



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

## ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Estudio de las variaciones de algunas interleucinas en el  
tratamiento acupuntural de mujeres con artritis Reumatoide”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN LA  
ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

CARLOS MANUEL PÉREZ ALVARADO

México D.F. Agosto 2010



**Directora:**

Dra. Consuelo Gómez García

**Asesores:**

Dra. Tania Romo González de la Parra

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Francisco Javier Sánchez García

Dr. Cesar Augusto Sandino Reyes López

**Colaborador:**

Médico Acupunturista: Roberto González González

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular I de la sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía bajo la dirección de la Dra. María del Consuelo Gómez García, investigadora titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular de la ENMH-IPN. También se contó con la colaboración del laboratorio de Biología y Salud integral de la Universidad Veracruzana bajo la dirección de la Dra. Tania Romo González de la Parra.

Este proyecto fue apoyado por el programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI), por el programa de Becas Institucionales del IPN, por el programa de becas de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) registro 254273 y por los proyectos SIP-20080309, SIP-20090859 y SIP-20100914. Esta investigación también fue financiada en parte por el POA-21299 del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana y el proyecto PROMEP 103.5/07/2753 (PTC-262).

El presente proyecto se realizó en colaboración con los Departamentos de Reumatología y de Acupuntura del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE a cargo de la Dra. Fedra Irazoke Palazuelos y el Dr. Arturo Gómez Mera respectivamente.

El Dr. Roberto González González Profesor de la Especialidad de Acupuntura de la Sección de Posgrado e Investigación de la ENMyH del IPN asesoró parte de la terapéutica acupuntural aplicada.

## AGRADECIMIENTOS

A la ciudad que me ayudo a destruir una parte de mi  
para retransformar y llegar a la siguiente...  
Negra urbe con tintes personales que acuden  
a la adolorida ansiedad de una felicidad implícita.

A mi mama, papa, hermano, y familia en general,  
por entender la necesidad casi imprudente  
de conocer el mundo que hay detrás  
de la alternativa a la sanación total.

A Ri(p) Alarcón, por enseñarme a vivir  
en la ciudad que nos transmutó...  
Dios nos hizo,,para que el diablo nos uniera,  
gracias a él...

A la Dra Consuelo por convertir su instinto de mujer  
en una guía paciente, encarnada y exigente, en la porción adecuada.  
Dulce maestra que cobija en su regazo  
las almas de ilusiones magi(a)strales.

A Tania por ser esa amiga que me  
mostró la oportunidad de hacer  
algo diferente desde la banqueta  
de lo siempre igual...

Al Dr Guillermo por indicarme  
como hacer las cosas de una manera  
que parezcan lo mejor posible desde  
una veracidad acorde con el mundo.

A Oly porque antes que maestra fue mi amiga,  
por ser esa gran persona que es.  
Metodológicamente hablando casi perfecta ...  
Humanamente viviendo ... una gran mujer ...

A mis amigo(a)s del laboratorio  
y la maestría, por que sin ellos  
esta aventura no sería igual...  
Y por último a todo aquel que me extendió la mano.

***“GRACIAS TOTALES”***  
***Cerati Gustavo***  
***A Dios***

## Contenido

<b>I. Introducción</b> .....	19
1.1 La Medicina Alternativa y Complementaria.....	19
1.2 La Acupuntura .....	22
1.3 Mecanismos de acción de la acupuntura.....	25
1.4 Acupuntura y sistema inmune.....	28
<b>II. Antecedentes</b> .....	34
2.1 La Artritis Reumatoide .....	34
2.2 Acupuntura y artritis reumatoide .....	40
<b>III. Justificación</b> .....	46
<b>IV. Objetivos</b> .....	47
4.1 Objetivo general.....	47
4.2 Objetivos particulares .....	47
<b>V. Material y Métodos</b> .....	48
5.1 Pacientes.....	48
5.2 Toma de muestra sanguínea .....	51
5.3 Evaluación del grado de dolor.....	51
5.4 Medición de las articulaciones .....	52
5.5 Tratamiento acupuntural .....	52
5.6 Extracción de ARN .....	53
5.7 Determinación de la integridad, concentración y pureza del ARN .....	56
5.8 Tratamiento con DNAsa.....	57
5.9 Transcripción reversa .....	59
5.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (M-PCR) .....	60

5.11 Enzimo inmunoensayo (ELISA) .....	66
<b>VI. Resultados</b> .....	70
6.1 Pacientes .....	70
6.3 Inflamación de las articulaciones .....	74
6. 4 MPCR .....	80
6.5 Detección de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ mediante ensayos de ELISA .....	92
<b>VII. Discusión</b> .....	96
<b>VIII. Conclusiones</b> .....	111
<b>IX. Perspectivas</b> .....	112
<b>X. Bibliografía</b> .....	113

## Índice de figuras:

<b>Figura 1.</b> Estímulo nervioso del estímulo acupuntural.....	26
<b>Figura 2.</b> Comparación de una articulación normal con una artrítica.....	36
<b>Figura 3.</b> Células y moléculas liberadas en el estado inflamatorio en la AR. ....	38
<b>Figura 4.</b> ARN de cuatro pacientes diferentes corridos en un gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído al 1.2%. ....	56
<b>Figura 5.</b> Amplificación del gen de <i>actina</i> .....	58
<b>Figura 6.</b> Amplificación de fragmentos de los genes de las moléculas Th1/Th2. ..	62
<b>Figura 7.</b> Amplificación de fragmentos de los genes de las moléculas proinflamatorias.....	64
<b>Figura 8.</b> Intensidad del dolor en pacientes con AR tratadas punto y no punto.....	73
<b>Figura 9.</b> Cambios en el diámetro en el codo de las pacientes con AR del grupo A y B durante su tratamiento. ....	76
<b>Figura 10.</b> Cambios en el diámetro en la muñeca de las pacientes con AR del grupo A y B durante su tratamiento. A.....	77
<b>Figura 11.</b> Cambios en el diámetro en la rodilla de las pacientes con AR del grupo A y B durante su tratamiento .....	78
<b>Figura 12.</b> Cambios en el diámetro en los tobillos de las pacientes con AR de los grupos A y B durante su tratamiento.....	79
<b>Figura 13.</b> Expresión de moléculas Th1/Th2 en pacientes con AR tratadas o no con acupuntura. ....	81
<b>Figura 14.</b> Expresión relativa de interleucinas Th1 en pacientes con AR tratadas con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).....	84

<b>Figura 15.</b> Expresión relativa de interleucinas Th2 en pacientes con AR tratadas con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).....	86
<b>Figura 16.</b> Expresión de moléculas proinflamatorias en pacientes con AR tratadas o no con acupuntura.....	88
<b>Figura 17.</b> Expresión relativa de interleucinas Th2 en pacientes con AR tratados con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).....	90
<b>Figura 18.</b> Expresión relativa de IL-1 $\beta$ en pacientes con AR tratadas con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).....	91
<b>Figura 19.</b> Determinación de los niveles séricos de TNF- $\alpha$ analizada mediante ELISA en pacientes con AR tratados con y sin acupuntura. ....	94
<b>Figura 20.</b> Determinación de los niveles séricos de INF- $\gamma$ analizada mediante ELISA en pacientes con AR tratados con y sin acupuntura. ....	95
<b>Figura 21.</b> Propuesta de los cambios en el balance de la red de interleucinas generados en las pacientes con AR al aplicárseles acupuntura .....	110

## Índice de tablas:

<b>Tabla 1.</b> Ubicación de los puntos acupunturales.....	53
<b>Tabla 2.</b> Ajuste de Buffer RLT según cantidad de sangre.....	55
<b>Tabla 3.</b> Tamaños moleculares de las interleucinas Th1/Th2 de humano. ....	61
<b>Tabla 4.</b> Tamaños moleculares de los amplificadores de las interleucinas proinflamatorias.....	63
<b>Tabla 5.</b> Mezcla para realizar el MPCR .....	65
<b>Tabla 6.</b> Ciclo de amplificación de la MPCR de moléculas Th1/Th2.....	65
<b>Tabla 7.</b> Ciclo de amplificación de la MPCR de moléculas proinflamatorias.....	66
<b>Tabla 8.</b> Estadísticas descriptivas de la calificación a la intensidad del dolor en pacientes tratadas en ambos métodos, por sesión. ....	72
<b>Tabla 9.</b> Cambios en la expresión relativa (ARNm) de interleucinas Th1/Th2.....	92
<b>Tabla 10.</b> Cambios en la expresión relativa (ARNm) de moléculas proinflamatorias .....	92

## Resumen

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria, en la cual algunos de sus agentes inmunopatogénicos son la polarización del ratio de interleucinas (IL's) Th1/Th2 y la elevada producción de interleucinas proinflamatorias. Por otro lado se tiene que el tratamiento convencional para la AR genera efectos secundarios indeseables y no produce los resultados deseados, por lo cual las pacientes han optado por la utilización de la medicina alternativa, en particular la acupuntura. No obstante poco se conoce a nivel molecular de los efectos de esta terapia.

Por lo que en el presente trabajo se estudió el efecto de la acupuntura aplicada en los puntos Dijí (B8), Zusanli (E36), Yinliquan (VB34), Quchi (IG11) y Hegu (IG4) en pacientes con AR. Este efecto se evaluó a nivel del grado de dolor percibido por las pacientes, el grado de inflamación de articulaciones (codos, muñecas, rodillas, tobillos e interfalángicas), los niveles de expresión a nivel de ARNm de interleucinas Th1/Th2 y moléculas inflamatorias, así como el nivel sérico de INF- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ . Veintidós pacientes acudieron al departamento de reumatología y al servicio de acupuntura del Hospital 20 de noviembre del ISSSTE, sin embargo solo 12 concluyeron el estudio mismas que se separaron en dos grupos al azar. Al grupo A se le aplicó acupuntura real en los puntos antes mencionados dos veces por semana durante 10 sesiones y al grupo B se le aplicó acupuntura en no punto el mismo tiempo. Los resultados mostraron cambios en la expresión de IL's Th1/Th2 y pro-inflamatorias. En donde la IL-12, la IL-10, el TNFR2 y la IL-1 $\beta$  presentaron cambios en sus niveles de expresión relativa de ARN en la segunda y tercera toma. Mientras que IFN- $\gamma$  e IL-13 presentaron una

expresión relativa cercana al 20% en las tres tomas, no mostrando una diferencia significativa. En conclusión el tratamiento aplicado en este estudio no indujo cambios significativos en el grado de dolor, inflamación y niveles séricos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Sin embargo si generó cambios en los niveles de expresión de algunas interleucinas Th1/Th2 e inflamatorias que probablemente en conjunto permitan ayudar a generar una mejoría en las pacientes con AR.

## Summary

Rheumatoid Arthritis (AR) is an inflammatory autoimmune disease, in which some of their immunopathogens agents are the polarization of the ratio of interleukins (IL's) Th1/Th2 and the high production of the pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. On the other hand the conventional treatment for the AR generate indirect effect undesirable and it does not produce the expected results, thus the patients adopted the alternative medicine, particularly the acupuncture. Despite, little it is known at molecular level of the effects of this therapy.

By these reason, in the present work we studied the effect of acupuncture applied in the Diji (B8), Zusanli (E36), Yinliquan (VB34), Quchi (IG11) and Hegu (IG4) points in patients with AR. This effect was evaluated concerning the degree of pain perceived by the patients, the degree of inflammation of joints (elbows, wrists, knees, ankles and interphalanges), the levels of expression concerning mRNA of interleukines Th1/Th2 and inflammatory molecules, as well as the serum level of INF- $\gamma$  and the TNF- $\alpha$ . Twenty-two patients went to the rheumatology department and to the acupuncture service of Hospital 20 de Noviembre of the ISSSTE, nevertheless only 12 patients concluded the study and were separated at random in two groups. To the group A, real acupuncture in the points mentioned before was applied twice per week during 10 sessions and to the group B the same time was applied to him to acupuncture in nonpoint. The results showed changes in the Th1/Th2 interleukines and pro-inflammatory molecules expression. Where the IL-12, the IL-10, the TNFR2 and the IL-1 $\beta$  presented changes in their relative expression levels of RNA after fifth session and at the end of treatment. Whereas IFN- $\gamma$  and IL-13 displayed a relative expression near to 20% in the three uptakes,

not showing significant differences. In conclusion, the treatment applied in this study did not generate significant changes in the degree of pain, inflammation and serum levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Nevertheless if it generated changes in the expression levels of some Th1/Th2 and inflammatory interleukins that probably altogether allow to help to generate an improvement in patients with AR.

## **I. Introducción**

### **1.1 La Medicina Alternativa y Complementaria**

El término Medicina Alternativa y Complementaria (CAM, del inglés *Alternative and Complementary Medicine*) se refiere a un amplio rango de perspectivas de salud, enfoques y terapias que existen generalmente fuera de las instituciones donde se imparte la medicina convencional (Pal, 2002). En un principio, entre 1970 y 1980, esta medicina solo era conocida como medicina alternativa, ya que se planteaban exclusivamente como estrategias opcionales al tratamiento médico convencional. El término complementario surgió cuando se observó que este tipo de terapias pueden manejarse paralelamente con la medicina convencional, y así se acuñó el término Medicina Alternativa y Complementaria. Actualmente este tipo de medicina se define como un dominio de fuentes de salud que abarcan sistemas, modalidades y prácticas, así como creencias y teorías, diferentes a aquellas relacionadas con el sistema de salud aceptado por una sociedad o cultura en un periodo histórico dado (Pal, 2002; Lee, 2006). Además, algunos autores indican que este tipo de terapias son sólo prácticas médicas para las cuales hacen falta pruebas y evidencias científicas apoyadas por datos sólidos.

Las prácticas médicas “ajenas” a la medicina convencional siempre han tenido un papel importante en el cuidado de la salud pública, se tienen estudios que indican que cerca del 42% de los americanos, el 52% de los australianos y entre el 20 al 65% de los europeos han utilizado un tipo de CAM (Lee, 2006). Esto se debe, entre otras cosas, a que se considera que por lo menos el 80% de la población mundial no alcanza a cubrir, o lo hace escuetamente, el costo de los

procedimientos médicos básicos (Debas y col, 2006). En relación a ésta, y otras razones, las personas buscan tratamientos de menor valor económico, los cuales muchas veces los encuentran en las CAM's. Diferentes estudios indican que tratamientos de las CAM's para algunas enfermedades son 53 a 63% menos caros que los tratamientos recomendados por la medicina convencional y sus niveles de efectividad son equivalentes (Debas y col, 2006). Otros motivos por los cuales algunos individuos prefieren las CAM's es que evitan los efectos secundarios producidos por los productos alopáticos, además que las consideran de mayor confidencialidad, fácil acceso y conveniencia. A pesar de lo planteado hasta ahora, en general la utilización de un tipo de sistema de salud dependerá de la enfermedad, estatus económico y educación del paciente, principalmente.

Entre algunas características comunes de las CAM's se encuentra el promover la autoevaluación y auto-cuidado de la salud así, como la calidad de vida por parte del individuo. También se invita a tomar conciencia acerca de la conducta social y de los aspectos ambientales, económicos y sociales implicados en el sistema de salud. Además, se plantea la necesidad de que el paciente cuente con una asesoría profesional, información del sistema alternativo y complementario utilizado, entre otras cosas, que le permita crear una estrategia terapéutica adecuada (Baldwin y col, 2004). Todos estos aspectos son compartidos por varias formas de las CAM's, formas que han sido catalogadas por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos en cinco grupos:

1. Prácticas biológicas, las que incluyen el tratamiento con suplementos alimenticios;
2. Enfoques corporales y con manipulación, como el masaje o la quiropraxia;
3. Medicina mente-cuerpo, ejemplo de esto son el yoga y la meditación;
4. Medicina energética, en la cual se puede encontrar al bioelectromagnetismo; 5. Sistemas Médicos Alternativos, entre los que destaca la acupuntura (Debas y col, 2006).

De esta forma se muestra que las CAM's son una opción médica que por cuestiones económicas, sociales y/o personales ha tomado auge en la actualidad. Esto se ha observado a tal punto que estudiantes de medicina y médicos ya graduados incluyen algún tipo de CAM en su *Curriculum vitae*. Por ejemplo, en la Universidad Nacional de Singapur se tiene que el 86% de los estudiantes cuentan con alguna CAM en su formación, y que entre las terapias alternativas y complementarias de mayor elección esta la acupuntura (Lee, 2006). Esta terapia, de la cual se profundizará en la siguiente sección, ha mostrado entre otras cosas ser económica, por ejemplo se tienen evidencias de que para afecciones musculoesqueléticas su costo es 63% menor comparado con lo que cuesta un tratamiento convencional. Además, la acupuntura, al igual que otras CAM's, tiene la ventaja de que el tratamiento es personalizado, de mayor confidencialidad, de fácil acceso y con un trasfondo que coincide con las ideas de varias personas. Por otro lado es conveniente indicar que debido a las características planteadas anteriormente, y otras más, las CAM's son mayormente usadas por personas con padecimientos crónicos como artritis reumatoide, Síndrome de Inmunodeficiencia

Adquirida (SIDA), cáncer, asma, diabetes, epilepsia, y muchas otras enfermedades más. Todo esto hace notar la necesidad de la creación de investigaciones que evidencien que las CAM's, entre las que se encuentra la acupuntura, ejercen efectos biológicos reales que pueden influir en la salud de las personas.

## 1.2 La Acupuntura

La acupuntura es una terapia médica utilizada desde hace tiempo en el este de Asia, por países como China, Japón y Tailandia, entre otros (Carballo, 2006). En este método se insertan agujas delgadas en puntos corporales específicos ubicados en diferentes regiones físicas, puntos que forman rutas determinadas a lo largo del cuerpo a las que se les llama canales energéticos. En la actualidad son aceptados, por la comunidad médica y científica, alrededor de 365 puntos acupunturales, que forman 14 meridianos, los cuales se utilizan en diferentes combinaciones según el padecimiento que se esté tratando (Carballo, 2006). En un principio en los países occidentales esta técnica fue grandemente rechazada por considerarse como altamente precientífica debido a lo extraño que parece, según la lógica occidental, su teoría y método (Kaptchuk, 2002). Sin embargo, los resultados satisfactorios observados al utilizar la acupuntura en varios padecimientos como hipertensión arterial, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, asma, migrañas, entre otras, genera la necesidad de realizar investigaciones para fundamentar racionalmente sus posibles mecanismos de acción (Carballo, 2006; Hecker y col, 2007).

En 1970 en países occidentales, entre los que destacan Francia, Inglaterra y Estados Unidos, se comenzó a realizar investigación sobre la acupuntura basada en los puntos gatillo miofaciales y otros procesos orgánicos, como estimulación nerviosa, regulación neuroinmune, entre otras. Uno de los principales objetivos de éstas y otras investigaciones posteriores, es no sólo mostrar la eficacia y efectividad clínica de la acupuntura, sino también sus efectos biológicos e implicaciones en el cuidado de la salud. Hasta el momento se considera que está científicamente comprobado que la acupuntura es efectiva para dos trastornos, los cuales son, la disminución del dolor y de la náusea, ya sea postquirúrgica, asociada a la quimioterapia o relacionada con el embarazo (Kaptchuk, 2002; Sierpina y Frenkel, 2005). Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la indica como efectiva para enfermedades relacionadas con el tracto respiratorio, como la rinitis y la sinusitis; con patologías gastrointestinales, como la gastroptosis y la gastritis, así como con desordenes músculoesqueléticos como el codo de tenista y la osteoartritis, entre otras patologías (Sierpina y Frenkel, 2005). Esto ha ayudado a posicionar a la acupuntura como una de las CAM's de mayor utilización y credibilidad entre las personas que utilizan este tipo de tratamientos.

Sin embargo, en la investigación acupuntural se han observado algunos problemas como los siguientes: el tamaño de muestra, la manera de cuantificación de los parámetros fisiológicos y la forma de seguimiento del tratamiento, entre otras cosas (Kaptchuk, 2002). Basados en estas observaciones se han generado varias revisiones sistemáticas, las cuales han ayudado a la producción de criterios que favorecen la estandarización y objetividad de los ensayos relacionados con el

proceso acupuntural. Una de las estrategias para lograr lo anterior es el desarrollo y descripción de diversos grupos control, grupos a los que no se les aplica acupuntura “verdadera” sino un tratamiento “falso”. Con lo anterior se intenta identificar la posible diferencia, en parámetros biológicos, entre individuos que han sido expuestos a la acupuntura y aquellos que han recibido el procedimiento “falso”, buscándose de ésta forma eliminar la idea del efecto placebo (Lewith, 1993). Con base en ésto se han planteado metodologías para ensayos de investigación aleatorios (RCT's, por sus siglas en inglés, *Random Controlled Trials*) con los que se pretende la validación del tratamiento acupuntural, y de otros métodos alternativos.

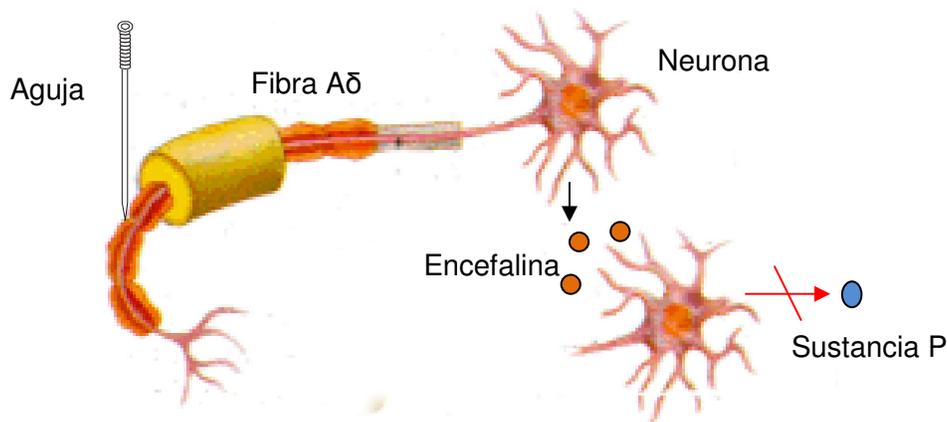
Algunos de los tratamientos placebo diseñados para su inclusión en ensayos de investigación aleatorios relacionados con la terapia acupuntural se mencionan a continuación. En primera instancia se tiene el estudio donde se utilizan puntos no relacionados con la enfermedad tratada, estrategia denominada “no punto”. La ventaja de este estudio es que es altamente creíble, y su desventaja es la posibilidad de que el tratamiento “falso” cause algún tipo de efecto. La desventaja de este tratamiento puede deberse a que la función de los diversos acupuntos no está completamente descrita hasta el momento, es decir, un punto acupuntural podría generar efectos desconocidos en el padecimiento concerniente al estudio (Vicker, 2002). Otro ejemplo de placebo, es la no inserción de las agujas, para esto algunas veces solo se toca la piel con la aguja o se utilizan agujas romas o tubos guía bloqueados. Lo conveniente de esta técnica es que es psicológicamente creíble ya que si se hace cuidadosamente puede tener una gran similitud con la verdadera inserción de agujas (Vicker, 2002). El

inconveniente de este método es que el paciente en algún momento puede percatarse de la no punción, lo que causa problemas, más si se presenta esta situación en ensayos de tiempo prolongado. De este modo se muestran alternativas por las cuales los científicos pueden crear grupos control para RCT's dirigidos a la investigación acupuntural.

### 1.3 Mecanismos de acción de la acupuntura

Los RCT's diseñados para la investigación del tratamiento acupuntural han expuesto que esta técnica terapéutica genera efectos fisiológicos cuantificables y replicables en el laboratorio (Kaptchuk, 2002). En dichos ensayos se indica, entre otras cosas, que la acupuntura ejerce su acción a través de variaciones o regulación de estímulos fisiológicos, entre los cuales podemos encontrar aquellos relacionados con el sistema nervioso e inmune (Kaptchuk, 2002). Por ejemplo, en lo que corresponde al sistema nervioso, se apunta que la punción con la aguja (punción acupuntural o acupunción) estimula diversas estructuras cerebrales, como el hipotálamo, relacionándose ésto con la disminución del dolor (Schlünzen y col, 2007). Por otro lado se ha observado que la punción del punto ubicado cerca de la uña del dedo meñique de la mano, punto "jing" del meridiano de corazón, genera una señal que es conducida a través del nervio cubital del brazo que asciende a través de las vías de nocicepción, modificando así la sensación de dolor (Sánchez Araujo, 1996). Además se ha establecido que la inserción de agujas excita terminaciones nerviosas cuyos aferentes primarios conducen impulsos que ascienden a través de las vías de nocicepción. Entre las fibras

nerviosas que se ha observado están implicadas en la transmisión del estímulo acupuntural se encuentran las fibras A delta, las cuales son estimuladas por la microlesión generada por la acupunción. Esto favorece la liberación de distintas sustancias por algunas neuronas, tales como las encefalinas que impiden a su vez la liberación de una sustancia implicada en la sensación dolorosa, la sustancia P, disminuyendo así dicha sensación (figura 1) (Sánchez Araujo, 1996). De esta forma se indica que durante la interacción de algunos componentes del sistema nervioso, generada por el estímulo acupuntural, se auto-producen sustancias que participan en procesos fisiológicos relacionados con el alivio de la patología (Sánchez Araujo, 1996).



