



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

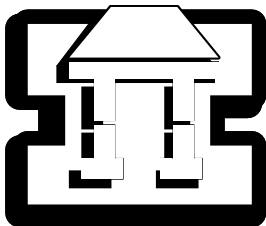
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“PAPEL DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN
DE LOS MACRÓFAGOS (MIF) EN LA REGULACIÓN
DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL MURINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A :
BIOL. IMELDA JUÁREZ AVELAR

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA



MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

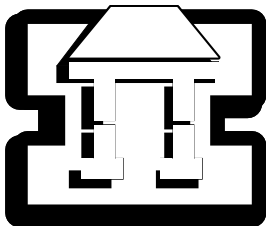
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“PAPEL DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN
DE LOS MACRÓFAGOS (MIF) EN LA REGULACIÓN
DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL MURINA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A :
BIOL. IMELDA JUÁREZ AVELAR**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA**



MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2008

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, la dirección estuvo a cargo de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

El presente proyecto de investigación fue apoyado por:

CONACYT 49812-Q

Proyectos

PAPPIT IN208606,UNAM

PAPCA-FES,IZTACALA UNAM

Durante el desarrollo de los créditos la autora contó con beca CONACYT y beca COMECyT para la escritura de la presente tesis de posgrado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir y porque siempre esta conmigo.

A mi familia porque es una parte importante en mi vida.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo. Gracias por su apoyo, conocimientos, asesoría y amistad.

A los miembros del Jurado:

Dra. Ana Flisser Steinbruch

Dr. Rafael Saavedra Durán

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dra. Leticia Moreno Fierros

Por sus importantes observaciones, sugerencias y supervisión durante el desarrollo de la presente investigación.

A la M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras por brindarme su apoyo para mi superación académica.

A todos los compañeros del Lab 8 y ahora 5 de Inmunoparasitología por su apoyo, tiempo y amistad.

SINCERAMENTE
GRACIAS A TODOS

DEDICATORIAS

A mi padre el Sr. Héctor Juárez Ramírez un hombre incansable que hasta el último momento de su vida me demostró lo valioso que es vivir un día como si fuera el último, así como lo importante de ser alguien en la vida. Siempre estarás conmigo papá.

A mi madre la Sra. Juana Avelar Gómez por su apoyo incondicional en todo momento aún en los momentos más difíciles, gracias por esas palabras de aliento que algún día me levantaron para seguir adelante. Recuerde que no está sola, yo siempre estaré con usted hasta el último momento y que nuestro angelote nos cuida desde arriba. Espero no haberla defraudado y que se sienta orgullosa de mí.

A Noé A. Ramírez Javier por su paciencia, su apoyo, por ser la persona que le sigue dando un sentido especial a mi vida, por tu entrega incondicional y porque ahora formaremos una nueva familia con la llegada de nuestra nena.

A mi familia sobrinos y hermanos por sus ocurrencias y por su apoyo incondicional.

A mi amigocha de clases Ana Luisa Gutiérrez porque juntas logramos lo que algún día parecía imposible de alcanzar. Gracias por tu amistad.

INDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

GLOSARIO

INTRODUCCIÓN

- Sistema inmune 1
- Autoinmunidad y enfermedades autoinmunes 3
- Artritis reumatoide 7
- Inmunología de la Artritis Reumatoide 10
- Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) 12
- MIF y su participación en artritis reumatoide..... 13
- Mataloproteinasas de matriz 15
- Modelo de artritis reumatoide 16

OBJETIVOS E HIPÓTESIS 18

DISEÑO Y METODOLOGÍA 19

RESULTADOS 28

DISCUSIÓN 49

CONCLUSIONES 55

BIBLIOGRAFÍA 56

APÉNDICE 63

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, de origen autoinmune que afecta aproximadamente el 1% de la población, puede presentarse a cualquier edad siendo la mayor incidencia entre los 25 y 55 años. El reconocimiento de un antígeno exógeno o de un autoantígeno es el detonante de una serie de eventos, como la infiltración de células T autoreactivas y macrófagos dentro del sinovio, lo que resulta en la formación de pannus y eventualmente en la destrucción de huesos y ligamentos articulares en pacientes con AR. En años recientes se ha identificado y relacionado al factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) como una molécula determinante en la inmunopatogénesis de la AR. MIF es una proteína trimérica, altamente conservada, de 12 kDa, que puede actuar como citocina, es secretada por células T y macrófagos activados y participa de manera importante en su activación. En pacientes con AR, MIF se encuentra en altas concentraciones en el fluido articular, correlacionando este fenómeno con los modelos murinos experimentales de AR inducida con colágena, en los que se ha observado que la administración exógena de MIF exagera la enfermedad, mientras que los anticuerpos monoclonales anti-MIF inhiben la inflamación. Estas observaciones no han dejado lugar a dudas de que MIF tiene una participación importante en la patofisiología de la AR, sin embargo, aún no se conocen con precisión los mecanismos finos de la participación que tiene MIF en este proceso. Con el objetivo de definir la participación de MIF en la AR, desarrollamos un modelo de AR inducida por antígeno (ARiA) en ratones deficientes para el gen de MIF (MIF^{-/-}) y en ratones silvestres como controles (MIF^{+/+}), ambos con fondo genético BALB/c, por inyección intra-articular de albúmina agregada por calor, en ratones previamente sensibilizados (transferencia intravenosa de células TCD4⁺ de ratones transgénicos para ovoalbúmina). Los dos grupos de ratones desarrollaron ARiA, y el progreso de la AR se determinó midiendo el desarrollo de la inflamación (edema y eritema) de las articulaciones diartrodiales, la producción de citocinas, y de óxido nítrico; la infiltración celular y la expresión de metaloproteínas de matriz (MMP2 y MMP9). Los ratones MIF^{-/-} AR presentaron un cuadro clínico de AR reducido, menor grado de inflamación y eritema en comparación con los ratones MIF^{+/+} AR. La producción de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y óxido nítrico fue menor en los MIF^{-/-} AR en comparación con los MIF^{+/+} AR. En la tinción de H & E de los cortes longitudinales de las articulaciones posteriores, los ratones MIF^{-/-} AR

presentaron infiltrado celular menor, el cartílago se observó más compacto y homogéneo. No se observó deformación de la membrana sinovial, presencia de pannus ni granulomas en comparación con los ratones MIF^{+/+} AR, los cuales presentaron un aumento significativo en el infiltrado celular. Así mismo la expresión de MMP2 y MMP9 fue proporcional a la cantidad de infiltrado inflamatorio en ambos grupos. Con estos resultados podemos concluir que MIF funge como mediador en la génesis, desarrollo y perpetuación de la inflamación en la AR por medio de la inducción de IL-1 β , TNF- α , y óxido nítrico. MIF participa en la regulación de la infiltración celular a nivel del cartílago lo cual contribuye al desarrollo del daño articular. MIF favorece la liberación de metaloproteínas de matriz 2 y 9.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease caused mainly by pathogenic activation of T-cells recognizing cartilage antigens. Infiltration of these autoreactive T-cells and macrophages into the synovium results in the formation of pannus, eventually destructing bones and ligaments. MIF is a 12 kDa highly conserved trimeric protein which acts as an enzyme, hormone and cytokine. MIF is largely known for its role in macrophage effectors function and T cell activation, as well as a pro-inflammatory molecule. Using a murine antigen-induced arthritis model (**ARiA**) in MIF^{-/-} and MIF^{+/+} BALB/c mice we analyzed the role of endogenous MIF in rheumatoid arthritis. **ARiA** was induced by intra-articular injection of heat aggregated OVA in presensitized (i.v. transferred CD4⁺ DO11.10 cells) mice. MIF^{-/-} mice displayed low signs of disease, given that inflammation and eritema were reduced, these observations were associated with low levels of TNF- α , IFN- γ and nitric oxide in serum. Histological arthritic scores for synovial inflammation were also significantly decreased compared to MIF^{+/+} mice. Similarly, levels of MMP-2 and MMP-9 performed by immunohistochemistry were lower. These results indicated that MIF plays a critical role in inflammation and joint destruction in AR.

INTRODUCCIÓN

En la lucha por la existencia, los seres vivos están expuestos a una serie de microorganismos invasores como virus, bacterias, hongos así como a las moléculas producidas por los mismos. Para impedir los efectos dañinos de esta interacción, los animales incluyendo al hombre han desarrollado, a lo largo de la evolución, una serie de mecanismos de defensa, y de ellos el más sofisticado es el sistema inmunitario, constituido por diversas células, tejidos y moléculas encargados de conferir respuestas protectoras, rápidas y específicas contra sustancias extrañas, siendo así responsable de llevar a cabo la respuesta inmune [1]. Este sistema se ha dividido en 2 partes: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa.

La respuesta inmune innata: La inmunidad innata de cada individuo, comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares. Los principales componentes de este tipo de inmunidad son a) las barreras físicas y químicas como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas [2] y linfocitos citolíticos naturales (NK); 3) proteínas de la sangre, que incluyen componentes del sistema complemento y otros mediadores de la inflamación, y 4) citocinas que regulan y coordinan numerosas actividades de las células. Este tipo de respuesta proporciona las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos [2].

La respuesta inmune adaptativa: La inmunidad adquirida no está presente desde el nacimiento, sino que se produce con el tiempo y es específica contra el inmunógeno que le da origen, es decir se produce como una respuesta específica a cada tipo de infección, distinguiendo diferentes agentes patógenos. Las células que participan en este tipo de inmunidad son linfocitos que provienen de 2 linajes diferentes producidos en la médula ósea. Sin embargo el lugar de maduración es diferente para cada uno de ellos. Los linfocitos que maduran en la médula ósea se llaman linfocitos B y los que maduran en el timo reciben el nombre de linfocitos T [2].

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos (Ac), reconocen antígenos extracelulares y actúan así como mediadores específicos de la inmunidad humoral. En este proceso de reconocimiento antigénico los linfocitos B participan en la presentación de antígeno. En la superficie de las APC (del inglés Antigen

Presenting Cell) como células dendríticas y macrófagos se encuentran moléculas que optimizan la presentación del antígeno (Ag). Este grupo de moléculas es llamado complejo principal de histocompatibilidad (-MHC-del inglés Major Histocompatibility Complex). La especificidad del MHC para presentar el Ag a linfocitos TCD8⁺ ó a linfocitos TCD4⁺, consta de especificidad, dividido en moléculas de clase I (MHC-I) y moléculas de clase II (MHC-II) respectivamente [2].

Los linfocitos T son las células responsables de la inmunidad celular, reconocen antígenos, pero no sintetizan anticuerpos, y presentan una característica sobresaliente, sólo reconocen Ag peptídicos unidos a proteínas del huésped que están codificados por genes del MHC y Ag peptídicos que se expresan en la superficie de otras células. Los linfocitos T se dividen en dos grupos; T cooperadores y T citotóxicos. Los linfocitos T cooperadores (-Th- del inglés T helper) se caracterizan por expresar en su superficie moléculas de tipo CD4 (TCD4⁺). Este tipo de linfocitos, en respuesta a la estimulación antigénica, sintetizan citocinas, proteínas cuya función es estimular la proliferación y la diferenciación de ellos mismos y de otras células como los linfocitos B [2]. Los linfocitos T citotóxicos expresan en su membrana moléculas de tipo CD8 (TCD8⁺); este tipo de linfocitos participa activamente en la eliminación de células infectadas ó células tumorales [3].

