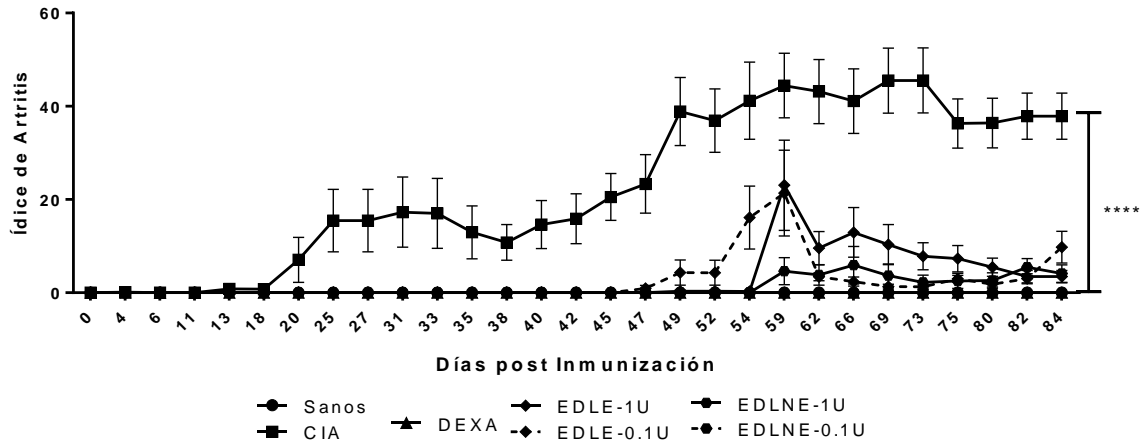


Figura 12. Índice de Artritis de los ratones tratados con los extractos dializables de leucocitos comparados con los tratados con dexametasona y los no tratados. Índice calculado a partir de las mediciones de los 4 ratones de cada grupo (ANOVA dos vías y Comparación múltiple de Tukey, $p < 0.0001$ ****). CIA: ratones sin tratamiento, DEXA: ratones tratados con Dexametasona, EDL-E: Extracto dializable específico, EDL-NE: Extracto dializable no específico.

2. Histología

Siguiendo al sacrificio de los ratones se tomaron algunas de las patas y se descalcificaron para finalmente incluirlas en parafina y hacer cortes histológicos. Debido a que se observaron más cambios y mayor inflamación en las patas delanteras se muestran los resultados de las mismas, teñidas con Hematoxilina-Eoisna (HE) y Masson. En la figura 13 se muestra la anatomía de una mano humana y una de ratón en la que se identifican los huesos que las componen y a los que se hará referencia durante este trabajo.

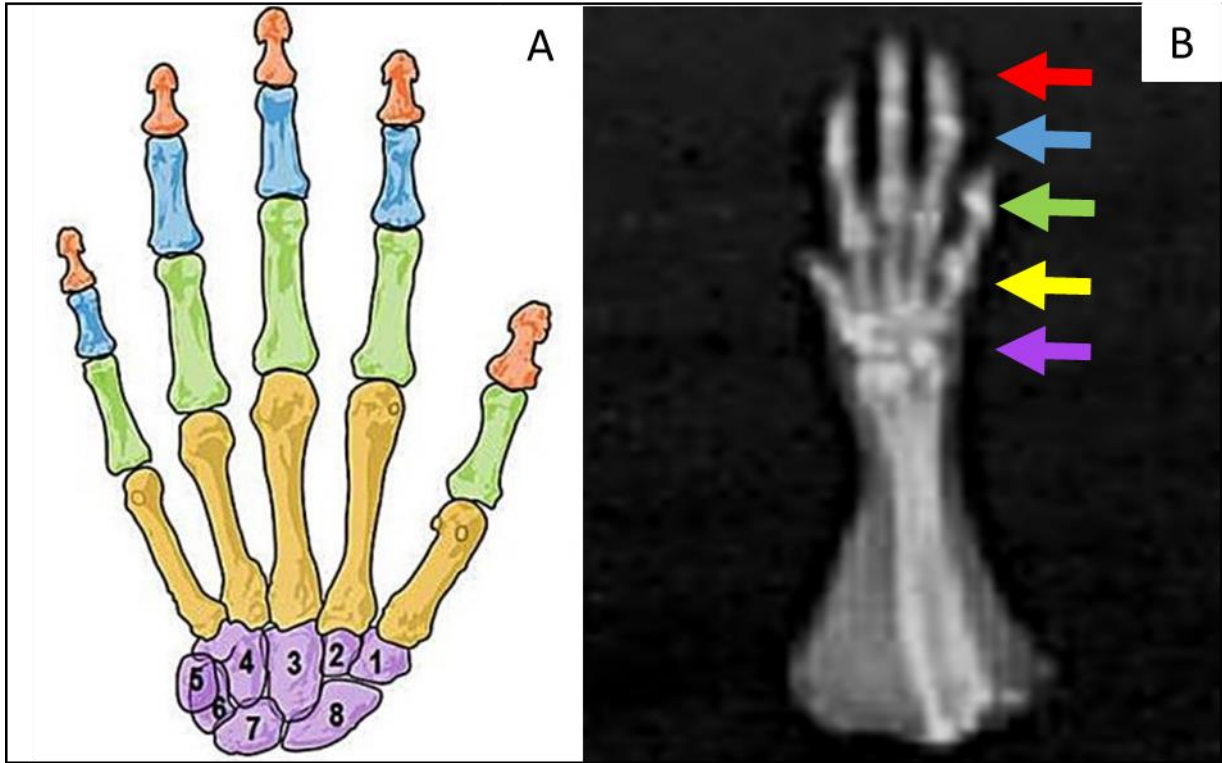


Figura. 13. Anatomía ósea de mano y pata delantera en humano y ratón respectivamente. A. Esquema de los huesos de la mano humana y B radiografía de la pata delantera de un ratón DBA-1, los diferentes huesos se indican con colores: Falanges distales (rojo), falanges medias (azul), falanges proximales (verde), metacarpos (amarillo) y carpos (morado).

❖ Grupo Sano

En los cortes de ratones sanos que no recibieron ningún tratamiento se observa la articulación íntegra, los huesos y el cartílago (H) completos sin alteraciones, la membrana sinovial rodea a la articulación de manera normal (→) y no existe ningún tipo de infiltrado entre un hueso y otro (Figura 14)

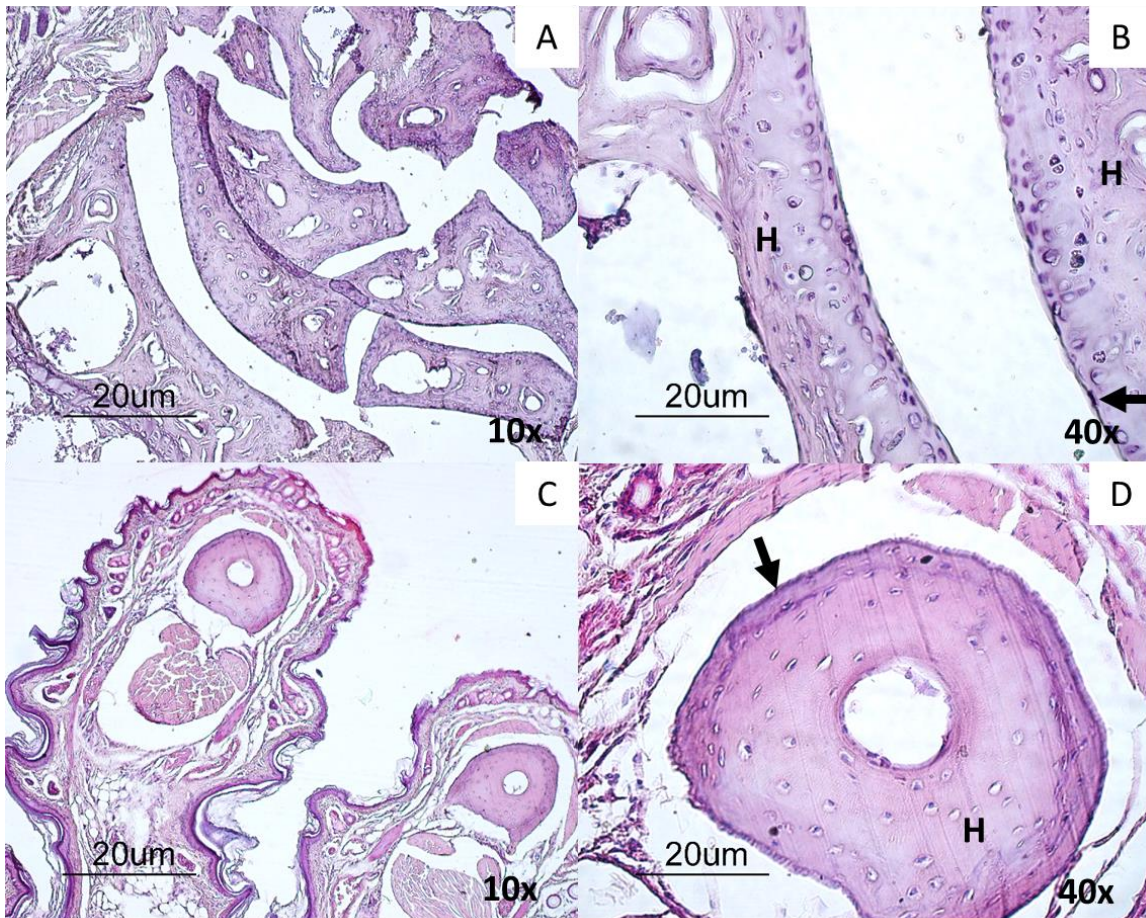


Figura 14. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 sanos teñidos con HE. Fotografías de carpos (A y B) y falanges (C y D) de ratones sanos donde no se observan alteraciones en hueso y cartílago (→), imágenes representativas de un grupo de 4 ratones.

❖ Grupo CIA

Contrario a lo sucedido con ratones sanos, los ratones CIA que no recibieron tratamiento presentaron diversas alteraciones (Fig. 15), la más evidente, un gran infiltrado inflamatorio principalmente mononuclear (Pannus →). Se observa la pérdida de la estructura de la articulación, hiperplasia de los condrocitos e incluso en algunos casos las falanges parecen estar unidas por el intenso infiltrado (Panel A), el infiltrado inflamatorio se encuentra no solo en la articulación si no también rodeado tejidos blandos hasta llegar a la piel (P), y también en musculo (M) y nervios (N). Es muy común que las articulaciones se fusionen en un proceso llamado anquilosis (↔) evidente en estos ratones (B). Otro cambio observado es la presencia de trabéculas óseas necróticas compuestas por células y material fibroso (T) en el panel F.

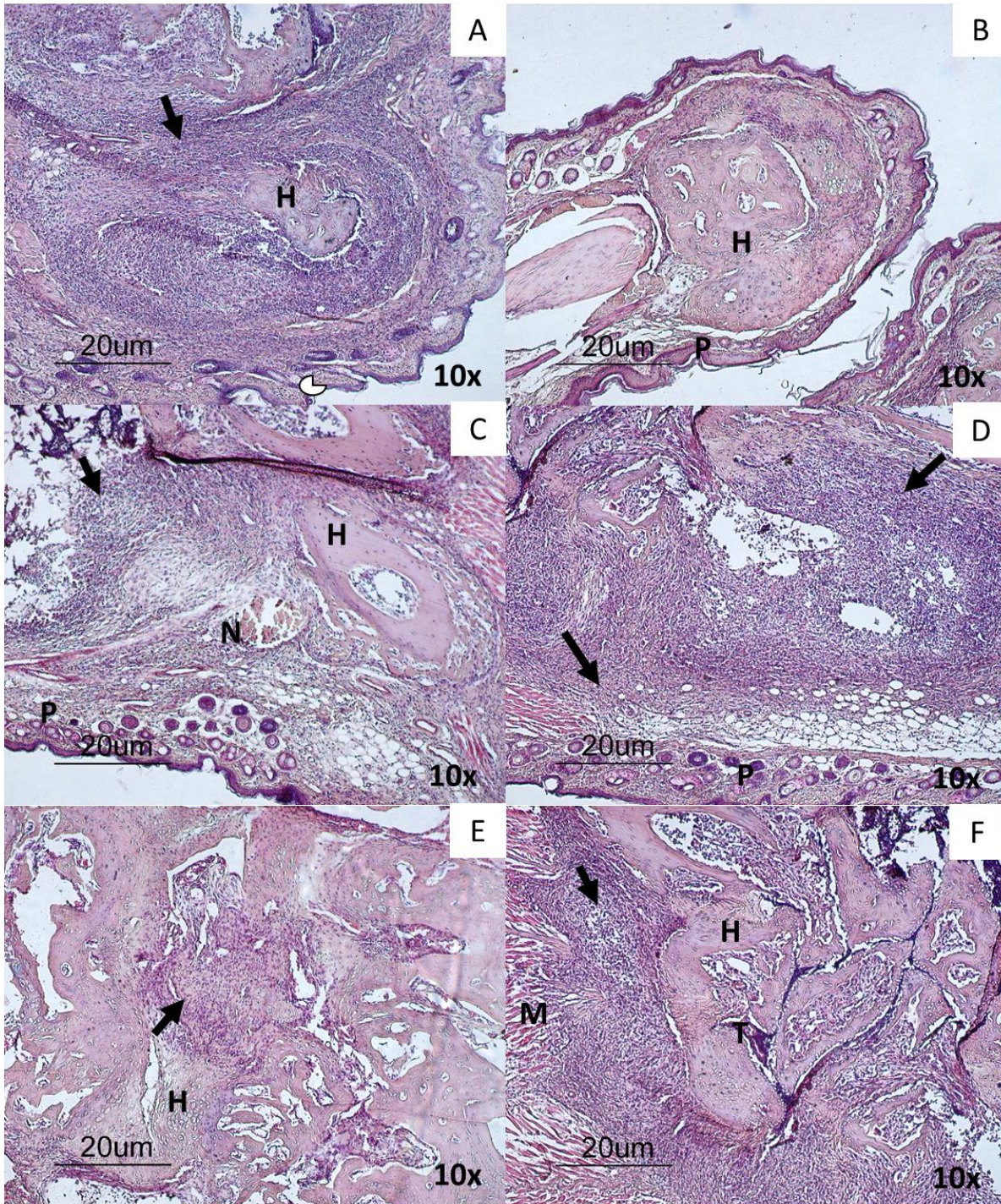


Figura 15. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA teñidos con HE. Fotografías de falanges (A y B), carpos (C y D) y metacarpos (E y F) de ratones con CIA donde se observa infiltrado inflamatorio (→) en articulación (H) y tejidos blandos (P) así como en nervios (N) y musculo (M), además de trabéculas necróticas (T). Imágenes representativas de grupos de 4 ratones.

Para evidenciar más los cambios histológicos se presentan a continuación fotografías representativas de los ratones con CIA (Figura 16) a un mayor aumento (40x). En los paneles A y C se observa la erosión y el daño en el hueso y el cartílago (→), para favorecer la llegada de nuevas células al sitio de inflamación suelen formarse nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) lo cual es evidente en el panel B (●), con mayor aumento se puede apreciar más claro la anquilosis en el panel D (↔).

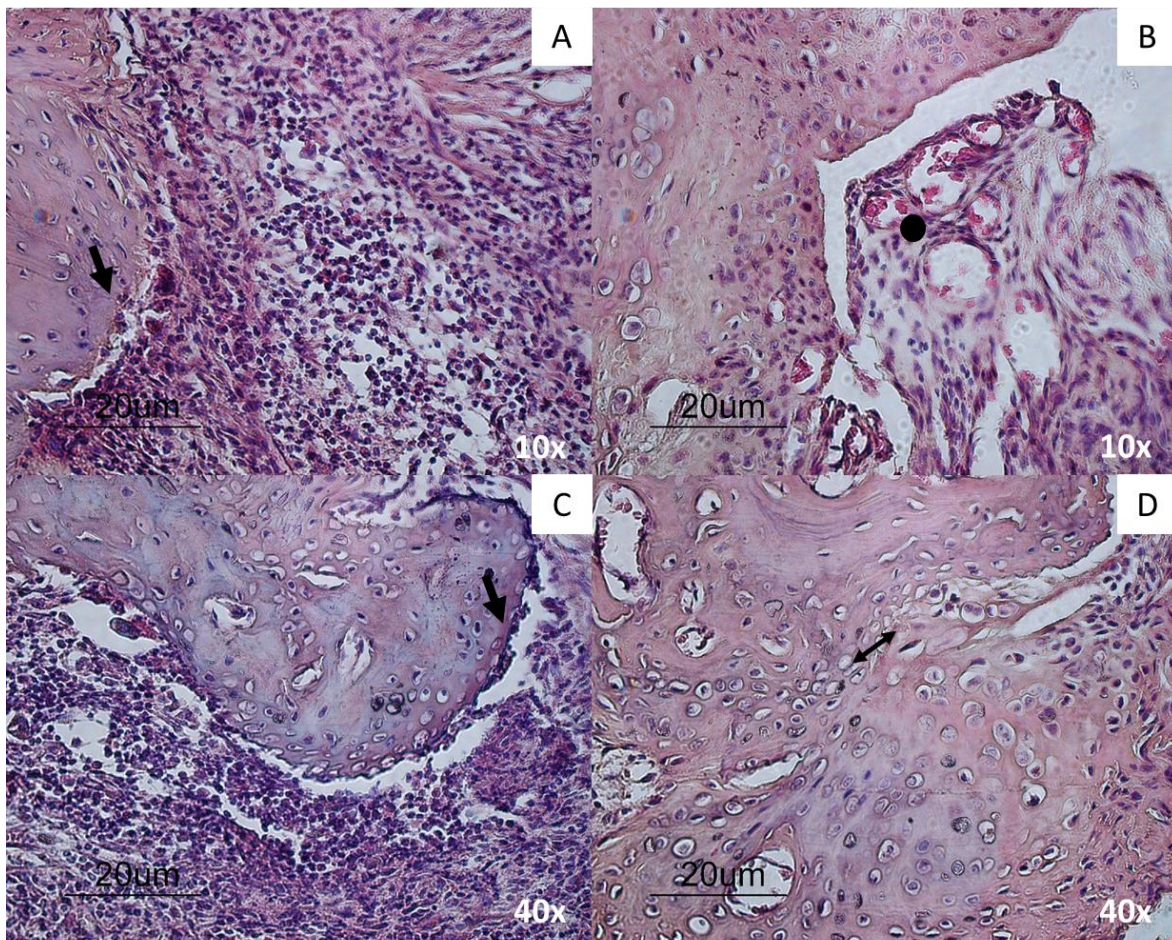


Figura 16. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA teñidos con HE. Fotografías de carpos y metacarpos de ratones con CIA donde se observa infiltrado inflamatorio, angiogénesis (B ●), anquilosis (D ↔) y erosión ósea (A y C →). Imágenes representativas de grupos de 4 ratones.