**Figura 1. Estímulo nervioso del estímulo acupuntural.** La fibra nerviosa estimulada por acupunción favorece la síntesis de encefalina por algunas neuronas, lo que a su vez disminuye la generación de sustancia P y consecuentemente del estímulo doloroso.

Como se observa en la figura 1, por medio de las interacciones de los componentes del sistema nervioso se liberan diversas sustancias, entre las cuales

destacan los neurotransmisores (Sánchez Araujo, 1996). Por ejemplo, diferentes experimentos han mostrado que la acupunción favorece la liberación de  $\beta$ -endorfinas por la glándula pituitaria, la que se conoce es una de las sustancias de mayor influencia en la disminución del dolor (Sánchez Araujo, 1996). También se indica que la punción acupuntural dirige a la producción de opiodes endógenos, algunos a partir del precursor pro-opio-melano-cortina (POMC), en plasma, entre éstos se encuentran: la  $\beta$ -endorfina, la  $\beta$ -lipotrofina, la metaencefalina, hormona estimulante de los melanocitos y la hormona adrenocorticotropica (ACTH). Aunado a esto existen evidencias que muestran que al exponer al individuo que recibe acupuntura a inhibidores de los opiodes, como la naloxona, el efecto analgésico de la punción acupuntural disminuye. Al respecto se tiene que la naloxona actúa preferentemente sobre un tipo de moléculas que se unen a ella, o receptores, nombrados como Mu, dejando a los receptores opiáceos  $\kappa$  libres. Esto lleva a plantear que la acupuntura podría inducir la generación de dinorfinas, las cuales interactúan con los receptores  $\kappa$ , y así generar un efecto analgésico (Sánchez Araujo, 1996). Así se tiene que la acupunción favorece la producción de diversas sustancias por parte de los componentes del sistema nervioso, lo cual facilita la generación de algunos procesos fisiológicos (Tabla 1) (Sánchez Araujo, 1996).

El estímulo acupuntural no solo actúa a nivel del sistema nervioso, sino también ejerce su acción a través de la generación de factores inmunomodulatorios (Park y col, 2004). Esto se puede explicar con investigaciones que revelan que algunos componentes del sistema nervioso pueden influir en procesos del sistema inmune. Por ejemplo, se tiene que el sistema noradrenérgico del locus cerúleus puede modular la inmunidad celular, y que el

sistema serotoninérgico del Rafe, a través del eje hipotálamo- hipófisis- adrenal regula la inmunidad humoral (Sanchez Araujo, 1996). Por otro lado se tiene que la acupunción se correlaciona con cambios en las poblaciones celulares de linfocitos B y T, además de cambiar por consiguiente los niveles de algunas interleucinas (Lagevin y Yandow, 2002). También se ha reportado que la acupuntura puede modificar algunos parámetros fisiológicos relacionados con patologías vinculadas con el sistema inmune. Un ejemplo de esto son las observaciones de que en el asma alérgica la acupuntura aumenta la cantidad de células CD4+ y CD3+, igualmente disminuye las concentraciones de IL- 6 e IL-10 e incrementa los niveles de IL-8, lo que se asocia con una mejora de la patología (Joos y col, 2000). Estos hallazgos indican que el tratamiento acupuntural tiene efectos clínicos y biológicos sobre diferentes enfermedades, incluso aquellas que se relacionan con sistemas como el inmune, aspecto que se abordará en la siguiente sección.

#### **1.4 Acupuntura y sistema inmune**

Como se pudo observar en la sección anterior los efectos de la acupuntura en el sistema nervioso pueden tener como consecuencia la inducción de procesos relacionados con el sistema inmune. Por ejemplo se tiene que neuronas catecolaminérgicas y opioides endógenos están involucrados en la diferenciación de células implicadas en la inmunidad, como lo son las células T (Zagon y col, 2010; Ziljastra y col, 2003). Por otro lado se plantea que cambios en la respuesta inmunitaria producidos por la punción acupuntural se generan debido a modificaciones en la forma de la matriz extracelular de la región de tejido cercana a la aguja, cambios que se traducen en modificaciones a nivel de expresión génica

y secreción de factores autocrinos y paracrinos, como proteínas de enlace a membrana nuclear como la NF- $\kappa$ B y citocinas como el TGF $\beta$ 1, entre otras cosas (Langevin y Yandow, 2002).

En un estudio realizado en 16 personas sanas a quienes se les puncionó los puntos Heku (IG4), Zuzanli (E36), Kongzui (P6), Sanyinjiao (Sp6), Qinling (C2), Zhongdu (VB32), Quchi (IG11), y Chengshan (V57) (Langevin y col, 2002), se observó que la fuerza que se ejerce al insertar la aguja es suficiente para generar un cambio en la matriz extracelular del tejido puncionado. La fuerza mencionada es de varios cientos de gramos y se plantea provoca modificaciones en algunos tipos celulares tales como fibroblastos, células inmunes y vasculares, entre otras (Langevin y Yadow, 2002).

La acupuntura interviene en la respuesta inmune de diversas formas, una de ellas, como ya se mencionó, es en la regulación de las poblaciones celulares. Un ejemplo de esto lo dan investigaciones realizadas en 11 voluntarios sanos tratados bilateralmente en el punto hígado (H)-11, donde se muestra que después del tratamiento acupuntural se pueden observar cambios en la cantidad de neutrófilos que se encuentran en las vías respiratorias (Karst y col, 2003). Por otro lado Yamaguchi y col en el 2007, demostraron que al aplicar acupunción en los puntos Ganshu (V-18), Pishu (V-20), Shenshu (V-23) y Zuzanli (E-36), en 17 voluntarios sanos, cuyas edades se encontraban entre 21-51 años y que se aseguró no habían tenido episodios alérgicos previos al tratamiento, se modifican algunos aspectos de la respuesta inmune (Yamaguchi y col, 2007). Por ejemplo, existe un incremento en el número de células CD2+, CD4+, CD8+, CD11b+,

CD16+, CD19+ y CD56+, y disminución en el número de células NK, todo esto cuantificado mediante citometría de flujo. Lo anterior sugiere que la acupuntura modula la inmunidad humoral y celular mediante la inducción de cambios en el número y tipo de células involucradas en la respuesta inmune (Yamaguchi y col, 2007).

Sin embargo la acupuntura no solo genera cambios a nivel celular, como lo que se menciona en el párrafo anterior, sino también a nivel molecular. Por ejemplo se tiene que la acupuntura genera cambios en dicho nivel en el sistema inmune en estudios realizados en un modelo murino de peritonitis en el cual se puncionó 10 min en los puntos Yintang (EX-HN3), Houxi(ID3) y Baihui (DM20). A esos ratones se les cuantificó por ELISA el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la IL-10 y la IL-1 $\beta$  (Scognamillo-Szabo y col, 2005). En esta investigación se observó una disminución en la inflamación en el peritoneo en conjunto con la disminución significativa de la concentración de IL-1 $\beta$ , pero sin cambios significativos en la cantidad de IL-10 y TNF- $\alpha$  (Scognamillo-Szabo y col, 2005). Con base en estos resultados se concluye que la disminución de la inflamación seguida de la punción acupuntural puede ser generada por un decremento de la IL-1 $\beta$ .

Siguiendo con cambios a nivel molecular se tiene que la secreción de algunas moléculas relacionadas con el sistema inmune puede explicarse debido a que el tratamiento acupuntural modifica los niveles de cortisol sanguíneo, lo que se ha observado se relaciona con modificaciones en la secreción de algunas interleucinas (Arranz y col, 2006). En cuanto a esto se ha observado que el cortisol inhibe la proteinquinasa mitogeno activada p38 deletando la actividad del gen

gata-3, lo que culmina con la disminución de la expresión del gen de IL-5 (Lieberman y col, 2005). Por tanto, la modificación de los niveles de cortisol se puede relacionar con cambios en la expresión de algunas interleucinas. En lo que respecta a la acupuntura y este tipo de cambios se ha mostrado que la punción de los puntos Zuzanli (E-36), Lingdao (H-4) y Innlien (H-11) (los cuales se han utilizado para tratar padecimientos del sistema inmune) en mujeres con ansiedad se relaciona con la disminución de los niveles de cortisol sanguíneo 72 h después de su tratamiento. Lo anterior se evidenció va de la mano con el decremento de los niveles de algunas interleucinas como la IL-2 y el TNF- $\alpha$  (Arranz y col, 2006). Así mismo, estos resultados se refuerzan con estudios que mencionan que cambios conjuntos en los niveles de cortisol e IL-2 influyen en el alivio de algunos síntomas, como el del estado de inflamación crónico y en patologías como la esquizofrenia (Fontana, 2008; Davis y col, 2007; Zhang y col, 2005).

La disminución en el cortisol junto con la disminución de la IL-2 y el TNF- $\alpha$  favorecidos por el tratamiento acupuntural se ha relacionado con la reducción en el estado inflamatorio que se presenta en sujetos con ansiedad (Arranz y col, 2006). Además se ha evidenciado un aumento en los niveles intracelulares de moléculas antioxidantes, lo cual puede resultar en la normalización del funcionamiento de las células del sistema inmune (Arranz y col, 2006). Lo anterior se refuerza con investigaciones en un modelo de isquemia en ratón donde se estudia a la superóxido dismutasa (SOD3), la cual es una molécula antioxidante (Laurila y col, 2009). Dicha molécula modifica los niveles de interleucinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL1- $\alpha$ , IL-6, y la expresión de moléculas de adhesión, tales como VCAM, ICAM, P-selectina y E-selectina, en tejidos dañados (Laurila y

col, 2009). Lo anterior se ha mostrado se relaciona con una disminución en la inflamación en dichos tejidos, que se puede decir es por la normalización de las funciones del sistema inmune (Laurila y col, 2009). En base a esto, se plantea que la acupuntura puede tener un efecto benéfico sobre el sistema inmune a través de la modulación de cortisol y moléculas antioxidantes o interleucinas como la IL-2 y el TNF- $\alpha$  (Arranz y col, 2006). Aunque es necesario hacer las investigaciones pertinentes para mostrar como las moléculas anteriormente mencionadas participan en la disminución de la inflamación durante el tratamiento acupuntural.

Las interleucinas no son las únicas moléculas del sistema inmune en las cuales se han observado modificaciones cuando un individuo es sometido a un tratamiento de acupuntura, también se han apreciado cambios en las concentraciones de algunos anticuerpos, como la inmunoglobulina E (IgE), la IgA y la IgM, entre otros (Park y col, 2004). Esto debido a que en algunos artículos señalan que la electroacupuntura puede modificar las concentraciones de IgE antígeno específica (Park y col, 2004). Esto se evidenció al electropuncionar el punto E-36 en ratones BALB/c, de los cuales algunos fueron inmunizados con proteína de paca 2,4- dinitrofenilada (DNP-KLH) para inducirles un estado alérgico (Park y col, 2004). Además se cuantificaron los niveles de IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-10 con el fin de evaluar el balance entre las poblaciones de células T cooperadoras (Th) de tipo 1 y 2. En estos experimentos se mostró una disminución de la IgE antígeno específica, para la proteína introducida, y una disminución en los niveles de IL-4 e IL-13, las cuales favorecen el desarrollo del linaje celular Th2 (Park y col, 2004). Estos resultados indican que la acupuntura aplicada en el punto Zusanli (E-36) disminuye la producción de IgE antígeno

específico para DNP-KLH mediante la modulación del balance Th1/ Th2 (Park y col, 2004).

Así se muestra que en el mecanismo de acción de la intervención acupuntural además de promover modificaciones a nivel del sistema nervioso, también puede generar variaciones en el sistema inmune. En primera instancia se plantea que ésto se favorece por la generación y liberación de ciertos compuestos, como opioides endógenos y/o cortisol, los cuales influyen en la producción o no de algunas células y/o moléculas del sistema inmune. Por ejemplo dichas moléculas pueden generar variaciones en las concentraciones de algunas interleucinas, en particular de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e incluso de anticuerpos (Tam y col, 2007; Arranz y col, 2006; Scognamillo- Szabo y col, 2005; Park y col, 2004). Es necesario mencionar que el tratamiento acupuntural según el padecimiento, causara en las células y/o moléculas inmunes aumento o disminución de su expresión, concentración y/o actividad, es decir produce un proceso de inmunoregulación. Por todo lo anterior algunos autores apuntan que la acupuntura puede utilizarse como un tratamiento alternativo y/o complementario para algunas enfermedades del sistema inmune, tales como la Artritis Reumatoide (Park y col, 2004), de la cual se hablará a continuación.

## II. Antecedentes

### 2.1 La Artritis Reumatoide

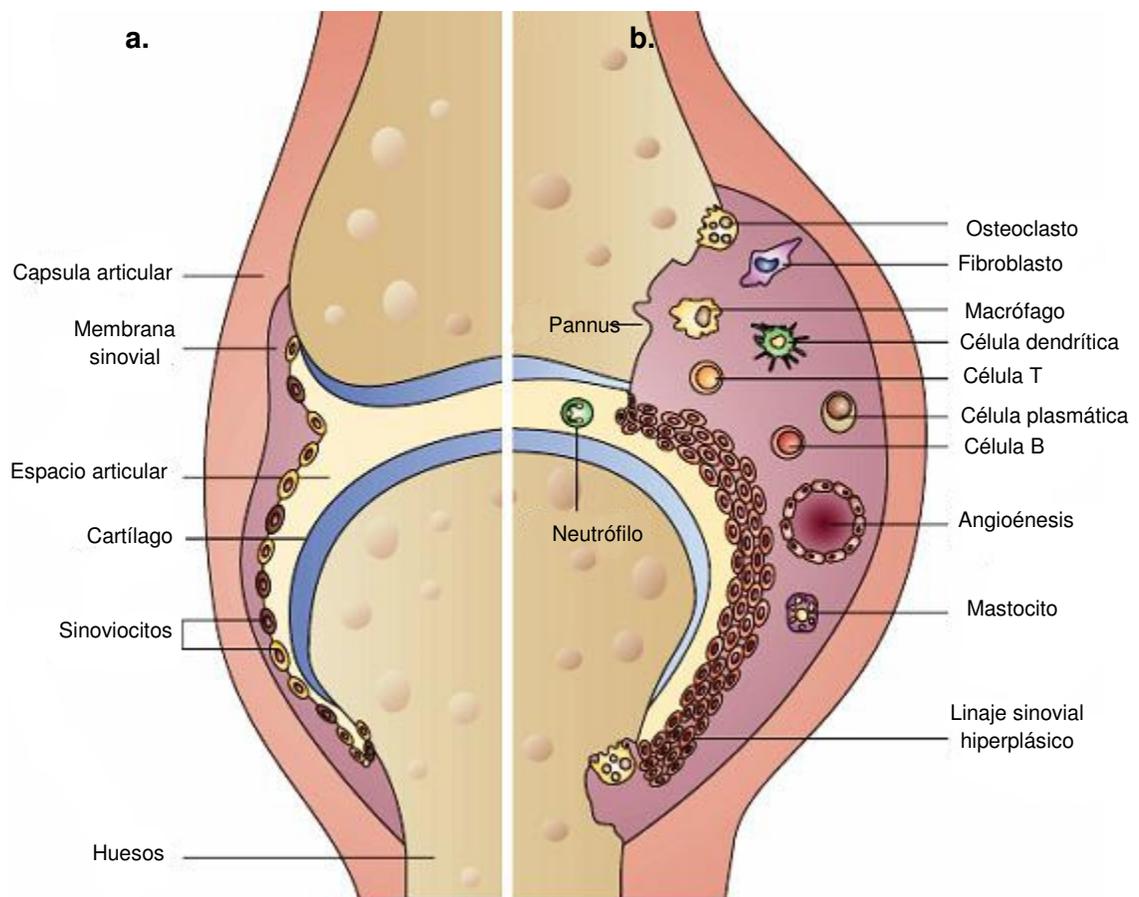
La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica donde se experimenta inflamación sistémica en juntas sinoviales y algunas veces es acompañada de manifestaciones extra-articulares (Gobalt e Isenberg, 2005). Se estima que su prevalencia en la población mundial varía entre el 0.8% y el 1.0% en adultos (Carmona y col, 2002). Siendo las mujeres la parte de la población más afectada, teniéndose que la AR afecta 2 a 4 veces más a este género que al género masculino (Constenbänder y Manson, 2008; Gerosa y col, 2008). Investigaciones realizadas en una población suburbana de la ciudad de México muestran que la prevalencia de la AR, en una muestra de 2300 individuos, es de alrededor del 0.3% (Cardiel y Rojas- Serrano, 2002). Aunado a los resultados anteriores se tienen estudios donde se muestran que en una población rural de Yucatán la prevalencia de la AR, en una muestra de 761 sujetos, fue de 4.7% (Álvarez Nemegeyi y col, 2005). Como se observa hay diferencias en prevalencia de la AR aún cuando se habla del mismo país, se plantea que dichas variaciones entre la prevalencia de la AR a nivel nacional, e incluso algunas veces a nivel regional, se plantea puede deberse a factores demográficos, geográficos y socioeconómicos (Álvarez Nemegeyi y col, 2005).

En general los valores elevados de prevalencia a nivel mundial y nacional, entre otros factores, son motivo por los que se ha llegado a considerar a dicha enfermedad como un problema de salud pública (Álvarez Nemegeyi y col, 2005).

Esto porque la AR puede dirigir a las personas hacia una incapacidad física, debido al dolor crónico que presentan estos pacientes en varias partes del cuerpo, en especial en las articulaciones. Las articulaciones más afectadas en estos individuos son las interfalángicas proximales, metatarsofalángicas, muñecas, rodillas y hombros (Chorus y col, 2003). Se ha observado que aunado al dolor en esas zonas articulares hay una disminución en su movilidad que dirige al individuo a una discapacidad física (Mettier, 1955). Dicha discapacidad no permite que los individuos realicen adecuadamente sus tareas cotidianas, ni laborales, lo que se asocia con una aparición de afecciones emocionales, como la depresión (Shneider y col, 2008; Walker y Littlejohn, 2007). Por éstos y otros motivos los pacientes con AR buscan alternativas para controlar el dolor, y además la inflamación, la cual es una característica estrechamente relacionada con la sensación dolorosa en este tipo de pacientes (Shneider y col, 2008).

La inflamación de las articulaciones asociada al dolor de los pacientes con AR resulta en la destrucción irreversible del cartílago y el hueso articular (Figura 2) (Guincheleaar y col, 2007). Además es posible la presencia de daños en el recubrimiento de los tendones y otras afecciones no articulares, como deterioro en pulmones, vasos sanguíneos, y puede causar anemia. También se relaciona con infecciones, osteoporosis, linfoprolifereación maligna y ulcera péptica (Mikuls, 2003). Comúnmente las manifestaciones sistémicas y articulares relacionadas con la AR se asocian con procesos inmunológicos (Itoh y col, 2003). Respecto a esto se tiene que la inmunopatogénesis de la AR es multifactorial, sugiriéndose la interacción entre un antígeno exógeno o endógeno vía células CD4<sup>+</sup> cooperadoras, lo que promueve la activación del sistema inmune (Goldblatt e

Insenberg, 2005). Subsecuentemente se suscita el reclutamiento y activación de monocitos y macrófagos favoreciéndose la secreción de interleucinas proinflamatorias, en particular el TNF- $\alpha$  y la IL-1 en la cavidad sinovial. La liberación de dichas interleucinas activa condrocitos y fibroblastos, los cuales liberan colagenasas y metaloproteinasas que generan la pérdida del cartílago y erosión ósea (Goldblatt e Insenberg, 2005).

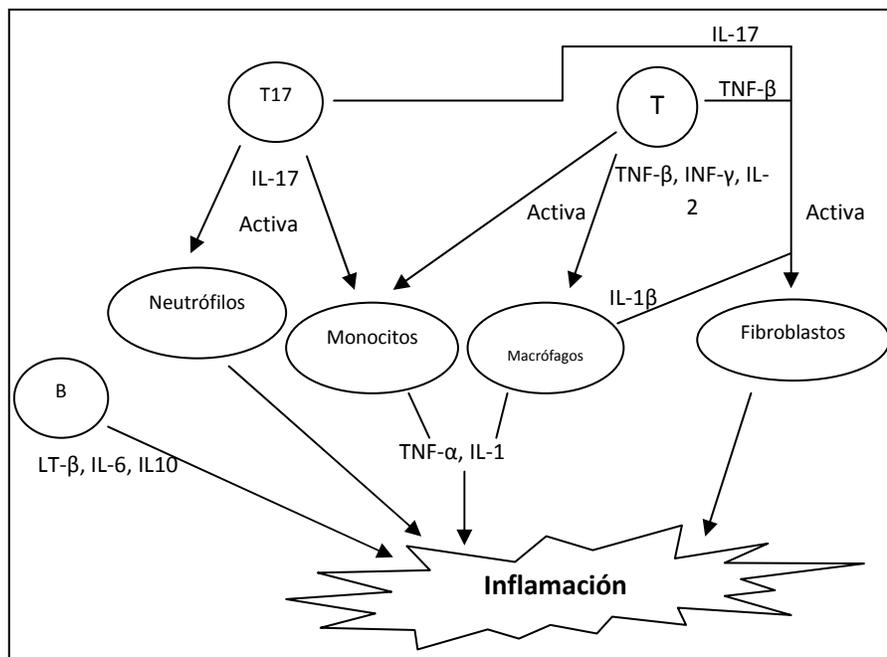


**Figura 2. Comparación de una articulación normal con una artrítica.** a. Esquema de una articulación normal. b. Representación de una articulación con AR inflamada.

Diversas evidencias apuntan que la AR es un trastorno mediado por un incremento en la producción de interleucinas producidas por células Th1, con respecto a las generadas por las células Th2 (McInnes y Schett, 2007; Tam y col, 2007; Joosten y col, 1999). Entre dichas evidencias se encuentra aquellas que apuntan que en pacientes con AR se ha observado que algunas interleucinas relacionadas con las células Th2 como la IL-10 se encuentran disminuidas (McInnes y Schett, 2007). Otro dato que muestra el desbalance entre la producción de interleucinas Th1 y Th2 en este padecimiento son los niveles bajos de IL-4, esta molécula es producida por células Th2, y estimula la maduración de ese mismo tipo celular. Por tanto como los niveles de IL-4 están disminuidos, la inhibición sobre la síntesis de moléculas proinflamatorias como la IL-1, el TNF- $\alpha$ , y otras, no se logra eficientemente, empeorándose así la inflamación artrítica (Joosten y col, 1999). Esto se refuerza con estudios que muestran una alta cantidad de células Th1 en el líquido sinovial de las articulaciones afectadas de pacientes con AR (Joosten y col, 1999). Tomando en cuenta éstas y otras evidencias se plantea que el grado de polarización y heterogeneidad de las interleucinas secretadas por los linfocitos T está directamente relacionada con la patogénesis de la AR (Cañete y col, 2000). Asimismo, la diferencia en la producción de interleucinas entre células Th1 y Th2, a lo que se le ha denominado ratio Th1/Th2, se propone puede ser importante para la perpetuación de la inflamación articular (Cañete y col, 2000).

Otro de los procesos involucrados que favorece la inflamación en la AR, es la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 en la cavidad sinovial por monocitos y macrófagos (Gobalt e Isenberg, 2005). Por su parte las células T, contribuyen al proceso

inflamatorio al producir moléculas como el INF- $\gamma$ , el TNF- $\beta$  y la IL-2, lo que favorece la activación de macrófagos y fibroblastos sinoviales. Por otro lado existen células T productoras de IL-17 que dirigen la diferenciación, maduración, y activación de neutrófilos, monocitos y fibroblastos (Gobalt e Isenberg, 2005). En lo que se refiere al linaje de células B, éstas contribuyen al proceso inflamatorio mediante la producción de IL-6, IL-10 y linfotoxina (LT)  $\beta$  (McInnes y Schett, 2007). Todo esto muestra como la producción y acción de algunas interleucinas liberadas por diferentes tipos celulares están implicadas en el proceso inflamatorio asociado con la patogénesis de la AR (figura 3).



**Figura 3. Células y moléculas liberadas en el estado inflamatorio en la AR.**

De acuerdo a lo anterior se puede ver que algunos de los síntomas de la AR están mediados por diversas interleucinas, como la IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17,

por mencionar algunas. Estas moléculas, entre otras cosas, causa inflamación, acumulación de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que dañan el cartílago, lo cual conlleva a la destrucción de la articulación.

En este proceso también se observa la producción de anticuerpos, en especial la producción de inmunoglobulina IgM anti IgG llamada Factor Reumatoide (FR). Dicho factor forma complejos IgM:IgG, que reaccionan con el colágeno, lo cual contribuye a la generación de un proceso patológico complejo que culmina con el daño del tejido conectivo en las articulaciones (Jan, 2004). Cabe destacar que además de los altos niveles de IgM anti IgG también se ha observado una alta producción de IgA (Cassidy y col, 1973) e IgE (Zuraw y col, 1981) asociada con la presencia de AR.

Así se muestra que el aumento de la actividad de algunas células del sistema inmune como células T, células B y macrófagos, entre otras, lo que hace a la AR una patología inmunológica compleja, tanto en su etiología como en su tratamiento. Hasta ahora, se han incluido medicamentos inmunosupresivos y otros fármacos denominados como drogas antirreumáticas modificantes de la enfermedad (DMARD's). Entre las medicinas mayormente utilizadas para tratar este padecimiento se encuentran los glucocorticoides, la prednisolona, el azatiopine, la ciclosporina A, la sulfasalazina y el metotrexato, siendo el último el más recomendado para el cuidado estándar (Gobalt e Isenberg, 2005).