En 1986 el grupo de linfocitos Th recibió otro tipo de división basada en el patrón de citocinas que secretan. Los linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1) que se caracterizaron por la secreción de interleucina (IL) 2, interferón (IFN) γ y el factor de necrosis tumoral (TNF α) (citocinas pro-inflamatorias) y los linfocitos cooperadores tipo 2 (Th2) que producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que son citocinas anti-inflamatorias [4].

AUTOINMUNIDAD

La función del sistema inmune es proteger el cuerpo de microorganismos invasores, como virus, hongos, bacterias o parásitos, mediante la producción de anticuerpos o linfocitos sensibilizados. El sistema inmune, en condiciones normales debe distinguir las células propias de células exógenas o agentes extraños. Sin embargo, en ciertos casos, las células del sistema inmune, específicamente los linfocitos, atacan a las células propias. Esta alteración puede conducir a una gran variedad de enfermedades llamadas autoinmunes, con patologías específicas que dependen del órgano o sistema atacado [4].

Los linfocitos “autorreactivos” existen de manera natural, sin embargo por un sistema homeostático son suprimidos por otros linfocitos, sin generar enfermedad o patología alguna en la mayoría de los organismos. Cuando se produce alguna alteración en el control de este proceso de supresión de los linfocitos autoreactivos, o existe una alteración en algún tejido, el sistema inmune genera autoinmunidad [5].

No se conocen del todo los mecanismos exactos que producen estos cambios en el proceso de control de autoreactividad, aun cuando se han sugerido algunos mecanismos que podrían estar implicados en el desencadenamiento de la autoinmunidad. A continuación se describen brevemente algunos de estos mecanismos:

Mecanismos de autoinmunidad

1) Anormalidades de linfocitos: estas alteraciones pueden ocurrir primariamente en los linfocitos T, B o ambos, y llevan a falla de la tolerancia a lo propio. Las causas de estas anomalías se pueden dividir en dos grupos:

Falla de la tolerancia central: normalmente el timo selecciona los linfocitos inmaduros que serán útiles en la respuesta inmune. La selección tímica es positiva y negativa. La eliminación de linfocitos autoreactivos se hace por apoptosis y/o anergia funcional (bloqueo o inactivación). Si hay una falla en este tipo de selección, se altera la tolerancia a lo propio y se desencadena un mecanismo autoinmune [5].

Falla de la tolerancia periférica: este tipo de tolerancia se refiere a que los linfocitos ya maduros podrían reaccionar contra autoantígenos, pero existen distintos mecanismos para evitar esto a nivel periférico, como son:

-
-
- Citocinas inmunosupresoras producidas por linfocitos T reguladores, pueden perder su función en determinadas condiciones [5].
 - Los linfocitos TCD8⁺ pueden ser citotóxicos o supresores. Estos últimos pueden bloquear la respuesta inmune a nivel periférico, pero en determinadas enfermedades pierden esta propiedad [6, 7].
 - Hay moléculas que pueden inactivar las células T, como CTLA-4, que funciona como inhibidor de respuesta inmune contra antígenos propios, pero que en determinadas condiciones se hace deficiente [8].
 - Los linfocitos maduros (T reguladores) en algún momento sufren apoptosis, pero esto se puede alterar con mutaciones de péptidos que participan en este proceso. [9].

2) Factores genéticos: la mayoría de las enfermedades autoinmunes tiene un fuerte componente genético y una gran variedad de alteraciones:

- Alteración genética en el sistema MHC (HLA en humanos) el que más frecuentemente se encuentra relacionado, sobre todo el de clase II, ya que estas moléculas están involucradas en la selección y activación de los linfocitos TCD4⁺ mediante la presentación de antígenos [5].
- Deficiencias congénitas de proteínas del complemento, como por ejemplo C2 y C4, que se han visto alteradas en el lupus y artritis reumatoide[5].
- Alteración en el gen de alguna interleucina que genere la condición de que se produzca más una citocina que otra, produciéndose un desbalance que desencadene un proceso de autoinmunidad [10].
- Mutación del gen de Fas y su ligando: el receptor Fas normalmente induce apoptosis, pero si muta su gen, perderá esta importante función [11].

3) Papel de las infecciones: El desencadenamiento de autoinmunidad por procesos infecciosos es común, sin embargo éste no se debe al agente infeccioso por sí mismo, sino a la respuesta inmune que se dispara en forma no-regulada, que puede llevar a las siguientes consecuencias:

-
- Producción de inflamación local y expresión de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos, que llevan a la pérdida de la tolerancia de los linfocitos T y producción de autoinmunidad específica en los tejidos [12].
 - Alteración de antígenos propios y creación de neo-antígenos que desencadenarán una respuesta inmune [13].
 - Mimetismo molecular: hay antígenos bacterianos, virales o parasitarios que son excepcionalmente similares a antígenos propios y que dentro de nuestro organismo inducen una respuesta inmune, en que los anticuerpos contra la infección pueden tener reactividad cruzada contra el antígeno propio y producir daño [12].
 - Activadores policlonales o super-antígenos: son productos de origen bacteriano que pueden estimular gran número de linfocitos B potencialmente autorreactivos en ausencia de un antígeno; este proceso infeccioso puede llevar a una reactivación de la enfermedad inmune [14].

4) Factores hormonales: la mayoría de las enfermedades autoinmunes ocurren en mujeres lo que indica la importancia de hormonas sexuales en estas enfermedades. En este sentido, está plenamente demostrado que los estrógenos estimulan la producción de IgG, que es la inmunoglobulina patogénica, ya que puede formar complejos inmunes. Los andrógenos tienen cierto efecto inmunosupresor, ya que favorecen el desarrollo de linfocitos T supresores [5].

5) Otros mecanismos: Existen autoantígenos que normalmente no son visibles para el sistema inmune, por lo tanto no han inducido tolerancia. En situaciones que se producen alteraciones anatómicas de los tejidos (inflamación, isquemia o trauma), se pueden exponer estos autoantígenos y desencadenar la producción de anticuerpos con el consecuente daño tisular [15].

ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Las enfermedades autoinmunes son consideradas en la actualidad como incurables y muchas de ellas son agresivamente incapacitantes a corto plazo, llegando inclusive a causar la muerte. Hay poco más de 80 tipos de enfermedades autoinmunes diferentes y cada una de ellas presenta síntomas distintos. Los órganos y tejidos que se ven comúnmente afectados por trastornos autoinmunes son los componentes de la sangre como los glóbulos rojos, los vasos sanguíneos, los tejidos conectivos, las glándulas endocrinas, los músculos, las articulaciones y la piel. Los procesos autoinmunes pueden tener varios resultados, por ejemplo, destrucción lenta de un tipo específico de células o de tejido, estimulación excesiva del crecimiento de un órgano, o interferencia en su función. Las enfermedades autoinmunes han sido clasificadas de la siguiente manera:

A) Órgano específicas: el proceso autoinmune se dirige sobre todo contra un órgano. Por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto (glándula tiroidea), la anemia perniciosa (estómago), la enfermedad de Addison (glándulas suprarrenales), y la diabetes insulino dependiente o diabetes tipo I (páncreas) [15].

B) No órgano específicas: la actividad autoinmune se extiende por todo el cuerpo. Entre ellas se encuentran artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, y la dermatomiositis.[16]

ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, sistémica e inflamatoria de origen autoinmune y de etiología desconocida, que afecta aproximadamente entre el 0.8-1 % de la población en su mayoría adulta a nivel mundial [17] con un impacto económico comparable con el de la enfermedad arterial coronaria [18].

Algunas de las causas reconocidas como detonadores del proceso de autoinmunidad en la AR son:

Factores ambientales: Ha sido ampliamente reportado en la literatura científica que algunas bacterias y virus pueden desencadenar el proceso de la AR en individuos genéticamente susceptibles [21]. Sin embargo, esta enfermedad no es contagiosa y no se ha descubierto un microorganismo involucrado en su desarrollo. Entre algunos agentes infecciosos que han sido objeto de estudio como causantes de la AR se citan: virus de Epstein Barr (EBV), retrovirus, parvovirus B19, virus de la hepatitis C, *Mycobacterium tuberculosis* (Mt), *Mycoplasma*, *Proteus* y *Helicobacter pylori* [22].

Factores inmunológicos: La transición de los linfocitos de un estado de tolerancia a una fase de activación inmune o autoinmune es regulada a diferentes niveles. Dos parámetros importantes en esta transición son el estado de maduración de las células presentadoras de antígenos (CPA) y los niveles de antígenos propios que son detectados por el sistema inmunitario [22].

La hipótesis actual es que las CPA, en ausencia de señales del sistema inmunitario innato o de señales de peligro, permanecen relativamente inmaduras e inducen tolerancia en las células T autorreactivas al presentarle péptidos propios [23, 24]. La inducción de tolerancia periférica también depende de la concentración del antígeno propio [8]. El incremento en la presentación de antígenos propios por las CPA, debido al aumento de sus niveles de expresión, permite que las células T autorreactivas “ignorantes” sean activadas. Si se incrementan los niveles de antígenos propios en ausencia de eventos que promuevan la maduración de las CPA, se mantiene la tolerancia a estos antígenos; y si por el contrario, ocurre en presencia de señales proinflamatorias u otros eventos que promueven la

maduración de las CPA, se rompe la tolerancia por activación de células T autorreactivas y se desarrollan enfermedades autoinmunes[14].

La AR puede presentarse a cualquier edad, sin distinción de razas, se ha observado que la mayor incidencia de inicio ocurre entre los 25 y 55 años de edad, y es 2.5 veces mayor en las articulaciones distales de las mujeres que en los hombres [5, 25, 26]. En la Fig.1 se puede observar las tres fases que distinguen el desarrollo de la inflamación en la artritis reumatoide.

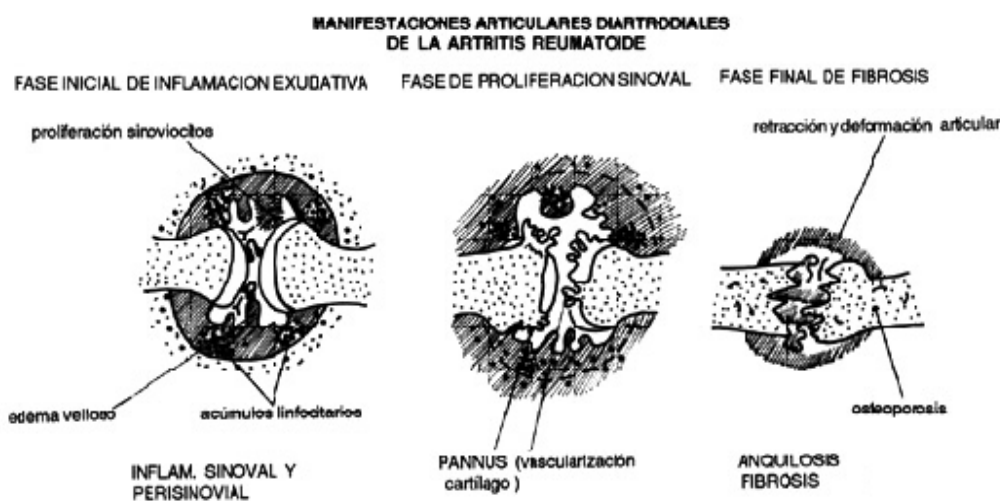


Fig. 1 Morfología del desarrollo de las tres fases características de la inflamación en la Artritis Reumatoide.