❖ Grupo Dexametasona

Muy similares a los ratones sanos se encuentran los tratados con Dexametasona donde no se observan cambios en la articulación (H) ni en la membrana sinovial (→) (Fig. 17)

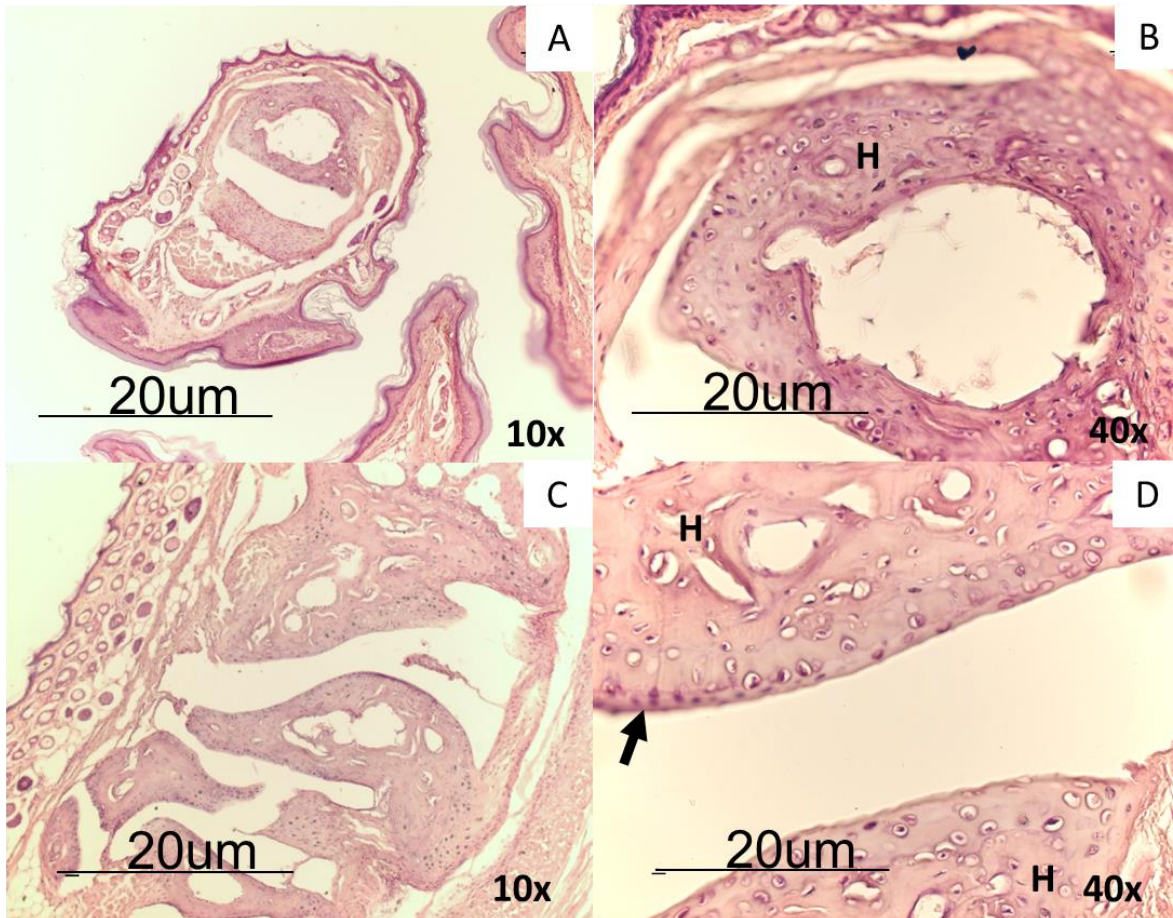


Figura 17. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con dexametasona teñidos con HE. Fotografías de falanges (A y B) y carpos (C y D) de ratones tratados con DEX donde no se observan alteraciones en articulación (H) ni en membrana sinovial (→). Imágenes, representativas de un grupo de 4 ratones.

❖ Grupo Ácidos Grasos

En los demás tratamientos también se encontraron alteraciones, sin embargo muchos menores que en los ratones con CIA que no recibieron tratamiento. En el caso de los ácidos grasos, no se encontró infiltrado inflamatorio sino más bien focos de reparación cartilaginosa (hiperplasia de los condrocitos ♦) y fibrosis reparativa (fibroblastos ◇) pero sin ningún infiltrado lo que indica que el tejido se encuentra en reparación, lo que si se observa son alteraciones en la membrana sinovial que no está adherida a la superficie del cartílago. Los ratones que recibieron el ω -3 (Fig. 18) se mantuvieron sin muchos cambios a excepción de focos de reparación tanto en los huesos del carpo como en falanges.

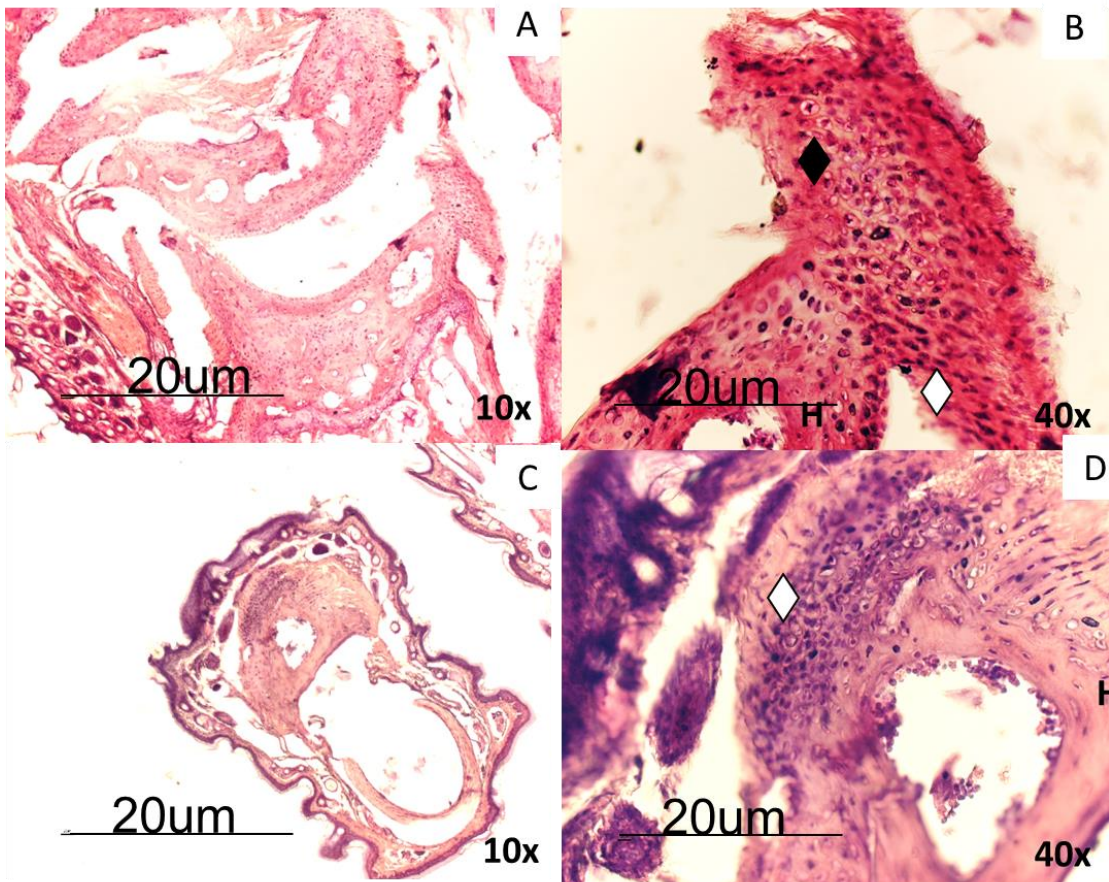


Figura 18. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con ω -3 teñidos con HE. Fotografías de carpos (A y B) y falanges (C y D) de ratones tratados con ω -3 donde se observan sitios de reparación y regeneración focales con fibroblastos (◇) y condrocitos (♦). Imagen representativa de un grupo de 4 ratones.

En los cortes histológicos de los ratones tratados con ω -6 solo se encontraron alteraciones en la membrana sinovial y algunos focos de reparación como la hiperplasia de condrocitos (\blacklozenge) y la presencia de fibroblastos (\diamond) (Fig. 19)

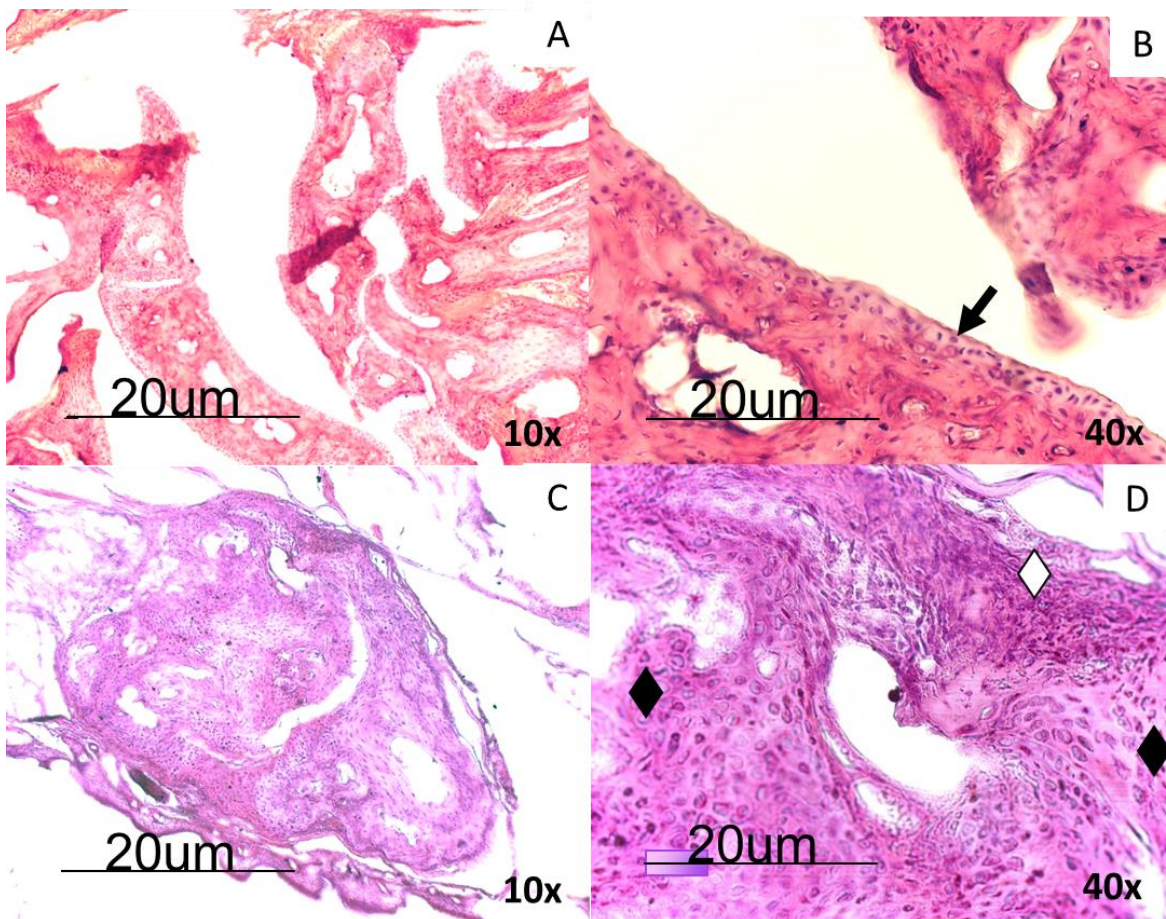


Figura 19. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con ω -6 teñidos con HE. Fotografías de carpos (A y B) y falanges (C y D) de ratones tratados con ω -6 donde se observan sitios de reparación y regeneración con hiperplasia de condrocitos (\blacklozenge) y fibroblastos (\diamond), la membrana sinovial (\rightarrow) no se encuentra alterada en el panel superior. Imagen representativa de un grupo de 4 ratones.

El ácido graso ω -9 también mostro efectos anti-inflamatorios a nivel histológico pues se observan signos de reparación y la integridad de la articulación no se ve alterada (Fig. 20)

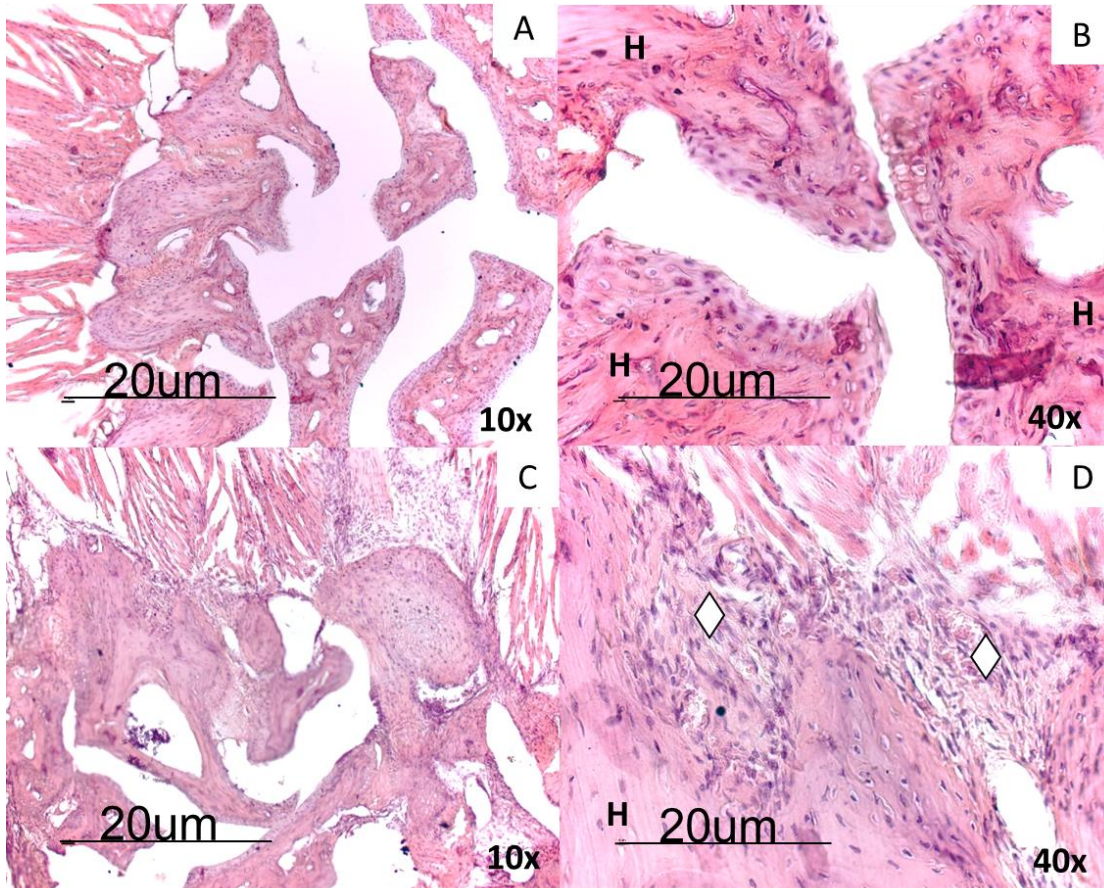


Figura 20. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con ω -9 teñidos con HE. Fotografías de metacarpos de ratones tratados con ω -9 donde se observan sitios de reparación y regeneración focales (\diamond) sin daño aparente en el hueso y el cartílago (H). Imagen representativa de un grupo de 4 ratones.

❖ Grupo EDLs

En cuanto a los ratones que fueron tratados con los EDLs a excepción del EDLNE 0.1U en el que no se encontraron alteraciones, con el EDL específico se observan diferentes grados de infiltrado y un mayor daño. La figura 21 muestra los cortes de los ratones tratados con el EDL específico a la mayor dosis donde se muestran ligeros focos de infiltrado inflamatorio y signos de reparación. Es importante destacar que las alteraciones solo se encuentran en la articulación y no en los tejidos blandos.

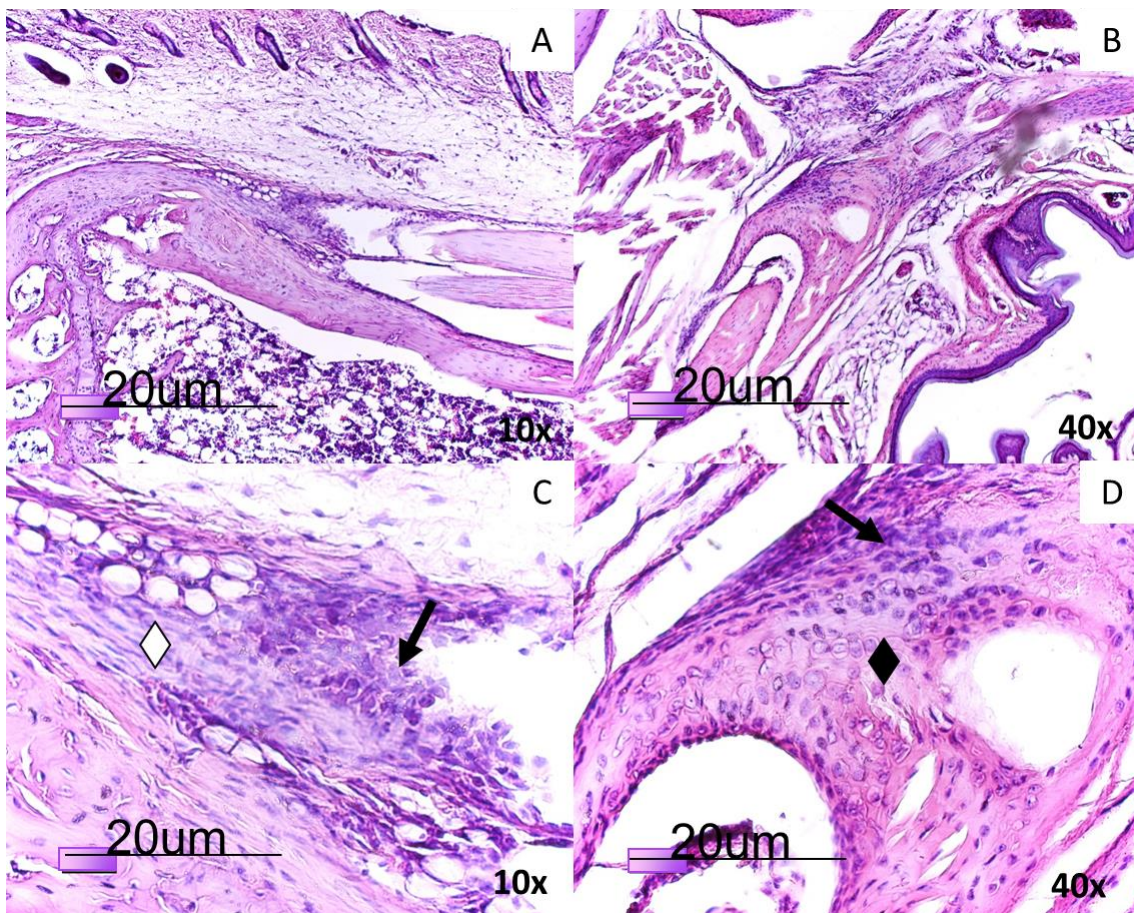


Figura 21. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL-E 1U teñidos con HE. Fotografías de metacarpos de ratones tratados con EDL- E1U donde se observan sitios de reparación y regeneración con hiperproliferación de condrocitos (◆) y fibroblastos (◊), así como infiltrado focalizado (→). Imagen representativa de un grupo de 4 ratones.