El incremento de investigaciones relacionadas con la AR ha generado la producción de nuevas opciones terapéuticas, en las cuales se incluye a: factores anti-TNF- $\alpha$ , antagonistas del receptor de IL-1, regímenes de disminución de células B y otras terapias que tienen como blanco diversas interleucinas (Gobalt e

Isenberg, 2005). La mayoría de estos tratamientos, se ha mostrado, reducen la actividad de la enfermedad y la progresión de la erosión ósea. Sin embargo, algunos son muy costosos de tal forma que son inaccesibles a ciertos sectores de la población. Además se tienen evidencias de que generan varios efectos secundarios indeseables como pérdida de peso, diarrea, gastritis, salpullido, entre otros (Nersting y Schmiegelow, 2009; Gobalt e Isenberg, 2005; Zan-Bar y col, 2004). Aunado a lo anterior se tiene que algunos pacientes presentan una respuesta parcial o refractaria a los medicamentos (Gobalt e Isenberg, 2005), e incluso en algunos casos con todo y el tratamiento los pacientes quedan eventualmente incapacitados (Zan-Bar y col, 2004). Al mismo tiempo debido a que el tratamiento es administrado al paciente por un largo periodo de tiempo se afectan algunos órganos, tales como el hígado y los riñones, provocando el surgimiento de otros padecimientos (Nersting y Schmiegelow, 2009). Por motivos como los anteriores, y otros, como la cronicidad del dolor, es que muchas personas con AR, aproximadamente 26.7% en Estados Unidos, incursionan en alguna CAM, de las cuales una de las más utilizadas es la acupuntura (Gobalt e Isenberg, 2005).

## **2.2 Acupuntura y artritis reumatoide**

La acupuntura es ampliamente utilizada en el tratamiento de la AR, entre otras cosas, porque se ha observado que esta terapia tiene efectos clínicos y biológicos benéficos en pacientes con dicha enfermedad. Por ejemplo se tienen evidencias que indican que la acupuntura disminuye los síntomas de las personas con AR,

entre ellos se encuentra un decremento en el dolor articular y consecuentemente una disminución del número de articulaciones sensibles (Tam y col, 2007). Se plantea que ésto se logra a través de la alteración de la percepción del dolor y/o por la alteración de procesos fisiológicos, tales como la inflamación y/o el control antiálgico. En lo que corresponde al dolor se ha observado que los pacientes algunas veces pueden experimentar alivio hasta por dos o tres meses después de un tratamiento local (British Acupuncture Council, 1998).

Desde hace algunos años diversos investigadores han mostrado que el tratamiento acupuntural puede generar mejoras en el sistema inmune en sujetos con AR. Por ejemplo en un estudio donde se aplicó acupuntura se evidencia un decremento en los niveles de las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA, de 12 personas con AR, después de que los individuos recibieron 15 a 45 sesiones acupunturales (Zan-Bar y col, 2004). Otro ensayo, realizado con 54 afectados con AR, muestra que después de un proceso de 30 sesiones diarias, todos los sujetos mostraron una disminución del dolor, no se observaron cambios en las Ig's pero si se observó la reducción de los niveles de grado de sedimentación eritrocitaria y del número de pacientes con FR positivo, que se relaciona con una disminución en la agudeza de la enfermedad. Esto debido a que hay una reducción del daño articular favorecido por la disminución en la formación de complejos IgM:IgG y consecuentemente de la activación del sistema del complemento (British Acupuncture Council, 1998). Las modificaciones en los niveles de FR, entre otras cosas, permite plantear que la acupuntura ejerce un efecto inmunoregulator en pacientes con AR, ya que afecta directamente la producción de este autoanticuerpo (Veitria y col, 2002; Zan-Bar y col, 2004). Para ésto se plantea que

durante el tratamiento acupuntural se activan los sistemas de defensa del organismo, lo cual incluye la regulación de la producción de diferentes moléculas como interleucinas, neuropéptidos y mediadores vasoactivos, como los péptidos genéticamente relacionados con la calcitonina, INF- $\gamma$  y el óxido nítrico, entre otras sustancias (Zijlstra, 2003). Estos datos sugieren que la acupuntura aplicada en la AR incluye cambios en la función inmune, lo que hace difícil de ignorar a esta terapia como complementaria cuando el tratamiento convencional muestra limitaciones.

Por otro lado, dentro de la acupuntura hay diversas técnicas para tratar diferentes padecimientos, tales como la AR, entre ellos podemos encontrar a la electroacupuntura. Un ejemplo de esto lo dan Tam y colaboradores quienes aplicaron acupuntura y electroacupuntura a pacientes con AR, con una edad promedio de 58 años, en los puntos intestino delgado (IL) 11, triple calentador (TC) 5, intestino delgado (ID) 4, vesícula biliar (VB) 34, vesícula biliar (VB) 39 y estómago (E) 36, estimulándose estos acupuntos por 40 min dos veces a la semana durante 10 semanas. En este estudio se agruparon los pacientes en tres grupos: 1, al que se le aplicó electroacupuntura; 2, al que se trató con acupuntura sin estimulación eléctrica y 3, en el que se empleó acupuntura falsa (Tam y col, 2007). La cuantificación de los diferentes rasgos fisiológicos se realizó en las sesiones 5, 10, 15 y 20. En general se mostró que en la sesión 10 hay una reducción significativa de los síntomas reportados en la evaluación médica, como percepción de dolor y número de articulaciones sensibles tanto en los grupos de electroacupuntura como en el de acupuntura manual (Tam y col, 2007). En lo que se refiere al dolor se evidencia una disminución en la percepción por parte de los

pacientes mediante la aplicación de la escala de valoración análoga del dolor (EVA), pero no se observa diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos estudiados. Los resultados sugieren que la acupuntura puede ser efectiva como complemento en la reducción del dolor y en la disminución de articulaciones sensibles en la AR.

Asimismo, se tienen estudios a nivel clínico realizados posteriormente en donde se aplicó acupunción por 20 minutos una vez a la semana durante 10 semanas de los puntos Geshu (V17), Zuzanli (E36), Shenshu (V23), Yinlian (H11), Dazhui (DM14) en pacientes con AR. Los resultados mostraron una disminución significativa en la percepción del dolor en pacientes con AR, esto tomando como referencia los valores de la EVA (Shen weixing, 2004).

Otra investigación en la que se evaluó la acción de la acupuntura en la AR se realizó en ratones DBA/1J de 5 semanas, a los cuales se les indujo artritis mediante la inyección de colágeno tipo II, y se trataron con acupunción en el punto Zuzanli (E36) durante 15 min (Yim y col, 2007). Los ratones se dividieron en 5 grupos: 1, ratones normales sin tratamiento; 2, control positivo sin tratamiento; 3, ratones con artritis que solo recibieron acupunción; 4, ratones con artritis que recibieron electroacupuntura por 5 semanas; y 5, ratones con artritis que recibieron electroacupuntura por 10 semanas. Los resultados mostraron que hay una disminución en los niveles séricos de IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IgG e IgM en los ratones de los grupos 3, 4 y 5, siendo estadísticamente significativa en el grupo 5. Estos resultados demuestran que la acupuntura puede tener efectos anti-inflamatorios, anti-artríticos e inmuno-regulatorios en este modelo animal de AR.

En otro estudio se describe los efectos de la acupunción del punto Hígado (H) 3 en 56 pacientes con AR de entre 18 y 75 años de edad (David y col, 1999). En este trabajo se puncionó bilateralmente H3 durante 4 min una vez a la semana durante 6 semanas, con una manipulación manual de la aguja a los dos minutos por 5 s. Se dividió a los pacientes en dos grupos uno tratado con acupuntura y otro tratado con la estrategia del no punto. Los resultados mostraron una mejoría en la sintomatología, así como en la intensidad del dolor cuantificada con EVA y el número de articulaciones sensibles, medidas evaluando el índice de actividad de la enfermedad, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Así mismo no se observó un cambio en el grado de sedimentación eritrocitaria y en los niveles de proteína C reactiva, los que son parámetros que indican el grado de inflamación. Esto sugiere que este tratamiento de H-3 en particular es inadecuado para la AR (David y col, 1999). Por lo que se concluye que la acupunción propuesta en este ensayo no es recomendable para el alivio de la AR (David y col, 1999). Por este, y otros motivos, se incita a la generación de más estudios donde se produzca un mejor entendimiento del porque la acupuntura muestra mayor acción benéfica en enfermedades que presentan desgaste articular y dolor que en las que exhiben inflamación articular.

De esta forma se muestra que la acupuntura puede tener efectos sobre los síntomas y alteraciones fisiológicas presentes en personas con AR (David y col, 1999; Zijlstra, 2003; Tam y col, 2007). Cabe destacar que los puntos acupunturales Zuzanli (E36) y Yanglingquan (VB34) que serán utilizados en este estudio han mostrado tener efectos en la AR tanto a nivel clínico, como molecular (Tam y col, 2007; Yim y col, 2007, David y col, 1999). Esto se puede generar

gracias a las modificaciones inmunoreguladoras que puede ejercer este tratamiento, como los cambios en los niveles de algunas inmunoglobulinas y en las alteraciones de las concentraciones del FR, por mencionar algunos (Zijlstra, 2003; Zan-Bar y col, 2004; Tam y col, 2007). Además se evidencia que en ciertas ocasiones las variantes de la acupuntura, como la electroacupuntura, o el tratamiento falso, aplicadas en estudios doble ciego, no exponen diferencias estadísticamente significativas (Tam y col, 2007). También se exhibe que los resultados del tratamiento dependen, entre otras cosas, del tiempo y ocasiones en que se aplique la acupunción, así como del o los acupuntos utilizados en el procedimiento (David y col, 1999; Zijlstra, 2003; Tam y col, 2007). Así se incita a generar investigaciones que muestren que condiciones de los tratamientos acupunturales son efectivas para ciertos padecimientos, de esta manera se respaldaría a las personas que proponen a la acupuntura como una terapia adyuvante en el manejo de diversas enfermedades.

Por éstos, y otros motivos, algunos autores han planteado a la acupuntura como un procedimiento efectivo para la disminución del dolor y control de la inflamación en individuos con AR.

### **III. Justificación**

Hasta ahora se ha mostrado que la AR es una enfermedad autoinmune que se manifiesta principalmente con inflamación articular. Diferentes Investigaciones muestran que esta patología es de alta prevalencia a nivel mundial, y nacional, y que la población de mayor afección son las mujeres entre los 30 y 50 años . Por otro lado se tiene que este padecimiento, está asociado con una polarización en el ratio de generación de interleucinas entre las células TH1/TH2 . Además se tiene que entre las moléculas correlacionadas con la AR se pueden encontrar al INF-  $\gamma$ , TNF-  $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-4, y el FR, por mencionar algunas. A pesar de que varias evidencias apuntan que éstos son algunos factores que promueven dicha enfermedad autoinmune hacen falta más estudios, como el presente, que refuercen esta noción.

Por otro lado se tiene que debido a la elevada prevalencia y la posibilidad de que la AR cause incapacidad en el individuo generándose así afecciones socioeconómicas y personales, se hace necesaria la indagación acerca de posibles tratamientos alternativos. Ésto debido a que los tratamientos convencionales muchas veces son inaccesibles económicamente y además pueden causar varios efectos colaterales, por lo cual diversas personas han optado por CAM's como la acupuntura. Lo anterior porque la acupuntura es una terapia que ha mostrado tener efectos clínicos en este padecimiento. Sin embargo, pocos son los estudios en donde se ha evaluado la acción de la acupuntura en patrones biológicos, como en el ratio de interleucinas TH1 y TH2, así como en la expresión de moléculas inflamatorias e inmunoglobulinas en pacientes con AR.

## **IV. Objetivos**

### 4.1 Objetivo general

Identificar variaciones en la percepción del dolor e inflamación de diferentes articulaciones, así como en la expresión de IL's Th1/Th2 y de moléculas de inflamación y observar modificaciones en los niveles proteicos séricos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el tratamiento acupuntural de los puntos Diji (B8), Zuzanli (E36), Yanglingquan (VB34), Quchi (IG11) y Hegu (IG4) en mujeres con artritis reumatoide.

### 4.2 .Objetivos particulares

- I. Distinguir cambios en el grado de dolor de los pacientes durante el tratamiento.
- II. Observar modificaciones en el diámetro de las articulaciones de las pacientes en el transcurso del tratamiento.
- III. Determinar el patrón de expresión de interleucinas Th1/Th2 en el transcurso del tratamiento
- IV. Identificar variaciones en la expresión de interleucinas pro-inflamatorias en el transcurso del tratamiento
- V. Reconocer modificaciones en los niveles séricos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el transcurso del tratamiento

## V. Material y Métodos

### 5.1 Pacientes

El estudio se realizó en 12 pacientes de sexo femenino con AR entre 45 y 60 años de edad, quienes fueron diagnosticadas según los criterios del Colegio Americano de Reumatología (*American College of Rheumatology*) (Arnett y col, 1988), que se enuncian a continuación:

1. Rigidez matutina: rigidez matutina en y alrededor de las articulaciones de al menos una hora de duración antes de su mejoría máxima.
2. Artritis de tres o más áreas articulares: al menos tres de dichas áreas tienen que presentar simultáneamente inflamación de tejidos blandos o líquido sinovial (no sólo crecimiento óseo) observados por un médico; las 14 posibles áreas articulares son las interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas (MTF).
3. Artritis de las articulaciones de las manos: manifestada por hinchazón en al menos una de las siguientes áreas articulares: muñeca, MCF o IFP.
4. Artritis simétrica: involucra simultáneamente las mismas áreas articulares (como se exige en el punto 2) en ambos lados del cuerpo (se acepta la afección bilateral de áreas IFP, MCF o MTF, ésto aunque la simetría no sea absoluta).

5. Nódulos reumatoides: nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas o en superficies extensoras o en regiones yuxtaarticulares, observados por un médico.
6. Factor reumatoide sérico: demostración de "FR" sérico positivo por cualquier método.
7. Alteraciones radiográficas: alteraciones típicas de AR en las radiografías posteroanteriores de las manos y de las muñecas, que pueden incluir erosiones o descalcificación ósea indiscutible localizada o más intensa junto a las articulaciones afectadas (la presencia única de alteraciones artrósicas no sirve como criterio).

Nota: Para que un paciente se situé dentro de la clasificación debe de presentar al menos 4 de los 7 criterios mencionados. Lo apuntado en los criterios 1 al 4 se debe de experimentar al menos por 6 semanas (Arnett y col, 1988).

Las pacientes fueron captadas con la ayuda de la Sección de Reumatología del Hospital 20 de Noviembre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE) a cargo de la Dra. Fedra Irazoque y sus colaboradores. Las pacientes recibieron tratamiento en la sección de acupuntura del mismo hospital, cuyo responsable es el Dr. Arturo Gómez. Entre los criterios de inclusión se tiene que se trataron mujeres entre 45 y 60 años de edad con diagnóstico positivo para AR, tomando en cuenta los criterios planteados anteriormente. Otro punto para el diagnóstico fue la evaluación de radiografías recientes, esto para poder identificar con mayor precisión la presencia de AR.

A las mujeres participantes se les realizó una entrevista y además el personal médico del hospital registró la historia clínica de las personas que participaron en el estudio. En el caso de las pacientes que fueron sometidas a tratamiento con agujas, ya sea del grupo con acupuntura real o con la estrategia del no punto, se les pidió que firmaran un consentimiento informado para que fueran tratadas con dichos instrumentos.

En lo que respecta a los criterios de exclusión se tiene que la paciente no tuviera enfermedades hormonales o algún otro tipo de enfermedad que comprometiera su salud. Además las mujeres candidatas debieron de especificar el tratamiento al que se estaban sometiendo durante el estudio, si consumían antiácidos o si recientemente habían cursado con un cuadro infeccioso. También se evaluó si las pacientes presentaban daño hepático y/o renal mediante los análisis de laboratorio pertinentes, cuando se detectó alguno de estos padecimientos la persona no pudo participar en el proyecto de investigación. Por último fueron eliminadas del estudio aquellas pacientes que no se presentaron a más de una sesión de terapia acupuntural y/o toma de muestra y/o presentaron un proceso infeccioso.

Con las pacientes que terminaron adecuadamente el estudio se generaron dos grupos de 6 individuos con AR cada uno, el grupo A recibió el tratamiento acupuntural que se describe más adelante. El grupo dos, que fue el grupo placebo, recibió un tratamiento en el cual se puncionó una región cercana a la ubicación del punto aceptado convencionalmente, pero no el que corresponde específicamente al acupunto del canal utilizado en el tratamiento, ni a algún otro

canal. A esta estrategia se le llama no punto y fue descrita en la sección, la acupuntura.

Todas las participantes recibieron la información relacionada con el propósito del estudio y otorgaron por escrito su consentimiento para que su sangre pudiese utilizarse para la investigación.

## 5.2 Toma de muestra sanguínea

La muestra sanguínea consistió en la extracción 10 - 18 ml de sangre venosa periférica colectada de 8 - 9 am, en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA) y con gel separador. Cabe mencionar que la primera muestra sanguínea fue recolectada antes de la sesión número uno del tratamiento acupuntural o con la estrategia del no punto, la segunda muestra fue tomada 15 -16 h después de la quinta sesión acupuntural y la última muestra se obtuvo 15 -16 h posteriores a la 10ª sesión de terapia.

## 5.3 Evaluación del grado de dolor

Para evaluar el grado de dolor en articulaciones de los tres grupos incluidos en el estudio se usó la Escala Visual Análoga (EVA) (Tam y col, 2007). A través de esta estrategia se le pidió al paciente clasificar su dolor en una escala de 0 a 10, en donde cero es ausencia de dolor, de 1 a 4 se considera dolor leve, de 5 a 6 se plantea que el dolor es de intensidad moderada y de 7 a 10 el dolor es severo. En el caso de las pacientes con AR se aplicó la EVA antes, durante y después del

tratamiento, no importando si fue acupuntura real o no punto a los pacientes de todos los grupos en estudio.

#### 5.4 Medición de las articulaciones

Además a las mujeres con AR se les midió el diámetro de algunas articulaciones, humero-cubital, articulación rotuliana, interfalángicas proximales de los dedos de las manos, durante el transcurso de su tratamiento, esto para observar si hubo cambios en el grado de inflamación relacionado con el tratamiento. Esto unos instantes antes de iniciar cada uno de sus 10 tratamientos acupunturales.

#### 5.5 Tratamiento acupuntural

El tratamiento acupuntural que se aplicó en el presente estudio se basó en algunos puntos que se utilizan de forma cotidiana en la clínica de acupuntura de la ENMyH del IPN, así como en algunos trabajos previamente reportados (Hecker, 2007; Tam y col, 2007; Shen Weixing, 2004) en pacientes con AR. Se utilizaron los puntos Diji (B8), Zuzanli (E36), Yinliquan (VB34), Quchi (IG11) y Hegu (IG4), las ubicaciones anatómicas de los puntos se pueden observar en la tabla 1 (Hecker, 2007). Los acupuntos fueron puncionados con agujas, sin ninguna estimulación extra, por 20 min dos veces semanales hasta completar 10 sesiones. Las agujas fueron de acero inoxidable, estilo chino, de una pulgada y de la marca Nature.

**Tabla 1.** Ubicación de los puntos acupunturales

Punto acupuntural	Ubicación anatómica
Diji (B8)	Borde Posterior de la tibia. Tres pulgadas distal al punto B9, en la línea del punto conector B9 y la prominencia del maléolo medial.
Zuzanli (E36)	Con la rodilla un poco flexionada, 3 pulgadas debajo del punto E35 aproximadamente al nivel del límite inferior de la tuberosidad de la tibia, alrededor de un ancho del dedo medio lateral al borde anterior de la tibia, en el musculo tibial anterior.
Yinliquan (VB34)	En la depresión anterior e inferior del peroné.
Hegu (IG4)	En el ángulo formado por los extremos proximales del 1º y 2º metacarpiano, en un hueco.
Quchi (IG11)	Lateral a la terminación radial del pliegue del codo cuando el antebrazo esta flexionado en un ángulo recto, en una depresión entre el final del pliegue y el epicóndilo lateral en el área del músculo extensor radial largo de la muñeca.

## 5.6 Extracción de ARN

Primeramente se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) de leucocitos, esto se realizó utilizando el Kit para aislamiento de ARN, RNeasy de QIAGEN.

Brevemente, se mezcló un volumen de sangre con 5 volúmenes de buffer EL en un tubo falcon de 50 ml y se incubó 15 min en hielo. La suspensión resultante se observó traslúcida, indicándose así la lisis de los eritrocitos. Posteriormente se centrifugó la solución a 400 g por 10 min a 4°C, se removió y descartó el sobrenadante. Una vez realizada la centrifugación se adicionó buffer EL nuevamente, en esta ocasión agregando dos volúmenes de buffer por cada volumen de sangre usado en el primer paso y se resuspendieron las células por vórtex. Consecutivamente se centrifugó a 400 g por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se guardó la pastilla de leucocitos. Posteriormente se procedió a deshacer la pastilla por agitación con vortex y se adicionó un volumen apropiado de mezcla de buffer RLT-  $\beta$ -mercaptoetanol<sup>1</sup>. Para saber que volumen de buffer RLT se ocupara ver Tabla 2. Después se aplicó vortex para mezclar.

---

<sup>1</sup> Para generar la mezcla se añadieron 10  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol por mililitro de buffer (para conocer la cantidad de buffer a utilizar ver tabla 3).

**Tabla 2.** Ajuste de Buffer RLT según cantidad de sangre.

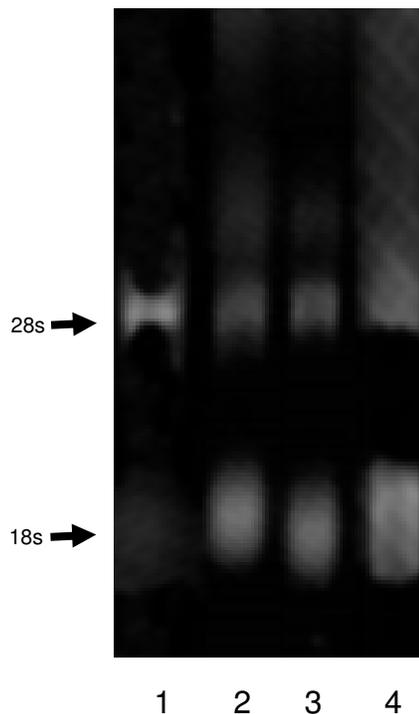
Numero de leucocitos	Cantidad equivalente de sangre	Buffer RLT (ml)
$\leq 3 \times 10^7$	$\leq 4.0$	2.0
$3 \times 10^7 - 1 \times 10^8$	$\leq 4.0 - 10$	4.0

A continuación se homogenizaron los leucocitos usando vórtex por 45 s a máxima velocidad hasta que la muestra se mostró homogénea. Se adicionó un volumen de 2 a 4 ml de etanol al 70% para homogenizar el lisado, y se mezcló por agitación vigorosa. Después se aplicó la muestra, incluyendo el precipitado que pudo haberse formado, a una columna RNeasy puesta en un tubo de centrifuga de 15 ml, se centrifugó por 5 min a 3500 g y se descartó el sobrenadante. En caso de que el volumen de la muestra al añadir el alcohol exceda a 4 ml centrifugar de 4 ml en 4 ml hasta que se termine la mezcla. Posteriormente se adicionaron 4 ml de buffer RW1 a la columna RNeasy, se centrifugó 5 min a 3500 g para lavar la columna y se descartó el sobrenadante. Se agregó 2.5 ml de buffer RPE a la columna, se centrifugó 2 min a 3500 g para lavar la columna. Consecutivamente se añadieron otros 2.5 ml de buffer RPE a la columna y se centrifugó por 5 min a 3500 g para secar la membrana de la columna. Por último se transfirió la columna a un tubo de colección de 15 ml nuevo, se pipeteó un volumen de 100  $\mu$ l de agua libre de RNasa directamente en la membrana de la columna, se dejó reposar por un minuto y se centrifugó por 3 min a 3500 g. Sin descartar el sobrenadante se

repitió el paso anterior dos veces y el último eluido, que fue de 300 µl, donde ya se tiene el ARN, se colocó en un tubo ependorf de 1.5 ml.

### 5.7 Determinación de la integridad, concentración y pureza del ARN

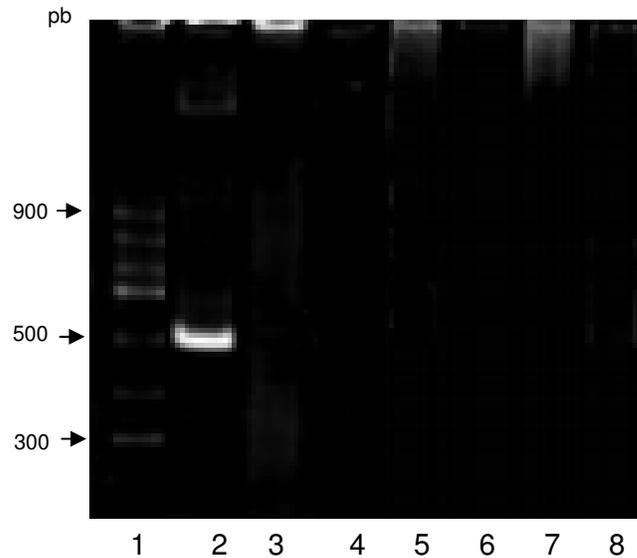
Una vez aislado el ARN se cuantificó su concentración y se observó su pureza por medio de un análisis de absorbancia de cada muestra a 260/280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Beckman. Después para verificar su integridad se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa desnaturizante con formaldehído al 1.2% (Figura 4).