Primera fase (de inflamación sinovial y perisinovial) caracterizada por edema en el estroma sinovial, que produce hipertrofia vellosa, la proliferación celular sinovial se dispone en 6 a 9 capas (normalmente de 1-3 capas), gran infiltración de linfocitos, que se distinguen a manera de folículos linfáticos (cuerpos de Allison-Ghormley), células plasmáticas, monocitos, macrófagos y presencia de exudado fibrinoso en la superficie sinovial y, en menor grado en el estroma. Como consecuencia puede presentarse daño de pequeños vasos (vénulas, capilares y arteriolas) que consiste en tumefacción endotelial, engrosamiento de la pared, infiltración de algunos leucocitos, trombosis y hemorragias perivasculares, así como microfocos de necrosis [25, 26].

Segunda fase (de proliferación o de desarrollo de pannus). Si la inflamación persiste se desarrolla tejido granuloso, exuberante, llamado *pannus*, que se extiende sobre la superficie articular y se acompaña de vascularización del cartílago. El daño del cartílago y de los tejidos vecinos (cápsula, tendones, ligamentos y hueso) se produce por dos mecanismos:

1) Desarrollo de tejido granular junto a proliferación de células sinoviales con destrucción directa del cartílago articular.

2) Liberación de enzimas lisosomales de sinoviocitos, polimorfonucleares y macrófagos; entre aquéllas, proteasas ácidas y neutras, colagenasas y enzimas proteolíticas (metaloproteínas de matriz) capaces de fragmentar proteoglicanos y fibras colágenas [26].

Tercera fase (de fibrosis y anquilosis). En esta fase se produce deformación e inmovilidad articular. El tejido granuloso se convierte en tejido fibroso en la cápsula, tendones y tejido periarticular inflamados, lo que produce gran deformación de la articulación. La desaparición del cartílago articular y fibrosis del espacio articular conducen a la inmovilización articular (anquilosis) [27].

La AR aunque es considerada una enfermedad de las articulaciones, puede exhibir una variedad de manifestaciones extra-articulares, por lo que puede considerarse una enfermedad sistémica que puede afectar a otros órganos y tejidos como los pulmones, los ojos y la médula ósea [1] manifestándose principalmente como:

- *Nódulo reumatoideo.* Se presenta en el 20 a 25% de los casos, se produce en el tejido subcutáneo, en tejido periarticular y, menos frecuentemente, en vísceras.
- *Alveolitis fibrosante.* Puede llegar hasta el pulmón.
- *Angeítis de pequeños vasos.* Produce úlceras cutáneas, escleritis, conjuntivitis y uveítis.
- *Pericarditis y endocarditis.*
- *Compromiso renal* (glomerulitis, glomerulonefritis focal y segmentaria; neuropatía)

INMUNOLOGÍA DE LA AR

En situaciones no patológicas, existe un equilibrio entre las citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β , IL-15, IL-17, e IFN- γ , y las anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, pero en el caso de la AR este equilibrio se mueve a favor de las citocinas proinflamatorias [28]. Probablemente el reconocimiento de un antígeno exógeno o autoantígeno sea el detonante de una serie de eventos que culminan con la destrucción articular en pacientes con AR. Este fenómeno desencadena la activación de los linfocitos TCD4⁺ que, junto con diferentes citocinas, induce a su diferenciación a células Th1, con la consecuente liberación de IL-2 e IFN- γ [1, 28].

Actualmente existe un consenso generalizado que apoya el concepto de que la inflamación crónica de las articulaciones en la AR es inducida por estas células T activadas (Th1) que infiltran la membrana sinovial, que es el asiento primario del proceso inmunopatogénico en la AR y se compone de una capa interna o íntima sinovial y una capa externa o subíntima. En condiciones normales la membrana sinovial contiene fibras de colágena, elastina y varios tipos celulares que incluye sinoviocitos, mastocitos, histiocitos y un escaso infiltrado de células mononucleares [25]. Entre los sinoviocitos se identifican dos tipos celulares de morfología y linaje distintos, los sinoviocitos tipo macrófagos (tipo A) y los sinoviocitos tipo fibroblastos (tipo B o FLS) [25, 29-33]. Los sinoviocitos tipo macrófago representan las células principales tanto en la íntima normal como en la reumatoide. Los marcadores principales de estas células son las moléculas CD14, CD68 y el receptor Fc de inmunoglobulina (FcR). Los FLS poseen la maquinaria estructural para sintetizar y secretar proteoglicanos, citocinas, metabolitos del ácido araquidónico y enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMP) [34]. Estas enzimas participan en la remodelación de la matriz extracelular, degradación del tejido presente en la bolsa sinovial con la consecuente destrucción del hueso y son responsables de la degradación de la capa hialina del cartílago (colágena) y la cápsula articular. En la actualidad se han relacionado directamente a la MMP-2 (Gelatinasa A) y MMP-9 (Gelatinasa B) en fluidos sinoviales típicos en enfermedades inflamatorias, particularmente en AR. La activación de estas enzimas es mediada por la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β las cuales juegan un papel importante en su síntesis.

Se ha detectado la presencia de MMP 2 y MMP 9 (Gelatinasa A y B) en ensayos inmunohistoquímicos y se ha observado que ambas metaloproteinasas se presentan en los sitios de inflamación y linajes celulares de la superficie sinovial como linfocitos, macrófagos y fibroblastos. En los últimos años se ha descrito que el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) juega un importante papel en esta destrucción como inductor de la producción de MMP9, MMP13 y principalmente MMP2. MMP 2 es detectable en la sinovia inflamada de pacientes con AR se ha relacionado significativamente en el proceso de erosión del hueso ya que se ha encontrado en mayor nivel en el tejido sinovial. Se ha establecido que MMP 9 participa de manera especial en la sinoviocitis ya que se incrementa de nivel en suero y fluido sinovial.

Así, la AR se caracteriza por la interacción de múltiples mediadores, de los cuales la mayoría y más importantes son las citocinas. En años recientes la extensiva investigación ha permitido identificar y relacionar con la inmunopatogenésis de la AR a MIF una citocina que forma parte fundamental en los eventos de la inmunidad innata y adaptativa [35, 36].

FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) fue la primera citocina descubierta a principios de los años 60 como un producto secretado por linfocitos T activados capaz de inhibir la migración de los macrófagos “in vitro” por lo cual se le asoció con el mecanismo de la reacción de hipersensibilidad retardada [37]. MIF tiene un peso molecular de 12.5 kDa y consiste de 115 aminoácidos; el gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 22 en los humanos y en el cromosoma 10 en los ratones [38].

Actualmente MIF se reconoce como una citocina de acción pleiotrópica, producida en el sistema inmune, además de linfocitos, por monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos [19, 39, 40, 41]. Adicionalmente MIF es constitutivamente expresado en una gran variedad de células no inmunes de tejidos normales, como las células de la pituitaria anterior [42, 43], miocitos cardiacos [44-47], células parenquimales en el hígado, cerebro, riñón, y células β del páncreas [47, 48]. Llama la atención que en muchos de estos tejidos y células MIF está sobre-expresado bajo condiciones patológicas implicando que MIF participa en el proceso de la enfermedad. Al respecto se ha reconocido a MIF como un mediador crucial que participa activamente en diversos desórdenes inmuno-inflamatorios como glomerulonefritis [18, 19, 49-51], artritis reumatoide [51], encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) [43], miocarditis autoinmune experimental (EAM) [41, 44], sepsis gram-negativa [52, 53] y gram-positiva [54], hipersensibilidad de tipo retardada [55-58], colitis [59] y asma [60]. Por otra parte el desarrollo específico de anticuerpos (Ac) neutralizantes anti-MIF [61-63], así como la clonación del cDNA humano y murino que codifica para MIF han permitido ampliar el campo de estudio de esta molécula para establecer sus características biológicas, bioquímicas, biofísica y las funciones de esta citocina. Así se sabe que:

- MIF es la única citocina conocida con actividad enzimática [64], aún cuando no se ha establecido una conexión entre la capacidad enzimática de MIF y su función biológica [65].

-
- Los glucocorticoides en bajas concentraciones inducen la producción de MIF. Sin embargo, una vez inducido, MIF es capaz de anular los efectos anti-inflamatorios de los glucocorticoides estableciéndose una contra-regulación entre ellos [66, 67].
 - MIF participa en la activación de los macrófagos, la inducción de la fagocitosis y en la potenciación de la inmunidad antitumoral [68, 69].

PARTICIPACIÓN DE MIF EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

En años recientes diversos estudios han sugerido una participación importante de MIF en la génesis de la AR [34, 70]. Algunas de las evidencias que dan soporte a esta propuesta son que:

- MIF promueve la producción y expresión de moléculas proinflamatorias incluyendo citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8 [34, 50].
- MIF se encuentra en concentraciones elevadas en el suero, fluido sinovial y tejido de pacientes con AR [71].
- MIF se encuentra incrementado en suero de pacientes con artritis juvenil (JIA). Estos niveles elevados se asocian con la persistencia a nivel sistémico y de las articulaciones inflamadas. MIF es una citocina que tiene papel relevante en la patogénesis de la JIA particularmente en la artritis juvenil sistémica [72].
- MIF ha sido asociado con funciones pro-inflamatorias y se ha detectado elevado en enfermedades infecciosas severas. En modelos experimentales de AR se ha detectado que la administración exógena de MIF exacerba la enfermedad [73, 74] contribuyendo en la hiperplasia sinovial por medio de diferentes efectos sobre la apoptosis de los sinoviocitos [75-77].
- MIF regula positivamente la expresión de mRNA de las metaloproteinasas (MMP) y ciclooxigenasa 2 en fibroblastos sinoviales reumáticos aumentando la apoptosis [75].

-
- MIF regula la expresión de FLS los cuales liberan MMP, entre las que se encuentran MMP1 (con actividad colagenasa), MMP8 (actividad elastasa) y MMP3 (con actividad degradativa sobre proteoglicanos) que provocan destrucción y erosión del cartílago en la AR [51, 74].

 - MIF favorece la secreción de TNF- α y promueve la producción de IFN- γ , por macrófagos y FSL los cuales son inductores de óxido nítrico (NO), en conjunto se han considerado moléculas responsables de la patología de la artritis ya que participan en la degradación y erosión de todos los componentes de la matriz extracelular del cartílago (MEC), como proteoglicanos y colágeno tipo II (CII), así como la infiltración de células en la membrana sinovial que da lugar a la formación del *pannus* [76].

 - MIF induce la producción de TNF- α y NO por macrófagos y FSL [18].

 - Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales contra MIF tienen efectos inhibitorios en la inflamación de las articulaciones en modelos de roedores con AR [73].

 - Se ha identificado recientemente la asociación de polimorfismos en la región promotora del gen MIF como principales iniciadores de la severidad crónica en osteoartritis y AR [18, 51, 73, 78, 79].

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las metaloproteínas de matriz comprenden a una familia de enzimas que colectivamente pueden degradar todos los componentes de la matriz extracelular. MMP tienen un papel importante en muchos procesos fisiológicos como desarrollo y crecimiento embrionario y remodelación y reparación del tejido. Están implicadas en la degradación de la colágena que contribuye a la destrucción de la articulación [99, 112, 113].

La destrucción irreversible del cartílago, tendón y hueso que comprenden las articulaciones sinoviales son el cuadro característico de la artritis reumatoide. Mientras que la mayor parte del cartílago está compuesto por proteoglicanos y colágena tipo II, los tendones y el hueso están compuestos principalmente por colágena tipo I. En la AR las citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α estimulan la producción de MMP. Entre estas enzimas se encuentra la MMP-1 que es producida por células sinoviales de la articulación; la MMP13 producto de los condrocitos que residen en el cartílago, la cual puede degradar las moléculas de proteoglicanos; por otro lado, se ha descrito que MMP2 y MMP9 se encuentran en mayor expresión en las articulaciones en la AR. [114].