El mismo extracto específico a una menor dosis permitió más alteraciones ya que existe un infiltrado inflamatorio considerable rodeando la articulación que está dañando el hueso y el cartílago (→), al igual que en los ratones con CIA, aunque el infiltrado es menor (Fig. 22).

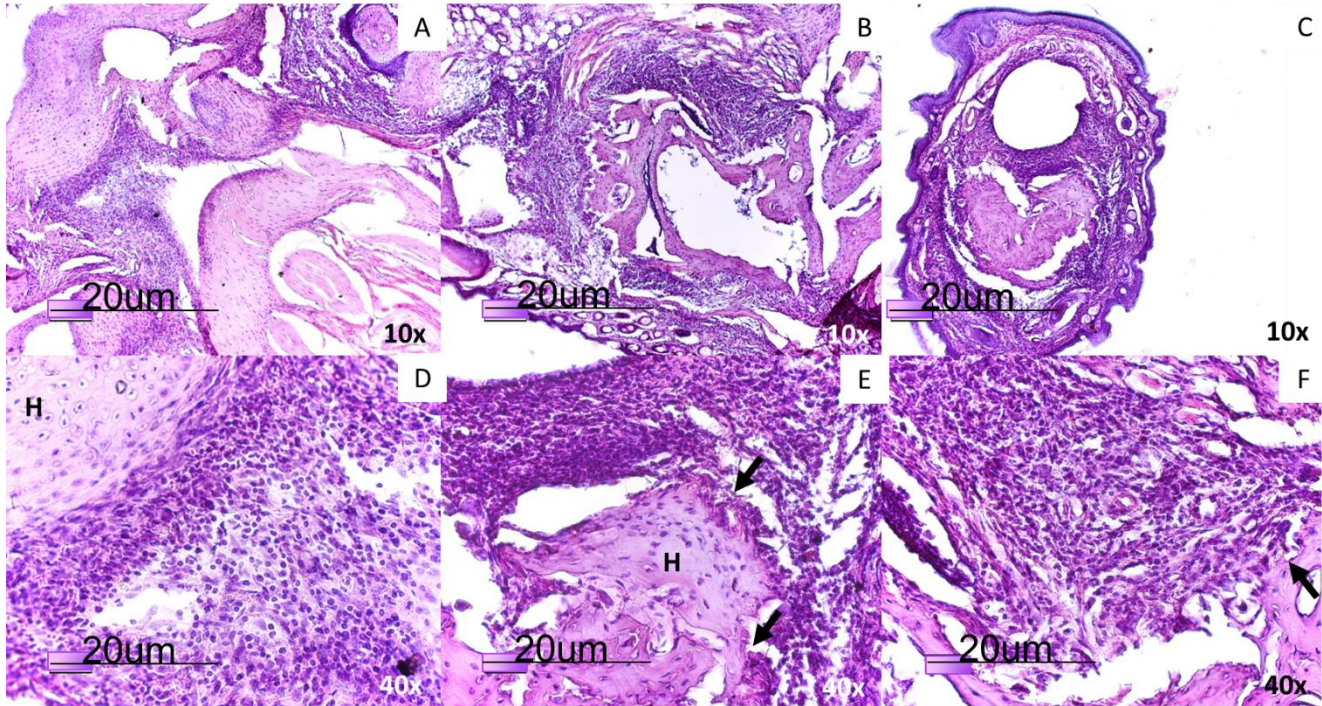


Figura 22. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL-E 0.1U teñidos con HE. Fotografías de metacarpos de ratones tratados con EDL-E 0.1U donde se observa un infiltrado inflamatorio mononuclear rodeando y dañando (→) la articulación (H) Imagen representativa de un grupo de 4 ratones.

Los resultados con el extracto no específico fueron mejores ya que a la dosis más alta se observan signos de reparación pero no infiltrado inflamatorio (Fig. 23).

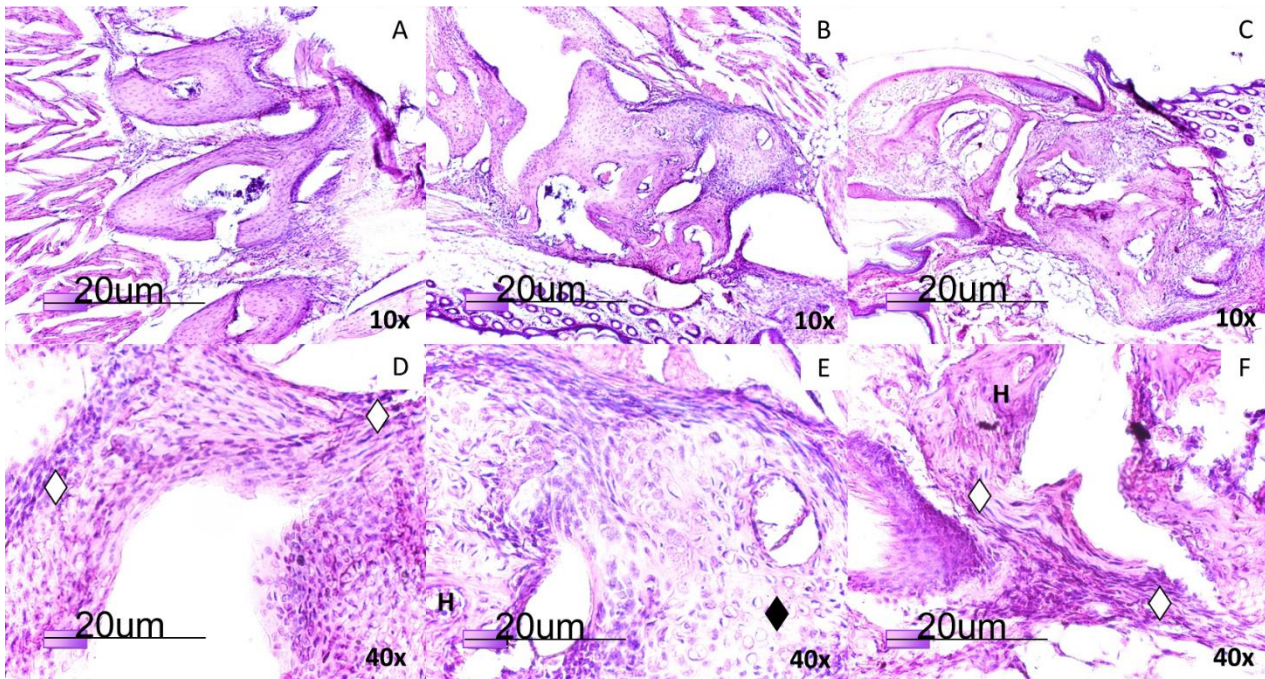


Figura 23. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDLNE 1U teñidos con HE. Fotografías de metacarpos de ratones tratados con EDLNE 1U donde se observan sitios de reparación y regeneración con hiperproliferación de condrocitos (◆) y fibroblastos (◇). Imagen representativa de un grupo de 4 ratones.

El tratamiento que tuvo los mejores resultados fue el EDLNE a la dosis más baja de 0.1 U en la siguiente figura se observan las articulaciones totalmente integras, el hueso y el cartílago no están dañados e incluso se observa la membrana sinovial rodeando de manera normal al cartílago (→) (Fig. 24).

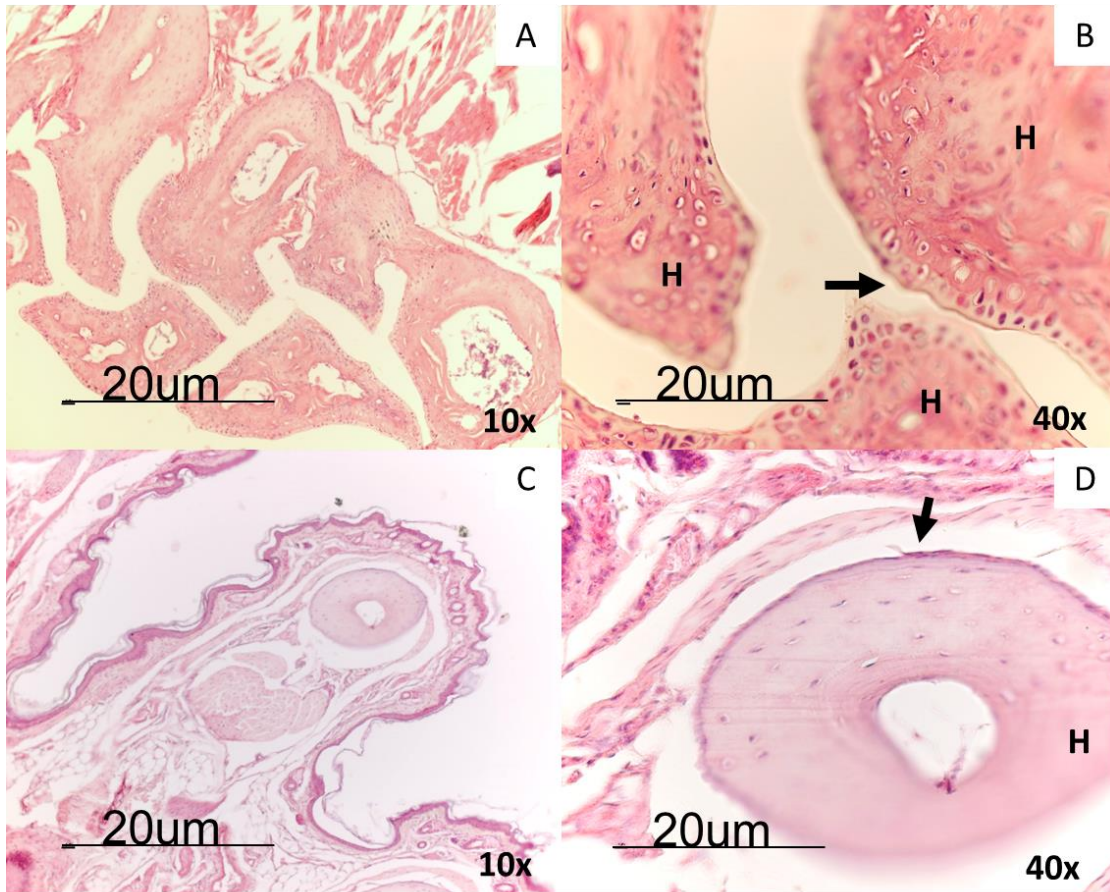


Figura 24. Cortes Histológicos de las de patas delanteras de ratones CIA tratados con EDLNE 0.1 U teñidos con H-E. Fotografías de metacarpos (A y B) y falanges (C y D) donde no se observan alteraciones en el hueso (H) o la membrana sinovial (→). Imágenes representativas de un grupo de 4 ratones.

Es claro el efecto anti-inflamatorio de los tratamientos a nivel histológico ya que a pesar de haber alteraciones estas se encuentran muy por debajo de las encontradas en los ratones sin tratamiento. Los hallazgos histológicos correlacionan con los encontrados a nivel clínico.

Los cortes teñidos por la técnica de Masson nos permite evaluar el estado del cartílago y la colágena en formación. En la mayoría de los tratamientos no se encontraron alteraciones en cuanto a la estructura del hueso y cartílago, y tampoco en la formación de colágena de reparación. En la figura 25 se muestra el hueso maduro en color rojo, mientras que el hueso en formación en la parte más superficial de la articulación tiende a ser más azul con esta tinción.

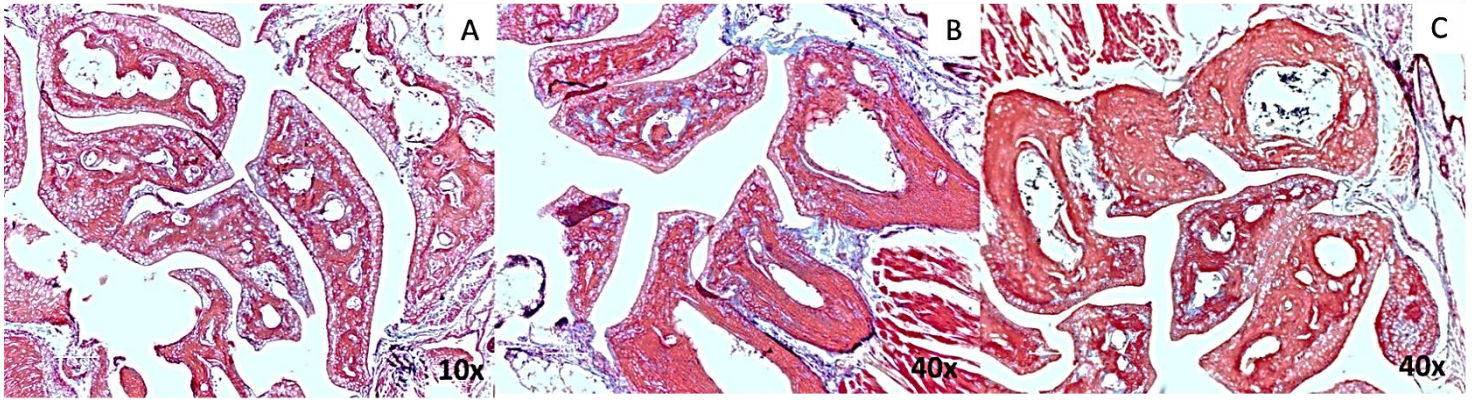


Figura 25. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 teñidos con Masson. Fotografías representativas de ratones que no presentaron alteraciones. A, ratones sanos, B, ratones CIA-DEX y C. ratones CIA-EDLNE 0.1 U.

Los ratones con CIA que no recibieron ningún tratamiento sí presentan alteraciones en el hueso y la articulación. Se observa en la figura 26 que es abundante la formación de hueso nuevo, probablemente debido a la cantidad de daño en el mismo, se puede también observar la anquilosis (→) en los paneles A y B, así como la formación de fibras de colágena (◆) y de angiogénesis (●) en los paneles inferiores.

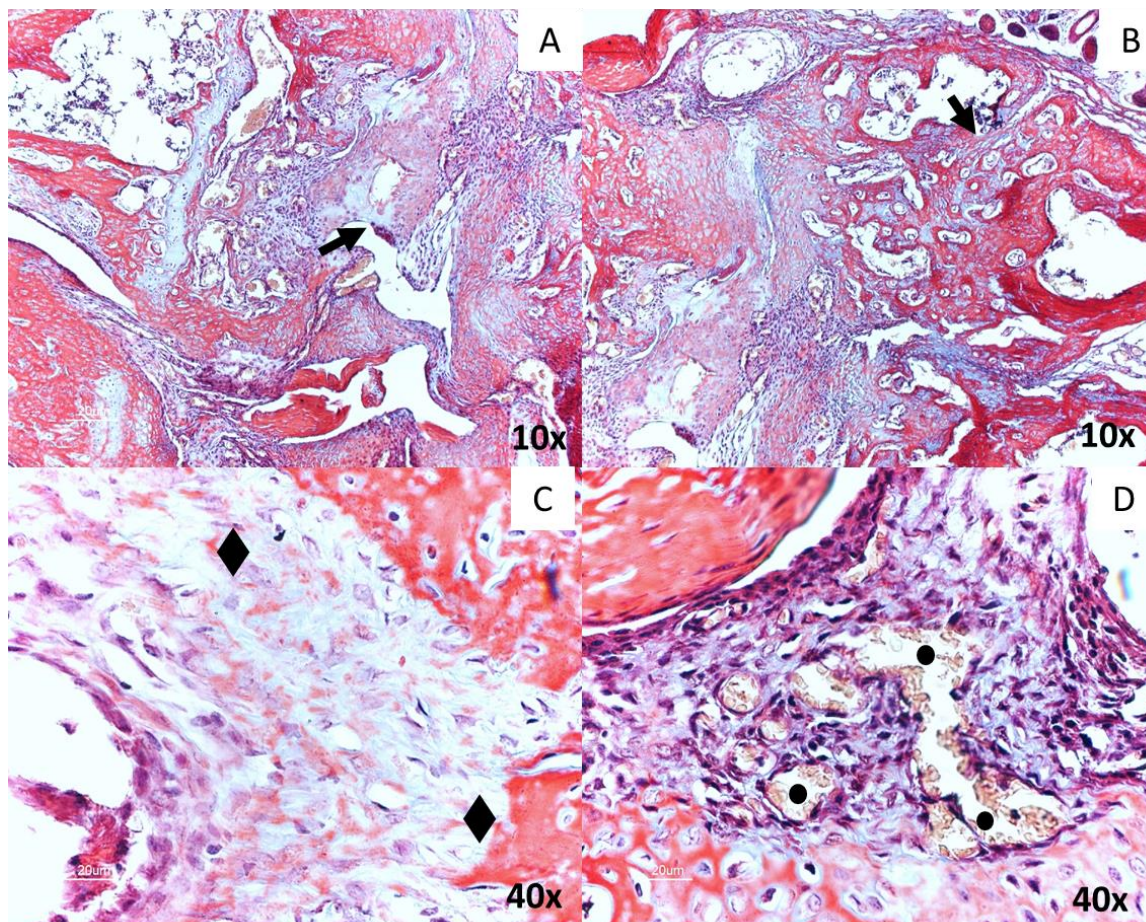


Figura 26. Cortes Histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA teñidas con Masson. Fotografías representativas de metacarpos de ratones que presentaron las mayores alteraciones, A y B anquilosis (→), C fibras de colágena en neof ormación (◆) y D angiogénesis (●).

La interpretación de los cambios histológicos en las articulaciones de los ratones de cada grupo fue realizada por dos patólogos que no conocían el tratamiento de cada grupo. Los parámetros evaluados se concentran en la Tabla 4. La intensidad de los cambios se valoró con cruces, desde ningún cambio (-) hasta cambios drásticos (++++).

Tabla 4. Parámetros evaluados en los cortes histológicos de las patas delanteras de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos. Se muestra la evaluación de cada patólogo así como el promedio de daño óseo y la fibrosis reparativa (cruces).