**Figura 4. ARN de cuatro pacientes diferentes corridos en un gel de agarosa desnaturizante con formaldehído al 1.2%. Carriles 1 y 2 pacientes con AR tratadas con punto; carriles 3 y 4 pacientes con AR tratadas con no punto.**

## 5.8 Tratamiento con DNAsa

Posteriormente se procedió a limpiar el ARN de posibles trazas de ADN, para esto se realizó lo siguiente, se incubaron 150  $\mu$ l de ARN con 20  $\mu$ l de buffer 10x para la enzima RQ1, 26  $\mu$ l de agua DEPC y 4  $\mu$ l de enzima RQ1 (Promega) por 15 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la enzima con 1  $\mu$ l de EDTA 2.5mM y se incubó a 65°C por 10 min. Por otro lado, con la finalidad de comprobar que el ARN, una vez tratado con DNAsa, no contenía ya trazas de DNA se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen de *actina* bajo las siguientes condiciones, se agregaron 10  $\mu$ l de Buffer 10x, 1  $\mu$ l de dNTP's, 1  $\mu$ l de oligonucleótido sentido (100ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de oligonucleótido antisentido (100ng/ $\mu$ l), 6  $\mu$ l de MgCl, 20  $\mu$ l de solución Q, 59.7  $\mu$ l de agua de ampolleta, 5  $\mu$ l de RNA y 0.3  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa. La reacción se realizó aplicando los siguientes ciclos 92°C 2 min, (92°C 20s, 50°C 20s, 72°C 30s) 35x, 72°C 5 min y 4°C. El producto de amplificación se corrió en un gel de acrilamida al 12 % a 70V por 2 h 30 min. Como se puede observar en la figura 5 las PCR's realizadas con el ARN templado de las pacientes con AR no amplificaron el fragmento de ADN de 500 pb esperado para el gen de *actina*. Mientras que el control positivo que fue una PCR realizada con ADN total de una persona sana amplificó un fragmento de 500 pb correspondiente al gen anteriormente mencionado (Figura 5). *Estos resultados nos comprobaron que los ARN's estuvieron libres de trazas de ADN.*



**Figura 5. Amplificación del gen de *actina*.** Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 2, PCR para el gen de *actina* con un ADN control; carriles 3, 4 y 5, PCR para el gen de *actina* usando como templado ARN's de tres pacientes tratadas con punto; carriles 6, 7 y 8, PCR para el gen de *actina* usando como templado ARN's de pacientes tratadas con no punto.

Asimismo para comprobar que el ARN era funcional se realizó una reacción en cadena de la polimerasa reversa de un solo paso para el gen de *actina* y el procedimiento fue el siguiente: se colocó 1 µg de ARN (5 µl), 10 µl de buffer AMV/TF1, 1 µl de dNTP's, 1 µl de oligonucleótido sentido (100ng/µl), 1 µl de oligonucleótido antisentido (100ng/µl), 1 µl de RT, 2 µl de MgSO<sub>4</sub>, 78 µl de agua de ampolleta y 1 µl de enzima TAMF1, del kit Acces RT-PCR (Promega). Los ciclos de amplificación fueron de 42°C 1 h, 92°C 2 min, (92°C 20s, 50°C 20s, 72°C 30s) 35x, 72°C 5 min y 4°C. El producto de amplificación se corrió en un gel de acrilamida al 12 % a 70V por 2 h 30 min.

## 5.9 Transcripción reversa

Una vez aislado, cuantificado y asegurándose que el ARN total estaba libre de trazas de DNA, se realizó la síntesis de ADN complementario (cADN) a través de una reacción de transcripción reversa (RT) catalizada por la enzima transcriptasa reversa, la cual sintetiza una cadena de ADN sobre un molde de ARN (Alberts, 2004). Este es el paso antecesor a una PCR, lo cual en conjunto con la RT se ha denominado reacción en cadena de la polimerasa- transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Ésto se realizó a partir del ARN total obtenido de cada una de las personas incluidas en el estudio.

Para realizar la RT se mezcló en un tubo de PCR 1  $\mu$ l de oligo dT, 1  $\mu$ l de buffer *annealing* y 1  $\mu$ g de RNA, ésto se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente se incubó en hielo 1 min y se centrifugó para colectar la mezcla generada. Después, en hielo se agregaron 2  $\mu$ l de la mezcla de reacción *2x first strand*, 2  $\mu$ l de la mezcla Superscript III/ RNase out, del kit Superscript III First Strand. Se dio vortex brevemente, se centrifugó e incubó a 50°C por 50 min, luego a 85°C por 5 min y por último se almacenó a -20°C para después realizar las PCR's.

Con el cDNA sintetizado lo primero que se realizó fue una PCR para amplificar el gen de *actina* y verificar la funcionalidad del cDNA. Esto se realizó con el siguiente protocolo, se agregaron 10  $\mu$ l de Buffer 10x, 1  $\mu$ l de dNTP's, 1  $\mu$ l de oligonucleótido sentido (100ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de oligonucleótido antisentido (100ng/ $\mu$ l), 6  $\mu$ l de MgCl, 20  $\mu$ l de solución Q, 59.7  $\mu$ l de agua de ampolleta, 5  $\mu$ l de cDNA y 0.3  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa. La reacción se realizó aplicando los

siguientes ciclos 92°C 2 min, (92°C 20s, 50°C 20s, 72°C 30s) 35x, 72°C 5 min y 4°. El producto de amplificación se observó en un gel de acrilamida al 12% y se corrió a 70V por 2 h 30 min.

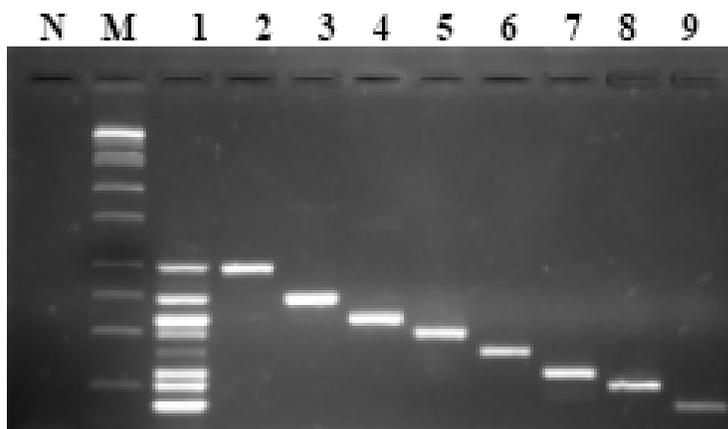
#### 5.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (M-PCR)

Una vez realizado lo anterior se utilizó una PCR Múltiple (M-PCR) la cual a diferencia de la PCR normal no sólo sirve para amplificar una sola secuencia de ADN sino varias en una misma reacción. Con el objetivo de observar la expresión de las interleucinas Th1/Th2 se utilizó el kit Maxim's Human Th1/ Th2 Set2 (Maximbio) (ciclo de amplificación en la tabla 3). Este kit permite detectar la expresión de las siguientes interleucinas humanas: INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL10, IL-12 (p40) e IL-13. Los oligonucleótidos tienen una temperatura Tm (por sus siglas en inglés, *melting temperature*) a la cual se alinean a su secuencia complementaria, muy similar, además no tienen zonas 3' de traslape parecidas, lo que eficientiza la amplificación múltiple. Los tamaños moleculares de los amplificadores se muestran en la tabla 3 y en la figura 6. En este kit se utilizó como control interno el gen *gadph*.

Asímismo el patrón de expresión de moléculas de inflamación en los pacientes se realizó utilizando el kit MPCR para genes de interleucinas inflamatorias III (Maximbio). Los genes de interleucinas inflamatorias a evaluar fueron: GM-SCF, GM-CSFR, I $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R (gpBO), IL-8, NFK $\beta$ , SSI-1, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNFR-I y TNFR-II. Los tamaños esperados para los genes de interleucinas pro-inflamatorias se pueden observar en la tabla 4 y su corrimiento electroforético se indica en la figura 7.

**Tabla 3.** Tamaños moleculares de las interleucinas Th1/Th2 de humano (Maximbio).

Gen	Tm oligonucleótidos sentido y antisentido	Tamaño de amplificado (pb)	Tamaño real del gen completo (pb)
IL-12	68 <sup>o</sup> / 68 <sup>o</sup> C	390	2807
IL-10	67 <sup>o</sup> / 68 <sup>o</sup> C	334	2498
IL-2	70 <sup>o</sup> / 68 <sup>o</sup> C	300	2680
GADPH	63 <sup>o</sup> / 63 <sup>o</sup> C	500	2534
INF- $\gamma$	67 <sup>o</sup> / 70 <sup>o</sup> C	262	1596
IL-13	68 <sup>o</sup> / 68 <sup>o</sup> C	177	524
IL-4	68 <sup>o</sup> / 65 <sup>o</sup> C	225	2823
IL-5 humano	66 <sup>o</sup> / 67 <sup>o</sup> C	205	1363

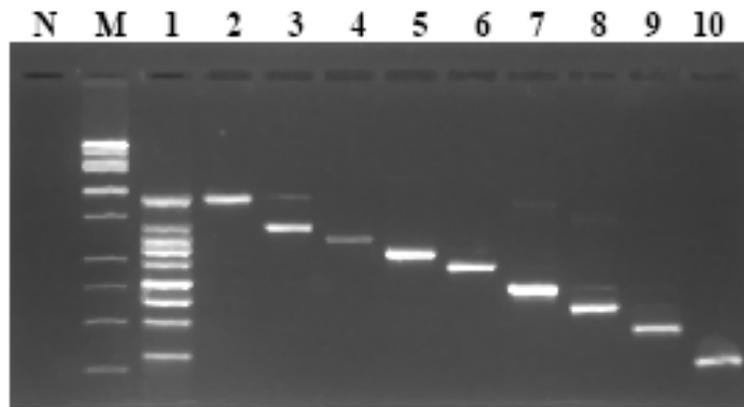


**Figura 6. Amplificación de fragmentos de los genes de las moléculas Th1/Th2.**

N, PCR interleucinas TH1/ TH2 sin oligonucleótidos (control negativo); M, marcador de tamaño molecular de 100 pb para ADN; carril 1; PCR usando los siete juegos de oligonucleótidos para amplificar los siete genes (control positivo); carril 2, PCR del gen de GADPH (500pb); carril 3, PCR para el gen de IL-12 (390pb); carril 4, PCR para el gen de IL-10 (334pb); carril 5, PCR para el gen de IL-2 (300pb); carril 6, PCR usando para el gen de INF- $\gamma$  (262pb); carril 7, PCR para el gen de IL-4 (225pb), carril 8, PCR para el gen de (205pb); carril 9, PCR para el gen de IL-13 (177pb) (Maximbio, 2003).

**Tabla 4.** Tamaños moleculares de los amplificadores de las interleucinas pro-inflamatorias.

Gen humano	Tm 5' / 3'	Tamaño esperado (pb)	Tamaño real del gen completo (pb)
TNF- $\alpha$	66° C/ 66° C	682	1783
TNFR-1	66° C/ 66° C	490	3212
TNFR-2	66° C/ 66° C	225	225
IL-1 $\beta$	70° C/ 71° C	556	3052
IL-6	72° C/ 73° C	358	2284
IL6R	72° C/ 73° C	301	6659
GM-CSF	72° C/ 73° C	415	2017
GM- CSFR	69° C/ 70° C	609	609
GAPDH	63° C/ 64° C	921	3149



**Figura 7. Amplificación de fragmentos de los genes de las moléculas proinflamatorias.**

N, PCR interleucinas pro-inflamatorias sin oligonucleótidos (control negativo); M, marcador de peso molecular para ADN; línea 1; PCR usando los 9 juegos de oligonucleótidos para las moléculas proinflamatorias (control positivo); línea 2, PCR para el gen de GADPH (609pb); línea 3, PCR el gen de TNF- $\alpha$  (682pb); línea 4, PCR para el gen de GM-CSFR (334pb); línea 5, PCR para el gen de IL-1 $\beta$  (556pb); línea 6, PCR para el gen de TNFR1 (490pb); línea 7, PCR para el gen de GM-CSF (415pb), línea 8, PCR para el gen de IL-6 (358pb); línea 9, PCR para el gen de IL-6R (301Pb), línea 10, PCR para el gen de TNFR2 (225pb) (Maximbio, 2003).

La técnica que se utilizó para realizar las reacciones de MPCR fue la siguiente:

Se preparó la siguiente mezcla de reacción con los buffers proveídos por el kit de MPCR de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 5.** Mezcla para realizar el MPCR

Volumen	Reactivo
12.5 $\mu$ l	Mezcla de Buffer MPCR 2x
2.5 $\mu$ l	Mezcla MPCR 10x (Oligonucleótidos para interleucinas TH1/TH2 o moléculas proinflamatorias)
0.3 $\mu$ l	Taq ADN polimerasa (5u/ $\mu$ l)
5 $\mu$ l	ADN muestra o ADNc 10x control del kit
4.75 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Una vez preparada la mezcla se utilizó un programa de temperaturas que se muestra en la tabla 6 para las moléculas Th1/Th2 y en la tabla 7 para las moléculas inflamatorias.

**Tabla 6.** Ciclo de amplificación de la MPCR de moléculas Th1/Th2.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96° C	1min	2
59° C	4min	
94° C	1min	35
59° C	2min	
70° C	10min	1
25° C	Dejar a esta temperatura	

**Tabla 7.** Ciclo de amplificación de la MPCR de moléculas proinflamatorias.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96° C	1min	2
63° C	4min	
94° C	1min	35
63° C	2min	
70° C	10min	1
25° C	Dejar a esta temperatura	

Posteriormente los productos obtenidos de las diferentes amplificaciones se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8.5% por 2:30 h a 70 V. En seguida los geles se tiñeron con bromuro de etidio para identificar las bandas de cada producto amplificado utilizando como referencia un marcador estándar de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen). Finalmente los productos amplificados de cada gel se evaluaron en el densitómetro.

### **5.11 Enzimo inmunoensayo (ELISA)**

Con el fin de reconocer cambios en los niveles séricos de algunas interleucinas, como el TNF- $\alpha$  y el INF- $\gamma$ , se utilizó el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA, (por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), tipo sándwich. Esto se realizó con el kit de Quantikine.

Para realizar el ensayo de TNF- $\alpha$  se prepararon los reactivos y soluciones de trabajo de la siguiente manera: 20ml de buffer de lavado se diluyeron en 480 ml de agua destilada, esto para preparar un volumen final de 500 ml. A 20 ml de diluyente calibrador RD6-35 se le adicionó 80ml de agua destilada. La solución estándar de TNF- $\alpha$  se reconstituyo con 1.2 ml de diluyente calibrador RD6-21, esto produjo una solución stock de 10000pg/ml, fue necesario que la solución estándar se agitara por 15 min antes de utilizarla. Por su parte la solución sustrato se realizó 15 min antes de usarla mezclando volúmenes iguales de los reactivos de color A y B, cabe mencionar que se requieren 200  $\mu$ l de la mezcla de estos dos reactivos por cada pozo que se esté utilizando.

Por otro lado para realizar el ensayo de INF- $\gamma$  se prepararon los reactivos y soluciones de trabajo de la siguiente manera. El buffer de lavado y la solución sustrato se prepararon de la misma manera que la del TNF- $\alpha$ . La solución estándar de INF- $\gamma$  se reconstituyó con 5.5 ml de diluyente calibrador RD6-21, esto produjo una solución stock de 1000pg/ml, fue necesario que la solución estándar se agitara por 15 min antes de utilizarla.

Para cada molécula se realizó una curva estándar para poder calcular la concentración de las muestras problema tanto para el TNF- $\alpha$  como para IFN- $\gamma$ , para esto se hizo lo siguiente. Se pipetearon 900  $\mu$ l del diluyente calibrador RD6-35, en el caso del TNF- $\alpha$ , y 500 ml del diluyente calibrador RD6-21, en el caso del IFN- $\gamma$ , en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Para el TNF- $\alpha$  se agregaron 100  $\mu$ l de la solución estándar reconstituida al tubo con la solución calibradora, mientras que para el IFN- $\gamma$  se agregaron 500  $\mu$ l de su solución estándar. La solución anterior se mezcló por vortex, y 500  $\mu$ l de dicha solución se mezclaron con 500  $\mu$ l de

calibrador RD6-35 y RD6-21, para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  respectivamente, que previamente se tenían en otro tubo eppendorf. Esto se realizó 5 veces más para TNF- $\alpha$  y así se obtuvieron soluciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 pg/ml de concentración. Mientras que para IFN- $\gamma$  solo se realizaron 4 diluciones mas obteniéndose soluciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 pg/ml.

Una vez teniendo las soluciones para realizar la curva estándar, así como todas las demás sustancias para trabajar, se procedió a realizar el ensayo. Primero se agregaron 100  $\mu$ l de assay Diluent RD1F para TNF- $\alpha$  y del RD1-51 para IFN- $\gamma$  a cada pozo, luego se adicionaron 200  $\mu$ l o 100  $\mu$ l de solución estándar, muestra o control por pozo, para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  respectivamente. Se cubrió la placa con una banda adhesiva provista por el kit y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Una vez transcurridas las dos horas se lavo la placa con el buffer de lavado, 4 veces, esto con la ayuda de una piceta. Es necesario remover bien todo el liquido. Después del último lavado se eliminó el buffer remanente mediante decantamiento, para esto se invirtió la placa en una toallita de papel por algunos segundos. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ l de conjugado de TNF- $\alpha$  o INF- $\gamma$ , según fue el caso, a cada pozo, se cubrió de nuevo la placa con una banda adhesiva y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Transcurridas las dos horas se lavó la placa como previamente se describió y una vez seca se le adicionaron 200  $\mu$ l de solución sustrato recientemente preparada a cada pozo, y se incubó a temperatura ambiente por 20 min, en el caso del TNF- $\alpha$ , y 30 min, en el caso de IFN- $\gamma$ , esto asegurándose que a la placa no le diera la luz. Al terminar los 20 min se agregaron 50  $\mu$ l de solución paro a cada pozo, el color del pozo cambio de azul a amarillo. Por último se determinó la densidad óptica en un

microlector de placas Epoch (BioTek), esto a una longitud de onda de 450nm con una corrección de longitud de onda a 540nm.

Finalmente se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos para el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  para posteriormente extrapolar los datos obtenidos de cada paciente para cada molécula y graficarlos.

## **VI. Resultados**

### 6.1 Pacientes

Se captaron en total 22 pacientes del sexo femenino que acudieron al departamento de acupuntura del Hospital 20 Noviembre del ISSSTE entre Junio del 2009 y Abril del 2010. A cada paciente se le elaboró su historia clínica por parte del personal médico del hospital y se determinó si cumplía o no con los criterios de inclusión/exclusión para la realización de este protocolo. Las pacientes que aceptaron participar firmaron la carta de consentimiento informado y se les dio un calendario en el que se especificaba los días cuando se les aplicaría su tratamiento y cuando se realizaría su toma de muestra.

De las 22 pacientes que acudieron al departamento de acupuntura se eliminaron 10 debido a que no cumplían con los criterios de inclusión o bien presentaron uno o más de los criterios de exclusión, como fue presentar una crisis de la enfermedad por una inflamación severa de diferentes articulaciones que les impedía moverse. Asimismo es importante mencionar que ocho de las 22 pacientes abandonaron su participación en este protocolo, por lo que fueron excluidas de este. Finalmente, 12 pacientes fueron las que concluyeron correctamente todo el tratamiento y acudieron en las fechas asignadas a realizarse las tomas de muestra. Estas personas fueron incluidas aleatoriamente conforme se fueron presentando al hospital en dos grupos, el grupo A, que fue de seis mujeres tratadas con acupuntura real, y el grupo B, que fue de seis pacientes a las que se les aplicó la punción en no punto. La edad de las pacientes estuvo entre los 45 y 60 años, teniéndose al final ocho pacientes en el rango de entre 45

y 50 años y 4 entre 51 y 60 años. Asimismo el tiempo de inicio de su enfermedad está entre 9 y 11 años.

## 6.2 Evaluación de la intensidad del dolor

El dolor es un síntoma característico de las personas que padecen AR y la percepción de su intensidad se ha registrado, por muchas instituciones como el Colegio Americano de Reumatología, a través de la escala EVA. Por este y otros motivos antes de la aplicación de cada tratamiento a cada paciente, se le evaluó su percepción del dolor en articulaciones mediante dicha escala. Los resultados para esa prueba se promediaron para cada grupo, se graficaron y se estudiaron mediante un análisis estadístico exploratorio y a través de la prueba t de Student.

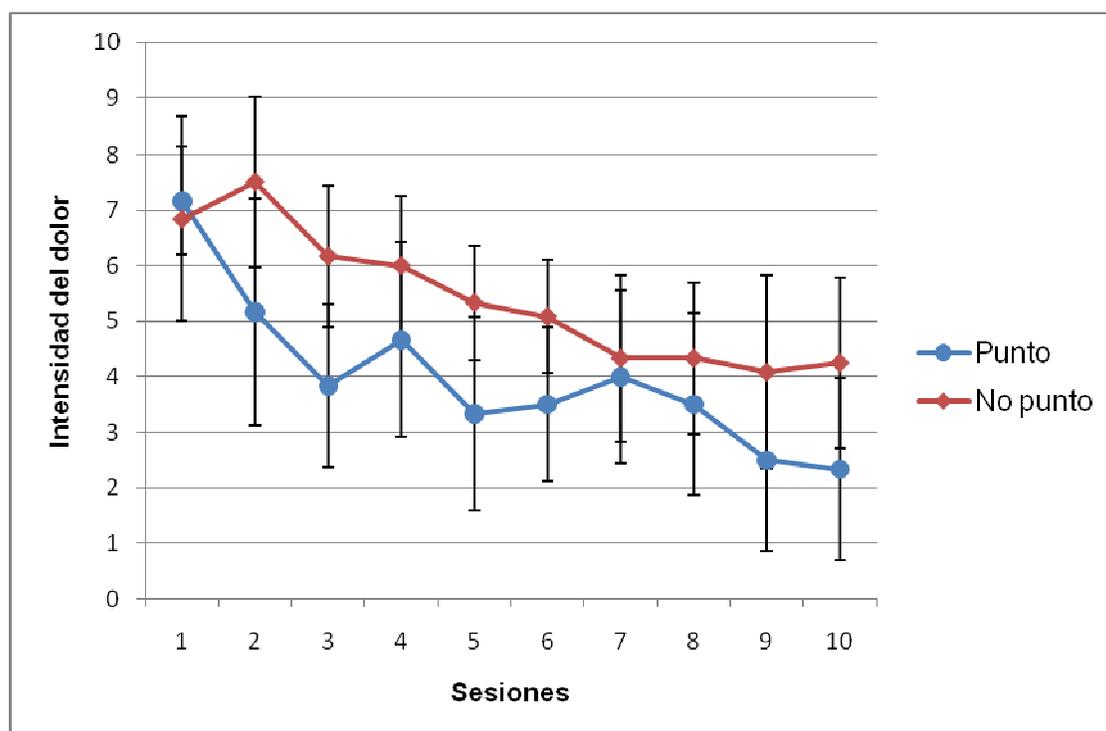
La estadística descriptiva (Mendenhall, 1991) para la calificación asignada a la intensidad del dolor en pacientes de ambos tratamientos, por sesión, se muestra en la tabla 8. En dicha tabla se exponen las unidades de estudio, el valor medio, el mínimo, el máximo y la desviación estándar de la calificación asignada a la intensidad del dolor en pacientes tratadas de ambos grupos (punto y no punto), de las diez sesiones de terapia. Los resultados fueron gráficos y se muestran en la figura 8.

**Tabla 8. Estadísticas descriptivas de la calificación a la intensidad del dolor en pacientes tratadas en ambos métodos, por sesión.**

Sesión	Método	Unidad de estudio	Media	Mínimo	Máximo	Desviación
1	Punto	6	7.2	6	8	0.98
	No punto	6	6.8	4	8	1.83
2	Punto	6	5.2	2	8	2.04
	No punto	6	7.5	6	10	1.52
3	Punto	6	3.8	2	6	1.47
	No punto	6	6.2	4	8	1.28
4	Punto	6	4.7	2	6	1.75
	No punto	6	6.0	4	7	1.26
5	PUNTO	6	3.3	1	6	1.75
	NO PUNTO	6	5.3	4	7	1.03
6	Punto	6	3.5	1	5	1.38
	No punto	6	5.1	4	7	1.02
7	Punto	6	4.0	3	7	1.55
	No punto	6	4.3	3	7	1.50
8	Punto	6	3.5	1	5	1.64
	No punto	6	4.3	3	7	1.37
9	Punto	6	2.5	0	5	1.64
	No punto	6	4.1	2	7	1.74
10	Punto	6	2.3	0	5	1.63
	No punto	6	4.2	3	7	1.54

En la figura 6 se observa que el grupo al que se le aplicó acupuntura real (grupo A) presentó una disminución evidente en el grado de dolor, la cual se manifestó desde la segunda y tercera sesión, y mayor comparada con la observada en el grupo B (grupo en el que se insertaron las agujas en sitios no punto) en las mismas sesiones. La tendencia de disminución en el grado de dolor

se observó a lo largo del tiempo de tratamiento pasando de una intensidad de dolor “grado 7” a una “grado 2” en el grupo A. Mientras que, las pacientes del grupo B mostraron también una disminución en la intensidad del dolor de 7 a 4, no obstante esta disminución fue menor a la observada en el grupo tratado con acupuntura real (Figura 8).