En conjunto estos datos sugieren que MIF es una molécula importante en la patogénesis de la AR, aún cuando los mecanismos por los cuales MIF participa en la inducción de la patología en la AR no se han establecido claramente.

MODELO DE ARTRITIS

Con la finalidad de caracterizar el tipo de células y mecanismos implicados en la patogénesis de AR han sido desarrollados diversos modelos murinos de AR. Uno de los modelos utilizados con más frecuencia está basado en el principio del desencadenamiento de autoinmunidad debido a una respuesta inmune que se dispara en forma no-regulada. Así, sucesivas inmunizaciones de colágena tipo II en las articulaciones de ratones DBA/1 (los cuales son genéticamente susceptibles a desarrollar AR) [81] inducen una fuerte activación de las células presentadoras de antígenos (células dendríticas) que desencadenan la pérdida de la tolerancia de los linfocitos T hacia la colágena, lo cual genera la autoinmunidad específica a colágena específica [82]. Esta hipótesis ha sido plenamente confirmada demostrándose que la sola transferencia de células dendríticas sensibilizadas con colágena es suficiente para inducir artritis en estos ratones [83].

En otros modelos de AR en ratas se estableció que la activación sistémica de las células T guiaban el desarrollo de osteoclastogénesis y destrucción del hueso. Sin embargo, la especificidad antigénica de las células T que inician y mantienen esa patología era incierta [84] y se necesitaba un modelo en el cual el desarrollo preciso, la migración antígeno-específico, y la contribución a la patogénesis de las células Th1 y Th2 pudiese utilizarse para un mayor entendimiento del proceso patológico de esta enfermedad [85].

Diferentes grupos han desarrollado recientemente modelos basados sobre la transferencia adoptiva de células T con un receptor transgénico antígeno-específico (TCR-Tg) (Fig. 2) para modelos *in vivo* de activación por antígenos. Estos sistemas han sido usados para investigar varios modelos de enfermedades tales como la enfermedad de Bowel [85]. Sin embargo no ha sido ampliamente utilizado en la artritis reumatoide [84]. Se ha propuesto que la inducción de artritis vía la administración de un antígeno exógeno pueda desencadenar una respuesta autoinmune como es el caso de la AR.

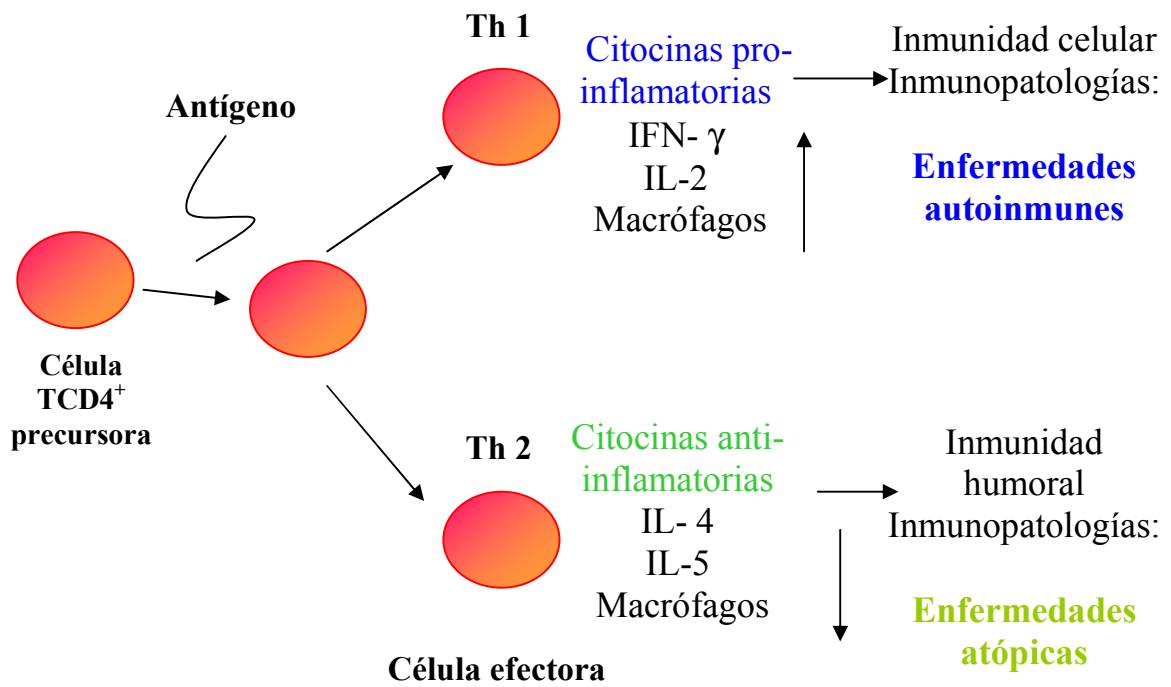


Figura.2. Desarrollo de una enfermedad autoinmune basado en el reconocimiento de un antígeno exógeno. Las células precursora TCD4⁺ diferenciada a TH1 con un TCR específico para el antígeno exógeno lo reconocerá y podrá así llevar a cabo la producción de citocinas proinflamatorias, dando como resultado una inmunidad de tipo celular que desencadenará una enfermedad autoinmune.

HIPÓTESIS.

Debido a los fuertes efectos pro-inflamatorios asociados a MIF, se plantea que:

- MIF participa en los procesos inflamatorios característicos de la artritis reumatoide, por medio de la inducción de TNF- α y NO, así como en el reclutamiento de células efectoras, moléculas de adhesión y citocinas responsables de la patogénesis de la AR, principalmente en los eventos tempranos de la patología.

OBJETIVO GENERAL

- Establecer la participación del factor inhibidor de la migración de macrófagos en la patología de la artritis reumatoide inducida por un antígeno en un modelo murino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un modelo de artritis experimental inducida por ovoalbúmina en ratones deficientes en el gen MIF (MIF^{-/-}) y en ratones silvestres (MIF^{+/+}) ambos con fondo genético BALB/c.
- Determinar la respuesta inflamatoria entre los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} midiendo el desarrollo de la inflamación de las articulaciones diartrodiales y, por observación clínica, el desarrollo de edema y eritema en los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-}.
- Determinar la producción de anticuerpos (IgG1 e IgG2a) específicos para el antígeno inductor (ova) de la AR entre los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} por ELISA.
- Cuantificar la producción de citocinas y óxido nítrico en suero obtenido de las articulaciones afectadas de los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} por ELISA.
- Determinar la infiltración celular entre los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} por histología, por tinción de H & E.
- Determinar la expresión de metaloproteínasas MMP-2 y MMP-9 por inmunohistoquímica.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

ANIMALES. Se utilizaron ratones machos de 6-8 semanas genéticamente deficientes en MIF (MIF^{-/-}) en un fondo genético BALB/c. Estos animales nos fueron donados por el Dr. John R. David de la Escuela de Salud Pública de Harvard. Como controles se utilizaron ratones BALB/c silvestres (MIF^{+/+}) de la misma edad y peso (Harlan, México). Los ratones se mantuvieron en ambiente libre de patógenos en el bioterio de la FES-Iztacala de acuerdo con las normas institucionales y nacionales.

Los reactivos y soluciones utilizados se describen en el Apéndice 1.

GENOTIPIFICACIÓN. Todos los animales fueron genotipados para determinar la ausencia del gen MIF por PCR.

Obtención de la muestra: se cortaron aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de los ratones experimentales, y se llevó a cabo una digestión en tubos de 1.8 ml (Eppendorf) previamente identificados, en la que se colocó el tejido con 500 µL de Amortiguador de lisis y 20 µl de proteínasa K (100µg/muestra) la cual se dejó durante toda la noche en un incubador a 55° C.

Obtención del DNA: Una vez disgregada la cola se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se pasó a otros tubos Eppendorf a los que se les agregaron 500µl de isopropanol frío, se homogenizó invirtiéndolos de manera suave hasta que la precipitación del DNA fue evidente. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 14000 rpm 1 minuto para concentrar el precipitado y se decantó la fase líquida para después lavar el botón de DNA con etanol frío al 75% en el mismo tubo, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos; se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por lo menos 1 hora. Una vez seco el botón de DNA se resuspendió en el tubo con 200µl de agua grado biología molecular, para nuevamente incubarlo toda la noche a 55°C.

PCR: Para la amplificación del gen de MIF se utilizaron los siguientes primers específicos.

MIF (F) AGACCACGTGCTTAGCTGAG

MIF (R) GCATCGCTACCGGTGGATAA

El producto esperado de amplificación para MIF es de 200pb.

Para amplificar el gen de selección Neomicina (NEO) se utilizaron los siguientes primers específicos:

NEO (F) ATTGAACAAGATGGATTGCAC

NEO (R) CGTCCAGATCATCCTGATC

El producto esperado de amplificación para NEO es de 500pb.

Para este proceso se utilizaron tubos nuevos estériles y libres de DNAsas y RNAsas con capacidad de 0.2 µl, se colocaron los siguientes reactivos en orden:

Reactivos	MIF µl	NEO µl
Amortiguador 10x	2.5	2.5
MgCl ₂ (50mM)	0.75	0.75
dNTP's (10mM)	0.5	0.5
Primer F (15pM)	7.5	3.0
Primer R (15pM)	6.34	3.0
Red Taq polimerasa (1.2 unidades)	0.25	0.24
Agua (Sigma)	6.16	14
Muestra DNA	1.0	1.0
Total de Reacción	25 µl	25 µl

Una vez que se tuvieron los tubos rotulados y con los reactivos respectivos se procesaron en un termociclador (Corbett Research) programado de la siguiente manera:

3 fases de 35 ciclos cada una a:

- 94°C durante 30 seg para desnaturalización
- 58°C durante 30 seg para alineación de la enzima
- 72°C durante 120 seg para extensión

Electroforesis: Una vez amplificado el gen por PCR se realizó una electroforesis, para lo que se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) 1% en Amortiguador TBE 1x y bromuro de etidio sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a 4°C durante 30 minutos para que gelatinizara. Una vez hecho el gel se hizo una dilución 1:4 de DNA y se colocaron por pozo 2µl de muestra previamente diluida en 8µl de colorante Blue-Juice (Invitrogen) a partir del segundo pozo colocando en el primer pozo 3µl del marcador de peso molecular con un patrón 100pb (Invitrogen). Se colocaron las muestras en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 80 volts, 300 amperes durante 50 minutos. Se observó en un transiluminador con luz UV y se capturó la foto utilizando el programa Alphamager.

INDUCCIÓN DE ARTRITIS (modelo experimental) El modelo se basa en la inducción de la AR en ratones a través de la transferencia de células Th1 sensibilizadas para el antígeno OVA, así el reconocimiento de un antígeno exógeno (ova agregada por calor) es el detonante de una serie de eventos que culminan en inflamación articular [84]. Esto se realizó de la siguiente manera:

Obtención de macrófagos de peritoneo. Los ratones se sacrificaron con cloroformo. Inmediatamente se les inyectó 5ml de solución salina estéril intraperitonealmente, recibieron en el abdomen un ligero masaje para despegar los macrófagos del peritoneo, y se les hizo una incisión en la piel sin romper el peritoneo, se introdujo una jeringa de 5 ml intraperitonealmente, teniendo cuidado de no dañar vísceras para recuperar el líquido intraperitoneal que se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1ml de solución salina, de ahí se tomaron 20 µl de células y se les agregó 20 µl de azul tripano para contar la viabilidad usando una cámara de Neubauer; las células se ajustaron a 1×10^6 cels/ml. Posteriormente se agregó 1 ml por pozo en placas de 24 pozos de cultivo de fondo plano y se dejaron 2 horas a 37°C.