Grupo	Infiltrado Inflamatorio		Hiperplasia Sinovial		Degeneración Articular		Promedio de Daño óseo		Fibrosis Reparativa	
Sanos	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0	0
CIA	4	3	1	3	4	1	3.00	2.33	0	0
Dexa	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0	1
ω -3	0	0	1	1	0	0	0.33	0.33	3	2
ω -6	0	1	1	1	0	0	0.33	0.67	4	0
ω -9	0	1	1	1	0	0	0.33	0.67	4	0
EDL E 1U	1	0	2	0	0	0	1.00	0.00	0	0
EDL E 0.1U	3	2	0	3	1	2	1.33	2.33	2	2
EDL NE 1U	1	1	1	1	1	0	1.00	0.67	2	1
EDL NE 0.1U	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0	1

La figura 27 representa la media del grado de daño óseo calculado como el promedio del Infiltrado inflamatorio, hiperplasia sinovial y degeneración articular, y de reparación o regeneración para los animales tratados con los omegas (A y C) y los EDLs (B y C). Es notorio que a pesar de que con la mayoría de los tratamientos se presenta daño, también hay reparación del tejido marcada como fibrosis regenerativa.

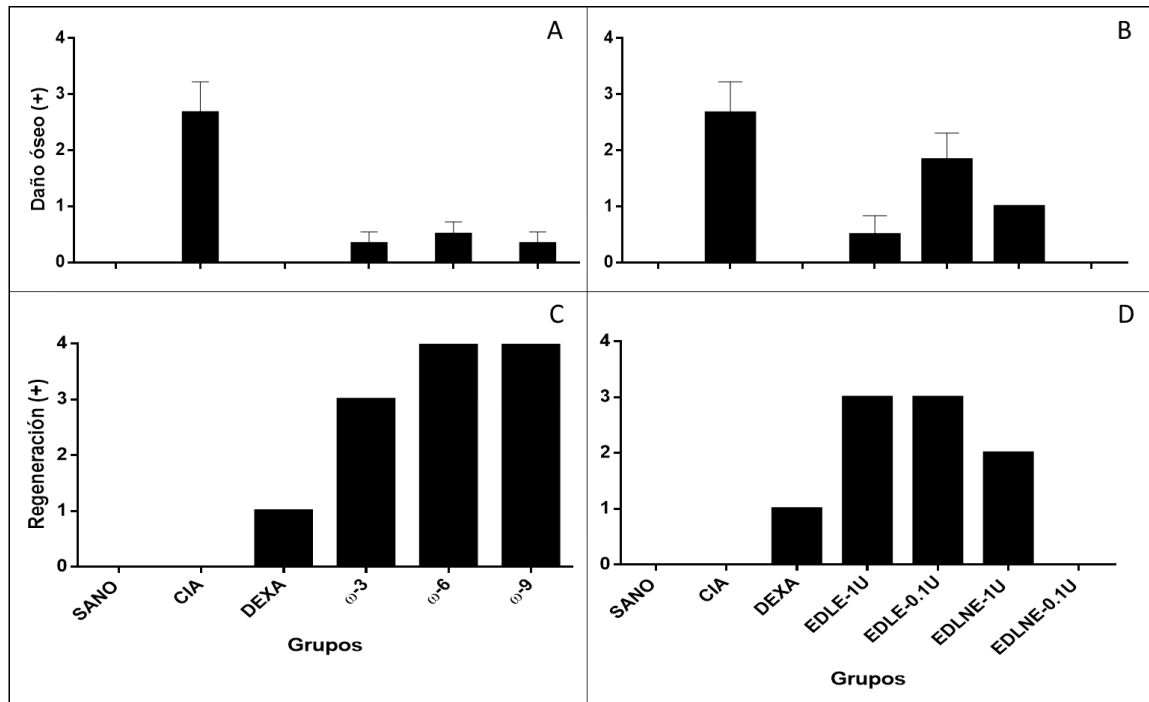


Figura 27. Promedio de Daño Óseo y Regeneración en cortes histológicos de las articulaciones de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos.

Para apreciar mejor los cambios observados en los cortes histológicos se analizaron las imágenes con el programa ImageJ para cuantificar el área del infiltrado inflamatorio (densidad de píxeles), a partir del análisis se obtuvieron las siguientes gráficas (Fig. 28) donde es claro que la mayoría de los tratamientos redujeron considerablemente el infiltrado inflamatorio en comparación con los animales no tratados (CIA).

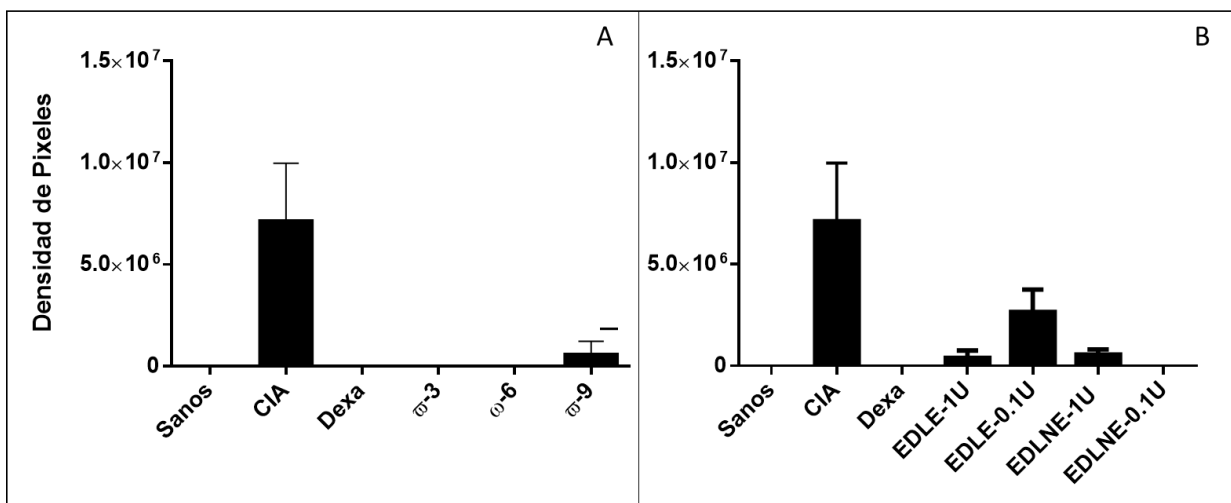


Figura 28. Área de infiltrado inflamatorio definida por la intensidad de pixeles obtenida por análisis en Image J de los ratones control y los ratones CIA tratados con los diferentes ácidos omega y EDLs

3. Proliferación de Esplenocitos

Al final del tiempo de tratamiento con los ácidos omega y con los EDLs, los animales se sacrificaron y de ellos se obtuvieron sus bazo. De los bazo se obtuvieron los esplenocitos y se cultivaron por 72 horas sin estímulo (SE), con Concanavalina A, o con CII. El grado de proliferación se midió utilizando los ensayos de reducción del alamar azul y del MTT. Las gráficas siguientes (Fig. 29) representan los valores de proliferación normalizados con respecto al cultivo SE para cada ratón, se puede observar que la proliferación de las células estimuladas con Concanavalina A (control positivo) mostró la mayor proliferación. La proliferación en respuesta a la CII se vio disminuida con casi todos los tratamientos pero se observó aún más disminuida en los ratones tratados con los EDLs (Fig. 30), se realizó la prueba estadística de ANOVA de una vía resultando significativa con un valor de $p < 0.0206$ (*) y con la comparación múltiple de Tukey solo los ratones tratados con Dexa son estadísticamente significativo con respecto a los no tratados

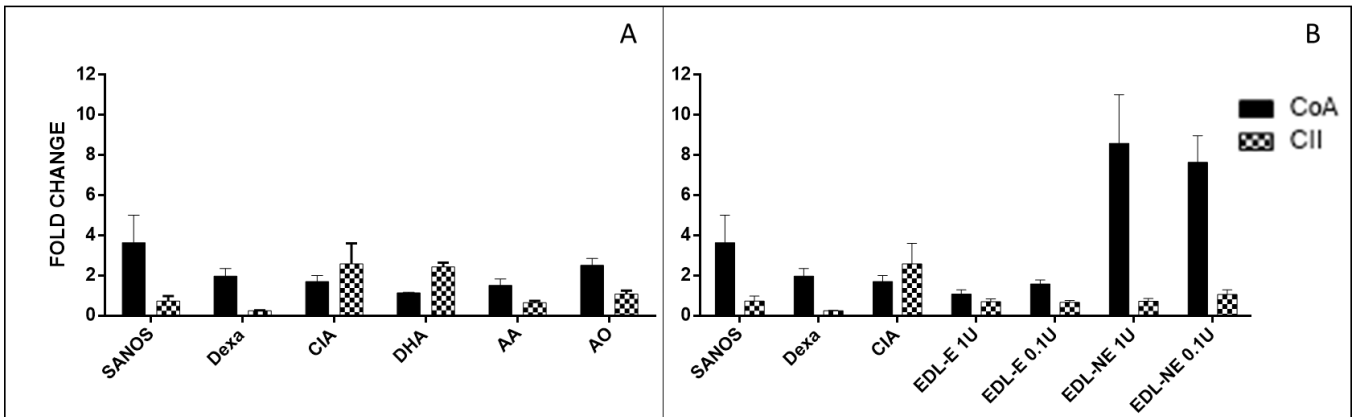


Figura 29. Proliferación de esplenocitos de los diferentes grupos estimulados con Concanavalina A y CII. Triplicados de 4 ratones por grupo.

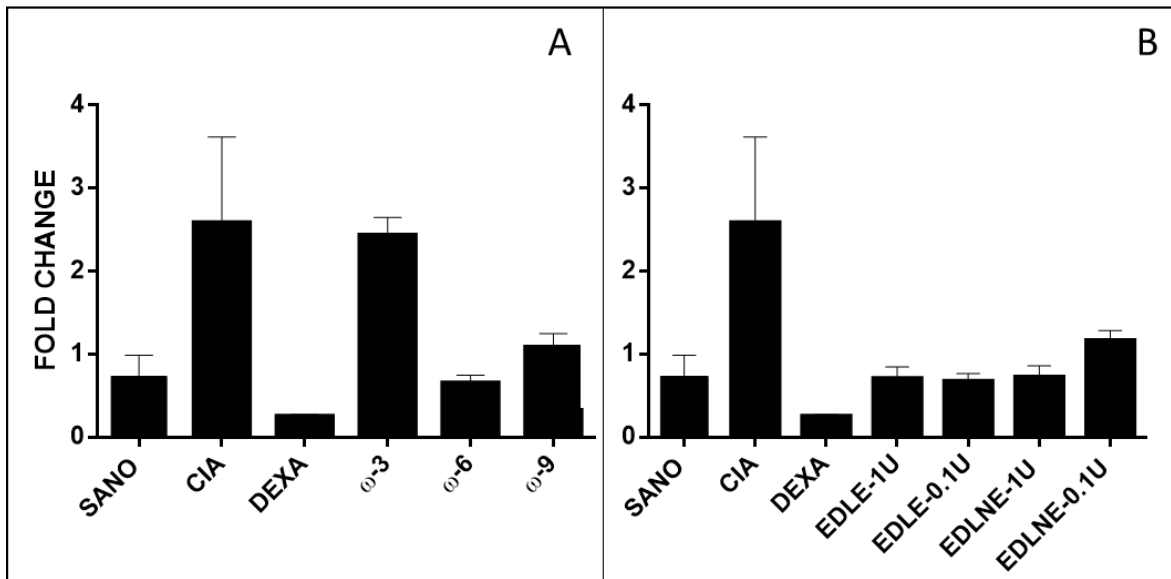


Figura 30. Disminución de la proliferación de esplenocitos de los diferentes grupos estimulados con CII en comparación con los ratones con CIA.

4. Medición de Anticuerpos contra CII

Se analizaron los sueros obtenidos tras el sacrificio de los ratones DBA-1 de los 10 grupos de tratamiento con el fin de medir anticuerpos contra CII. Como se observa en la gráfica a continuación (Fig. 31) todos los ratones inmunizados presentaron anticuerpos anti CII, con diferencia significativa ($p < 0.05$ *) con respecto a los no tratados en el caso del ω -6 y los EDLs a la menor dosis de 0.1 U.

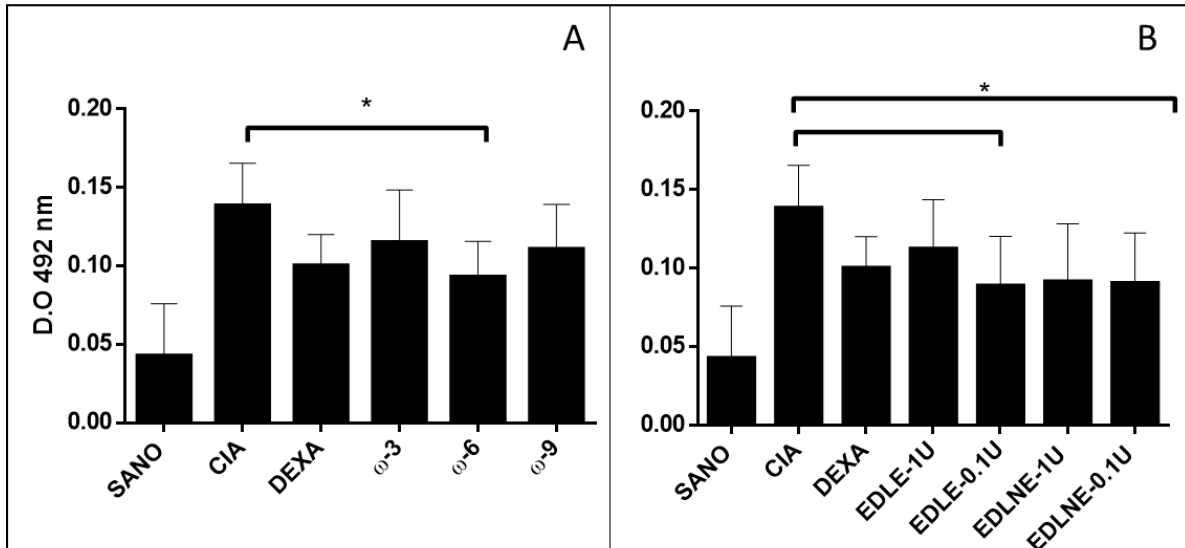


Figura 31. Anticuerpos contra CII en ratones DBA-1. Anticuerpos medidos por ELISA en el suero de los ratones sometidos a diferentes tratamientos. Resultados analizados por un ANOVA de una vía donde $p < 0.05$ (*)

5. Inflamasoma

Para evidenciar la presencia de las proteínas relacionadas con el factor de transcripción NFκB y el inflamasoma NLRP3 se realizó la técnica de inmunofluorescencia en cortes histológicos con anticuerpos marcados con fluorocromos que posteriormente se analizaron en un microscopio confocal. Es muy evidente que ambas moléculas se encuentran disminuidas en comparación con los ratones sin tratamiento (CIA). En la figura 32 se observan los cortes de ratones sanos donde no se aprecia marca para NFκB, solo se observan los núcleos de los diferentes tejidos teñidos con Hoescht.

❖ Expresión de NFκB en Cortes Histológicos

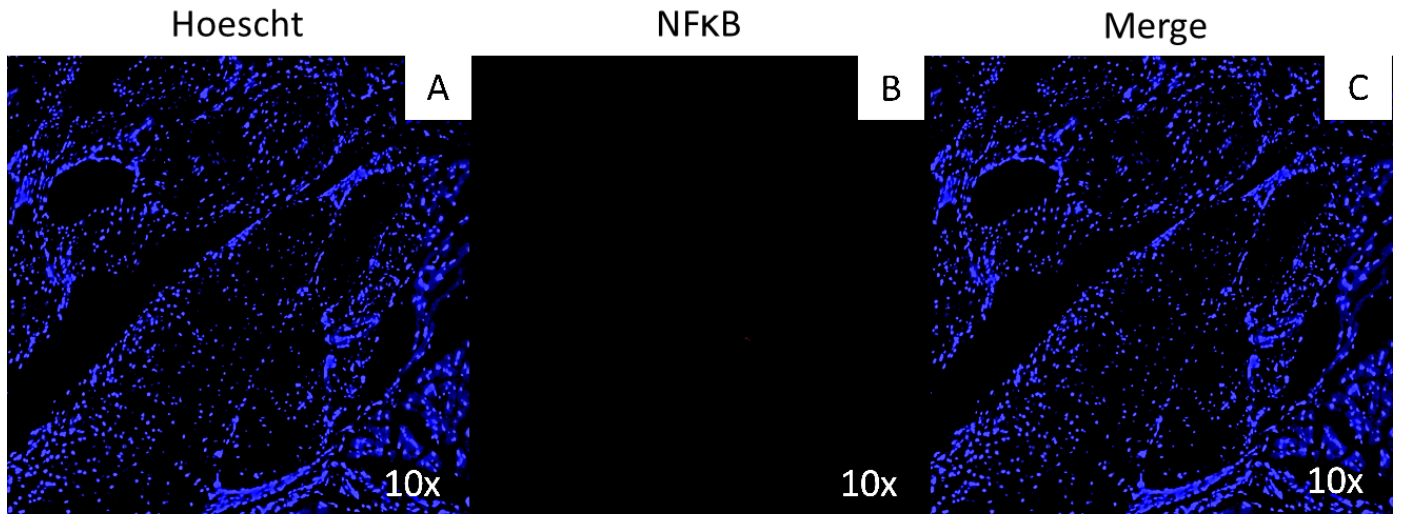


Figura 32. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones DBA-1 Sanos. Imágenes representativas de 4 ratones.

Los ratones con CIA presentan la expresión de NFκB en el infiltrado inflamatorio que rodea la articulación. (Fig. 33). A un mayor aumento, paneles inferiores, se logra identificar más fácilmente la marca de NFκB en el infiltrado.