**Figura 8. Intensidad del dolor en pacientes con AR tratadas punto y no punto.**

Sin embargo, en el análisis estadístico de los datos tanto del grupo A como del grupo B al aplicar la prueba t de Student con una  $\alpha = 0.01$  y la  $p = 0.0643$ , mostró que al final del tratamiento en la sesión 10, si bien la EVA del grupo A fue de 2.3 y la del grupo B de 4.2 no es estadísticamente significativa la diferencia entre los valores de los dos grupos.

Ahora si bien los resultados anteriores obtenidos con la prueba t de Student indican que no es significativa la diferencia en los valores de EVA entre los dos grupos. No obstante de acuerdo con el análisis exploratorio realizado si hay una tendencia en la que la disminución de la intensidad del dolor fue mayor en las pacientes del grupo A que del grupo B. Estos resultados entonces nos sugieren que la acupuntura esta generando alguna señal o señales que están favoreciendo una disminución en el grado de dolor de las pacientes con AR.

### 6.3 Inflamación de las articulaciones

Otro de los principales síntomas de la AR es la inflamación de diferentes articulaciones, en donde de acuerdo con el Colegio Americano de Reumatología los codos, muñecas, rodillas, tobillos e interfalángicas proximales de los dedos de las manos son las que preponderantemente se inflaman. Por tal motivo valoramos si el diámetro de estas articulaciones de las pacientes con AR cambiaba. Cabe mencionar que la medida del diámetro que cada articulación presentó en la primera sesión se tomó como 100% de inflamación. Esto debido a que todas las pacientes tenían inflamadas sus articulaciones desde el inicio del estudio, los resultados se representan de las figuras 9 a la 13.

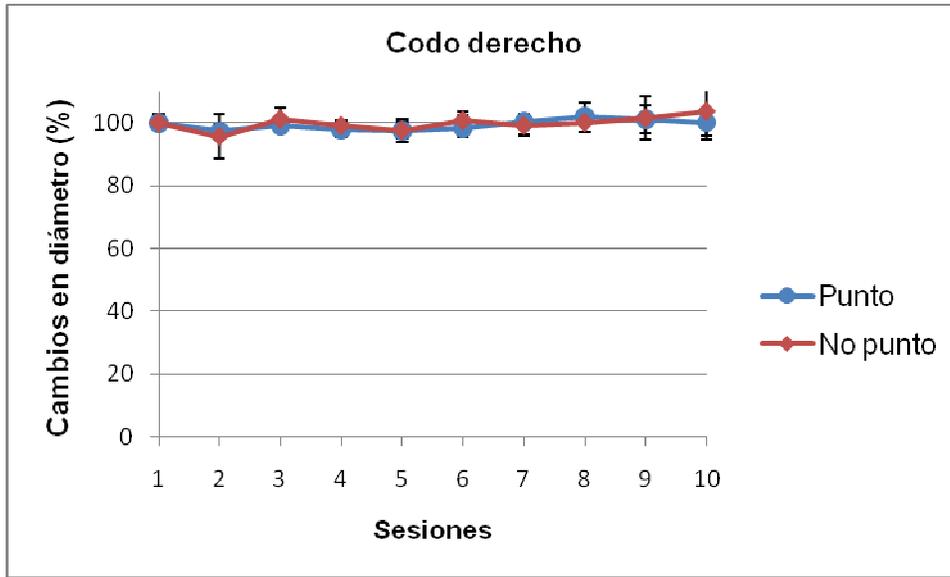
Los resultados de las mediciones de las articulaciones de las pacientes con AR mostraron que todas las pacientes incluidas en el estudio, tanto del grupo A, como del B no mostraron cambios significativos en el grado de inflamación de los codos, muñecas y rodillas tanto derecha como izquierda a lo largo de todo el tratamiento con acupuntura. Esto debido a que al realizar el análisis estadístico con la prueba t de Student obtuvimos una p promedio de 0.5 con una  $\alpha$  de=0.01

(Figuras 9- 11). Únicamente se observó una ligera disminución en la inflamación de las rodillas derecha e izquierda en las sesiones 9 y 10 con respecto a la inflamación detectada en la sesión 1, así como con la observada en estas mismas sesiones en las pacientes del grupo B. Sin embargo no es significativa esta diferencia.

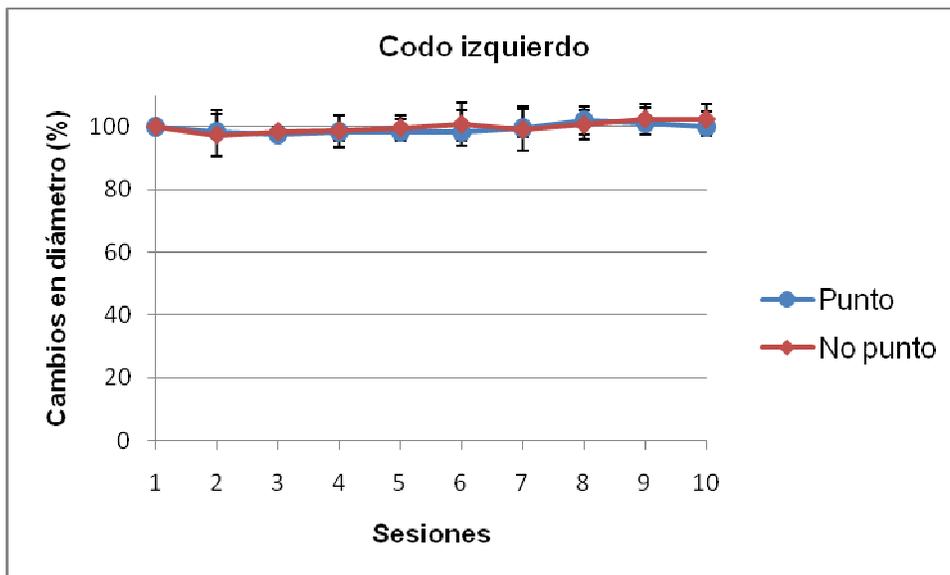
Ahora bien la inflamación observada en los tobillos derecho e izquierdo no mostró una variación significativa a lo largo de todo el tratamiento en las pacientes con AR del grupo A. Sin embargo, la inflamación de esta articulación, tanto derecha, como la izquierda en las pacientes del grupo B fue ligeramente mayor a partir de la séptima y hasta la conclusión del tratamiento (Figura 12).

Con respecto a las articulaciones interfalángicas de los dedos de la mano, si bien observamos inflamación en todas ellas desde el inicio del estudio, esta inflamación no disminuyó de forma significativa en el transcurso del tratamiento en ninguna de las pacientes del grupo A y B. Por lo que el tratamiento aplicado no fue eficaz en disminuir la inflamación de las articulaciones estudiadas, al menos con los puntos empleados y en el tiempo de tratamiento aplicado.

A)

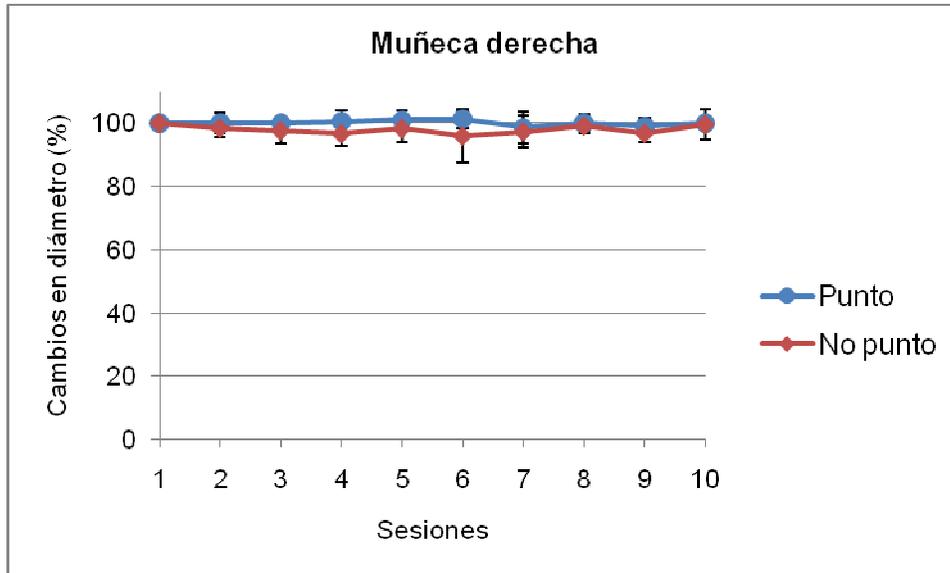


B)

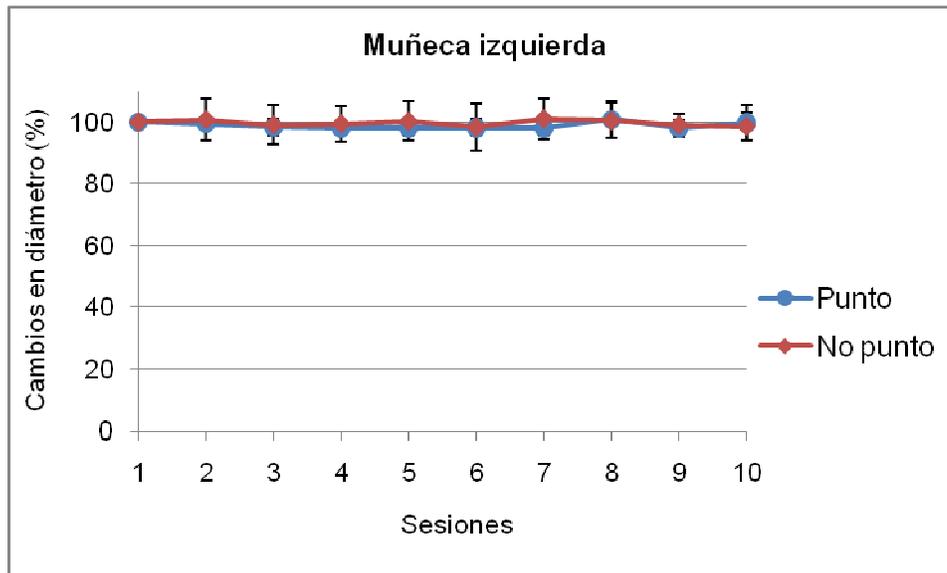


**Figura 9. Cambios en el diámetro en el codo de las pacientes con AR del grupo A y B durante su tratamiento. A. Codo derecho y B. Codo izquierdo.**

A)

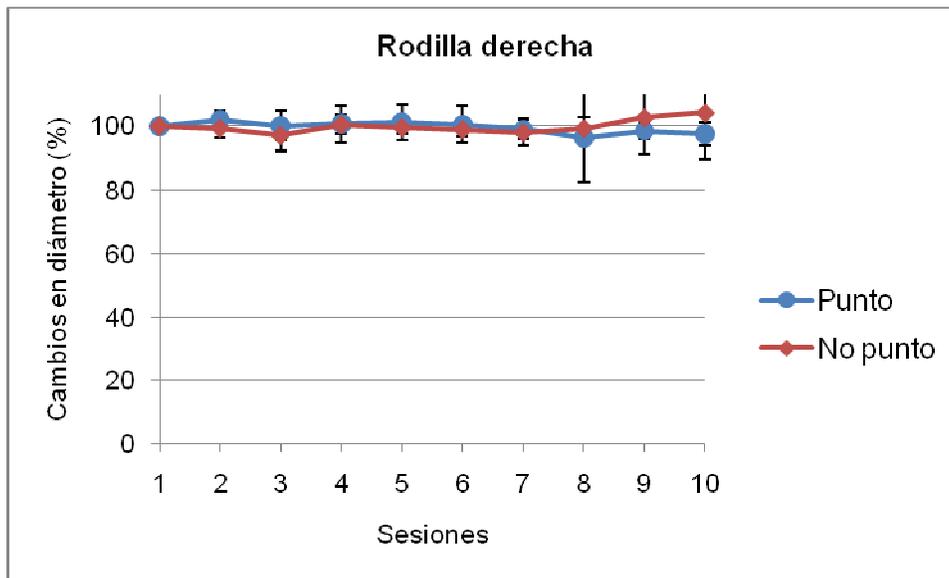


B)

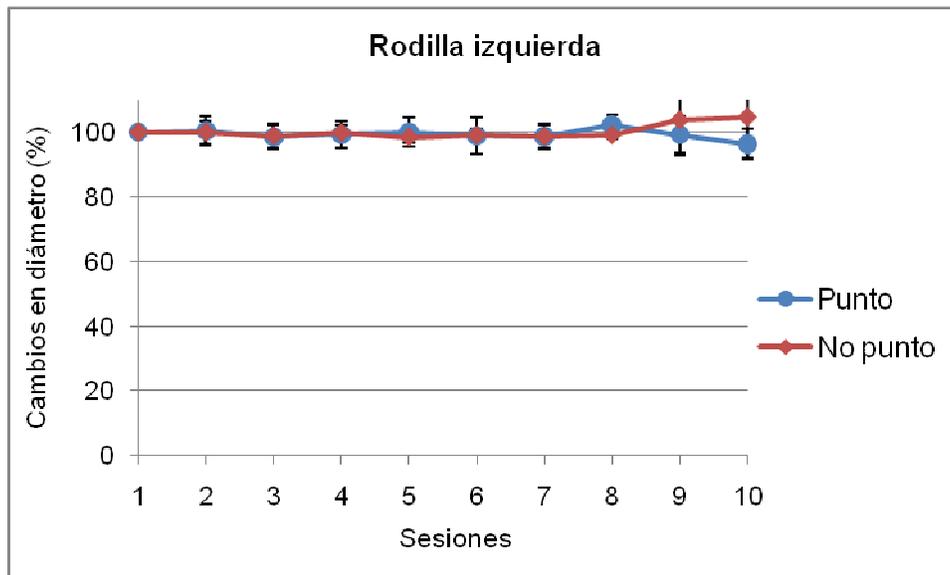


**Figura 10. Cambios en el diámetro en la muñeca de las pacientes con AR del grupo A y B durante su tratamiento. A. Muñeca derecha y B. Muñeca derecha.**

A)

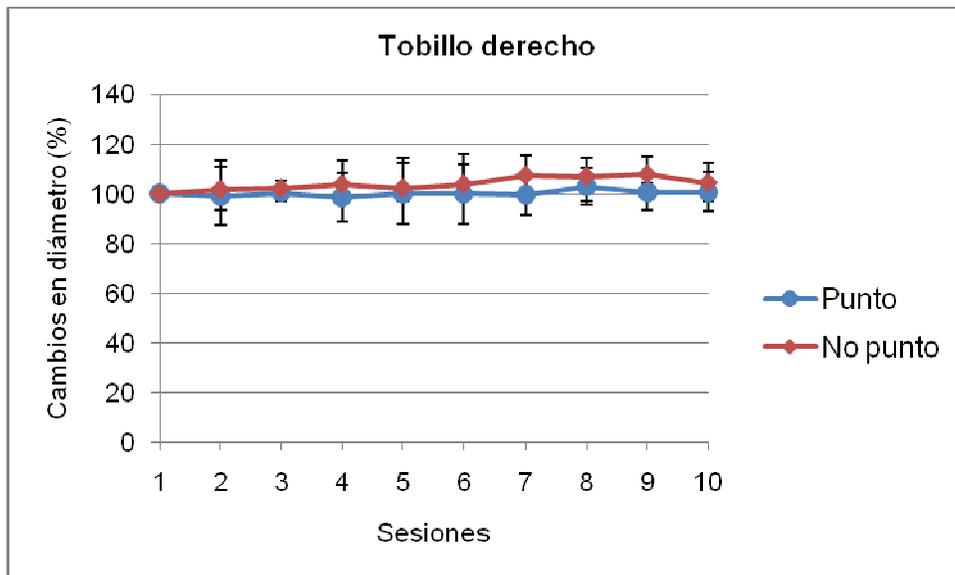


B)

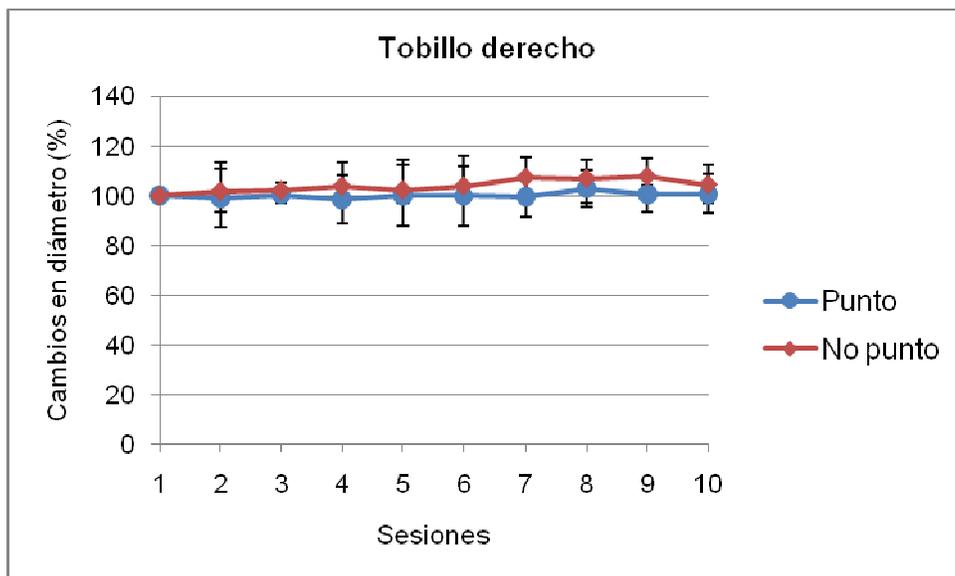


**Figura 11. Cambios en el diámetro en la rodilla de las pacientes con AR del grupo A y B durante su tratamiento. A. Rodilla derecha y B. Rodilla derecha.**

A)



B)



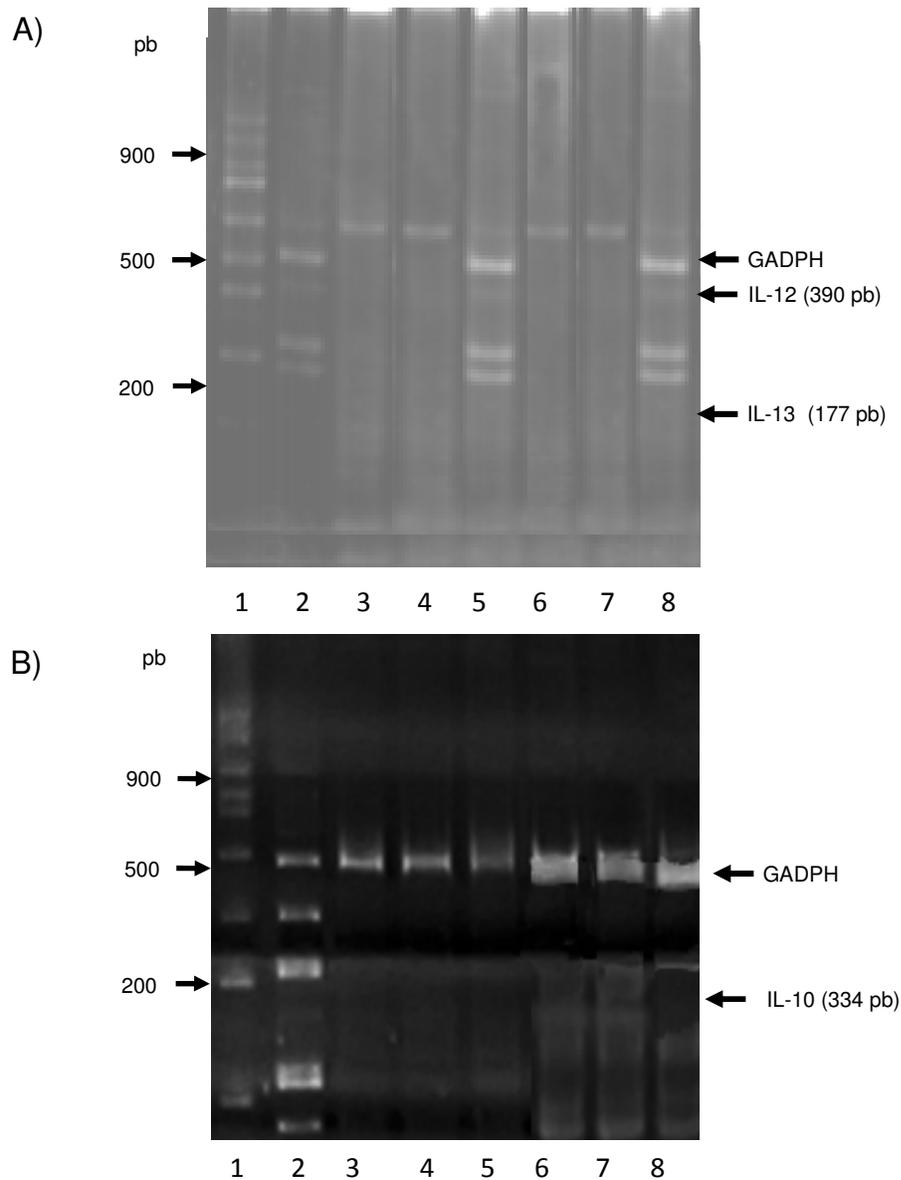
**Figura 12. Cambios en el diámetro en los tobillos de las pacientes con AR de los grupos A y B durante su tratamiento. A. Tobillo derecho y B. Tobillo izquierdo.**

## 6. 4 MPCR

### 6.4.1 MPCR interleucinas Th1/ Th2

Como ya se ha mencionado antes una característica inmunológica clave de la AR es el balance de interleucinas Th1 y Th2, que se plantea es el responsable de exacerbar la sintomatología de la enfermedad (Anaya y col, 2006). Sin embargo, como la acupuntura es capaz de modificar los niveles de expresión de ARNm de algunas interleucinas, como ya previamente se describió en la introducción, se procedió a aplicar el tratamiento de acupuntura y con la estrategia del no punto a las pacientes con AR de los grupos A y B respectivamente. Posteriormente se evaluó la expresión de las interleucinas IL-12, IL-2 e INF- $\gamma$  (Th1), e IL-10, IL-5, IL-4 e IL-13 (Th2).

Para realizar las MPCR's para detectar la expresión de interleucinas Th1/Th2 se tomó como plantilla el ARN de las pacientes con AR y se utilizó el kit para interleucinas humanas Th1/Th2 set 2 (Maximbio) como se describió en el apartado de material y métodos. En la figura 13 y 14 se observa el corrimiento electroforético de las MPCR's, realizadas antes de iniciado el tratamiento, después de la quinta sesión y al finalizar el tratamiento, de dos pacientes del grupo A y dos pacientes del grupo B representativas de las 12 pacientes incluidas en este estudio. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico de los diferentes fragmentos de ADN amplificados de cada paciente y de sus tres diferentes tomas. Todos los resultados se normalizaron con su respectivo control interno que fue el gen *gadh* y fueron graficados.



**Figura 13. Expresión de moléculas Th1/Th2 en pacientes con AR tratadas o no con acupuntura.** A. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 8.5% de las MPCR's de dos pacientes con AR tratadas con acupuntura real. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 2, amplificado del control positivo del kit; carriles 3, 4 y 5, MPCR's de la paciente 1 antes de iniciar el tratamiento, después de la quinta sesión y al finalizar el tratamiento, respectivamente; carriles 6, 7 y 8 MPCR's de la paciente 2 en los mismos tiempos que para la paciente 1. B. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 8.5% de las MPCR's de dos pacientes con AR tratadas en no punto. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 2, amplificado del control positivo del kit; carriles 3, 4 y 5, MPCR's de la paciente 1 antes de iniciar el tratamiento, después de la quinta sesión y al finalizar el tratamiento, respectivamente; carriles 6, 7 y 8 MPCR's de la paciente 2 en los mismos tiempos que para la paciente 1.

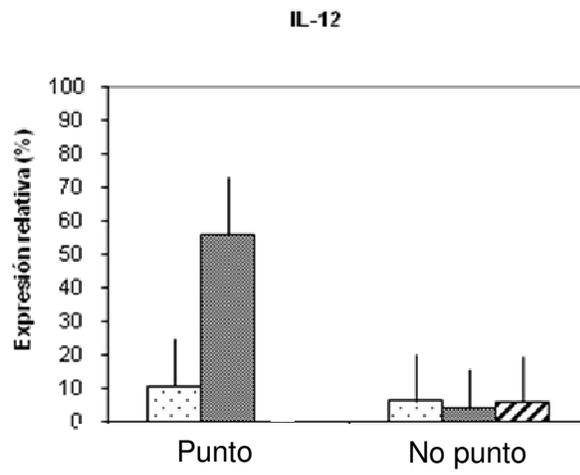
El análisis de los resultados de la expresión relativa de las interleucinas Th1/Th2 mostró que la expresión de la IL-2, IL-4 e IL-5 en el presente trabajo no fue similar en las seis pacientes de cada grupo. Esto ya que solo se detectaron cambios en la expresión de esas moléculas en uno o dos pacientes, por lo que no fue posible concluir un patrón de expresión de estas interleucinas por efecto de la acupuntura. Sin embargo, para el caso de la IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13 si se observaron cambios en sus niveles de expresión en cuatro, cinco o las seis pacientes de cada grupo, los cuales se describen a continuación.