Cultivos de linfocitos de bazo. En un ambiente de completa esterilidad se obtuvieron las células de bazo de ratones transgénicos para ovoalbumina, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Se resuspendió el botón celular en 2 ml de solución hemolizante dejándola durante 10 min, se detuvo la reacción con 5 ml de medio DMEM, se centrifugó

nuevamente a 2500 rpm durante 10 min. Este paso puede ser repetido de dos a tres veces hasta que el botón celular quede completamente blanco. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 3 ml de medio DMEM, se determinó viabilidad y las células se ajustaron a 1×10^6 ml.

Separación magnética de células TCD4⁺ de bazo. Una vez obtenidas las células de bazo se realizó la separación magnética positiva de células TCD4⁺. Esta técnica consistió en lavar el botón celular con 1 ml de PBS de separación, centrifugándolo a 2500 rpm durante 10 min, y se resuspendió el botón en 90 μ l de amortiguador de separación frío por cada 10×10^6 de células. Se agregaron 10 μ l de microesferas MACS-CD4 por cada 10×10^6 células y se incubaron de 15 a 20 min. a 4 °C, después las células se lavaron con 5-10 ml de amortiguador de separación y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y se resuspendió el precipitado en 500 μ l de amortiguador de separación posteriormente se pasó esta suspensión por una columna magnética.

Preparación de la columna MS/RS. Se colocó la columna de MS/RS en la Vario MACS, se le agregó 1 ml de amortiguador de separación (frío) hasta que salió claro, después se agregó la suspensión celular preparada antes (incubada con el anticuerpo correspondiente). Se dejó que fluyeran las células negativas y antes de que se terminara de eluir se agregaron 500 μ l de amortiguador de separación frío, esta operación se repitió 2 veces y se desechó lo eluido. Posteriormente se quitó la columna del campo magnético y se recolectaron las células en un tubo estéril agregando 500 μ l de buffer de separación frío. Se centrifugaron las células a 2500 rpm y se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM, se realizó el conteo de la cámara de Neubauer y se observó la viabilidad, se ajustaron las células a 1×10^6 cel/ml y se sembraron en co-cultivo con los macrófagos obtenidos previamente.

Diferenciación de células Th1. Se colocaron 1×10^6 macrófagos por cada 5×10^6 linfocitos en una placa de 24 pozos de fondo plano (COSTAR). A los macrófagos que estaban a una concentración de 1×10^6 por pozo se les añadió 3 μ M de péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉. Se incubó 2hrs para permitir que los macrófagos fagocitaran y presentaran el Ag en su superficie. Se retiró el medio de los macrófagos y se agregó 0.5 ml de células TCD4⁺ [2×10^6] y 0.5ml de IL-12 [10ng/ml]. Se incubó durante 72hrs para la diferenciación de

células. Transcurrido el tiempo las células TCD4⁺ se recuperaron para la transferencia. Se guardó el sobrenadante a -70⁰C hasta la determinación de IL-4 e IFN- γ .

Transferencia adoptiva de células. Trascurridos 3 días de cultivo se transfirieron 2 x 10⁶ células Th1 vía intravenosa en ratones BALB/c WT y BALB/c knockout para MIF. Los ratones controles sólo recibieron PBS.

Inducción de AR. Un día después de la transferencia adoptiva de células Th1, los ratones fueron inmunizados vía subcutánea con 100 μ g de OVA en adyuvante completo de Freund (CFA) (Sigma). 10 días después de la inmunización de OVA en CFA, todos los animales se inmunizaron vía subcutánea en ambos lados de las articulaciones (uniones de los tobillos) con 100 μ g de OVA agregada por calor (HAO) en 50 μ l de solución salina. El HAO consistió en calentar la solución durante 1 min. a 56 ⁰C. A partir de este día a los ratones se les midió el ancho y grosor de las patas, se obtuvo sangre a los 2 y 5 días y se observó el grado de inflamación (edema) y la presencia de eritema basada en la pérdida o aumento de las funciones y se les dio un valor de acuerdo a la siguiente tabla:

	GRADO DE INFLAMACIÓN
0	Ausencia de Edema y Eritema
1	Edema y eritema en dedos o articulación
2	Edema y eritema en dedos y articulación
3	Edema y eritema evidente

Obtención del suero. Los ratones se sangraron, utilizando una caja de madera con un foco de 60 wats, y fueron sometidos durante 1 minuto para inducir dilatación en la vena caudal y así facilitar el sangrado, con un bisturí se cortó en la vena caudal más sobresaliente para obtener de 200 a 500 μ l de sangre que se depositó en un tubo (Eppendorf), y se dejó reposar a temperatura ambiente y se guardó a 4⁰C durante 24 horas hasta su uso en la determinación de citocinas y anticuerpos.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS EMPLEANDO ELISA.

La medición se realizó en los días 2 y 5 posteriores a la inmunización con HAO utilizando anticuerpos de Pharmingen (Becton Dickinson) para detectar IL-4, IL-10, IL-12, IL-1 β , e IFN- γ y el equipo para TNF- α de Peprotech Laboratorios.

Sensibilización de la placa: Se diluyeron 2 μ g/ml del anticuerpo de captura en el amortiguador de pegado, se homogenizó y se colocaron 100 μ l por pozo utilizando una micropipeta multicanal (Finnpipette) en una placa para ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp). Para que se llevara a cabo la reacción de pegado del anticuerpo a la placa, esta última se cubrió con papel aluminio y se incubó a 4°C toda la noche.

Muestras y curva: Al día siguiente se lavó la placa con la solución de lavado y se secó por aspiración, se bloqueó el pegado inespecífico con 200 μ l de solución de bloqueo durante 2 hrs, posteriormente se lavó y se secó. Se añadieron 50 μ l de suero en los pozos correspondientes a las muestras, posteriormente, para poder extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la citocina recombinante correspondiente, con diluciones al doble solución de bloqueo para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras líneas de cada placa. Las curvas se iniciaron partiendo de 50 ng hasta 0.01 ng. y nuevamente se incubó la placa toda la noche a 4°C.

Revelado de la placa: Se lavó, secó y adicionó el anticuerpo marcado con biotina en un volumen de 100 μ l (1 μ g/ml) en solución de bloqueo, se incubó durante una hora a 37°C, terminado el tiempo de incubación se lavó. Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima estreptoavidina peroxidasa (Amersham Biosciences) y se colocaron 100 μ l dejando incubar por 35 minutos a temperatura ambiente. Se lavó por última vez, se preparó la solución del sustrato (100 μ l de H₂O₂ al 3% (J.T.Baker) en 10 ml de ABTS) y se colocaron 100 μ l por pozo, se incubó 10 minutos y se obtuvo la absorbancia en un lector de placas (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent) utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

CITOMETRÍA DE FLUJO Con el fin de determinar la pureza de las células T transferidas (co-cultivos TCD4+MΦ+IL-12+ OVA₂₃₂₋₂₃₉) se realizó una citometría de flujo. Las células T del co-cultivo se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm para obtener el concentrado celular, decantando el sobrenadante, se resuspendieron las células con 3 ml de amortiguador para FACs (PBS, 5% suero fetal y 0.1% azida de Na). Se homogeneizó la suspensión, se contaron las células en cámara de Neubauer ajustándolas con amortiguador de FACs a 1×10^6 por ml, este paquete celular se depositó en tubos para FACs (Falcon) en los que se volvieron a centrifugar las células 10 minutos a 2000 rpm para decantar el sobrenadante y resuspender con 200 μ l de amortiguador para FACs. Finalmente se agregó un anticuerpo acoplado a fluorocromo (PE rata antiratón CD4 (Pharmigen), y FITC antiratón F4/80 (Biolegend)) y los anticuerpos de isotipos: FICT IgG2a (Biolegend) y PE IgG2a (Biolegend) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2 μ g. Posteriormente la muestra se incubó durante 30 minutos a 4°C, se lavaron las células 2 veces con amortiguador para FACs y se utilizó el equipo FACs Calibur (Benton Dickinson) para la captura y análisis de las muestras y el análisis se hizo con el programa CellQuest.

ANÁLISIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN SUERO. Este ensayo provee la determinación de nitrito (NO_2^-) como un indicador de la producción de óxido nítrico (NO) en muestras biológicas. El NO tiene una vida media breve y es rápidamente convertido en productos finales estables como son el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-) en soluciones acuosas oxigenadas. Debido a que la reacción de Greiss es un reactivo colorimétrico usado para la determinación de (NO_2^-), es común usar una reducción enzimática o química para convertir todo el (NO_3^-) a (NO_2^-) y así medir el nitrito total como un indicador de la producción de NO. Este ensayo se realiza por medio de una reducción enzimática de NO_3^- por nitrato reductasa, seguida por un análisis espectrofotométrico del nitrito usando el reactivo de Greiss.

Se prepararon 2 soluciones:

Sol. A 0.1% Naphthylethylenediamine dihydrochloride en agua destilada.

Sol. B 1% Sulphanilamide en H_3PO_4 al 5%.

Poco antes de realizar el ensayo se mezclaron la solución A y B a igual volumen, para así obtener el reactivo de Greiss. Esta mezcla es estable por 12 hrs a 4°C, aunque las soluciones stock (A, B) pueden ser refrigeradas varios meses. En una placa de 96 pozos se colocó una curva de óxido nítrico como control y referencia para extrapolar las concentraciones, se colocaron 100 µl por pozo por duplicado de las diferentes concentraciones diluidas (0.01, 0.005, 0.025, 0.00125, 0.000625, 0.000315 M), para las muestras también se colocaron 100 µl del sobrenadante celular y 70 µl de reactivo de Greiss. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. y se midió a 550 nm-620 nm en un lector de ELISA.

HISTOLOGÍA. Al término del experimento (21 días post inducción de artritis) se realizó una disección de las extremidades posteriores de los animales experimentales, las cuales se colocaron en 5 ml de paraformaldehído al 4%. Después de fijado el tejido se lavó con agua, 1 hr o más para eliminar el fijador. Las muestras se colocaron en un mínimo 20 volúmenes en solución descalcificante (EDTA al 7%) y se hicieron cambios cada 24 o 48 hrs hasta que el hueso tuviera consistencia de tejido blando. Posteriormente se lavó abundante con agua corriente, como mínimo 2 hrs.

Técnica de procesamiento de inclusión en parafina Después de fijado el tejido, se deshidrató en cambios de 60 min en agua corriente, alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 90%, alcohol absoluto, butanol, parafina I*, parafina II*. Se incluyó el tejido en parafina.*(Fundida a 60°C). Posteriormente se realizaron cortes de 6µ y se colocaron en la minillas previamente silinizadas.

Tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E). Las laminillas se colocaron en una canastilla durante 30' antes de teñir para mejorar el pegado, y se dejaron enfriar. Posteriormente se desparafinaron con cambios de xilol I 5', xilol II 5', alcohol-xilol* 3', alcohol etílico 100% 3', alcohol al 90% y 80% durante 2' cada uno, al 70% 1' y agua corriente 3'. La tinción fue con Hematoxilina de Harris y se lavó agua corriente, alcohol ácido, agua corriente 1', Eosina alcohólica 3', agua corriente, alcohol etílico al 70%, 80% y 90% durante 1' cada uno y alcohol absoluto 5', seguido de alcohol-xilol* 1' y xilol I y Xilol II durante 5' cada uno. Posteriormente los cortes fueron montados en resina.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Fijación con sales de Zinc para anticuerpos sin marca y segundo anticuerpo – HRP. Se usaron laminillas silanizadas o lisanadas. Los cortes fueron de 6 μ de grosor se pegaron con Ruyter y posteriormente se metieron 30 min. al horno a 60°C para aumentar la adhesión. Una vez transcurrido este tiempo se realizó la siguiente técnica: xilol I 3', xilol II 2', alcohol etílico al 100%, 90% , 80% , 70% durante 1' cada uno, agua destilada 3', PBS 1X 1', metanol 15', PBS 1X 3 lavados 1', PBS-tritón (0.05%) 1', suero al 5% en PBS-tritón 1 hora PBS triton 3 lavados, anticuerpo sin marca diluido en PBS-tritón mínimo 2 hr. o toda la noche a 4°C, PBS-tritón 3 lavados, PBS 1X 1', segundo anticuerpo conjugado con HRP 1 hr a temperatura ambiente, PBS tritón 3 lavados 3' c/uno, solución de DAB tiempo según coloración observada (1'-10'), lavado PBS (con pizeta), lavado PBS 1', Contra-tinción con Hematoxilina de Weigert

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. La incidencia de AR (inflamación y eritema) en los grupos de ratones se comparó usando la prueba estadística U de Mann-Whitney. ($n=45$). Las diferencias entre los niveles de citocinas y óxido nítrico (NO) se realizó utilizando la prueba estadística de t de student o U de Mann-Whitney según el caso. Se consideró estadísticamente significativo valores α a 0.05.

Disolver el benzoato en la acetona

Mezclar ambas soluciones gota a gota (muy lentamente, pues se forma precipitado de no hacerlo) y después filtrar.

Albúmina glicerizada

Albúmina glicerizada 1:1

Clara de huevo de gallina vaciar a una probeta y agregar mismo volumen de glicerina posteriormente se guarda a 4°C. Este reactivo puede durar varios meses después de su preparación.

RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación son el promedio de 6 experimentos (n=45 ratones) en los que se indujo AR.

Genotipificación de los ratones del grupo control y el grupo experimental. Para asegurar que los ratones experimentales utilizados cumplieran con la condición de ser MIF^{+/+} (ratones silvestres) y MIF^{-/-} (ratones deficientes en el gen), se analizó el genotipo por PCR.

En la figura. 3 se muestra una electroforesis de agarosa de la amplificación del gen funcional para MIF. En la figura 3 se muestra en gen amplificado del grupo de los ratones MIF^{+/+}; el producto amplificado de MIF tiene un tamaño de 200pb. En el caso de los ratones deficientes en MIF se utiliza un gen de inserción llamado neomicina, el producto de amplificación es de 500 pb donde la amplificación del gen indica que los ratones utilizados como MIF^{-/-} eran deficientes para MIF.

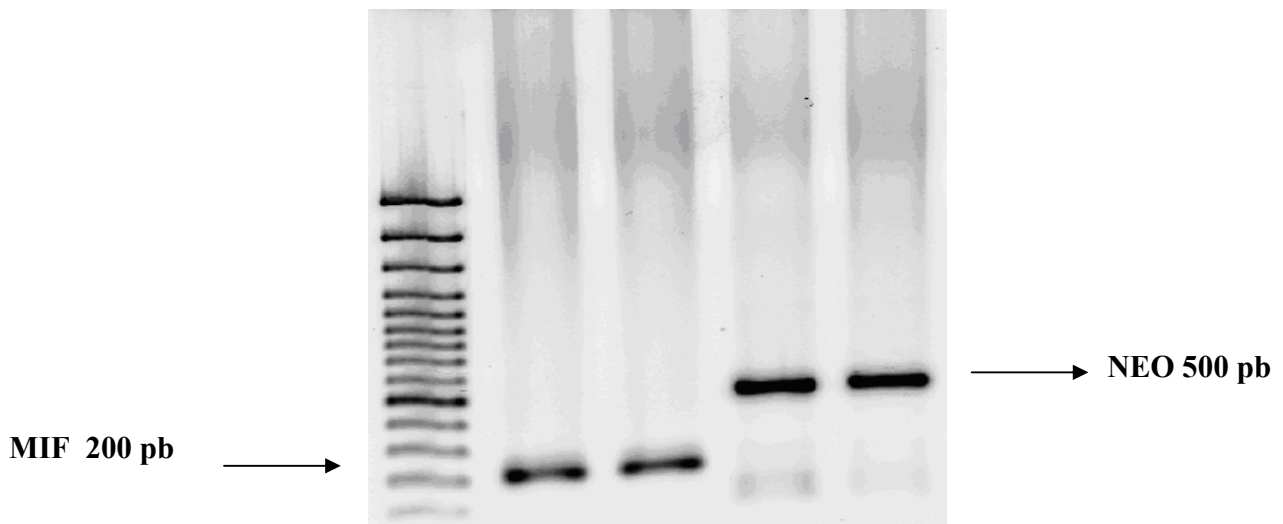


Figura. 3. Genotipo de los ratones experimentales por PCR. Amplificación del gen funcional de MIF^{+/+} y determinación del gen de inserción NEO MIF^{-/-}.

Citometría de Flujo: Las principales células involucradas en el desarrollo de la AR son los linfocitos TCD4. Para saber si las células utilizadas para la transferencia en su mayoría correspondían a este tipo de población se realizó una citometría de flujo utilizando anticuerpos acoplados a fluorocromos (PE rat anti-mouse CD4 (Pharmigen) y FITC anti-mouse F4/80 (Biolegend)) y los anticuerpos de isotipos: FITC mouse IgG2a (Biolegend) y PE Mouse IgG2a (Biolegend) como control para pegado inespecífico.

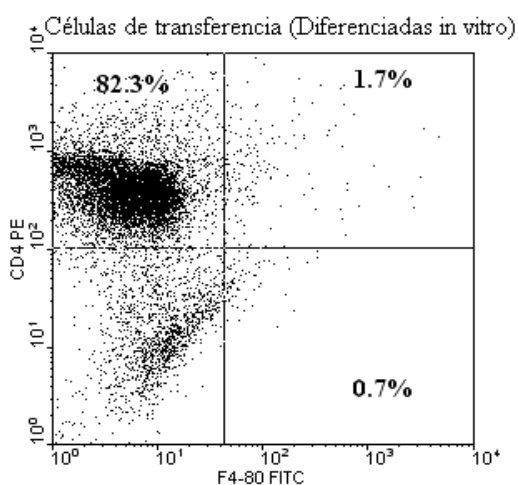


Figura 4. Citometría de flujo de células de transferencia TCD4 + .

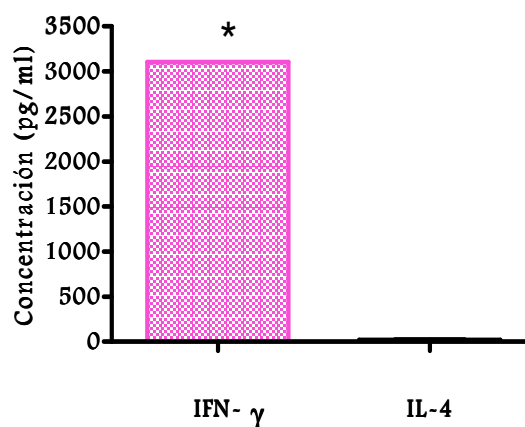


Figura 5. Concentración de IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante de células de transferencia cultivadas en presencia de IL-12.

Verificación de las células de transferencia adoptiva. El objetivo de la transferencia adoptiva fue crear un ambiente proinflamatorio Th1 en los ratones y así desencadenar una reacción autoinmune; una vez generadas las células Th1 (células de co-cultivo M ϕ +TCD4+OVA+IL12) *in vitro* se determinó por ELISA la naturaleza de las mismas cuantificando en sobrenadante del cultivo celular la producción de IFN- γ e IL-4. Como se podrá observar en la figura 5 se obtuvo una producción de IFN- γ (3,103 pg/ml) en comparación con IL-4 (19.71 pg/ml) lo que indica que las células que se utilizaron para la transferencia adoptiva eran realmente de naturaleza Th1.

Desarrollo de inflamación en los ratones experimentales. La transferencia de células Th1 desencadenó los primeros síntomas de la artritis haciéndose evidente un día después de la inmunización con HAO. El desarrollo subsecuente de la inflamación se definió de acuerdo al edema y eritema que presentaron. En la figura 6 se observa el grado de inflamación: los ratones MIF^{+/+} AR desarrollaron mayor inflamación en las articulaciones que los ratones MIF^{-/-} AR, siendo estadísticamente significativas estas diferencias a lo largo de todo el experimento.

Como controles se utilizaron ratones MIF^{+/+} PBS y MIF^{-/-} PBS que recibieron todo el tratamiento de OVA, sustituyendo la transferencia de células Th1 por PBS. Como se puede ver en la figura 6 los dos grupos controles MIF^{+/+} PBS y MIF^{-/-} PBS (líneas punteadas) desarrollaron una inflamación parcial, despreciable si se compara con los transferidos con las células Th1. Por lo que se infiere que la presencia de MIF influye en el desarrollo de la inflamación, característico de la AR y que su ausencia disminuye considerablemente el mismo.

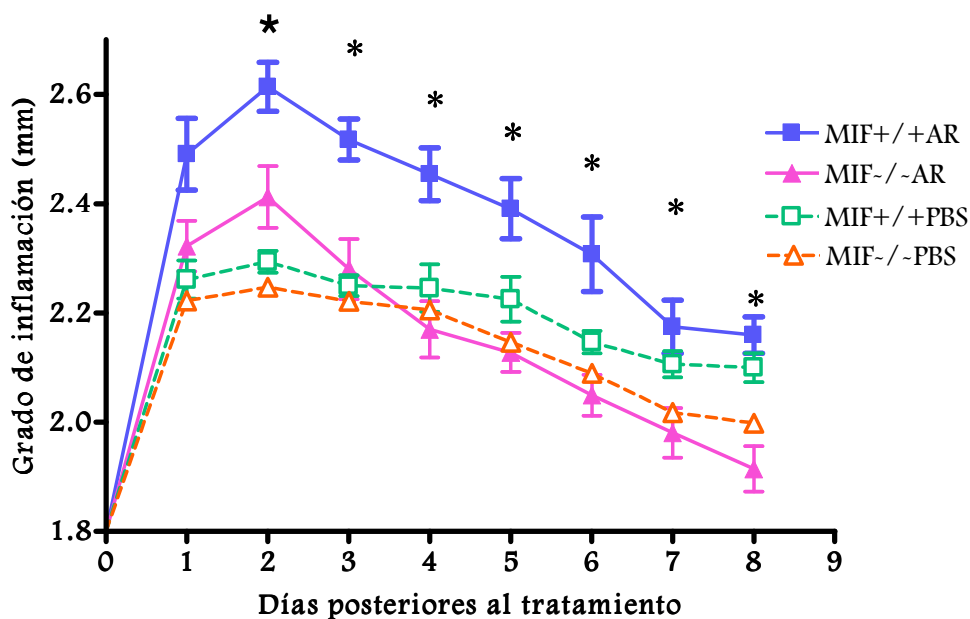


Figura 6. Grado de inflamación en articulaciones en ratones con AR debida HAO o controles sin AR utilizando PBS. $n = 45$, * $p < 0.05$, U de Mann-Whitney

Desarrollo de eritema en los ratones experimentales. En la figura 7 se puede observar que los ratones MIF^{+/+} AR desarrollaron mayor eritema durante todo el experimento que los ratones MIF^{-/-} AR. El eritema desarrollado por los ratones MIF^{+/+} AR se caracterizó por una coloración morada-rojiza (figura 8) en toda la articulación desde el día 2 post-inmunización con HAO, en los ratones MIF^{-/-} AR esta misma coloración fue parcial, sólo se observó en una parte de la extremidad. Los controles, ratones MIF^{+/+} PBS y MIF^{-/-} PBS (líneas punteadas) presentaron eritema muy leve estando siempre por debajo del grado de eritema en los ratones transferidos. Esto indica que el desarrollo de eritema se asocia al grado de inflamación y que éste a su vez es más agudo con la presencia de MIF el cual participa desde el inicio y durante el desarrollo del proceso inflamatorio que se presenta en la AR.