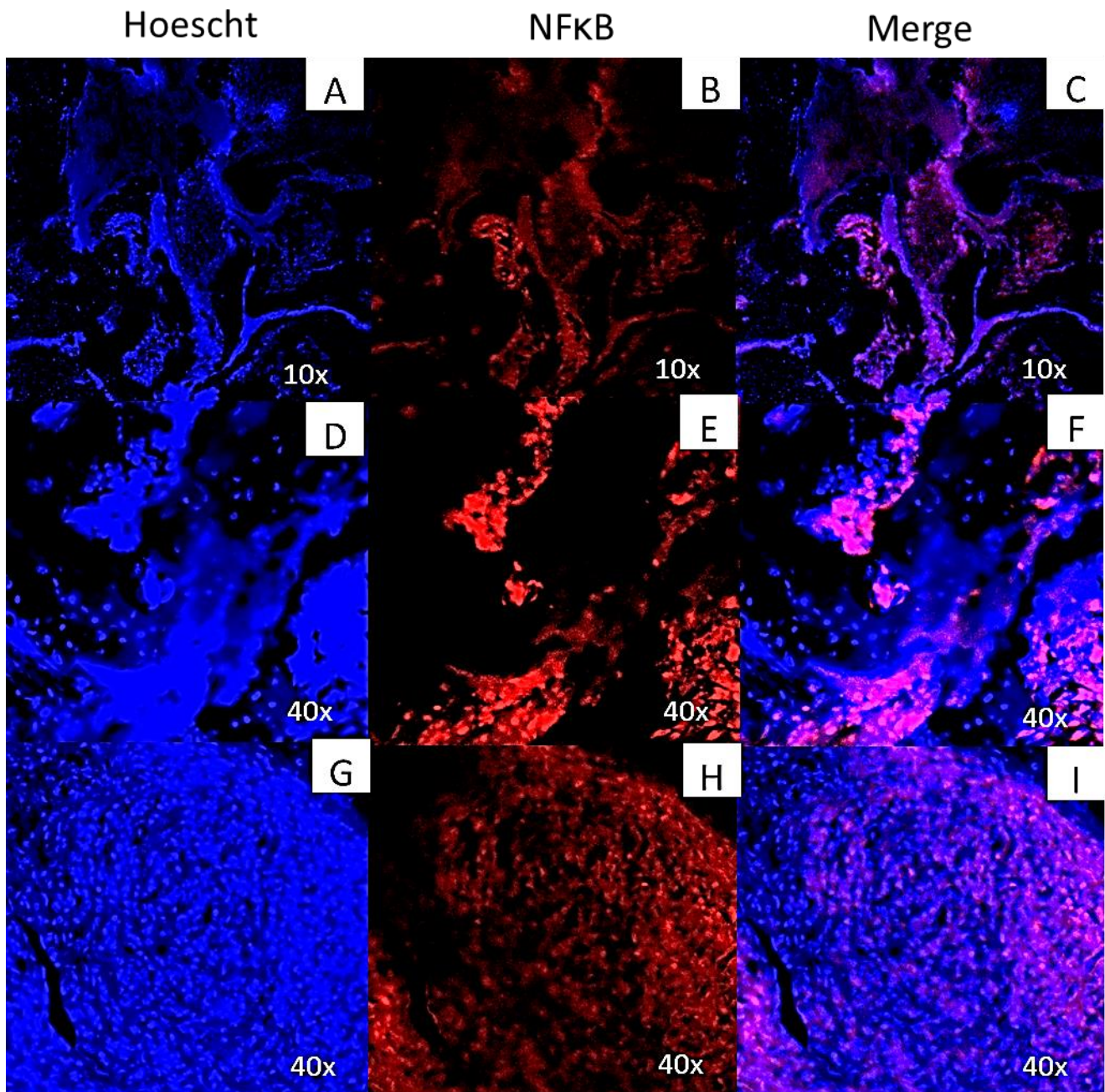


Figura 33. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA. Imágenes de cortes teñidos para NFκB de ratones con CIA representativas de 4 ratones.

❖ Grupo Ácidos grasos

Cuando los ratones son tratados con los ácidos grasos se observa disminuida la expresión de NFκB y solo se puede apreciar el tejido articular en el corte (Fig. 34).

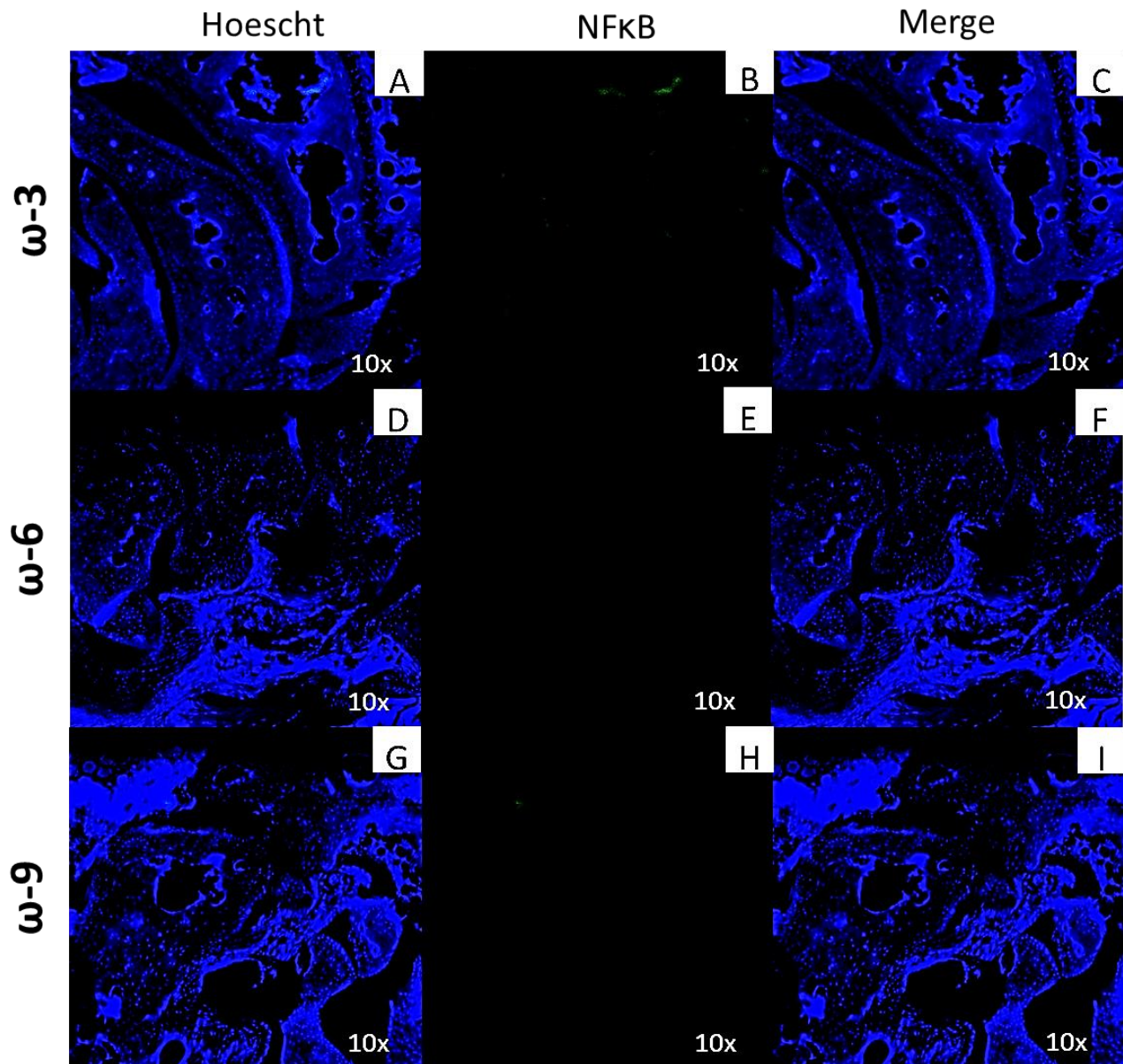


Figura 34. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones DBA-1 tratados con ácidos grasos Omega. Imágenes representativas de cortes teñidos para NFκB de ratones tratados con ω-3, ω-6 y ω-9.

❖ Grupo EDLs

El tratamiento con los EDLs también disminuyó la expresión de NFκB en comparación con los ratones CIA, es más evidente la disminución en le EDL-E a 1U (Fig. 35) y en el EDLNE a 0.1 U (Fig. 36).

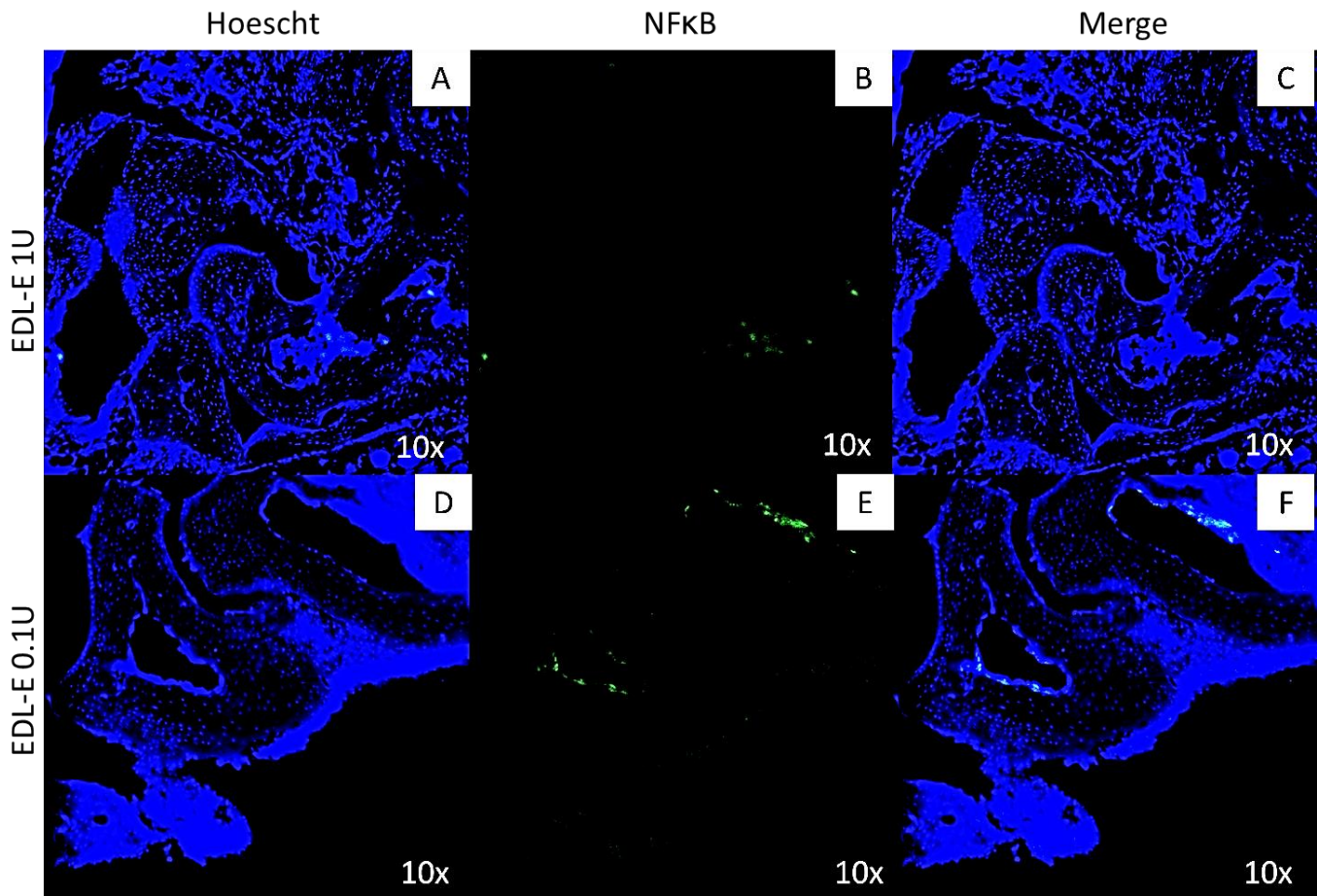


Figura 35. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL específicos. Imágenes representativas de cortes teñidos para NFκB de ratones tratados con EDL-E a 1 y 0.1U.

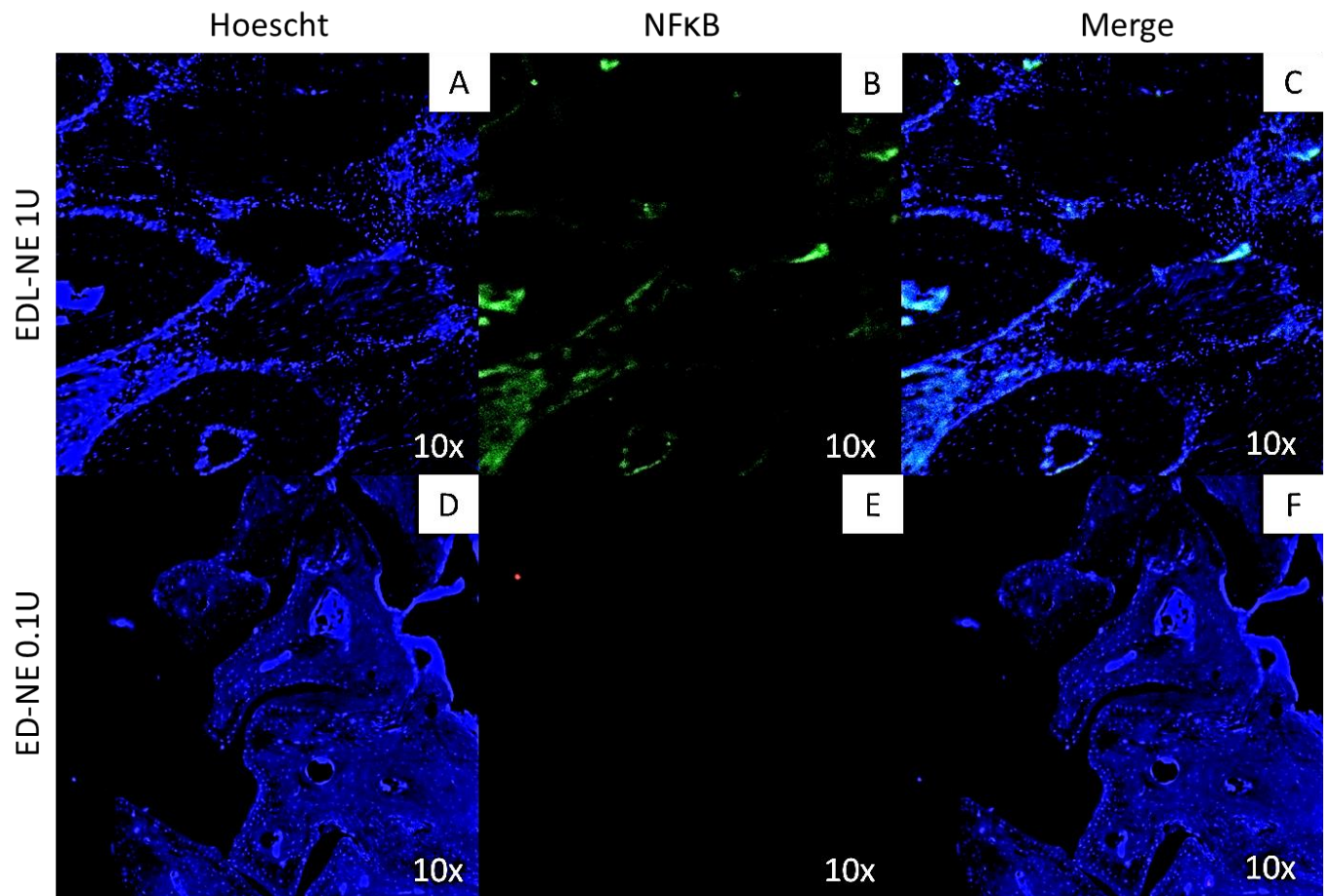


Figura 36. Inmunofluorescencia para NFκB en las patas delanteras de CIA tratados con EDL no específico a las dosis de 1.0 y 0.1 U. Imágenes representativas de cortes de 4 animales por grupo

❖ Expresión de NLRP3 en cortes Histológicos

Para evidenciar la activación del Inflamasoma NLRP3 se buscó la expresión del receptor NLR3 en los cortes histológicos de los diferentes grupos obteniendo resultados similares a la expresión de NFκB. En los sanos no se encontró marca para el receptor (Fig. 37) mientras que en los que no recibieron tratamiento (CIA) se encontró expresado el receptor en el infiltrado inflamatorio (Fig. 38).

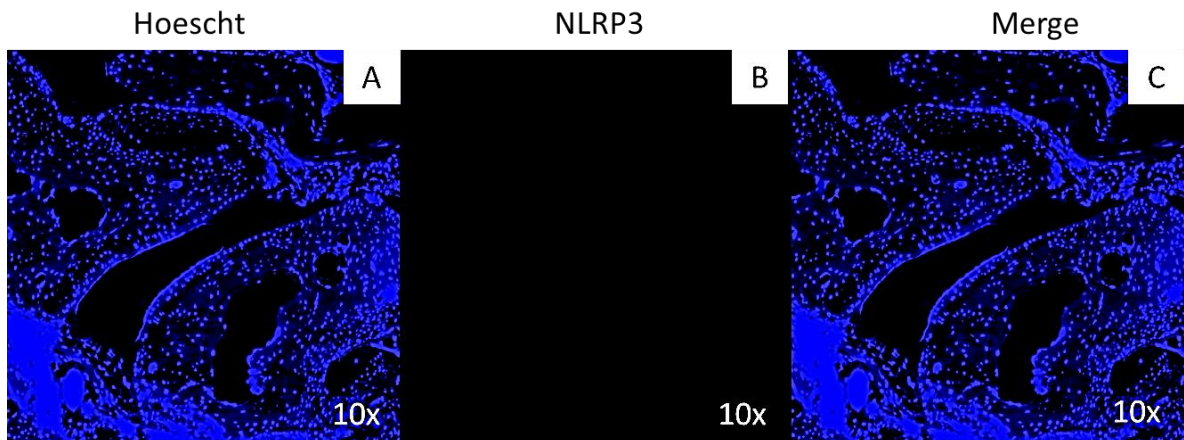


Figura 37. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones DBA-1 sanos. Imágenes de cortes teñidos para NFκB de ratones sanos, representativas de 4 ratones.