Como se puede observar para el caso de las interleucinas Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), la interleucina 12 se detectó en un 10% en las pacientes del grupo A antes de iniciado el tratamiento y sus niveles se incrementaron hasta un 55.30% después de la quinta sesión, no obstante hacia el final del tratamiento su expresión se abatío. Mientras que en el grupo B la expresión relativa de IL-12 fue muy baja en las tres muestras analizadas, estando por debajo del 10% y no fue significativa la diferencia entre ellas. Sin embargo, si se detectó una diferencia relevante en los niveles de esta interleucina entre las pacientes del grupo A y del B en donde los resultados sugieren que la acupuntura induce cambios en los niveles de expresión de esta molécula.

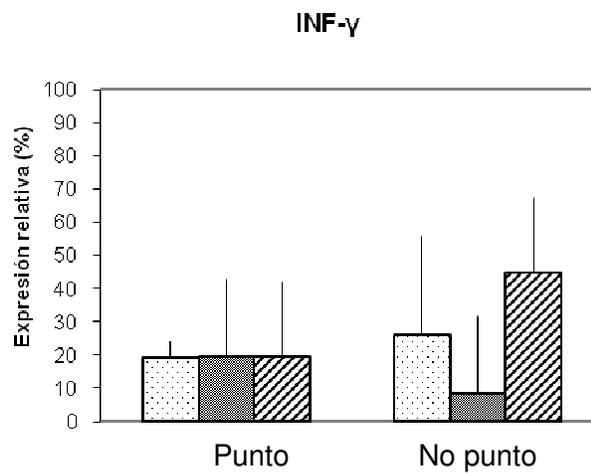
Ahora bien con respecto al IFN- $\gamma$  se detectaron los mismos niveles de expresión (19%) en los tres tiempos analizados en las pacientes del grupo A. Sin embargo en las pacientes del grupo B inicialmente se presentó una expresión relativa de 26.07% de IFN- $\gamma$ , posteriormente disminuyó a menos de 10% y al final los niveles se incrementaron por arriba de un 40%, indicando una mayor expresión de esta interleucina en las pacientes con AR no tratadas con acupuntura

particularmente al final del tratamiento ( $\alpha= 0.01$  y  $p= 0.89$ ), aunque no hay una diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, podemos concluir que el tratamiento acupuntural aplicado no indujo variaciones en la expresión de IFN- $\gamma$  en las pacientes del grupo A, sino que la expresión estuvo constante. Mientras que el grupo con de las pacientes tratadas en no punto (grupo B) mostraron cambios en la expresión de IFN- $\gamma$

A)



B)



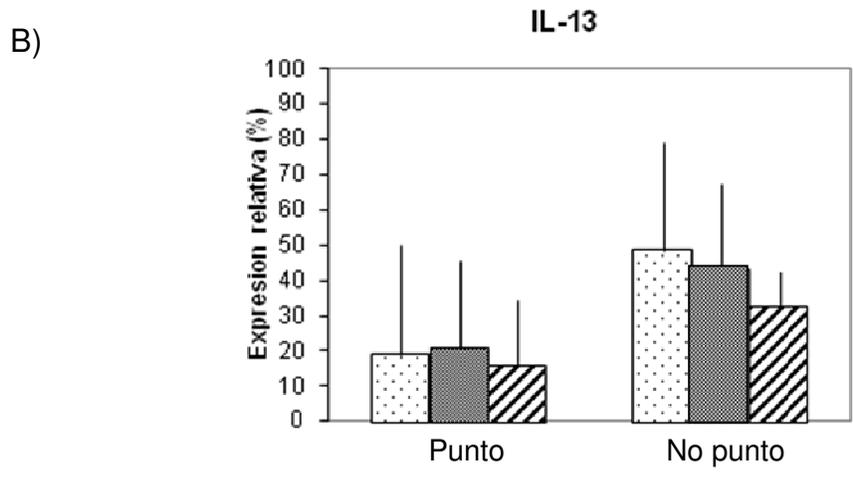
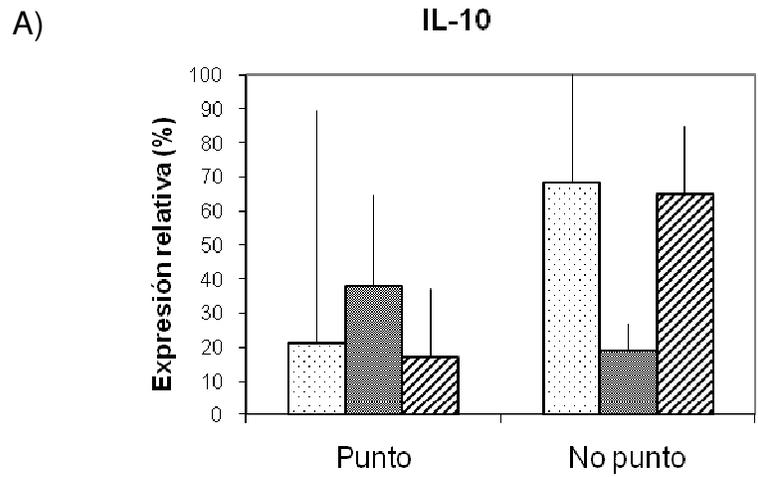
**Figura 14. Expresión relativa de interleucinas Th1 en pacientes con AR tratadas con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).**

A) IL-12 y B) INF- $\gamma$ .

□ Antes de iniciar el tratamiento, ■ después de la quinta sesión y ▨ al finalizar el tratamiento.

En lo que corresponde a las interleucinas Th2, se tiene que la IL-10, en el grupo tratado con acupuntura real mostró una expresión del 21.06% en la primera sesión, incrementó en la segunda toma (37.82%), para disminuir en la última sesión a un 17.15%. No obstante no se observó una diferencia significativa entre las tres tomas de las pacientes de este grupo. Por otro lado en el grupo tratado con la estrategia del no punto la expresión relativa de la IL-10 estaba muy elevada en la primera toma de muestra (68.36%), disminuyó en la segunda toma a 18.986%, pero incrementó en la muestra de la última sesión a 64.759% casi al mismo nivel que al inicial, por lo que no es significativamente diferente al valor de expresión de la primera toma de muestra. Sin embargo, si podemos observar una diferencia entre la cantidad de interleucina detectada en ambos grupos, sugiriendo que la acupuntura pudiera estar manteniendo bajos los niveles de esta molécula.

Por último, con respecto a la IL-13 se observó que la expresión relativa de 19.0%, 21.33 y 15.77% en la 1ª, 2ª y 3ª tomas respectivamente, no mostraron una diferencia significativa en las pacientes del grupo A. No obstante en el grupo B la expresión de IL-13 inicialmente fue de 48.59% en la primera toma y mostró una tendencia a disminuir en las siguientes dos tomas, presentaron un expresión de 42.98 y 32.85%, respectivamente. El análisis estadístico de la prueba t de Student no mostró una diferencia significativa entre estos valores de la expresión de IL-13 en el grupo B. Sin embargo, la cantidad de IL-13 en los pacientes tratados y no tratados con acupuntura, fue mayor en las pacientes del grupo B. Por lo que nuevamente, el tratamiento aplicado en las pacientes del grupo A mantuvo un nivel de expresión de IL-13 menor, que lo observado para el grupo B, pero constante a lo largo del tratamiento.



**Figura 15. Expresión relativa de interleucinas Th2 en pacientes con AR tratadas con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).**

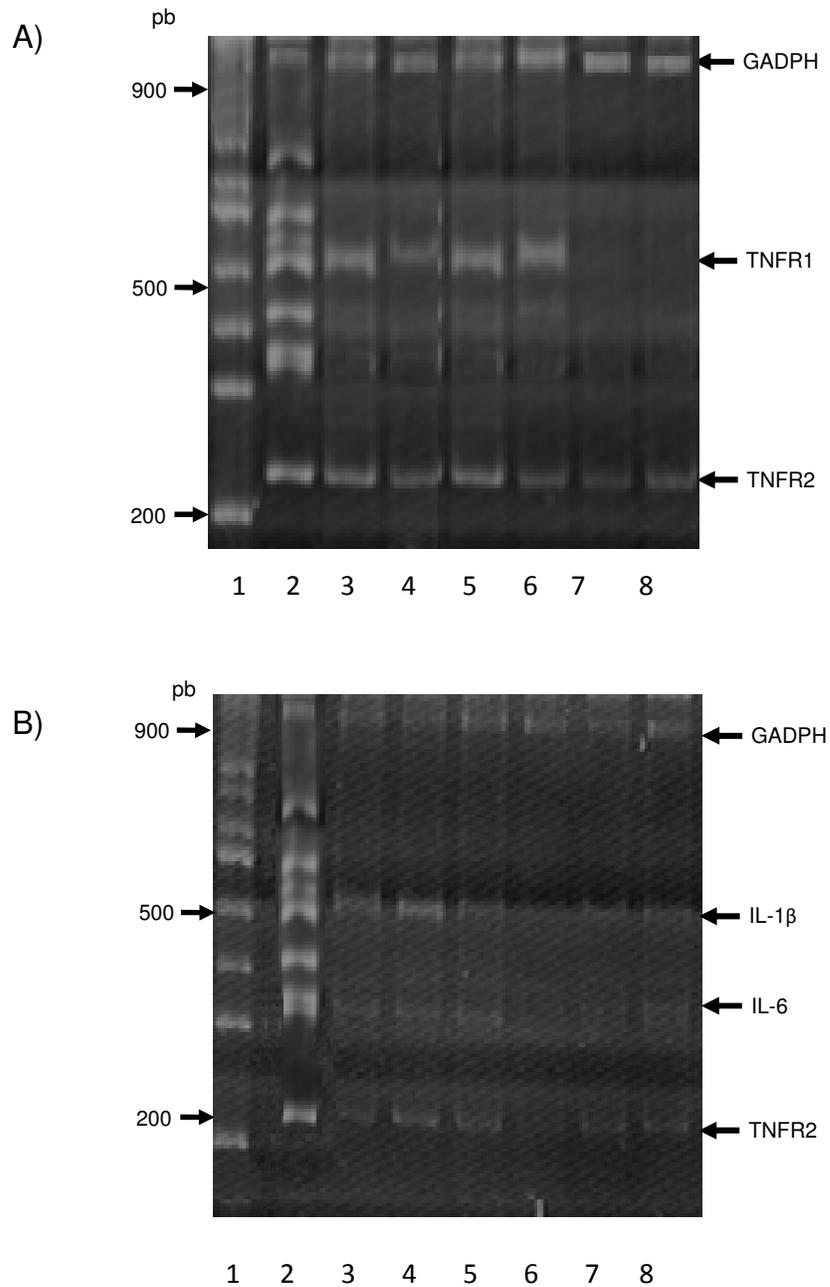
A) IL-10 y B) IL-13.

□ Antes de iniciar el tratamiento, ■ después de la quinta sesión y ▨ al finalizar el tratamiento.

#### 6.4.1 MPCR moléculas proinflamatorias

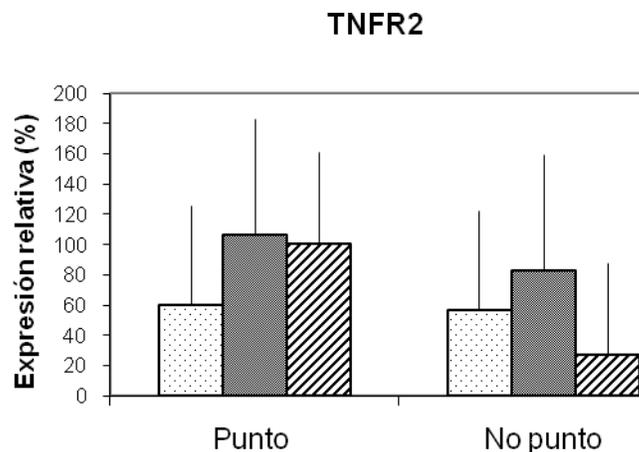
Tal como se mostró en la sección anterior, una característica inmunológica clave de la AR es el balance de interleucinas Th1 y Th2, que se plantea es el responsable de exacerbar la sintomatología de la enfermedad (Anaya y col, 2006). Así mismo se han reportado cambios en la expresión de moléculas proinflamatorias en pacientes con AR, cuyos niveles pudieran estar influenciando en la mejoría o bien en la crisis de la enfermedad (Tam y col, 2007). Por tal motivo también evaluamos los niveles de algunas de estas moléculas proinflamatorias utilizando el kit para interleucinas inflamatorias set 3 (Maximbio), como se describió en material y métodos en las pacientes tratadas o no tratadas con acupuntura.

En general observamos nuevamente que algunas interleucinas como IL-1 $\beta$  y el TNFR2 presentaron cambios en su expresión conforme transcurrió el tiempo de tratamiento, mientras que otras como el TNF- $\alpha$ , GM-CSF, GM-CSFR, TNFR1, IL-6 e IL-6R presentaron cambios pero solo en uno o dos pacientes, de los seis que conformaron cada grupo por lo que no fue posible tener una generalidad en la expresión relativa de estas moléculas inflamatorias en las condiciones estudiadas en el presente trabajo.



**Figura 16. Expresión de moléculas proinflamatorias en pacientes con AR tratadas o no con acupuntura.** A. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 8.5% de las MPCR's de dos pacientes con AR tratadas con acupuntura real. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 2, amplificado del control positivo del kit; carriles 3, 4 y 5, MPCR's de la paciente 1 antes de iniciar el tratamiento, después de la quinta sesión y al finalizar el tratamiento, respectivamente; carriles 6, 7 y 8 MPCR's de la paciente 2 en los mismos tiempos que para la paciente 1. B. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 8.5% de las MPCR's de dos pacientes con AR tratadas en no punto. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; carril 2, amplificado del control positivo del kit; carriles 3, 4 y 5, MPCR's de la paciente 1 antes de iniciar el tratamiento, después de la quinta sesión y al finalizar el tratamiento, respectivamente; carriles 6, 7 y 8 MPCR's de la paciente 2 en los mismos tiempos que para la paciente 1.

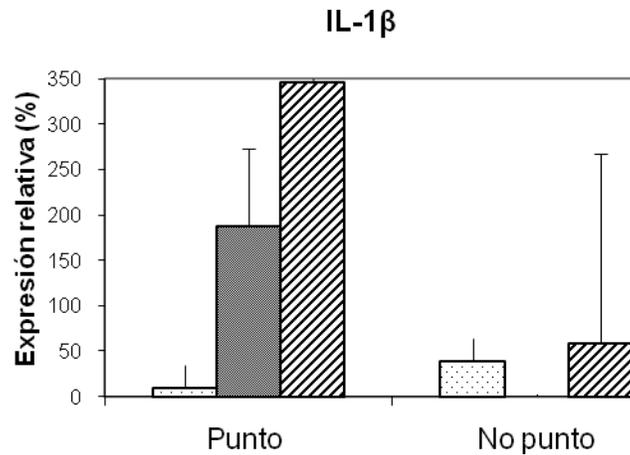
Los resultados del análisis de la expresión relativa de las moléculas proinflamatorias se muestran en las figuras 17 y 18. En donde se puede observar que el TNFR2 mostró una expresión relativa de 59.83 y 56.42% en la primera toma en los pacientes del grupo A y B respectivamente. Sin embargo después de la quinta sesión la cantidad de TNFR2 incrementó significativamente hasta un 106.64% y 100.05 en las pacientes del grupo A. Mientras que en las pacientes del grupo B, si bien ésta molécula también incrementó su expresión a un 82.66%, al final se detectó una disminución en la expresión relativa de 26.83%, menor a la observada en la misma toma en las pacientes del grupo A. Por lo que los niveles de TNFR2 observados al finalizar el tratamiento si mostraron una diferencia significativa entre los grupos (Fig. 17). De tal forma que podemos ver que esta molécula presenta una tendencia a incrementar sus niveles de expresión por acción de la acupuntura real con respecto al tiempo del tratamiento, contrario a lo observado en las pacientes del grupo B. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa en los niveles de expresión de esta interleucina ni entre las tomas de cada grupo, ni entre los grupos, en las dos primeras mediciones.



**Figura 17. Expresión relativa de interleucinas Th2 en pacientes con AR tratados con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B).**

□ Antes de iniciar el tratamiento, ■ después de la quinta sesión y ▨ al finalizar el tratamiento.

Para la IL-1 $\beta$ , otra molécula proinflamatoria, se tuvo que en el grupo A, la expresión relativa inicial fue de 9.25%, la cual fue aumentando de forma tiempo dependiente a 187.29 y 345.95% en las dos últimas tomas de muestra. En lo que respecta al grupo B la expresión relativa de IL-1 $\beta$  fue de 38.81% en la primera toma de muestra, después se abatío su expresión en la segunda toma de muestra, pero incrementó a 57.88% en la ultima toma de muestra. Estos resultados sugieren que la acupuntura estimuló específicamente la expresión de la IL-1 $\beta$  en los pacientes con AR del grupo A.



**Figura 18. Expresión relativa de IL-1 $\beta$  en pacientes con AR tratadas con acupuntura en los sitios punto (grupo A) y no punto (grupo B). □ Antes de iniciar el tratamiento, ■ después de la quinta sesión y ▨ al finalizar el tratamiento.**

Finalmente en la tabla 8 y 9 se presentan los valores de expresión a nivel de ARNm de todas las moléculas Th1/ Th2 e inflamatorias analizadas. Estas tablas muestran que la acupuntura aplicada a las pacientes con AR en este estudio modifica los niveles de expresión de IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-13, TNFR2 e IL-1 $\beta$ .

**Tabla 9. Cambios en la expresión relativa (ARNm) de interleucinas Th1/Th2.**

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
<b>IL-12</b>			
Punto	10.547%	55.308%	0.000%
No punto	6.312%	3.785%	5.820%
<b>IFN</b>			
Punto	19.179%	19.678%	19.659%
No punto	26.076%	8.607%	44.911%
<b>IL-10</b>			
Punto	21.066%	37.824%	17.151%
No punto	68.366%	18.986%	64.759%
<b>IL-13</b>			
Punto	19.003%	21.337%	15.774%
No punto	48.599%	42.986%	32.859%

**Tabla 10. Cambios en la expresión relativa (ARNm) de moléculas proinflamatorias.**

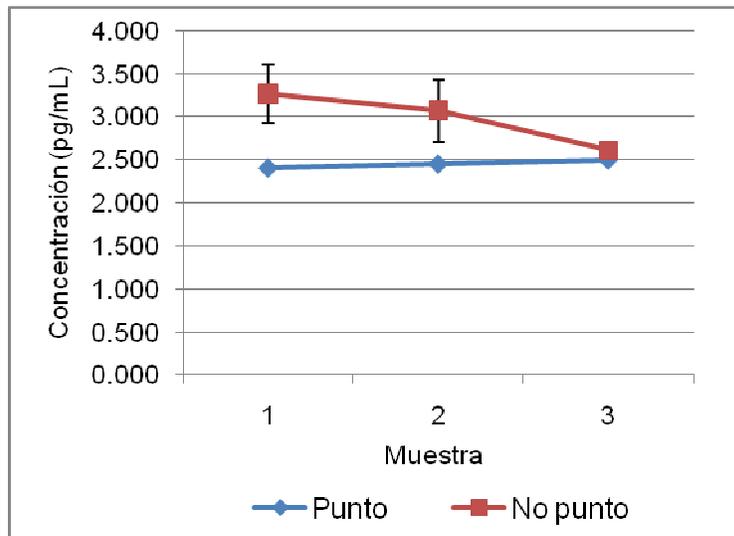
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
<b>TNFR2</b>			
Punto	59.830%	106.649%	100.052%
No punto	56.424%	82.666%	26.837%
<b>IL-1<math>\beta</math></b>			
Punto	9.258%	187.297%	345.957%
No punto	38.819%	0.000%	57.881%

#### 6.5 Detección de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ mediante ensayos de ELISA

La detección de los niveles proteicos en el suero de pacientes con AR de moléculas como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  ha sido crucial dado que ha permitido realizar correlaciones entre el grado de severidad y/o evolución de la enfermedad y dichos niveles proteicos (Kavoussi y Ross, 2007). Por lo que en el presente estudio también se realizaron ensayos de ELISA para cuantificar estos posibles cambios.

Cabe mencionar que para esta cuantificación al igual que para las MPCR's se realizaron tres tomas de muestra una antes de iniciado el tratamiento, otra después de la quinta sesión y la última posterior a la décima sesión, solo que en esta ocasión se utilizó el suero de las pacientes.

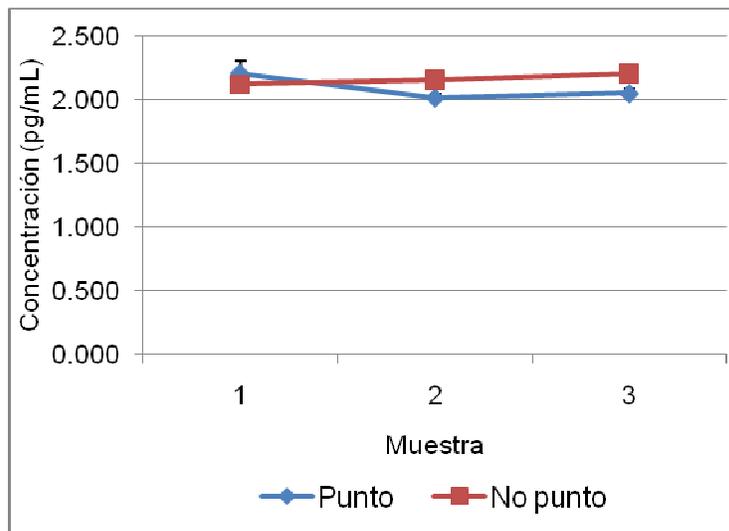
Con respecto al TNF- $\alpha$  no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de esta molécula durante el tratamiento de las pacientes del grupo A, cuyos niveles estuvieron alrededor de 2.5 pg/ml. Mientras que en el grupo tratado con la estrategia del no punto se presentaron niveles más altos de esta molécula proinflamatoria en el suero (3.267 pg/ml) mostrando una ligera tendencia a la disminución conforme transcurrió el tiempo del estudio (2.609 pg/ml). De tal forma que si se detectó que las pacientes con AR de grupo A tuvieron niveles más bajos de TNF- $\alpha$  que las pacientes del grupo B, lo que probablemente se deba al efecto del tratamiento con acupuntura. No obstante no fue posible comparar los niveles proteicos de esta molécula con los niveles de expresión de ARNm, ya que en estos últimos sólo se detectó su expresión en dos pacientes del grupo A y uno del grupo B.



**Figura 19. Determinación de los niveles séricos de TNF- $\alpha$  analizada mediante ELISA en pacientes con AR tratados con y sin acupuntura.**

Finalmente la concentración sérica de otra molécula proinflamatoria como lo es el IFN- $\gamma$  fue analizada. Por su parte en el grupo tratado con acupuntura real esta proteína presentó un nivel inicial de 2.205 pg/ ml en la primera toma de muestra no se observó un cambio significativo en sus niveles con respecto a las siguientes dos tomas de muestra. Es decir los niveles proteicos de IFN- $\gamma$  permanecieron muy semejantes en el transcurso de todo el estudio. Por otro lado la concentración sérica de esta molécula en el grupo tratado con la estrategia del no punto mostró una ligera tendencia al aumento. En dicho grupo los valores detectados de IFN- $\gamma$  fueron de 2.119 pg/ ml en la primera toma de muestra, 2.156 pg/ ml en la segunda toma de muestra y en la ultima toma de muestra la concentración sérica fue de 2.202 pg/ ml. Estos resultados de expresión proteica y a nivel de ARNm para el caso de las pacientes con AR del grupo A muestran una

relación directa ya que a nivel proteico se observa una ligera disminución pero no significativa, mientras que a nivel de ARNm no se detectaron cambios en sus niveles de expresión relativa. Mientras que en el caso de las pacientes del grupo B no se observó una correlación entre proteína y ARNm, ya que a nivel proteico se detectó una ligera tendencia a incrementar, y a nivel de ARNm algo similar fue observado, con el único punto de que en la segunda toma la expresión se redujo considerablemente.



**Figura 20. Determinación de los niveles séricos de INF- $\gamma$  analizada mediante ELISA en pacientes con AR tratados con y sin acupuntura.**

## VII. Discusión

En la acupuntura, la medicina alternativa más utilizada a nivel mundial, poco se conoce del efecto que genera a nivel molecular en los pacientes que son atendidos con diferentes padecimientos. No obstante existe un gran número de evidencias sobre la eficacia de este tratamiento, particularmente en el dolor (Hecker, 2007; Tam y col, 2007; Lewith y col, 2000; David, 1999). Por otro lado, la AR es una enfermedad inflamatoria principalmente de las articulaciones diartrodiales, con manifestaciones sistémicas, de etiología desconocida, de naturaleza autoinmune y evolución crónica con curso y duración variables. La incidencia de esta patología es alta no solo a nivel nacional, sino incluso a nivel internacional y tiene el potencial de afectar severamente la supervivencia, capacidad funcional y calidad de vida del individuo que la padece. De ahí nuestro interés por investigar los cambios que puede generar el tratamiento con acupuntura en pacientes con AR que resulten benéficos para la salud de estos pacientes.