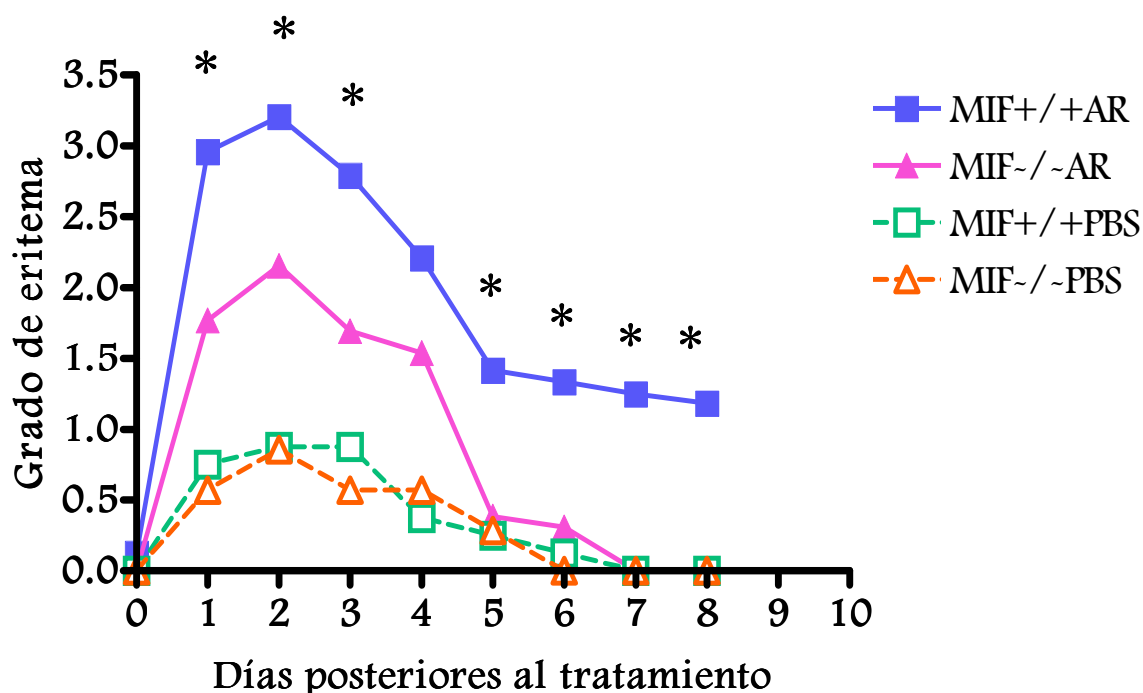


Figura 7. Grado de eritema de artritis en articulaciones en ratones con AR debida HAO o controles sin AR utilizando PBS. $n=45$, * $p < 0.05$, U de Mann-Whitney

Grado de inflamación. La figura 8 complementa en forma visual los resultados obtenidos en el desarrollo de inflamación y presencia de eritema. Se puede observar que los ratones MIF^{+/+} con AR desarrollaron una evidente inflamación, con eritema agudo en comparación con los MIF^{-/-} AR los cuales presentaron significativos menores signos propios de este proceso inflamatorio. Los ratones controles MIF^{+/+} PBS y MIF^{-/-} PBS, a diferencia de los 2 grupos anteriores, solo presentaron una ligera hinchazón que disminuyó con el paso del tiempo.

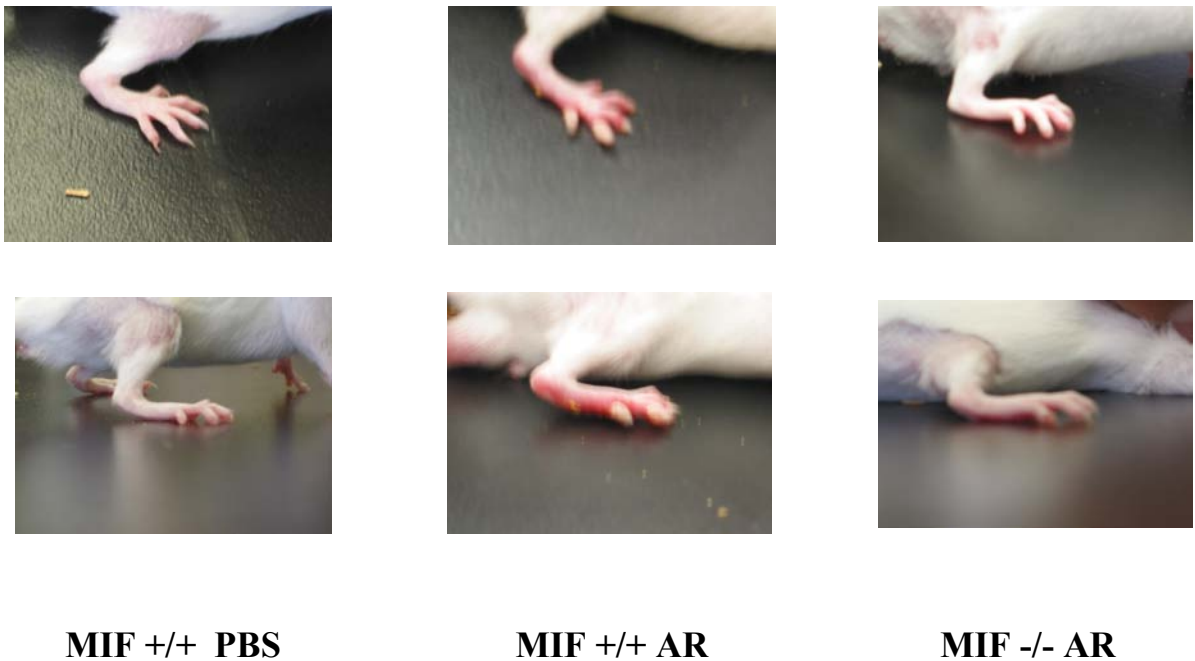


Figura. 8. Fotografías de las articulaciones posteriores de los ratones que representan el grado de edema y eritema mostrado en las figuras 6 y 7.

Estudio de gabinete (radiografía)

Debido a la presencia de un edema y eritema evidente en los grupos experimentales con AR y a los elevados niveles en la producción de citocinas proinflamatorias se realizó la toma de radiografías para observar si existía daño a nivel del hueso en las articulaciones posteriores. Cabe mencionar que esto se realizó al término del experimento (17 días post inducción de AR) (figura 9).

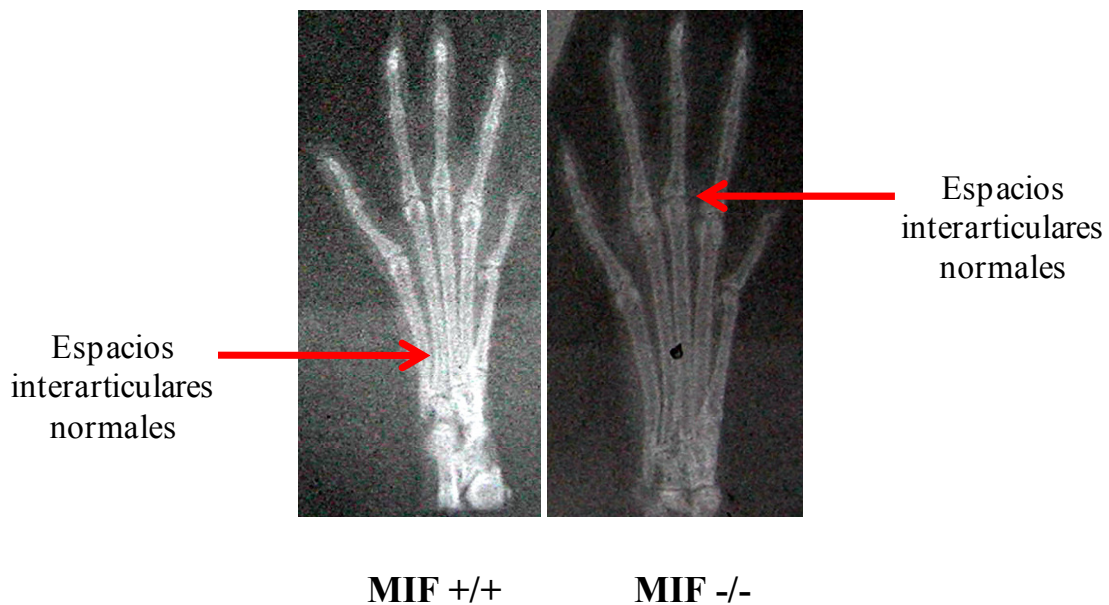


Figura 9. Articulaciones posteriores de ratones normales BALB/c sin transferencia de células ni tratamiento para la inducción de AR. En la cual se observa la presencia de los espacios articulares normales así como el fino grosor de las falanges.

En la figura 10 puede observarse que los ratones MIF^{+/+} PBS presentaron un ensanchamiento de la cápsula ocasionado por la infiltración de células que se acumuló en el borde de la membrana sinovial como se puede observar en los cortes histológicos (que se mostrarán posteriormente), en comparación con los ratones MIF^{-/-} PBS los cuales presentaron sólo un aumento moderado en la cápsula articular de los nudillos y disminución del espacio articular provocado probablemente por la infiltración celular, a diferencia de los ratones.

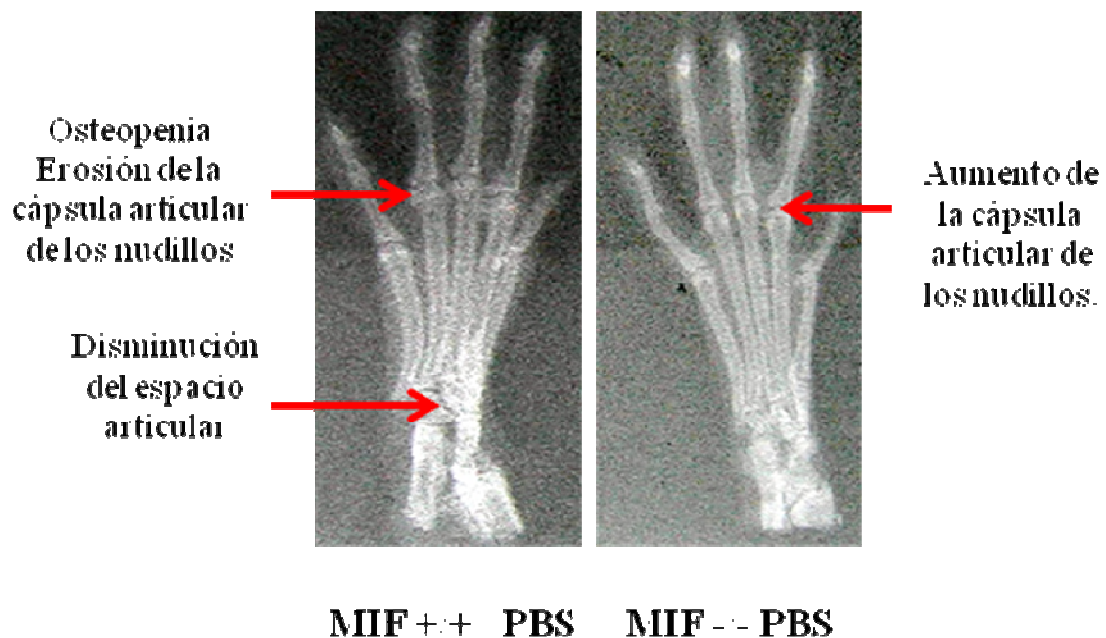


Figura 10. Articulaciones posteriores de ratones (MIF ^{+/+} PBS y MIF ^{-/-} PBS) sin transferencia de células y con tratamiento para la inducción de AR.