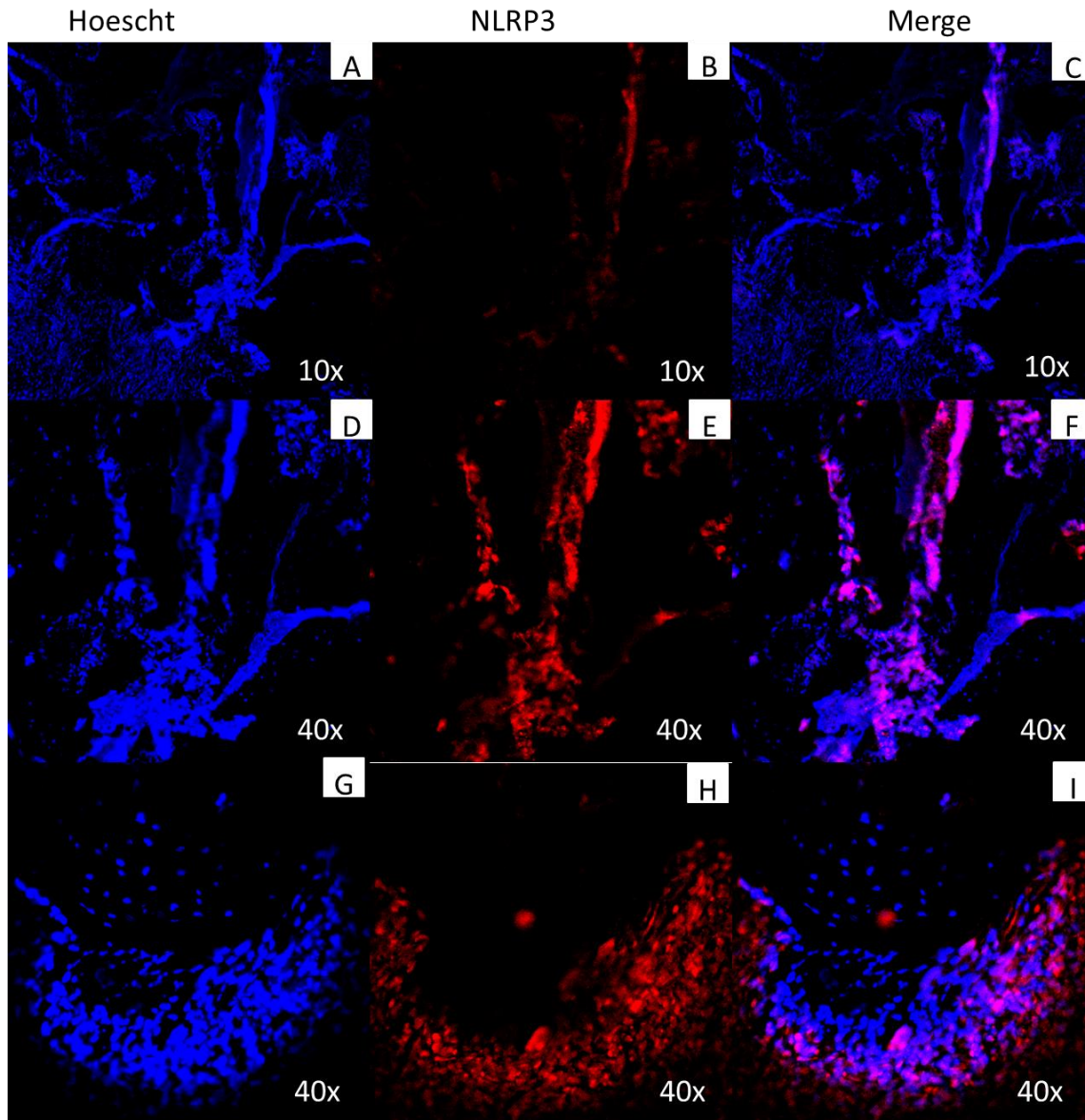


Figura 38. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones DBA-1 con CIA. Imágenes de cortes teñidos para NLRP3 de ratones con CIA a 10 x (A, B y C) y 40 x (D-I), Resultado representativo de 4 ratones.

❖ Grupos Ácidos Grasos y EDLs

Lo ratones que recibieron los tratamientos con omegas y EDLs no presentan la expresión del receptor NLRP3 a niveles comparables con los ratones CIA sin tratamiento. Las figuras 39, 40 y 41 muestran el caso de los ratones que mostraron la mayor expresión dentro de cada grupo de tratamiento.

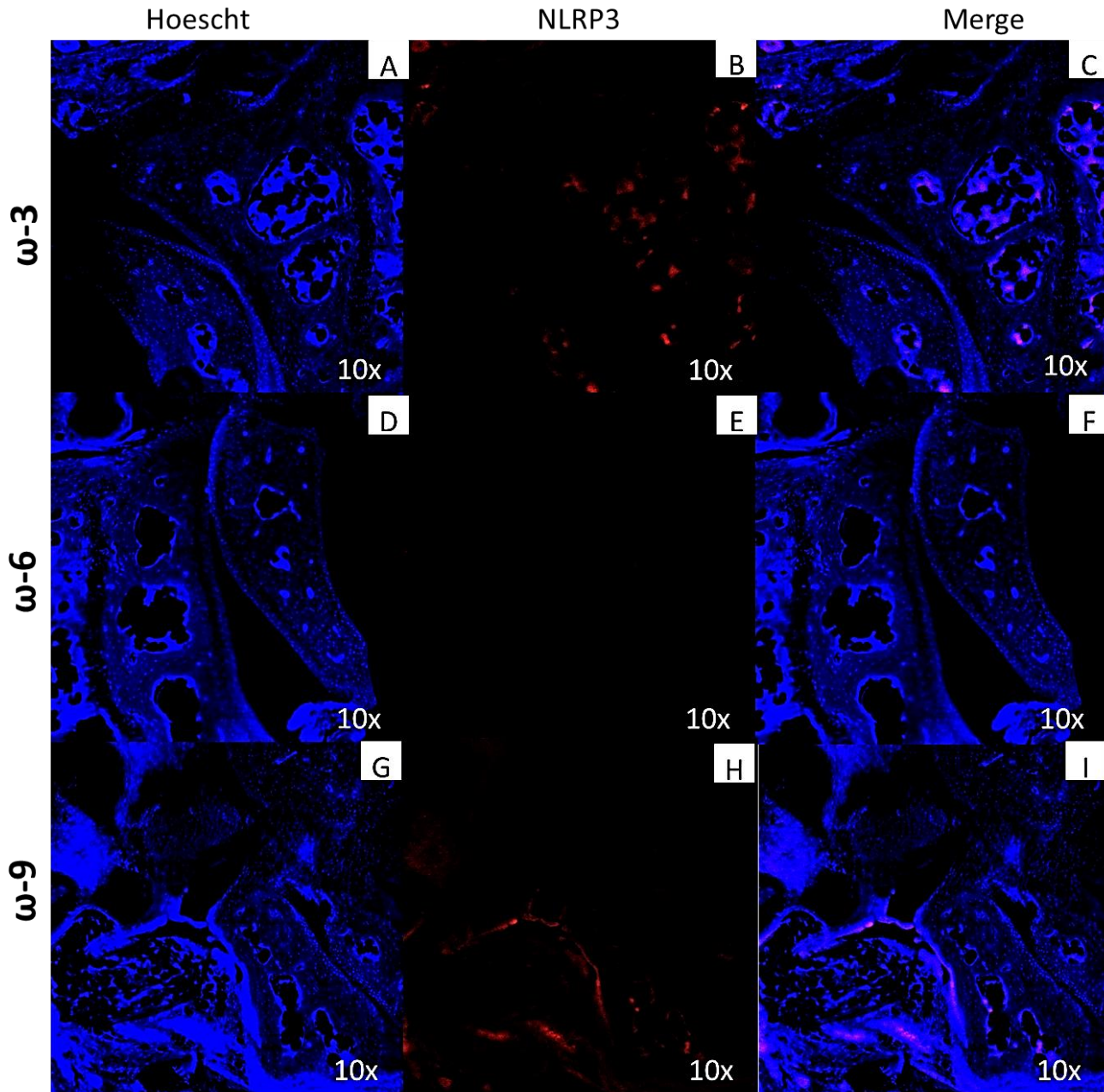


Figura 39. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones CIA tratados con ácidos grasos omega. Imágenes correspondientes al ratón de cada grupo que mostró la mayor expresión de NLRP3.

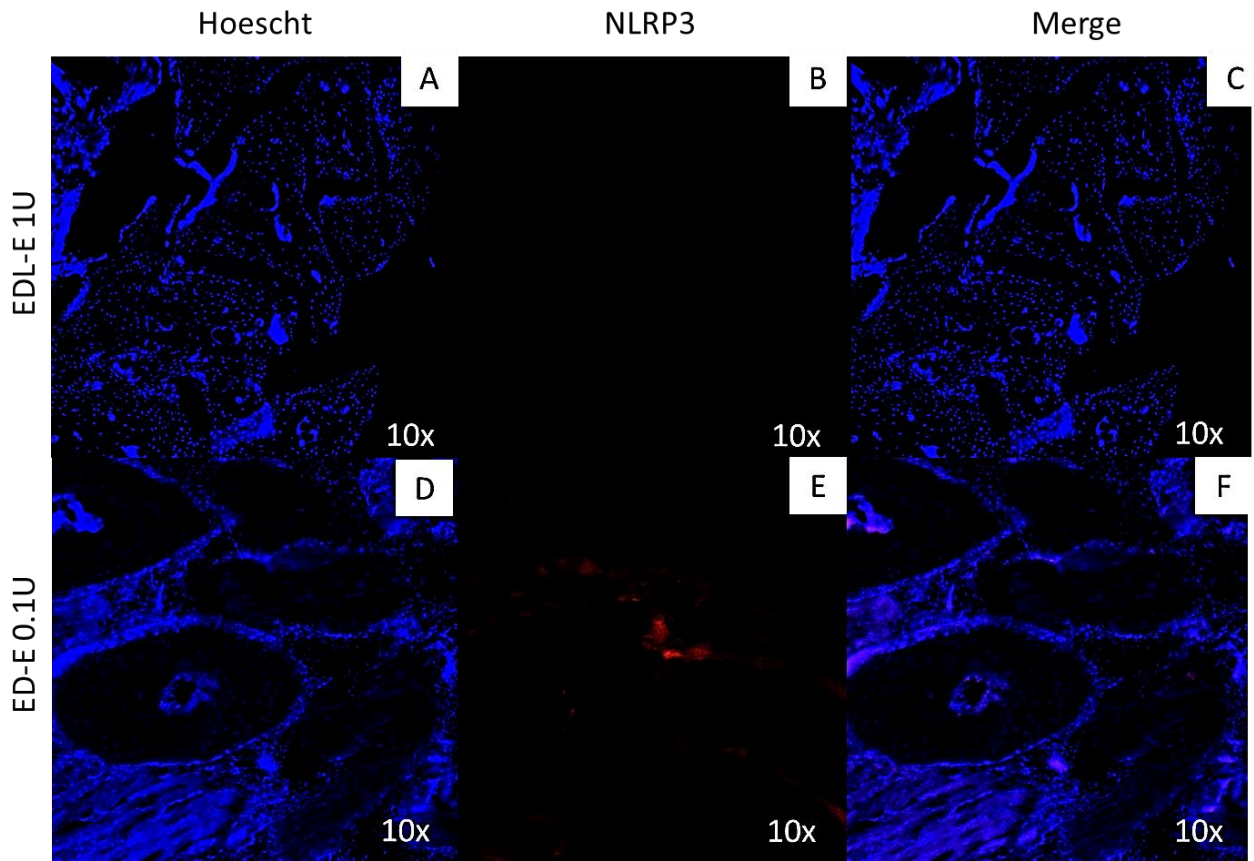


Figura 40. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL-E. Las imágenes corresponden al ratón de cada grupo que mostró la mayor expresión de NLRP3.

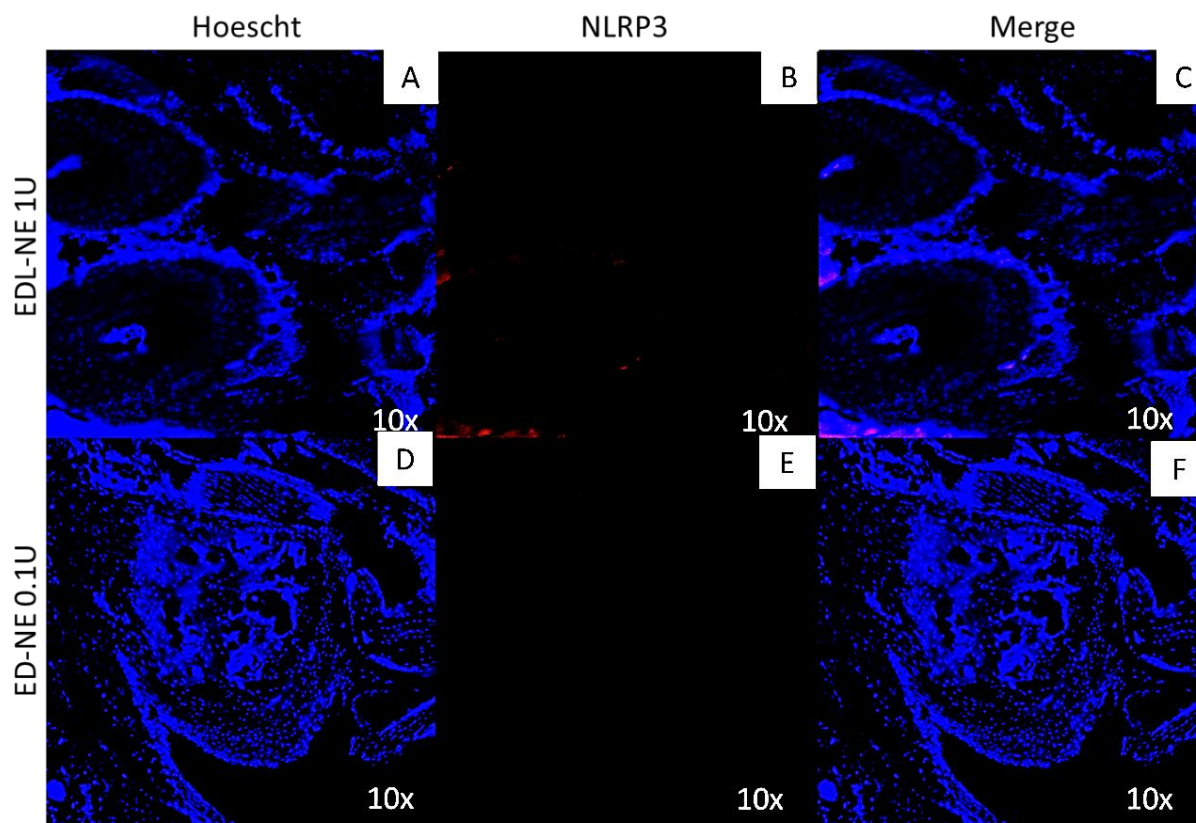


Figura 41. Inmunofluorescencia para NLRP3 en las patas delanteras de ratones CIA tratados con EDL no específico a las dosis de 1.0 y 0.1U. Las imágenes corresponden al ratón de cada grupo que mostró la mayor expresión de NLRP3

Nuevamente se utilizó el programa ImageJ para cuantificar la densidad en pixeles de la expresión de NLRP3 y NFκB. Se observa que su expresión es mucho menor en los ratones CIA tratados con omegas y EDLs que en los no tratados. Es más evidente la disminución en la expresión para el caso de NLRP3 (Fig. 42) que para NFκB (Fig. 43).

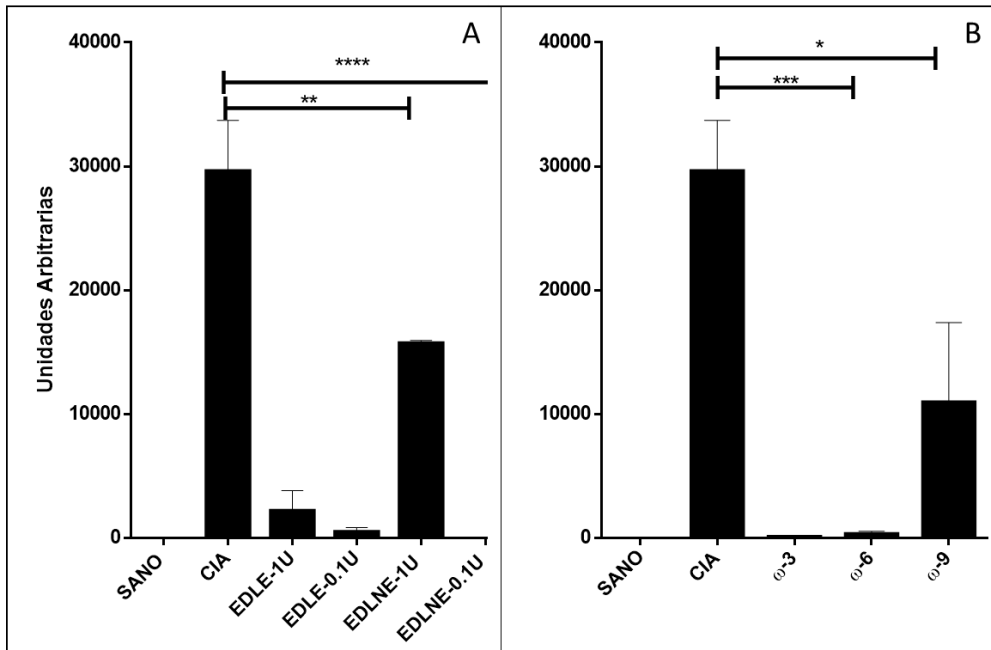


Figura 42. Expresión de NLRP3 en cortes histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos. Medición del área en pixeles de la marca positiva para NLRP3 en ratones tratados con omegas (A) y EDLs (B).

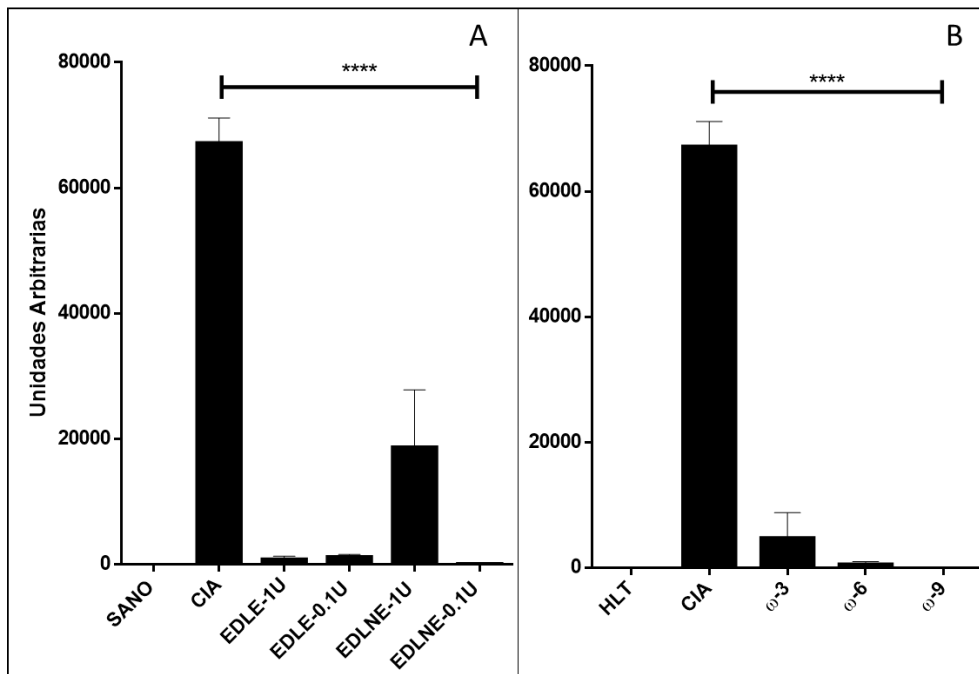


Figura 43. Expresión de NFκB en cortes histológicos de patas delanteras de ratones DBA-1 bajo diferentes tratamientos. Medición del área en pixeles de la marca positiva para NFκB en ratones tratados con omegas (A) y EDLs (B). Los asteriscos señalan diferencias significativas, $p < 0.001$, entre el grupo CIA sin tratamiento y los grupos tratados en general.