En el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento acupuntural aplicado en los puntos Diji (B8), Zusanli (E36), Yinliquan (VB34), Quchi (IG11) y Hegu (IG4), dos veces por semana, durante 10 sesiones en pacientes con AR. Esto con la finalidad de demostrar si dicho tratamiento generaba cambios en el grado de dolor, en la inflamación de diferentes articulaciones y en la expresión de moléculas de la respuesta inmune Th1/Th2 y moléculas inflamatorias, tanto de ARN como a nivel de proteínas en las pacientes con AR.

Así mismo esta investigación se realizó con una muestra final de 12 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y que en una historia

clínica realizada por médicos del Hospital 20 de noviembre del área de acupuntura precisaron que cumplían con al menos 5 de los 7 puntos que los incluyen en el diagnóstico de que el padecimiento que presentan es artritis reumatoide. Finalmente se formaron dos grupos al azar, el grupo A en el que se les aplicó a las pacientes la acupuntura en los puntos correspondientes y el grupo B al que se le aplicó acupuntura no real, es decir en sitios no punto.

Dado que el dolor es uno de los principales síntomas de la AR debido a la inflamación que se genera en diferentes articulaciones, se evaluó el grado de dolor de cada paciente en el transcurso del tiempo del tratamiento. Interesantemente observamos que si bien no fue significativa la diferencia entre la disminución en el grado de dolor entre las pacientes de los grupos A y B, si fue evidente que todas las pacientes tratadas con acupuntura real como terapia adyuvante, refirieron una disminución mayor en su percepción del dolor y una mejoría en general de su estado de salud al final del tratamiento, en comparación con las pacientes del grupo tratado con la estrategia del no punto. Esto concuerda con los resultados obtenidos en un estudio doble ciego realizado en 36 pacientes con AR a los cuales se les aplicó un tratamiento con acupuntura, electroacupuntura y acupuntura no real en los puntos Quchi (IG11), Waiguan (TC5), Hegu (IG4), Zusanli (E36), Yanglingquan (VB34) y Xuanzhong (VB39) por 40 min, dos sesiones por semana, durante 10 semanas mostró que no había una diferencia significativa en la disminución en el grado de dolor presentado por las pacientes evaluado con la escala visual análoga durante todo el tratamiento (Tam y col., 2007). Sin embargo, las pacientes con electroacupuntura y acupuntura presentaron una mayor tendencia a disminuir el grado de dolor evaluado (Tam y col., 2007). En

dichas investigaciones se apunta que la punción en sitios no punto disminuye el dolor ya que genera efectos biológicos, como la liberación de algunos neurotransmisores y la disminución o aumento de moléculas anti y proinflamatorias, pero que dichos efectos son diferentes a los generados por la estimulación de un punto acupuntural real, o clásico. Esto porque el punto acupuntural real generalmente está situado sobre nervios que conducen toda una serie de señales que al final permiten estimular con bastante precisión toda una serie de células o moléculas que permiten en este caso disminuir el grado de dolor (Lansdown y col, 2009; Moffet, 2006; Filshie y Abbot, 1991). Por lo que los cambios en la percepción del dolor son generados por que el estímulo acupuntural promueve la síntesis de péptidos opioides, como  $\beta$ -endorfinas y metaencefalina entre otros, y también de serotonina, catecolaminas, y otros neurotransmisores relacionados con la disminución de la sensación de dolor. Más aún se plantea que se estimulan fibras nerviosas como las A-delta y las fibras C relacionadas con la nocicepción, lo que fundamenta aún más el cambio en la percepción del dolor experimentado por individuos tratados con acupuntura (Taguchi, 2007; Moffet, 2006; Filshie y Abbot, 1991). Además, cabe mencionar que la disminución en el dolor que se observa en las pacientes en este estudio concuerda con lo observado en padecimientos musculoesqueléticos en los que se aplica acupuntura como la osteoartritis (Lansdown y col, 2009; Itoh y col, 2008). Interesantemente en este trabajo cuatro de los seis puntos de acupuntura aplicados [Quchi (IG11), Hegu (IG4), Zusanli (E36) y Yanglingquan (VB34)] a las pacientes fueron los mismos que se utilizaron en el presente trabajo lo que podría coincidir con el efecto

observado en la disminución en el grado de dolor presentado por las pacientes con AR

Tal como se mencionó anteriormente en la AR otro de los principales síntomas en las pacientes es la inflamación de diferentes articulaciones, mismo que puede registrarse a través del cambio de diámetro durante el tratamiento. En el presente estudio no se encontraron cambios significativos en el diámetro de las articulaciones medidas, lo que dichos resultados estarían planteado que el tratamiento acupuntural aplicado a las pacientes con AR no genera ningún cambio significativo en la inflamación. A este respecto, algunos estudios han mostrado que el registro de variaciones en el diámetro articular solo se consigue a nivel de sensibilidad y no tanto en la inflamación (Tam y col. 2007). Además, cuando el cambio en la inflamación ha sido percibido ha sido a través de la aplicación de electroacupuntura (Yim y col, 2006). En este estudio, Yim y col en el 2006, utilizaron la electropunción del punto Zusanli (E36) durante 15 min una vez a la semana hasta completar 10 semanas en ratones DBA/1J a los que se les indujo artritis con colágeno tipo II, observando cambios histológicos que se relacionaron con una disminución en la inflamación.

Aunado a esto no hay una explicación totalmente aceptada para la disminución de la inflamación en pacientes con AR. No obstante se propone que hay una interacción entre componentes del sistema nervioso y del sistema inmune que llevan a una regulación neuroinmunológica que culmina con la disminución de la inflamación (Kavoussi y Ross, 2007). El nervio vago es una de las estructuras que se ha observado participa en la regulación neuroinmunológica, se menciona que la estimulación de este nervio favorece la producción de ACTH, la cual se

enlaza con el receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha 7$  ( $\alpha 7nAChR$ ) del sistema monocito-macrófago (Kavoussi y Ross, 2007). Esto es suficiente para inhibir la producción de algunas moléculas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , además puede afectar todas las regiones donde se encuentren componentes del sistema monocito-macrófago, lo cual se ha relacionado con una disminución en la inflamación (Kavoussi y Ross, 2007). Sin embargo, en nuestros resultados no observamos una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , por lo que probablemente el tratamiento aplicado a las pacientes del grupo A no indujo la transcripción de señales que en un principio se esperarían de acuerdo a lo reportado.

Ahora bien, tanto en seres humanos como en modelos animales se ha observado que en la AR hay un desbalance entre las interleucinas Th1 y Th2. Por ejemplo en modelos murinos de AR se ha mostrado que los linfocitos Th1 inducen una respuesta patogénica, mientras que los linfocitos Th2 inducen una respuesta protectora (Anaya y col, 2006; Kawashima y Miossec, 2003; Kim y col, 2000). Una de las interleucinas que se ha reconocido tiene un papel crítico en regular el balance de células Th1 y Th2 es la IL-12 (Anaya y col, 2006). Esta molécula es producida principalmente por linfocitos Th1, macrófagos, células dendríticas y por células NK. Entre otras cosas induce la producción de IFN- $\gamma$  y otras moléculas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, por mencionar algunas, su acción es regulada por la IL-4 e IL-10 (Kawashima y Miossec, 2003; Kim y col, 2000). También se ha correlacionado negativamente a esta interleucina con varios parámetros indicativos de la actividad de la AR como lo son el dolor e inflamación de articulaciones (Kim y col, 2000). Lo anterior se respalda por estudios en los que

observaron que la disminución de esta molécula en un modelo murino de artritis inducida por colágeno atenúa marcadamente la severidad de la enfermedad (Leung y col, 2008; Kawashima y Miossec, 2003; Kim y col, 2000).

Lo expuesto acerca de la IL-12 explicaría hasta cierto punto el aumento del dolor en las sesiones 4, 6 y 7 en el grupo de acupuntura real ya que en la segunda toma del tratamiento dicha molécula tenía una expresión elevada de su ARNm. Además se explica porque en el mismo grupo A el dolor disminuye en las siguientes sesiones ya que al final del tratamiento, se abatió la expresión de IL-12. Interesantemente, en la literatura no se ha reportado el papel de la IL-12 y la acupuntura, no obstante de acuerdo con los resultados obtenidos esta interleucina podría tener un papel importante en el mantenimiento del balance de las interleucinas Th1/Th2 como ya describimos antes.

Con respecto al IFN- $\gamma$ , otra interleucina Th1 central en la patogénesis de la AR, es producida principalmente por linfocitos Th1, entre su acciones esta la de activar macrófagos, favorece la diferenciación de células B y regula la proliferación y actividad de células T (Anaya y col, 2006; Melrose y col, 1998). Ésta molécula se ha catalogado comúnmente como un factor proinflamatorio debido a que favorece la proliferación de células inflamatorias (Sattler y col, 2009; Kim y col, 2008; Melrose y col, 1998). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que el IFN- $\gamma$  también puede tener un papel antiinflamatorio, como se describe a continuación (Sattler y col, 2009; Kim y col, 2008; Melrose y col, 1998). Se ha observado que anticuerpos contra IFN- $\gamma$  pueden aumentar la severidad de la artritis inducida por adyuvante en un modelo de rata, esto dependiendo de la terapia que se administre (Melrose y col, 1998; Jacob y col, 1989). Se plantea que

esto se debe a que el IFN- $\gamma$  disminuye la expresión de E-selectina y P-selectina en cultivos de células endoteliales, lo cual disminuye el reclutamiento de neutrófilos y consecuentemente aminora la inflamación (Melrose y col, 1998).

También se ha reportado que el IFN- $\gamma$  en el modelo de artritis inducida por adyuvante en ratas Lewis se detectan en altos niveles en fase de recuperación de la enfermedad (Kim y col; 2008). Esto se refuerza por observaciones de que la administración de IFN- $\gamma$  recombinante reduce la severidad, al disminuir el dolor y favorece la recuperación de la artritis autoinmune en un modelo murino (Kim y col, 2008; Nakajima y col, 1991). Además se ha observado que para que esta molécula tenga una acción predominantemente proinflamatoria entre otros factores se necesita la presencia de IL-12 (Sattler y col, 2009; Barbulescu y col, 1998) e IL-17 (Kim y col; 2008), ya que en presencia de dichas interleucinas el IFN- $\gamma$  estimula la proliferación de células inflamatorias como macrófagos y monocitos (Kim y col; 2008).

Así con esta información acerca del IFN- $\gamma$  se pueden respaldar los resultados obtenidos en el grupo A con respecto a esta molécula ya que, como se observó en este trabajo la expresión de esta molécula no cambia de forma significativa durante todo el tiempo del tratamiento, ni a nivel de ARNm, ni a nivel proteico. Junto con esto se debe de recordar que el dolor tendió a disminuir a lo largo del tratamiento, lo que podría deberse a que la expresión de la IL-12 ya no se detectó al final de éste y entonces el IFN- $\gamma$  podría reducir su actividad proinflamatoria.

Ahora bien los resultados obtenidos en este trabajo también concuerdan con los de Yim y col en el 2006, en el que se reportó una disminución aunque no

significativa de los niveles séricos de IFN- $\gamma$  que van de 250 pg/ml a 210 pg/ml. Sin embargo, también existen reportes en donde se observan incrementos en los niveles séricos de IFN- $\gamma$  en pacientes con AR después de un tratamiento con acupuntura (Liu y col, de 1993). Por tanto, los niveles de esta molécula en pacientes en los que se aplica acupuntura aún no muestran una generalidad y depende de muchas otras variables aún no evaluadas.

Por otro lado, las interleucinas Th2 se propone que son las moléculas que regulan a las interleucinas proinflamatorias en la AR (Guichelaar y col, 2008; Tam y col, 2007; Hillyer y Woodward, 2003). En el presente trabajo detectamos en particular cambios en dos interleucinas la IL-10 y la IL-13, cuyos papeles funcionales podrían resultar de relevancia en el balance de interleucinas Th1/Th2 y por consiguiente en una mejoría o no de algunos de los síntomas de las pacientes con AR. Una de estas moléculas clave en la inflamación de la AR es la IL-10, ya que favorece la proliferación de células Th2. Su principal acción consiste en inhibir la liberación y la función de moléculas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Guichelaar y col, 2008; Hillyer y Woodward, 2003). Otra de sus funciones es que detiene la degradación del cartílago articular por células mononucleares y regula la producción de citocinas Th1 (Guichelaar y col, 2008; Hillyer y Woodward, 2003). Es pertinente mencionar que esta molécula presenta un papel funcional inverso al de la IL-12, es decir cuando la expresión de IL-12 es elevada la expresión de IL-10 es baja, y viceversa (Guichelaar y col, 2008; Hillyer y Woodward, 2003). Como se puede observar en los resultados la expresión relativa de esta interleucina en el grupo de punto aumentó en la toma de muestra de la segunda sesión de 21.06% a 37.82% y disminuyó en la tercera toma de

muestra a 17.15%. Mientras que en la segunda toma de muestra la IL-12 aumentó a 55.30% y en la tercera toma de muestra dicha molécula no se expresó. Así se corresponde el aumento de dolor a la mitad del tratamiento del grupo A, con el aumento en la expresión de la IL-12 y una menor expresión de la IL-10, en cambio cuando disminuye el dolor la IL-10 se expresa pero la IL-12 abate su expresión como consecuencia del tratamiento acupuntural aplicado. No obstante en este estudio no podemos concluir contundentemente si los niveles de expresión de ARNm de estas interleucinas que se detectaron corresponden exactamente a la función que pudieran generar a nivel proteico.

Entre otras cosas estos resultados también explican la diferencia en la respuesta de la severidad de la enfermedad del grupo tratado en no punto, ya que este grupo presentó una alta expresión de IL-10 y niveles de expresión bajos de IL-12. Con respecto a la IL-10 si bien no existen reportes relacionados con su expresión en AR y acupuntura, si se ha reportado que esta medicina alternativa es capaz de modificar los niveles de la IL-10 en suero incrementándolos o disminuyéndolos en otros padecimientos como la rinitis alérgica (Petti y col, 2002).

Ahora bien, en cuanto a la IL-13 se tiene que es producida por linfocitos Th2 principalmente en la cavidad sinovial de pacientes con AR (Anaya y col, 2006). Esta interleucina inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 y favorece la producción de IL-1R (Anaya y col, 2006; Hart y col, 1995). También favorece la proliferación de linfocitos B e induce la síntesis de IgE e IgG, ejerce quimiotaxis sobre macrófagos, sinergiza la acción de la IL-2 e inhibe la acción de la IL-12 (Anaya y col, 2006; Hart y col, 1995). Por otro lado, en cultivos celulares de monocitos de líquido sinovial de pacientes con AR estimulados con

lipopolisacarido se observó que cuando la IL-13 está en concentraciones altas disminuye la producción de IL-1 $\beta$ , pero no de TNF- $\alpha$  en algunas condiciones (Hart y col, 1995). Así se muestra que la acción antiinflamatoria de la IL-13 depende de la presencia de otras moléculas, tales como el TNF- $\alpha$ , la IL-2 y la IL-1 $\beta$  entre otras, y que el efecto antiinflamatorio depende del ambiente en el que ejerza su acción (Hart y col, 1995).

Con lo anterior y lo observado en nuestros resultados solo podemos concluir respecto a la IL-13 que la acupuntura no indujo cambios en su expresión a lo largo del tratamiento manteniéndose una expresión por debajo del 20%. Sin embargo, probablemente estos niveles de IL-13 en las pacientes del grupo A pueden estar inhibiendo la acción sino de todo, tal vez si de una parte de la IL-12 que sintetizaron, particularmente en la segunda toma. Por otro lado en lo que respecta a las pacientes del grupo B si se incrementaron los niveles de esta interleucina, pero no fueron significativos. Sin embargo, probablemente estos niveles de IL-13 en las pacientes del grupo A pueden estar inhibiendo la acción sino de todo, tal vez si de una parte de la IL-12 que sintetizaron, particularmente en la segunda toma. Aún no se ha descrito ningún papel de la IL-13 por acción de la acupuntura en la AR, sin embargo existe al menos un reporte donde la aplicación con electroacupuntura en el punto Zusanli (E36) en ratones inmunizados con DNP-KLH suprime su expresión (Park y col, 2004), dando información de que la IL-13 es susceptible a la acción de esta medicina alternativa.

Por lo tanto, con base a lo anteriormente analizado y discutido podemos plantear que la ligera diferencia en cuanto a la percepción del dolor del grupo tratado con acupuntura con respecto al grupo B, puede relacionarse con los

cambios que se mostraron en la expresión de interleucinas Th1/Th2. En cuanto a esto se mostró que la acupuntura da características inmunológicas claves que podrían explicar la disminución del dolor en el grupo A, entre ellas tenemos la disminución significativa de IL-12 al final del tratamiento. Aunque se debe de decir que la presencia de una expresión considerable de algunas interleucinas como la IL-10, la IL-13 y el IFN- $\gamma$ , aunque no presenten cambios durante el tratamiento, también podrían influir en la diferencia de respuesta al tratamiento entre los grupos, debido a cambios en sus relaciones con otras moléculas que si cambian sus niveles de expresión, como la IL-12, como ya lo discutimos. Por otro lado, la respuesta que presenta el grupo de no punto puede deberse al aumento del IFN- $\gamma$  junto con los altos niveles de expresión que presentó la IL-10 durante el transcurso del tratamiento.

Las interleucinas proinflamatorias son moléculas que promueven la migración, proliferación y diferenciación de diversas células implicadas en la inflamación, entre otras cosas, ejemplo de estas moléculas son el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la IL-1 $\beta$ . Una de las interleucinas que se ha relacionado con la AR es el TNF- $\alpha$ . Al respecto diferentes estudios realizados en personas enfermas con AR o bien en modelos animales, se han detectado algunas de estas moléculas en cantidades elevadas mostrando una correlación entre el desarrollo de la destrucción ósea, inflamación y enfermedad con el incremento en los niveles de moléculas como el TNF- $\alpha$ , TNFR1, TNFR2, IL-6, IL-6R y GM-CSF (Rossol, 2007; Matthey, 2007; Gabay, 2006; Cronstein, 2007; Anaya, 2006). En el presente trabajo solo se detectaron cambios en los niveles de expresión de dos moléculas proinflamatorias, el TNFR2 y la IL-1 $\beta$ . Esto debido a que las otras moléculas estudiadas mostraron

algunas de ellas cambios pero únicamente en una o dos pacientes, por lo que no es posible realizar un análisis y conclusión de su expresión en este estudio.

El TNFR2, es una interleucina que participa en la transmisión de señales del TNF- $\alpha$  (Yang y col, 2010; Rossol y col, 2007). Tanto de TNFR1, como el TNFR2 son dos moléculas necesarias para la activación de monocitos por parte de células T (Mattey y col, 2007; Rossol y col, 2007). Se propone que la unión del TNFR2 con el TNF- $\alpha$  genera una serie de señales que culminan con la activación de monocitos y el aumento de su actividad fagocítica (Rossol y col, 2007).

Experimentos en los que se utilizó ARN de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) para disminuir la producción tanto de TNFR1 y TNFR2 muestran que las dos moléculas son necesarias para la activación de monocitos por parte de células T (Mattey y col, 2007; Rossol y col, 2007). Se propone que el TNFR2 se enlaza al factor de reclutamiento 2 de TNFR y se traslapa con la ruta de señalización del TNFR1 culminando con la activación de monocitos y aumentando su actividad fagocítica (Rossol y col, 2007). También se ha observado que niveles séricos elevados de los dos receptores del TNF- $\alpha$  se asocian con una mayor severidad (Yang y col, 2010) y mortalidad en pacientes con AR (Mattey y col, 2007).

Interesantemente, en el presente trabajo se observó un incremento del TNFR2 en las pacientes tratadas con acupuntura real, lo cual en apariencia no coincide con la disminución en la severidad de la enfermedad en estas pacientes. Sin embargo, probablemente aunque los niveles de expresión de TNFR2 aumentan en este grupo, la expresión de TNF- $\alpha$  detectada en los ensayos de ELISA pueden no ser suficientes para formar la cantidad de complejos TNF- $\alpha$ -

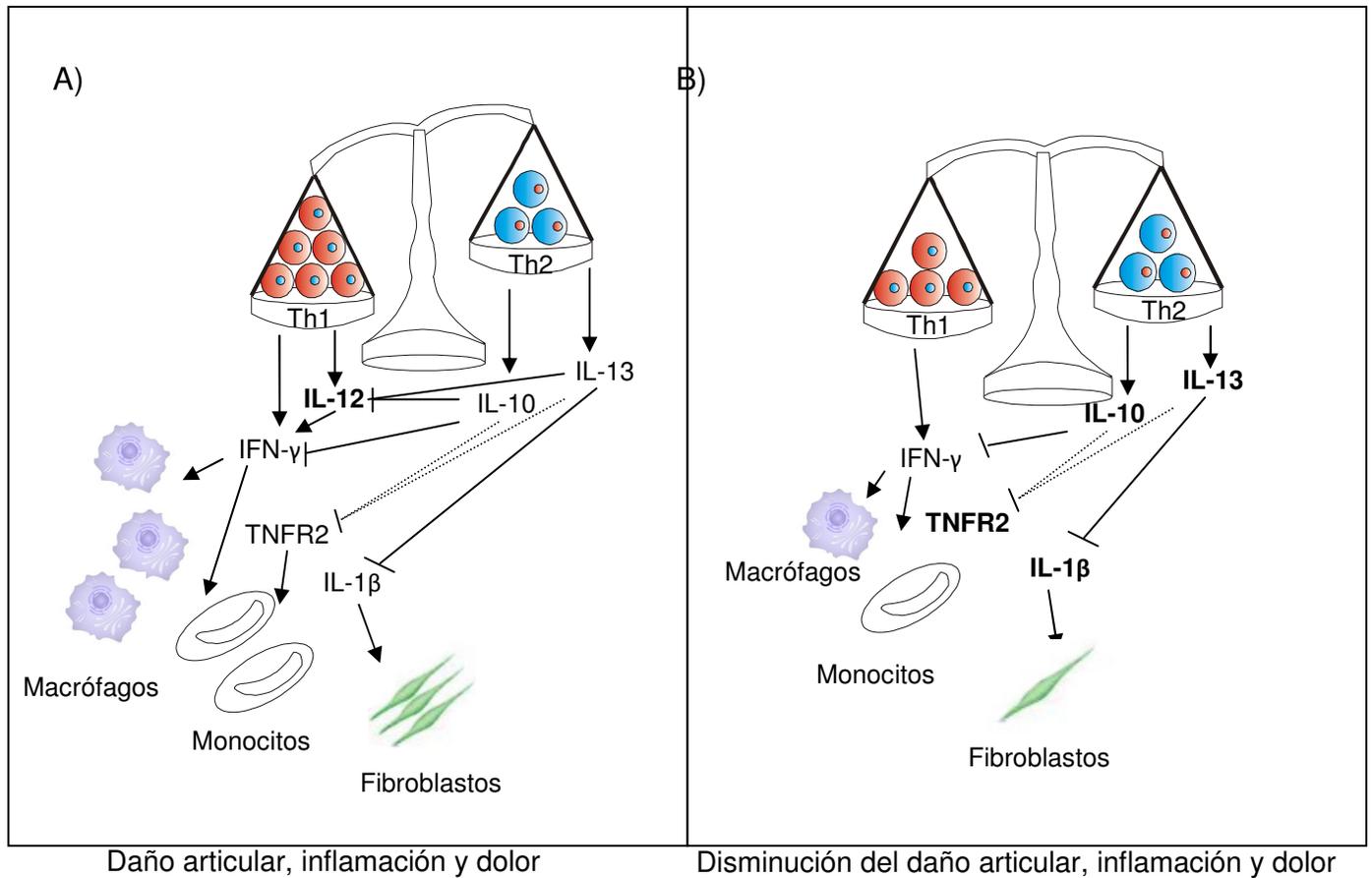
TNFR2 necesaria para activar los monocitos y al final generar un aumento en el daño articular y en la inflamación. O bien, aunque observamos un incremento en el transcrito de TNFR2 en las pacientes con AR tratadas con acupuntura, la cantidad de proteína generada por este transcrito puede no ser suficiente para generar la cantidad suficiente de complejos TNF- $\alpha$ -TNFR2 y transducir las señales. Por tanto si no hay una activación de monocitos, su actividad fagocítica disminuye y también el daño articular, la inflamación y el dolor (Rossol y col, 2007; Matthey y col, 2007).

Nuevamente en la literatura no existen reportes relacionados con la acupuntura y el TNFR2, sin embargo debido al papel que tiene esta molécula inflamatoria en la AR (Rossol y col, 2007), pudiera estar participando en los cambios en el dolor y la inflamación de las pacientes. Esto debido a su interacción con el TNF- $\alpha$  (Matthey y col, 2007). En donde esta última molécula si se ha documentado su disminución en pacientes con AR después de un tratamiento con acupuntura (Zijlstra y col, 2003).