DISCUSIÓN

Utilizando el modelo de la artritis inducida por colágena (CII) en el ratón DBA-1, se analizó el efecto anti-inflamatorio de los ácidos omega 3, 6 y 9, y de extractos dializables de leucocitos, específico y no específico. Una vez inmunizados los ratones con la CII se inició el tratamiento. Se procedió a evaluar el estado general de los animales registrando su peso, su actividad motriz, y los signos de inflamación a lo largo de 84 días de tratamiento.

Los ratones inmunizados con CII presentaron los signos de inflamación desde etapas tempranas mientras que la mayoría de los ratones inmunizados sujetos a tratamiento mostraron los signos de la enfermedad en diferentes grados de severidad según el tratamiento recibido. La medición del peso corporal mostró que dichos signos no afectaron la salud general de los ratones ya que el peso se mantuvo comparable en los diferentes grupos, aumentando conforme la edad de los ratones. A pesar de la inflamación que presentaron los animales no se identificaron signos de sufrimiento (como pelo erizado, orejas caídas, ceño fruncido y pérdida de peso). Existen diferentes métodos para evaluar el dolor en animales de experimentación sin embargo la mayoría no son éticos por lo que en este estudio el dolor no se evaluó.

Es común encontrar en la literatura que una manera de evaluar la efectividad de un tratamiento es el análisis de la capacidad motora de los animales. Con este fin se realizó una prueba modificada en la que se contó el número de veces que los ratones se paraban sobre sus patas traseras en un área definida por un periodo limitado de tiempo. Dicho experimento no arrojó resultados concluyentes ya que no distinguió entre los animales con CIA no tratados y los que recibieron los diferentes tratamientos. Este parámetro podría ser muy útil si se realiza con equipo adecuado, siguiendo un protocolo específico para evaluar movimiento.

Ya que el estado de salud general de los ratones no se vio afectado por la enfermedad se pudieron evaluar los tratamientos por 84 días. Se observó que los ratones con CIA no tratados presentaron los mayores puntajes de inflamación mientras que los tratados con dexametasona y con el EDL no específico a la dosis

de 0.1U mostraron los menores signos de inflamación. Los grupos con los otros tratamientos tuvieron un efecto anti-inflamatorio considerable aunque no se logró la remisión completa de la enfermedad. Sin embargo, en todos los casos las diferencias con el grupo CIA fueron estadísticamente significativas.

El estudio histopatológico de las patas delanteras fue más informativo del efecto de los diferentes tratamientos. Todos los tratamientos tuvieron un efecto anti-inflamatorio positivo, aunque en diverso grado, pero el extracto dializable de leucocitos no específico a la dosis de 0.1U tuvo el mayor efecto, comparable con el efecto que tuvo la dexametasona. Fue llamativo el efecto anti-inflamatorio que tuvo el EDLNE a la dosis de 0.1U comparado con el menor efecto del mismo a la dosis de 1.0 U, lo que indica que el efecto del EDL depende de la dosis. En un estudio publicado de un modelo de lepra murina se observaron resultados similares donde se vio que a menor dosis, mejor efecto (Juárez et al. 2013). También llamó la atención que el EDL específico tuviera menor efecto anti-inflamatorio que el EDL no específico, lo que sugiere que su efecto no sea un proceso netamente inmunológico sino un mecanismo metabólico regulador que opera cuando menos en el ratón y que puede tener influencia sobre el sistema inmune. En apoyo a esta idea, están los resultados relacionados con la disminución en la expresión de NLRP3 y NFκB en los ratones con CIA tratados con el EDL no específico a la dosis de 0.1U. El efecto anti inflamatorio no encontrado con la dosis alta (1.0 U) de EDL específico y no específico no es sorprendente ya que se han encontrado efectos opuestos en sistemas biológicos sujetos a dosis bajas y dosis altas de un mismo estimulante. Fuera de esto, no se conoce mucho sobre la actividad anti-inflamatoria del EDL. Algunos estudios sugieren que disminuye los niveles de TNF- α vía NFκB pero esto no está del todo comprobado (Lara, et al. 2011, Ojeda, et al. 2002). Acosta y cols. trataron ratas con osteoartritis con el EDL obteniendo resultados similares, donde atribuyen el efecto antiinflamatorio a la regulación de NFκB. (Acosta, et al. 2016). Las lesiones articulares en la mayoría de los casos sujetos a tratamiento, se acompañan de signos de reparación y regeneración de tejido. Los ácidos grasos omega mostraron un gran efecto antiinflamatorio y este efecto puede estar relacionado con el bloqueo de la vía del NF-κB, que además de que interviene en la

producción de citocinas pro inflamatorias, es necesaria para la activación de la Cox-2 la que a su vez es la responsable de la oxigenación y formación de derivados como prostaglandinas y leucotrienos altamente inflamatorios (Singer, et al 2008, Carrillo, et al. 2012, Madeiros de Moraes, et al. 2018).

En la destrucción del cartílago y el hueso que ocurre durante el proceso inflamatorio son liberados compuestos altamente inflamatorios como son las alarminas, por ejemplo proteínas de choque térmico y la proteína de cromatina HMGB1 (high-mobility group protein-1) que pueden ser reconocidos por TLRs y a su vez activar la vía de NFκB, se ha demostrado que los ácidos grasos omega pueden ser reconocidos por dichos TLRs bloqueándolos, o pueden interferir con la vía a nivel intracelular al evitar la fosforilación de IκBα y la unión del NFκB al DNA (Singer, et al. 2008, Carrillo, et al. 2012).

Un dato interesante es que casi no se observó infiltrado en las articulaciones de los ratones tratados con ω-3 y ω-9, lo que podía deberse a la producción local de protectinas y resolvinas de la serie D derivados de estos UFAS cuyos efectos están relacionados con la disminución en el número de neutrófilos, proliferación de linfocitos T y producción de mediadores inflamatorios (Singer, et al 2008, Madeiros de Moraes, et al. 2018, Da Silva Borges, et al. 2013).

Se sabe que un desbalance en la cantidad de ácido araquidónico lleva a un estado inflamatorio al ser precursor de moléculas inflamatorias, sin embargo en este estudio se encontró un efecto anti-inflamatorio considerable tanto a nivel histológico como a nivel clínico. En relación a esto, existen algunos estudios publicados donde se describe este mismo fenómeno (Kim, et al 2018, Kawahito, et al 2000 y Carregaro, et al 2010). Una posible explicación es que en ciertas células como son los condrocitos existen unas enzimas llamada H y L-PGDS que producen una prostaglandina antiinflamatoria conocida como 15-deoxy-D-12,14-PGJ2 (15d-PGJ2) a partir de ácido araquidónico y que uno de sus efectos es la inhibición de la cascada de NFκB (Kawahito, et al. 2000, Scher, et al. 2005). Sea cual sea la vía que inhiban los ácidos grasos cada vez son más los estudios que avalan su efecto antiinflamatorio en pacientes con enfermedades inflamatorias. (Fortin, et al. 1995, Cleland, et al. 2006, Galarraga, et al. 2008).

A pesar de que la Con-A utilizada como control positivo no activó a las células como se esperaba, sí se notó un aumento en la proliferación de los esplenocitos estimulados con la misma en comparación con las no estimuladas. Fue claro el efecto que tuvieron todos los tratamientos al disminuir la proliferación de los esplenocitos al estimularse con CII. Está reportado el efecto que tienen los ácidos grasos sobre la proliferación de linfocitos T al interferir en la cascada de IL-2, en el propio ciclo celular y en su división (Singer, et al. 2008, Yaqoob, et al. 1994, Calder, et al. 2010, Gorjao, et al. 2007). Los resultados apoyan la idea de que los tratamientos aplicados disminuyen la respuesta inmune celular responsable de la artritis

La Artritis es una enfermedad multifactorial donde intervienen una gran cantidad de células así como citocinas y anticuerpos (McInnes y Schett. 2007), estos últimos juegan un papel muy importante en el daño articular, en los humanos los pacientes con niveles bajos de autoanticuerpos tienen un mejor pronóstico y es más sencillo controlarlos. En este estudio se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la producción de anticuerpos anti-CII en los ratones tratados con EDLs, se ha reportado que el tratamiento con EDLs inclina la balanza hacia respuestas de tipo celular y no humoral (Salinas, et al. 2015, Ojeda, et al. 2005). A pesar de que no se logró una diferencia estadísticamente significativa con todos los ácidos grasos, si se observa una tendencia en la disminución de anticuerpos contra CII en los ratones que recibieron estos tratamientos, otros autores ya han reportado la capacidad de los ácidos grasos de disminuir la respuesta humoral (Aquino, et al. 2013, Impellizzeri, et al. 2011). En el modelo de artritis inducida por colágena el papel de los anticuerpos no es tan relevante en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, si en un futuro se pretende escalar el estudio a humanos, la disminución de anticuerpos será muy benéfica para los pacientes.

Algunos estudios in vitro han demostrado que los ácidos grasos ω -3 y ω -9 disminuyen la expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3 por lo que en este estudio se decidió evaluar al Inflammasoma como un blanco de los ácidos y los EDLs en el modelo de CIA. Una manera de identificar la expresión de dichas proteínas fue por medio de la inmunofluorescencia.

Los resultados obtenidos coinciden al demostrar una disminución de la expresión de las moléculas NLRP3 y NFκB en los ratones tratados con omegas y EDLs con respecto a los no tratados (CIA). Para que se puedan sintetizar los componentes del inflamasoma es necesaria la translocación de NFκB al núcleo, por lo que si no se activa la cascada de NFκB, no se puede activar el inflamasoma. Anteriormente se describió el efecto que tienen los tratamientos utilizados sobre el factor nuclear NFκB, por lo que el efecto observado de la disminución del receptor NLRP3 en los cortes se debe principalmente a la regulación vía NFκB.

Cada vez son más los pacientes con AR que esperan otras alternativas para controlar los síntomas de la enfermedad (National Center for Complementary and Alternative Medicine) ya que una gran parte de ellos no responden adecuadamente al tratamiento, sin contar con los múltiples efectos adversos y el alto costo de algunos como es el caso de los biológicos (Burnester y Pope, 2017). Muchas medicinas alternas y complementarias (MAC) han ayudado a los pacientes con AR y se han utilizado en diversos países basándose en el conocimiento empírico, afortunadamente ya se comienzan a hacer estudios científicos que avalen dichos resultados y de esta manera puedan llegar a más pacientes.

En 2017 Zhao y cols. realizaron una revisión sobre los MAC más utilizados por los pacientes con AR, en primer lugar encontramos a los ácidos grasos insaturados, omegas, contenidos en el aceite de pescado y algunas plantas, de los cuales ya se ha discutido su efecto antiinflamatorio, también es muy utilizada la medicina oriental proveniente de China donde se utilizan una serie de productos naturales, como jengibre (Altman y Marcussen, 2001), cúrcuma (Kuptniratsaikul, et al. 2009), extractos de plantas (Uncaria tomentosa (Mur, et al. 2012), Rosa canina (Willich, et al. 2010), Andrographis paniculata (Burgos et al. 2009)), y acupuntura. Estos tratamientos también han resultado efectivos controlando el dolor y la inflamación, la mayoría de estos tratamientos poseen un alto contenido de ácidos grasos omega, a los que atribuyen su efecto, lo anterior apoya la idea de que sin importar el origen de procedencia, los omegas tienen sin duda un efecto antiinflamatorio.

Recientemente se han comenzado a estudiar otros extractos de plantas como el de la Jamaican sarsaparilla, una vaina originaria de México, Sudamérica y la India, la

cual se ha utilizado para tratar los dolores reumáticos por su capacidad analgésica y antiinflamatoria. Khana y cols. utilizando un modelo de edema en ratas en 2019 comprobaron dicho efecto y plantean un efecto similar al de los AINEs como el ibuprofeno, la única desventaja es que se necesitan columnas cromatografías para extraer el compuesto con la actividad biológica.

Los resultados presentados reflejan un efecto inhibitor por parte de los omegas y los EDLs, en la expresión de NLRP3 y NFkB, lo que explicaría el efecto antiinflamatorio mostrado por estas sustancias. La enorme necesidad de encontrar nuevos tratamientos efectivos que ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes con AR está siendo abordada desde un enfoque científico y no sólo empírico, el presente trabajo demuestra que el consumo diario, tanto de los ácidos grasos omega 3, 6 y 9 o del EDL, tiene un efecto benéfico que podría coadyuvar de manera significativa al tratamiento convencional que reciben los pacientes.

CONCLUSIONES

- El modelo de CIA en el ratón DBA-1 es un buen modelo para estudiar el efecto de los ácidos omega y del EDL.
- Todos los tratamientos de los ratones con CIA mostraron un efecto anti-inflamatorio considerable y algunos de ellos (DEXA y EDLNE) impidieron casi al 100% el desarrollo de CIA.
- El EDL que tuvo el mayor efecto anti-inflamatorio fue el EDLNE a la dosis de 0.1U.
- A nivel histológico los grupos tratados con ácidos grasos ω -3, ω -6 y ω -9 mostraron signos de reparación y regeneración tisular lo que apoya el efecto benéfico de estas sustancias.
- Las articulaciones de los ratones con CIA mostraron la expresión de NFkB y NLRP3 en las zonas del infiltrado inflamatorio articular, lo cual sugiere que estos factores participan en el daño.
- La expresión de NFkB y NLRP3 se encontró disminuida en ratones tratados con ácidos grasos omega y EDL, lo que sugiere que el efecto anti-inflamatorio de estas sustancias tiene que ver con la inhibición de la activación de estas sustancias.
- Aunque no se conocen con precisión los mecanismos de acción de los ácidos omega y del EDL en la CIA, los resultados sugieren que tienen como blanco común la regulación de la cascada de NFkB lo cual afecta directamente la activación del inflamasoma NLRP3.

PERSPECTIVAS

- Realizar un estudio integral del o los inflamomas que participan en el daño en la artritis, incluyendo los elementos asociados (proteínas adaptadoras, procaspasa/caspasa 1, pre-IL-1b, IL-1B, pre IL-18, IL-18, etc.).
- Realizar el estudio in vitro comparativo del efecto de los ácidos omega y el EDL sobre la expresión del inflamoma inducida con agonistas como ATP, ácido úrico, etc.

REFERENCIAS

1. Acosta, P. Pérez, N. Pérez, E. Correa, B. Pérez, C. Gómez, C. Sánchez, B. y Pérez, D. (2016) "Anti-inflammatory effect of dialysable leucocyte extract in a rat model of osteoarthritis: histopathological and molecular characterization." *Scand J Rheumatol.* Doi: 10.3109/03009742.2016.1153140
2. Altman, R. y Marcussen, K. (2001) "Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis." *Arthritis Rheum.* **Vol. 44**(11):2531–8.
3. Aquino, M. Rodríguez, L. Arce, P. Hernández, V. Becerril, E. y Rojas, O.(2013) "The effect of alpha asarone, olive oil, and dexamethasone on collagen-induced arthritis (CIA) in the mouse." *Modern Research in Inflammation.* **Vol. 2**(1):9-20
4. Bendrups, A. Hilton, A. Meager, A. y Hamilton, J. (1993) "Reduction of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta levels in human synovial tissue by interleukin-4 and glucocorticoid." *Rheumatology international.* **Vol.12**:217-20.
5. Berrón, R. Chávez, R. Estrada, I. Espinosa, S. Cortez, R. Serrano, E. Ondarza, R. Pérez, M. Pineda, B. Jiménez. C, Portugués, A. Rodríguez, A. Cano, L. Pacheco, PU. Barrientos, J. Chacón, R. Serafín, J. Mendez, P. Monges, A. Cervantes, y E. Estrada, S. (2007). "Indications, usage, and dosage of the transfer factor." *Rev Alerg Mex.* **Vol. 54**(4):134-9. Review.
6. Blanco, F.J. Cañete, J.D. y Pablos, J.L. (2007) "Monografías SER. Técnicas de investigación básica en reumatología." Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. pp 69, 217-221
7. Bonilla, G. Miranda, E. y Martin, E. (2011). "New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors" *Rheumatology.*
8. Burgos, R. Hancke, J. Bertoglio, J. Aguirre, V. Arriagada, S. y Calvo, M. (2009) "Efficacy of an *Andrographis paniculata* composition for the relief of rheumatoid arthritis symptoms: a prospective randomized placebo-controlled trial." *Clin Rheumatol.* **Vol. 28**(8):931–46.

9. Calder P.C. (2010) "Omega-3 fatty acids and inflammatory processes". *Nutrients*. **Vol. 2**:355-374
10. Cao, D. van Vollenhoven, R. Klareskog, L. Trollmo, C. y Malmstrom, V. (2004) "CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease". *Arthritis Res Ther*. **Vol. 6**(4):R335–46. 51.
11. Carmona, L. (2002) "Epidemiología de la artritis reumatoide." *Rev Esp Reumatol*. **Vol. 29**(3):86-89
12. Carregaro, V. Napimoga, M. Peres, R. Benevides, L. Amorim, L. Pinto, L. Grespan, R. Cunha, T. Santana da Silva, J. y Cunha, F. (2016) "Therapeutic Treatment of Arthritic Mice with 15-Deoxy Δ 12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2) Ameliorates Disease through the Suppression of Th17 Cells and the Induction of CD4+CD25–FOXP3+ Cells". *Mediators of Inflammation*. **Vol.2016**:1-13
13. Carrillo, C. Cavia, MM. y Alonso, S. (2012) "Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review". *Nutr Hosp*. **Vol. 27**(4):978-90
14. Cascão, R. Rosário, H.S. Souto, M.M. y Fonseca, J.E. (2010) "Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors." *Autoimmunity Reviews*. **Vol. 9**: 531–535
15. Chen, L. Lu, Y. Chu, Y. Xie, J. Ding, W. y Wang, F. (2013) "Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis." *Acta Histochemica*. **Vol. 2**:005.
16. Choulaki, C. Papadaki, G. Repa, A. Kampouraki, E. Kambas, E. Ritis, K Bertsias, G. Boumpas, D. y Sidiropoulos, P. (2015) "Enhanced activity of NLRP3 inflammasome in peripheral blood cells of patients with active rheumatoid arthritis" *Arthritis Res Ther*. **Vol. 19** (17):257
17. Cleland, L. Caughey, G. James, M. y Proudman, S. (2006) "Reduction of cardiovascular risk factors with longterm fish oil treatment in early rheumatoid arthritis." *J Rheumatol*. **Vol. 33**(10):1973–9.
18. Da Silva Borges, D. Oliveira, P. De Quadros, C. Araújo, E. Santos. B. (2013). "Effects of omega-3 fatty acids on regulatory T cells in hematologic neoplasms." *Rev Bras Hematol Hemoter*. **Vol. 35**(2):119-25

19. Dong, C. Fu, T. Ji, J. Li, Z. y Gu, Z. (2018). "The role of interleukin-4 in rheumatic diseases" *Clin Exp Pharmacol Physiol*. doi: 10.1111/1440-1681.12946.
20. Essayan, D. (2001) "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation" *J Allergy Clin Immunol*. **Vol. 108**(5):671-680.
21. Finnegan, A. Grusby, M. y Kaplan, C. (2002) "IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms." *Journal of immunology*. **Vol.15**; 169: 3345-52.
22. Flores, F. Jury, E. Mauri, C. y Ehrenstein, M. (2008) "Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **Vol. 105** 49): 19396–401.
23. Fortin, P. Lew, R. Liang, M. Wright, E. Beckett, L. y Chalmers, T. (1995) "Validation of a meta-analysis: the effects of fish oil in rheumatoid arthritis." *J Clin Epidemiol*. **Vol. 48**(11):1379–90.
24. Froland, S. Natvig, Hoyeraal, H. y Kass, E. (1974) "A new principle of immunotherapy in rheumatoid arthritis: treatment with transfer factor." *Scand J Rheumatol*. **Vol. 3**:113-117.
25. Galarraga, B. Ho, M. Youssef, H. Hill, A. McMahon, H. y Hall, C. (2008) "Cod liver oil (n-3 fatty acids) as an non-steroidal anti-inflammatory drug sparing agent in rheumatoid arthritis." *Rheumatology*. **Vol. 47**(5):665–9
26. Gan RW, Demoruelle MK, Deane KD et al (2017) "Omega-3 fatty acids are associated with a lower prevalence of autoantibodies in shared epitope-positive subjects at risk for rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **Vol. 76**:147–152.
27. Georgescu, C. (1985) "Effect of long-term therapy with transfer factor in rheumatoid arthritis." *Med. Interne*. **Vol. 23**:135-140
28. Gheita, T. Kamel, S. Helmy, N. El-Laithy, N. Monir, A. (2012) "Omega-3 fatty acids in juvenile idiopathic arthritis: effect on cytokines (IL-1 and TNF- α), disease activity and response criteria." *Clin Rheumatol* **Vol. 31**:363–366.