Por último la IL-1 $\beta$  fue la otra interleucina inflamatoria que presentó cambios en sus niveles de expresión, esta es producida principalmente por los fibroblastos (Gao y col, 2006). Esta molécula induce la quimiotaxis de leucocitos cuando se encuentra junto a la IL-8 y también activa a neutrófilos, siempre y cuando interactúe con su receptor (Eskan y col, 2008). El IL-1R forma un complejo con la IL-1 $\beta$  no dejando interactuar a esta última molécula con su receptor de membrana y así no estimula la actividad de algunas células, como fibroblastos y neutrófilos que dañan el tejido articular (Marinou y col, 2008). La IL-1 $\beta$  induce el crecimiento de fibroblastos sinoviales activando la ruta MAPK (Gao y col, 2006), se propone que esto lo hace activando las proteínas Erk, JNK y p38.

En los resultados obtenidos en este trabajo observamos que esta molécula proinflamatoria aumenta de manera directamente proporcional con respecto al tiempo de tratamiento del grupo al que se le aplicó acupuntura real (Marinou y col, 2008). No obstante, dado que el papel de esta interleucina depende en gran medida de los niveles de su receptor el IL-1R (Marinou y col, 2008), sugerimos que tal vez en las pacientes del grupo A, este receptor pudiera estar también sobrepresado. Ya que así podría bloquear la acción de la IL-1 $\beta$  y evitar el daño en el tejido articular. Pocos estudios en donde se ha aplicado tratamiento con acupuntura han documentado el papel y/o presencia de la IL-1 $\beta$ . Más aun existe información que señala que la expresión de esta interleucina es inhibida por un tratamiento con acupuntura y moxibustión en un modelo de rata con colitis ulcerativa (Zijlstra y col, 2003). Por lo que son necesarios más estudios para documentar el papel que pueden realizar las interleucinas analizadas en este estudio.

En conclusión podemos decir que en lo que respecta a las interleucinas proinflamatorias también la acupuntura indujo cambios en la expresión de dos moléculas que si bien en la mayoría no fueron significativos, los niveles de algunas de ellas pudieran explicar la diferencia de respuesta en los dos grupos de pacientes con AR estudiados. Sin embargo, son necesarios otros estudios con un mayor número de pacientes y quizás utilizando otros puntos y dando un seguimiento tanto a nivel de ARNm como proteico en diversas interleucinas para poder establecer las posibles relaciones entre las interleucinas Th1/Th2 e inflamatorias en la mejoría de las pacientes con AR.



**Figura 21. Propuesta de los cambios en el balance de la red de interleucinas generados en las pacientes con AR al aplicárseles acupuntura.** A) Red de interleucinas en una paciente con AR sin tratamiento. La IL-12 aumenta la actividad inflamatoria y síntesis del IFN- $\gamma$ , el IFN- $\gamma$  favorece activación y proliferación de monocitos y macrófagos, el TNFR2 aumenta la actividad de monocitos al interactuar con el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  induce la proliferación y actividad de fibroblastos sinoviales, y las interleucinas 10 y 13 regulan pobremente la actividad de las interleucinas anteriormente mencionadas. En conjunto esto se traduce en la presencia de daño, inflamación y dolor en articulaciones de las pacientes con AR. B) Red de interleucinas en una paciente con AR tratada con acupuntura. La desaparición de la IL-12 modifica la actividad del IFN- $\gamma$ , hay mayor cantidad de IL-10 e IL-13 disponibles para contrarrestar los efectos de la IL-1 $\beta$ , y disminuir la síntesis de TNF- $\alpha$ , inhibiendo así indirectamente la acción del TNFR2. Todo esto disminuye el daño, inflamación y dolor articular en las pacientes con AR tratadas con acupuntura. (→) Aumenta acción, síntesis y/o proliferación, ( - →) inhibe acción y/o síntesis y (- - -) inhibición indirecta de acción y/o síntesis.

## VIII. Conclusiones

- El tratamiento acupuntural aplicado, bajo las condiciones descritas en este estudio, a las pacientes con AR no generó cambios significativos en el grado de dolor ni en la inflamación de las articulaciones.
- La acupuntura aplicada en los puntos Dijí (B8), Zusanli (E36), Yinliquan (VB34), Quchi (IG11) y Hegu (IG4) produjo cambios en la expresión de las interleucinas Th1/Th2: IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-13 en las pacientes con AR.
- El tratamiento con acupuntura aplicado a las pacientes con AR indujo cambios en la expresión de algunas interleucinas Th1/Th2, así como en algunas moléculas inflamatorias que favorecieron una mejoría en la pacientes.
- El tratamiento acupuntural en las pacientes con AR indujo cambios en la expresión relativa de TNFR2 y la IL-1 $\beta$ , moléculas inflamatorias.
- A nivel sérico el tratamiento acupuntural aplicado en las pacientes con AR no generó cambios significativos en el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ .

## IX. Perspectivas

- Incrementar el tamaño de la muestra de pacientes con AR para tener un mejor panorama de la respuesta en la expresión a nivel de ARNm de moléculas Th1/Th2 e inflamatorias que permitan ver su balance antes y después del tratamiento.
- Aplicar el tratamiento con acupuntura de cada punto en particular o bien otro conjunto de puntos que favorezcan más la disminución en la inflamación de las articulaciones.
- Evaluar la síntesis de péptidos opioides en las pacientes con AR tratadas con acupuntura para identificar el inicio del estímulo acupuntural.
- Estudiar de forma individual la expresión de algunas de las ILs y moléculas inflamatorias que se detectaron en el presente trabajo a nivel de proteína.
- Evaluar los cambios que podría inducir la acupuntura a nivel de expresión tanto de ARNm como proteico de otras interleucinas implicadas en la AR, como lo son la IL-17 y la IL-18.

## X. Bibliografía

- Ahn AC, Tewari M, Poon CS, Phillips RS (2006), **The Limits of Reductionism in Medicine: Could Systems Biology Offer an Alternative?** PLOS, Vol. 2003, 3(6): e208.
- Álvarez Nemegyei J, Nuño Gutiérrez BL, Alcocer Sánchez JA (2005), **Enfermedades reumáticas y discapacidad laboral en población adulta rural** [En línea], revMed IMSS, 43(4): 287-292 < <http://www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/A4E42E96-D099-4EA7-96F0-C7076FBE135B/0/RM05403Prevalenreum%C3%A1tica.pdf>
- Anaya JM, Pineda-Tamayo R, Gómez LM, Galarza Maldonado C, Rojas-Villarraga A, Martín J (2006), **Artritis Reumatoide. Bases Moleculares, Clínicas y Terapéuticas**, Corporación para investigaciones biológicas.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. (1988), **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis**[En línea]; Arthritis Rheum, Mar;31(3):315-24, < [http://www.rheumatology.org/publications/classification/ra/1987\\_revised\\_criteria\\_classification\\_ra.asp?aud=mem](http://www.rheumatology.org/publications/classification/ra/1987_revised_criteria_classification_ra.asp?aud=mem) >.
- Arranz L, Guayerbas N, Siboni L, De la Fuente M. 2007, **Effect of acupuncture treatment on the immune function impairment found in anxious women**, Am J Chin Med; 35(1):35-51.

- Arranz L, Siboni L, De la Fuente M (2006), **Improvement of the interleukin 2 and tumor necrosis factor  $\alpha$  release by blood leukocytes as well as of plasma cortisol and antioxidant levels after acupuncture treatment in women suffering anxiety** [en línea], Journal of APPLIED BIOMEDICINE, 2: 115-122.
- Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF. 1998; **IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes.** J Immunol. 1998 Apr 15;160(8):3642-7.
- Bell IR, Caspi O, Schwartz GE, Grant KL, Gaudet TW, Rychener D, Maizes V, Weil A (2002), **Integrative medicine and systemic outcomes research: issues in the emergence of a new model for primary health care.** Arch Intern Med. Aug 12-26;162(15):1781; author reply 1781-2.
- Bienvenu JA, Monneret G, Gutowski MC, Fabien N (1988), **Cytokine assays in human sera and tissues**, Toxicology. 1998 Aug 7;129(1):55-61. Review.
- British Acupuncture Council (1988), **“Arthritis and acupuncture. The evidence for effectiveness”** [En línea], British Acupuncture Council <  
[http://www.acupunctureresearch.org.uk/papers/BP3\\_Arthritis.pdf](http://www.acupunctureresearch.org.uk/papers/BP3_Arthritis.pdf)>.
- Cañete JD, Martínez SE, Farrés J, Sanmartí R, Blay M, Gómez A, Salvador G, Muñoz-Gómez J (2000), **Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies**, Ann Rheum Dis. 59(4):263-8.

- Carballo F (2006), “**Acupuntura y auriculoterapia**”, Editorial Kier.
- Cardiel MH, Rojas-Serrano J (2002), **Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study**, Clin Exp Rheumatol, Sep-20(5):617-24.
- Cronstein BN. 2007 **Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis**. Bull NYU Hosp Jt Dis;65 Suppl 1:S11-5. Review.
- David J, Townsend S, Sathanathan R, Kriss S, Doré CJ (1999), **The effect of acupuncture on patients with rheumatoid arthritis: a randomized, placebo-controlled cross-over study** [En línea], Rheumatology (Oxford). 38(9):864-9, <  
<http://rheumatology.oxfordjournals.org/cgi/reprint/38/9/864>>.
- Davis MC, Zautra AJ, Younger J, Motivala SJ, Attrep J, Irwin MR (2007); **Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: implications for fatigue**, Brain Behav Immun, 2008 22(1):24-32. Epub Aug 15.
- Debas HT, Laxminarayan R, Starus E (2006), **Complementary and alternative Medicine** [En línea], Disease Control Priorities in Developing Countries, Chapter 69, 2a Edición, Disease Control Priorities Project, <  
<http://files.dcp2.org/pdf/DCP/DCP69.pdf> >.
- Ekman P, Davidson RJ, Ricard M, Wallace A (2005), **Buddhist and Psychological Perspectives on Emotions and Well-Being** [En línea],

CURRENT DIRECTIONS IN PSYCHOLOGICAL SCIENCE, Vol. 14, Num. 2, <  
[http://psyphz.psych.wisc.edu/web/pubs/2005/Ekman\\_etal\\_CurrDirPsychSci.pdf](http://psyphz.psych.wisc.edu/web/pubs/2005/Ekman_etal_CurrDirPsychSci.pdf) >.

- Eskan MA, Benakanakere MR, Rose BG, Zhang P, Zhao J, Stathopoulou P, Fujioka D, Kinane DF. 2008. **Interleukin-1beta modulates proinflammatory cytokine production in human epithelial cells.** Infect Immun. May;76(5):2080-9. Epub Mar 10.
- Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, Fay A, MacMillan S, Laramie J, Xiao W, Moldawer LL, Cobb JP, Laudanski K, Miller-Graziano CL, Maier RV, Schoenfeld D, Davis RW, Tompkins RG; Inflammation and Host Response to Injury, Large-Scale Collaborative Research Program (2004), **Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses** [En linea]; Physiol Genomics, 17; 19(3):247-54, <<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/reprint/19/3/247> >.
- Filshie J, Abbot P.1991; **Acupuncture for Chronic Pain: A Review**, Acupunct. Med;**9**:4-14.
- Fontana L (2008), **Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction**; Exp Gerontol, 2009 44(1-2):41-5. Epub Apr 12.
- Gabay C. 2006; **Interleukin-6 and chronic inflammation.** Arthritis Res Ther;**8** Suppl 2:S3. Epub 2006 Jul 28. Review.
- Gao B, Calhoun K, Fang D. 2006; **The proinflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha induce the expression of Synoviolin, an E3 ubiquitin ligase,**

**in mouse synovial fibroblasts via the Erk1/2-ETS1 pathway.** Arthritis Res Ther. 2006;8(6):R172.

- Goldblatt F, Isenberg DA (2005), **New therapies for rheumatoid arthritis** [En linea], Clin Exp Immunol, 140(2):195-204. Review, <  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1809355&blobtype=pdf> >.
- Guichelaar T, ten Brink CB, van Kooten PJ, Berlo SE, Broeren CP, van Eden W, Broere F (2008), **Autoantigen-specific IL-10-transduced T cells suppress chronic arthritis by promoting the endogenous regulatory IL-10 response,** J Immunol. 1;180 (3):1373-8.
- Hart PH, Ahern MJ, Smith MD, Finlay-Jones JJ. 1995; **Regulatory effects of IL-13 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis.** Clin Exp Immunol. Mar; 99(3):331-7.
- Hecker HU, Steveling A, Peuker ET, Kastner J. 2007. **Acupuntura,** Manual Moderno.
- Hillyer LM, Woodward B. 2003; **Interleukin-10 concentration determined by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay is unrepresentative of bioactivity in murine blood.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Dec;285(6):R1514-9.
- Itoh K, Kitakoji H. 2007, **Acupuncture for chronic pain in Japan: a review.** Evid Based Complement Alternat Med. Dec;4(4):431-8.
- Jacob CO, Holoshitz J, Van der Meide P, Strober S, McDevitt HO. 1989 **Heterogeneous effects of IFN-gamma in adjuvant arthritis,** J Immunol. 1989 Mar 1;142(5):1500-5.

- Johansen, M., Yu, G. J., Madden, T., and Chiang, J. 2004, **Effect Of Acupuncture On Circulating Cytokines In Healthy Subjects**, 15 (2) 19-23.
- Jondostir IH (1998), **Physical exercise, acupuncture and immune function**, BMAS scientific meeting in London.
- Jong MS, Hwang SJ, Chen FP (2006), **Effects of electro-acupuncture on serum cytokine level and peripheral blood lymphocyte subpopulation at immune-related and non-immune-related point** , Acupunct Electrother Res. 31(1-2):45-59.
- Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegård D, van den Berg WB (1999), **Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis**, Arthritis Res. 1(1):81-91. .
- Junying G y Zhihong (1996), **Practical Traditional Chinese Medicine and Pharmacology. Basic Theories and Principles**, New World Press.
- Itoh K, Patki V, Furie RA, Chartash EK, Jain RI, Lane L, Asnis SE, Chiorazzi N (2000), **Clonal expansion is a characteristic feature of the B-cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis**”, Arthritis Res;2(1):50-8.
- Kaptchuk TJ (2002), **Acupuncture: theory, efficacy, and practice**, Ann Intern Med. 5; 136(5): 374-83. Review [Consulta: 28 de mayo 2008] <[www.hindawi.com/GetPDF.aspx?doi=10.1080/0962935031000114943](http://www.hindawi.com/GetPDF.aspx?doi=10.1080/0962935031000114943)>.
- Karst M, Scheinichen D, Rueckert T, Wagner T, Wiese B, Piepenbrock S (2003), **Effect of acupuncture on the neutrophil respiratory burst: a placebo-controlled single-blinded study**, Complement Ther Med, 11:4–10.



Singapore, 35(11):749-52, [Consulta: 17 de Septiembre del 2008] <  
<http://www.annals.edu.sg/PDF/35VolNo11Nov2006/V35N11p749.pdf> >.

- Leung AY, Kim SJ, Schulteis G, Yaksh T. **The effect of acupuncture duration on analgesia and peripheral sensory thresholds.** BMC Complement Altern Med. 2008 May 1; 8:18.
- Lequin RM (2005), **Enzyme immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked immnosorbent assay (ELISA)** [En línea], Clinical Chemistry 51:12 (2415-2418), , < <http://www.clinchem.org/cgi/reprint/51/12/2415>>.
- Lewith G (1993), **Acupuncture Trial Methodology** [en línea], ICMART Symposium, (<  
<http://www.acupunctureinmedicine.org.uk/servearticle.php?artid=209>>.
- Ley Hurtado G (1983), **Diagnostico sensitivo táctil**, s. ed., México.
- Liberman AC, Druker J, Refojo D, Holsboer F, Arzt E, **Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells**, FASEB J. 23(5):1558-71. Epub (2009).
- Liu X, Sun L, Xiao J, Yin S, Liu C, Li Q, Li H, Jin B. 1993; **Effect of acupuncture and point-injection treatment on immunologic function in rheumatoid arthritis.** J Tradit Chin Med. Sep;13(3):174-8.
- Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G (2001), **Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample** [En línea], *Biol. Proced. Online*;3(1): 19-25, < <http://biologicalprocedures.com/bpo/arts/1/20/m20.pdf>>.

- Matthey DL, Glossop JR, Nixon NB, Dawes PT. 2007; **Circulating levels of tumor necrosis factor receptors are highly predictive of mortality in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 2007 Dec;56(12):3940-8.
- McInnes IB, Schett G. 2007; **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,** *Nat Rev Immunol,* 7(6):429-42. Review.
- Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg EL. 1998; **IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells,** *J Immunol.* Sep 1;161(5):2457-64.
- Mendenhall, W. 1991; **Estadística para Administradores.** Editorial Iberoamericana, México, D. F.
- Moffet HH. 2006; **How might acupuncture work? A systematic review of physiologic rationales from clinical trials.** *BMC Complement Altern Med.* Jul 7;6: 25.
- Nakajima H, Takamori H, Hiyama Y, Tsukada W. 1991; **The effect of treatment with recombinant gamma-interferon on adjuvant-induced arthritis in rats.** *Agents Actions.* Sep;34 (1-2):63-5.
- Nersting J, Schmiegelow K (2009), **Pharmacogenomics of methotrexate: moving towards individualized therapy,** [Pharmacogenomics.](#),10(12):1887-9.
- Pal SK (2002), **Complementary and alternative medicine: An overview”** [En línea], *Current science,* Vol.82, No.5 < <http://www.ias.ac.in/currsci/mar102002/518.pdf> >.
- Park MB, Ko E, Ahn C, Choi H, Rho S, Shin MK, Hong MC, Min BI, Bae H (2004), **Suppression of IgE production and modulation of Th1/Th2 cell response by**

**electroacupuncture in DNP-KLH immunized mice**, J Neuroimmunol. 151(1-2):40-4.

- Petti FB, Liguori A, Ippoliti F. 2002; **Study on cytokines IL-2, IL-6, IL-10 in patients of chronic allergic rhinitis treated with acupuncture**. J Tradit Chin Med. 2002 Jun; 22(2):104-11.
- Pfab F, Hammes M, Huss- Marp J (2006), **Preventive effect of acupuncture on histamine- induced itch: A blinded, randomized, placebo controlled, crossover trial** [En linea], J. Allergy Clin. Immunol, <[http://www.zen-tai.com/user\\_files/acuskin.pdf](http://www.zen-tai.com/user_files/acuskin.pdf)>.
- Rein G (2004), **Bioinformation within the biofield: beyond bioelectromagnetics**; J Altern Complement Med,10(1):59-68. Review.
- Rossol M, Meusch U, Pierer M, Kaltenhäuser S, Häntzschel H, Hauschildt S, Wagner U. 2007; **Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells**. J Immunol. Sep 15; 179(6):4239-48.
- Sánchez Araujo M (1996), **Acupuntura: Mecanismos Básicos** [En linea], Gac. Med. Caracas, 104 (4): 378: 389 (1996), [Consulta: 13 de Agosto del 2008] <[http://www.anm.org.ve/FTPANM/online/1996/Octubre\\_Diciembre/09.%20S%E1nchez%20M%20\(378-389\).pdf](http://www.anm.org.ve/FTPANM/online/1996/Octubre_Diciembre/09.%20S%E1nchez%20M%20(378-389).pdf)>.
- Santana DP (2008), **Fundamental of buddhism** [En linea], Budha Dharma Association Inc, [Consulta: 18 de Junio 2008] <[http://www.buddhanet.net/pdf\\_file/fundbud1.pdf](http://www.buddhanet.net/pdf_file/fundbud1.pdf)>.

- Sattler A, Wagner U, Rossol M, Sieper J, Wu P, Krause A, Schmidt WA, Radmer S, Kohler S, Romagnani C, Thiel A. 2009; **Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation.** Blood. 2009 Feb 26; 113(9):1948-56. Epub 2008 Dec 22.
- Schlünzen L, Vafaee MS, Cold GE (2007), **Acupuncture of LI-4 in anesthetized healthy humans decreases cerebral blood flow in the putamen measured with positron emission tomography** [en línea], Anesth Analg. 104(2):308-11, [<http://www.anesthesia-analgesia.org/cgi/reprint/104/2/308.pdf> >.
- Scogmanillo-Szabo MVR, Bechara GH, Queiroz Cunha F (2005), **Effect of acupuncture on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 concentrations in the peritoneal exudates of carrageenan-induced peritonitis in rats** [En línea], Ciencia Rural, Santa Maria, 35(1), p. 103- 108, <  
<<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/331/33135116.pdf>>.
- Shen Weixing C (2004), **“Typical TCM therapy for Rheumatoid Arthritis”**, Shangai University of Traditional Chinese Medicine Press.
- Sierpina VS, Frenke MA (2005), **Acupuncture: A clinical Review**, Southern Medical Association.
- Streitberger K, Friedrich-Rust M, Bardenheuer H, Unnebrink K, Windeler J, Goldschmidt H, Egerer G (2003), **Effect of acupuncture compared with placebo-acupuncture at P6 as additional antiemetic prophylaxis in high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation: a randomized controlled single-blind trial** [En línea], Clin

[<<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/9/7/2538>>.

- Sussmann DJ (1973), **Acupuntura. Teoría y práctica**, 9ª edición, Editorial kier, (1973).
- Takakura N, Yajima H (2007), **A double-blind placebo needle for acupuncture research**, MC Complement Altern Med. Oct 10;7:31.
- Taguchi R, 2007; **Acupuncture anesthesia and analgesia for clinical acute pain in Japan**. Evid Based Complement Alternat Med. Jun;5(2):153-8.
- Tam LS, Leung PC, Li TK, Zhang L, Li EK (2007), **Acupuncture in the treatment of rheumatoid arthritis: a double-blind controlled pilot study** [en línea], BMC Complement Altern Med. Nov 3;7:35, (2007) <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/7/35>>.
- Tengstrand B, Ahlmén M, Hafström I (2004), **The influence of sex on rheumatoid arthritis: a prospective study of onset and outcome after 2 years**, J Rheumatol. 2004 Feb; 31(2):214-22.
- Veitria Estrada MC; Pentón Valdivia MA, Palmero Estrada M (2002), **Acupuntura y sus técnicas en el asma bronquial** [En línea], Rev. Cubana Enfermer, 18 (1): 32-7 [[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03192002000100006&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03192002000100006&script=sci_arttext&tlng=es)] >.
- Vikers AJ (2002), **Placebo controls in randomized trials of acupuncture**, Sage Publications, Vol 25. No 4(421-435) (2002).
- Wu Huan-Gan, ZHOU Li-Bin, PAN Ying-Ying, HUANG Cheng, CHEN Han-Ping, SHI Zheng and HUA Xue-Gui (1999), **Study of the mechanisms of**

**acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines** [En linea], World Journal of Gastroenterology December; 5(6): 515-517, <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/5/515.pdf>>.

- Yamaguchi N, Takahashi T, Sakuma M, Sugita T, Uchikawa K, Sakaiharu S, Kanda T, Arai M, Kawakita K (2007), “**Acupuncture Regulates Leukocyte Subpopulations in Human Peripheral Blood**” [En linea], Evid Based Complement Alternat Med. Dec;4(4):447-453<<http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/4/4/447>>.
- Yang T, Wang Z, Wu F, Tan J, Shen Y, Li E, Dai J, Shen R, Li G, Wu J, Wang L, Wang H, Liu Y. 2010; **A variant of TNFR2-Fc fusion protein exhibits improved efficacy in treating experimental rheumatoid arthritis** PLoS Comput Biol. Feb 5;6(2):e1000669.
- Yeom MJ, Lee HC, Kim GH, Shim I, Lee HJ, Hahm DH, 2003, “**Therapeutic effects of Hominis placenta injection into an acupuncture point on the inflammatory responses in subchondral bone region of adjuvant-induced polyarthritic rat.**”, Biol Pharm Bull. Oct; 26(10):1472-7.
- Yim YK, Lee H, Hong KE, Kim YI, Lee BR, Son CG, Kim JE. 2006, **Electro-acupuncture at acupoint ST36 reduces inflammation and regulates immune activity in Collagen-Induced Arthritic Mice.** Evid Based Complement Alternat Med. Mar;4(1):51-7. Epub Aug 18.
- Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T (2000), **Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2**

**balance and disease severity in rheumatoid arthritis**, *Arthritis Rheum*, Mar;43(3):617-27.

- Zagon IS, Rahn KA, Bonneau RH, Turel AP, McLaughlin PJ (2010); **Opioid growth factor suppresses expression of experimental autoimmune encephalomyelitis**, *Brain Res*. 2010 Jan 15;1310:154-61. Epub 2009 Nov 18.
- Zan-Bar T, Aron A, Shoenfeld Y (2004), **Acupuncture therapy for rheumatoid arthritis**, *APLAR Journal of Rheumatology* (3) , 207–214.
- Zhang H, Bian Z, Lin Z. 2010, **Are acupoints specific for diseases? A systematic review of the randomized controlled trials with sham acupuncture controls**. *Chin Med*. Jan 12;5:1.
- Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Wu GY, Shen YC. 2005; **Cortisol and cytokines in chronic and treatment-resistant patients with schizophrenia: association with psychopathology and response to antipsychotics**, *Neuropsychopharmacology*, 2005 Aug;30(8):1532-8.
- Zijlstra FJ, Van den Berg-de Lange I, Huygen F. J. P. M and Klein J (2003), **Anti-inflammatory actions of acupuncture**, *Mediators of Inflammation*, 12(2), 59-/69.