29. Gol, M. Jadidi, F. Sadria, R. Azizi, G. y Abbas, M. (2012) "The role of Different subsets of Regulatory T cells in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis." Hindawi Publishing Corporation Arthritis. **Vol. 10**
30. Gorjao R., Cury-Boaventura M.A., Martins T. & Curi R. (2007) Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. Cell biochemistry and function. **Vol. 25**:305–315.
31. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987) "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **Vol. 30**:1205–1213
32. Guo, H. Callaway, J.B. y Ting, J.P. (2015) "Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics." Nature Medicine **Vol. 21**(7)
33. Hamad, M. Cornelis, F. Marzouk, S. Chabchoub, G. Bahloul, Z. y Rebai, A. (2012) "Association study of CARD8 (p.C10X) and NLRP3 (p.Q705K) variants with rheumatoid arthritis in French and Tunisian populations." Int J Immunogenet. **Vol. 39**:131–136.
34. Headland, SE. y Norling, LV. (2015) "The resolution of inflammation: principles and challenges". Seminars in Immunology. **Vol. 27**(3):149-169
35. Hemmerle, T. Doll, F. y Neri, D. (2014) "Antibody-based delivery of IL4 to the neovasculature cures mice with arthritis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **Vol. 19** (111):12008-120012.
36. Hoyeraal, H.M. Froland S.S. Salvensen, C.F. Munthe, E. Natvig, J.B. Kass, E. Blichfeldt, P. Hegna, T.M. Revlem, E. Sanstad, B. y Hjort, N.L. (1978). "No effect of transfer factor in juvenile rheumatoid arthritis by double-blind trial." Annals of the Rheumatic Diseases. **Vol. 37**: 175-179
37. Impellizzeri, D. Esposito, E. Mazzon, E. Paterniti, I. DiPaola, R. Morittu, V. Procopio, A. Britti, D. Cuzzocrea, S. (2011) "Oleuropein Aglycone, an Olive Oil Compound, Ameliorates Development of Arthritis Caused by Injection of Collagen Type II in Mice." J Pharmacol Exptl Ther. **Vol. 339**(3): 859-869.
38. Jiao, Z. Wang, W. Jia, R. Li, J. You, H. y Chen, L. (2007) Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in

- synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. **Vol. 36**(6):428–433.
39. Juarez M, Hernandez VG, Arce P, Villanueva EB, Aguilar M, Rojas O. (2014) Induction and treatment of anergy in murine leprosy. *Int. J. Exp. Pathol*. **Vol. 96**:31-41.
 40. Kastbom, A. Verma, D. Eriksson, P. Skogh, T. Wingren, G. y Soderkvist, P. (2008) “Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project).” *Rheumatology (Oxford)*. **Vol. 47**:415–417.
 41. Kawahito, Y. Kondo, M. Tsubouchi, Y. Hashiramoto, A. Bishop-Bailey, D. Inoue, K. (2000) “15-deoxy-delta (12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats”. *J Clin Invest*. **Vol. 106**:189–97
 42. Kawashi, SY. Kawakami, A. Okada, A. (2011) “CD4+ CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis”. *J Rheumatol*. **Vol. 38**(12):2517–21.
 43. Khana, A. Singha, P. Reeseb, P. Howden, J. y Tomas, T. (2019) “Investigation of the anti-inflammatory and the analgesic effects of the extracts from *Smilax ornate* Lem. (Jamaican sarsaparilla) plant.” *Journal of Ethnopharmacology*. **Vol. 240**: 111830
 44. Kim, JY. Lim, K. Kim, KH. Kim, JH. Choi, JS. y Shim, SC. (2018) N-3 polyunsaturated fatty acids restore Th17 and Treg balance in collagen antibody-induced arthritis. *PLoS One*. **Vol. 5**:13(3):e0194331
 45. Kuptniratsaikul, V. Thanakhumtorn, S. Chinswangwatanakul, P. Wattanamongkonsil, L. y Thamlikitkul, V. (2009) “Efficacy and safety of *Curcuma domestica* extracts in patients with knee osteoarthritis.” *J Altern Complement Med*. **Vol. 15**(8):891–7.
 46. L’homme, L. Esser, N. Riva, L. Scheen, A. Paquot, N. Piette, J. y Legrand-Poels, S. (2013) “Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3

- inflammasome in human monocytes/macrophages.” *Journal of Lipid Research*. **Vol. 54**.
47. Lara, H. Ixtepan, L. Garza, E. Badillo, J. Rodriguez, C. (2011) “Antiviral mode of action of bovine dialyzable leukocyte extract against human immunodeficiency virus type 1 infection”. *BMC Research Notes*. **Vol. 4**:474
48. Li, F. Guo, N. Ma, Y. Ning, B. Wang, Y. y Kou, L. (2014) “Inhibition of P2X4 Suppresses Joint Inflammation and Damage in Collagen-Induced Arthritis” *Inflammation*. **Vol. 37**(1)
49. Liu, T. Zhang, L. Joo, D. y Sun, SC. (2017) NFkB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* Doi: 2017;2:e17023
50. López, A. Y González, S. (2008) “Papel De Mica En La Patogenia De La Artritis Reumatoide.” *Seminarios De La Fundación Española De Reumatología* **Vol. 9**(2): 77-85
51. Lu, A. y Wu, H. (2014) “Structural mechanisms of inflammasome assembly” *FEBS Journal*.
52. Medeiros-de-Moraes, I. Gonçalves, C. Kurz, A. Oliveira, F. de Abreu, V. Torres, R. Carvalho, V. Estado, V. Bozza, P. Sperandio, M. de Castro, H. y Silva, A. (2018) “Omega-9 Oleic Acid, the Main Compound of Olive Oil, Mitigates Inflammation during Experimental Sepsis”. *Oxid Med Cell Longev*. **Vol. 2018**:1-3
53. Meier, F. Frerix1, M. Hermann, W y Müller-Ladner, U. (2013). “Current immunotherapy in rheumatoid arthritis” *Immunotherapy*. **Vol. 5**:9, 955–974
54. Miao, J. y Zhu, P. (2018) “Functional Defects of Treg Cells: New Targets in Rheumatic Diseases, Including Ankylosing Spondylitis” *Curr Rheumatol Rep* **Vol. 20**:30
55. Miles, E. Calder, P. (2012) “Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis.” *Br J Nutr*. **Vol. 107** (2):S171-184.
56. Mulero, J. (2004) “Tratamiento de la artritis reumatoide.” *Rev Clin Esp*. **Vol. 204**(5):273-82

57. Mur, E. Hartig, F. Eibl, G. y Schirmer, M. (2002) "Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis." *J Rheumatol.* **Vol. 29**(4):678–81.
58. National Center for Complementary and Alternative Medicine. What is CAM. 2012. Disponible en: https://nccih.nih.gov/sites/nccam.nih.gov/files/D347_05-25-2012.pdf. Consultado Mayo 2019
59. Neeli I, Khan SN, Radic M (2008) "Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils." *J Immunol* **Vol. 180**:1895–1902
60. Netea, M.G. van de Veerdonk, F.L. van der Meer, J.M.N. Dinarello, C.A. y Joosten, L.A.B. (2015) "Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines" *Annu. Rev. Immunol.* **Vol. 33**:3.1–3.29
61. Nishimoto, N. Miyasaka, N. Yamamoto, K. Kawai, S. Takeuchi, T y Azuma, J. (2009) "Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study." *Ann Rheum Dis.* **Vol. 68**: 1580–1584.
62. Nistala, K. y Wedderburn, L. (2009) "Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis." *Rheumatology.* **Vol. 48**:602–606
63. Niu, Q. Cai, B. Huang, ZC. Shi, YY. y Wang, LL. (2012) "Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis". *Rheumatol Int.* **Vol. 32**(9):2731–2736.
64. Ojeda, M. Silva, C.V. de J Araña, M. Fernández C. (2002) "TNF α production in whole blood cultures from healthy individuals." *Biochem Biophys Res Commun.* **Vol. 29**:292(2):538-541.
65. Ojeda, M. Van't Veer, C. Fernández, C. Araña, M. y Buurman, W. (2005). "Dialyzable Leukocyte Extract differentially regulates the production of TNF α , IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells." *Inflamm. res.* **Vol. 54**:74–81

66. Páez, M.C. Gómez, L.M y Anaya, J.M. (2006) "Implicaciones funcionales de los linfocitos B en el desarrollo de la artritis reumatoide." Med UNAB. **Vol. 9(1): 34-44**
67. Parslow, T. Stites, D. e Terr, A. Imboden, J. 2002. "Inmunología básica y Clínica." Décima edición. Ed. Médica Panamericana. México, D.F pp 481-486
68. Pratesi F, Dioni I, Tommasi C et al (2014) Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. Ann Rheum Dis. **Vol. 73:1414–1422.**
69. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA et al (2012) "Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis." Nat Genet **Vol. 44:291–296.**
70. Raza K, Gerlag DM (2014) "Preclinical inflammatory rheumatic diseases: an overview and relevant nomenclature". RheumDis Clin N Am. **Vol.40:569–580.**
71. Rojas, A. (2012) "Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Literature Review in Latin America." Hindawi Publishing Corporation. **Vol. 2012**
72. Romero, I. Antón, R. Borrás, J. y Navarro, A. (2005) "Atención farmacéutica a pacientes con artritis reumatoide y psoriásica en tratamiento con Etanercept." Farm Hosp. **Vol. 29: 171-176**
73. Rosloniec, E.F. Cremer, M. Kang, A.H. Myers, L.K. y Brand D.D. (2010) "Collagen-Induced Arthritis." Current Protocols in Immunology Unidad 15.5.1-15.5.25
74. Rustan, A. y A Drevon, C. (2005). "Fatty Acids: Structures and Properties." Encyclopedia of life Science. **Vol. 10.1038**
75. Sarmiento, J.C. Amaya, J. Espinosa, J. S. Herrera, C. Anaya, J.M. y R
76. Scher, J. y Pillinger, M. (2005) "15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin?". Clinical Immunology. **Vol.114:100–09**
77. Shaw, P.J. McDermott, M.F. y Kanneganti, T.D. (2011) "Inflammasomes and autoimmunity." Trends in Molecular Medicine. **Vol. 17(2)**
78. Simard, C.J. Vallieres, F. de Liz, R. Lavastre, V. y Girard, D. (2015) "Silver Nanoparticles Induce Degradation of the Endoplasmic Reticulum Stress

- Sensor Activating Transcription Factor-6 Leading to Activation of the NLRP-3 Inflammasome” *The Journal Of Biological Chemistry*. **Vol. 290**(9):5926–5939
79. Singer, P. Shapiro, H. Theilla, T. Anbar, R. Singer, J. y Cohen, J. (2008). “Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective.” *Intensive Care Med*. **Vol. 34**:1580-1592
80. Soto, L. Catalán, D. Sabugo, F. Wurmman, P. Aguillón, J.C. (2011) “Rol de interleuquina-6 en artritis reumatoide: nuevos conceptos.” *Rev Hosp Clín Univ Chile*. **Vol. 22**:152 – 62
81. Souto, M.M. Mahadevan, V. Takada, K. Fritsch, R. Nanki, T. Brown, M. Fleisher, T.A Wilson, M. Goldbach, R. y Lipsky, P.E. (2009) “Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor.” *Arthritis Research & Therapy*. **Vol. 11**(3)
82. Tobón, G.J. Youinou, P. y Saraux, A. (2010) “The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis.” *Journal of Autoimmunity*. **Vol. 35**:10-14
83. Tobón, G.J. Youinou, P. y Saraux, A. (2010) “The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis.” *Journal of Autoimmunity*. **Vol. 35**:10-14
84. Tracy, A. Buckley C. y Raza, K. (2017) “Pre-symptomatic autoimmunity in rheumatoid arthritis: when does the disease start?” *Semin Immunopathol*. **Vol. 39**:423–435
85. Ursaciuc C, Surcel M, Ciotaru D. (2010) “Regulatory T cells and TH1/TH2 cytokines as immunodiagnosis keys in systemic autoimmune diseases.” *Roumanian archives of microbiology and immunology*. **Vol. 69**:79-84.
86. Vande Walle, L. Van Opdenbosch, N. Jacques, P. Fossoul, P. Verheugen, E. Vogel, P. Beyaert, R. Elewaut, D. Kanneganti, T.D. van Loo, G. y Lamkanfi, M. (2010) “Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis.” *Nature*. **Vol. 0 0 0**

87. Vivar, N. y Van Vollenhoven, R. (2014). "Advances in the treatment of rheumatoid arthritis" F1000Prime Reports. **Vol. 6:31**
88. Walker, LSK. (2013) "Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance". J Autoimmun. **Vol. 45(100): 49–57.**
89. Wardhana, Surachmanto, E. Datau, E. (2011) "The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation." Acta Med Indones. **Vol. 43(2):138-43.**
90. Waterman, E. Lockwood, B. (2007) "Active components and clinical applications of olive oil." Altern Med Rev. **Vol. 12(4): 331-342.**
91. Wegner N, Wait R, Sroka A et al (2010) "Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum. **Vol. 62:2662–2672**
92. Willich, S. Rossnagel, K. Roll, S. Wagner, A. Mune, O. y Erlendson, J.(2010) "Rose hip herbal remedy in patients with rheumatoid arthritis a randomised controlled trial." Phytomedicine. **Vol. 17(2):87–93.**
93. Wu H-J, Ivanov II, Darce J et al (2010) "Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. Immunity" **Vol. 32:815–827.**
94. Yan, Y. Jiang, W. Spinetti, T. Tardivel, A. Castillo, R. Bourquin, C. Guarda, G. Tian, Z. Tschopp, J. y Zhou, R. (2013) "Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation." Immunity. **Vol. 38:1154–1163.**
95. Yaqoob P., Newsholme E.A. & Calder P.C. (1994) "The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation". Immunology. **Vol. 82:603-610.**

APENDICE

Técnica para inclusión en parafina de tejido óseo

1. Descalcificar las patas con EDTA al 10% en PBS, pH. 6.2 por 4 semanas concambios cada tercer día.
2. Atemperar todas las soluciones siguientes a 60° C antes de usarlas.
4. Sumergir las patas, secuencialmente, en las soluciones de etanol al 70, 80 y 96% a 60°C durante 1 hora en cada solución (Utilizar estufa).
5. Mantener las patas en la solución al 96% durante 24 h a temperatura ambiente.
6. Sumergir las patas durante 1 hora, secuencialmente, en las soluciones de etanol absoluto (100%), etanol-xilol (50:50), y xilol (100%) a 60° C.
7. Transferir las patas a una mezcla de parafina-xilol (50:50) por 30 minutos.
8. Posteriormente transferir a recipientes diferentes con parafina fundida (Parafina I), (Parafina II) por 1 hora, finalmente transferir las patas a Parafina III por 30 min
8. Montar los tejidos en los histosets, manteniendo la misma orientación de los tejidos.

Técnica para desparafinar el tejido

1. Incubar las laminillas con los cortes histológicos por 2 horas en la estufa a 60° C (fijación de cortes)
2. Introducir las laminillas de manera secuencial por 5 minutos en las siguientes soluciones: Xilol 1 y 2(100%), Etanol 1 y 2(100%), Etanol 1 y 2 (96%).
3. Enjuagar con agua corriente cuidadosamente y reservar.

Tinción con Hematoxilina- Eosina

Formula

- Hematoxilina de Harris: Reactivo analítico preparado en forma líquida.
- Eosina
Eosina, 1%..... 1g
Agua Destilada.....20mL
Etanol, 96%.....80mL
- Alcohol Ácido
Etanol 70%.....1000 mL
Ácido Clorhídrico Concentrado.....10mL
- Bicarbonato de Sodio
Agua corriente.....1000 mL
Bicarbonato de Sodio, 0.028%.....0.028g

Tinción

1. Teñir con hematoxilina de Harris por 3 min
2. Lavar con agua corriente
3. Diferenciar con alcohol ácido al 1% sumergiendo las laminillas 2 veces en el alcohol y lavar rápidamente con agua de la llave
4. Sumergir las laminillas en bicarbonato de sodio por 1 minuto para virar la hematoxilina
5. Lavar con agua corriente
6. Enjuagar rápidamente en etanol al 96%
7. Teñir con eosina por 15 segundos (Eosina diluida 1:4 en etanol al 96%)
8. Lavar con agua corriente y dejar secar

Tinción MASSON

1. Colocar en la solución mordente de Bouin 90min a 60° C
2. Enfriar y lavar en agua corriente hasta que desaparezca el color amarillo
3. Lavar con agua destilada durante 5min.
4. Colorear con Hematoxilina de Weigert durante 25min
5. Lavar con agua corriente
6. Lavar con agua destilada
7. Teñir con solución de Fuscina ácida-escarlata de Briebrich durante 5 min.
8. Lavar con agua destilada
9. Tratar con solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 min.
10. Pasar el corte directamente a la solución de azul de anilina durante 15min
11. Lavar con agua destilada
12. Sumergir en solución de ácido acético glacial al 1%
13. Deshidratar en alcohol de 96%, alcohol absoluto, alcohol absoluto-xilol y xilol.
14. Montar en resina sintética.