En la figura 11 se muestran diferencias importantes entre los ratones MIF^{+/+} AR en los cuales ya existe una desaparición de los espacios articulares entre los nudillos así como la subsiguiente estrechamiento del espacio articular y esto debido al aumento en la migración e infiltración celular que provocó una inflamación y un eritema severos. Por otra parte ya se puede observar daño en el cartílago con la presencia de pequeñas fracturas así como erosión del hueso lo que se evidencia con la deformación de las articulaciones en comparación con los MIF^{-/-} AR los cuales sólo presentan un ensanchamiento de los nudillos o engrosamiento de partes blandas en comparación con los ratones MIF^{+/+}.

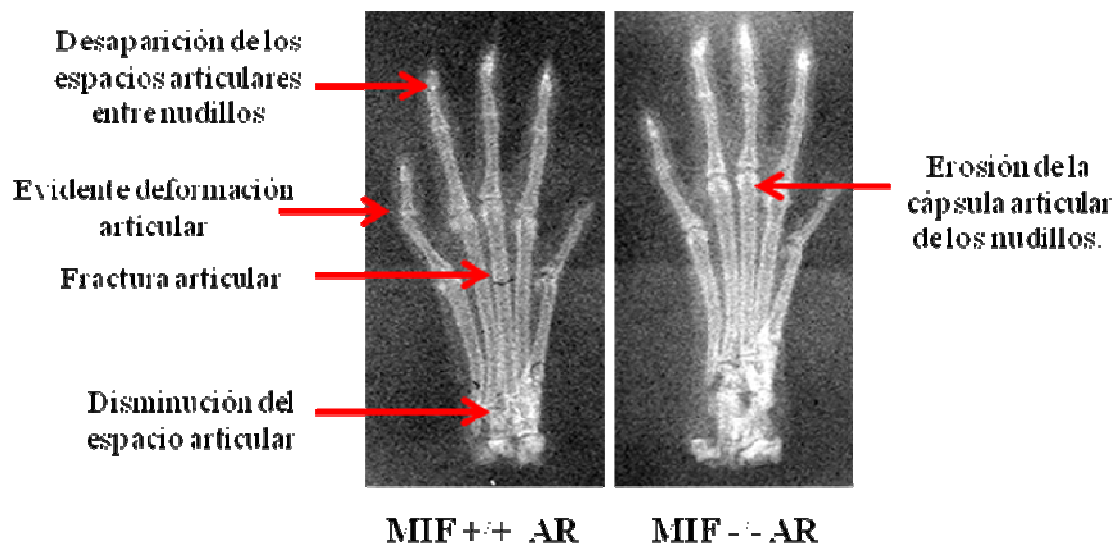


Figura 11. Articulaciones posteriores de ratones MIF^{+/+} AR y MIF^{-/-} AR. Los ratones MIF^{+/+} AR presentaron mayor daño a nivel articular con respecto a los ratones MIF^{-/-} AR.

Perfil de citocinas en suero al día 2 y 5 post-inmunización con HAO realizado por medio de ELISA.

IFN- γ . MIF induce la producción de IFN- γ que está implicada en la inflamación y en el desarrollo de la AR. En la figura 12 se observa que existen diferencias significativas en la producción de IFN- γ entre los ratones MIF+/+ AR (1250 +/- 217 pg/ml) y MIF-/- AR (808 +/- 94 pg/ml), lo que indica que existió una mayor respuesta inflamatoria en comparación con los ratones una MIF-/- AR, inducida principalmente por la transferencia adoptiva de células de transferencia TCD4⁺. Por otra parte los ratones MIF+/+ PBS y MIF-/- PBS presentaron un nivel por debajo que los MIF+/+ AR y MIF-/- AR, respectivamente, dado quizás por el tratamiento para la inducción de artritis. Cabe señalar que en todos los grupos control esta citocina no se modificó en ningún momento.

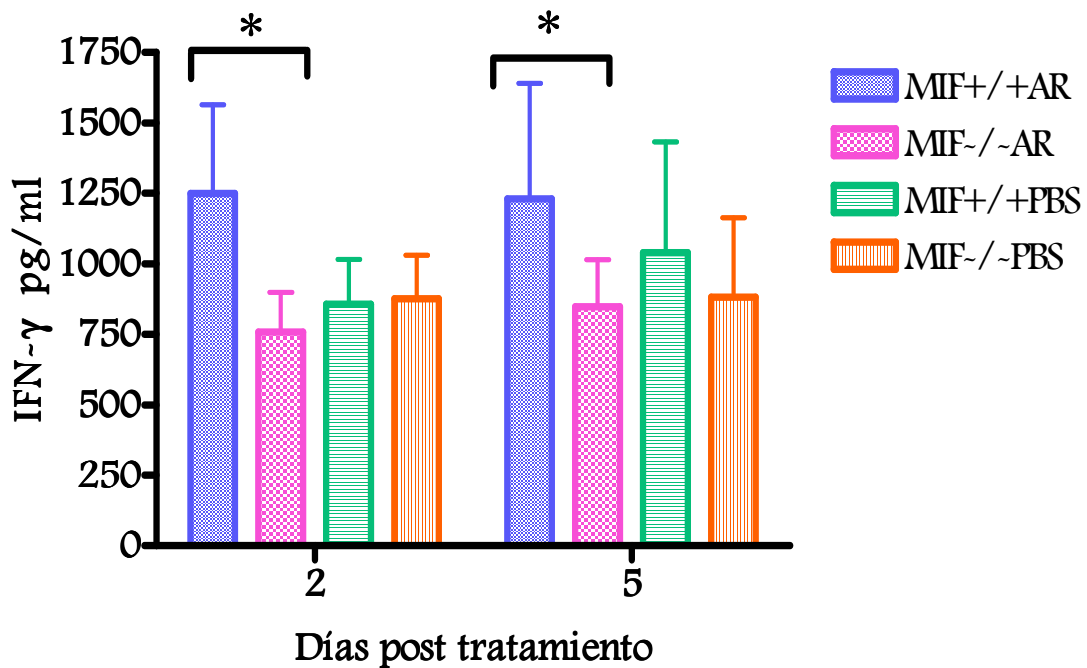


Figura 12. Concentración de IFN- γ en suero de ratones con o sin artritis. $n = 45$, * $p < 0.05$, t de students no pareada.

IL-12 Es una citocina que juega un papel importante en la diferenciación de células TCD4⁺ hacia Th1, las cuales se han descrito como las principales inductoras de AR. De acuerdo con lo anterior, en la figura 13 se observa que en los días 2 y 5 los ratones MIF^{+/+} AR tuvieron niveles mayores de IL-12 (120 +/- 17 pg/ml), en comparación con los MIF^{-/-} AR (94 +/- 7 pg/ml) lo cual correlaciona con el edema y eritema exacerbado que mostraron los MIF^{+/+} AR. Al igual que en IFN- γ los niveles de IL-12 en los controles MIF^{+/+} PBS (74 +/- 30 pg/ml), MIF^{-/-} PBS (13 +/- 16 pg/ml) fueron menores de los inducidos con AR.

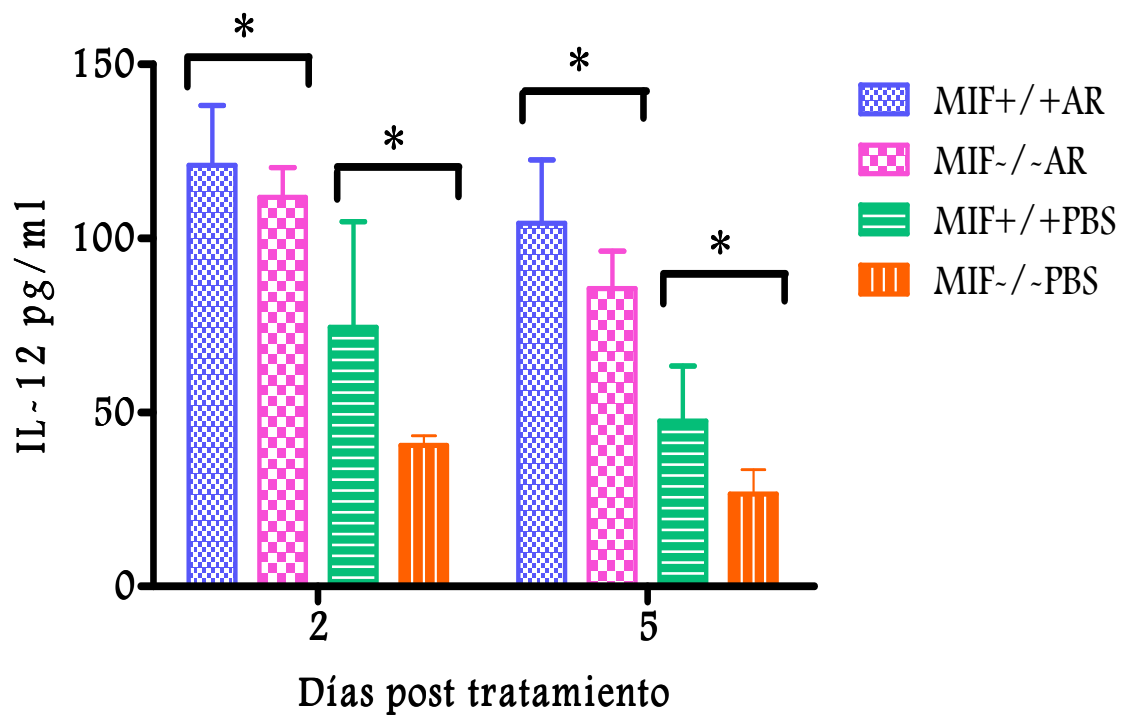


Figura 13. Concentración de IL-12 en suero de ratones con o sin artritis. $n = 45$ * $p < 0.05$, t de Students no pareada.

TNF- α : Citocina de gran importancia por sus implicaciones en la AR. Dado que los ratones presentaron mayor edema y eritema, se cuantificó la producción de TNF- α en todos los grupos experimentales. En la figura 14 se observa que tanto en los ratones MIF+/+ AR (376 +/- 35 pg/ml) y MIF+/+ PBS (198 +/- 26pg/ml) los niveles son mayores respecto a los ratones MIF-/- AR (195 +/- 31 pg/ml) y MIF-/- PBS (106 +/- 11 pg/ml). La tendencia de los ratones MIF-/- de presentar menor producción de TNF- α fue semejante en ambas mediciones, obteniendo diferencias significativas en todos los grupos experimentales.

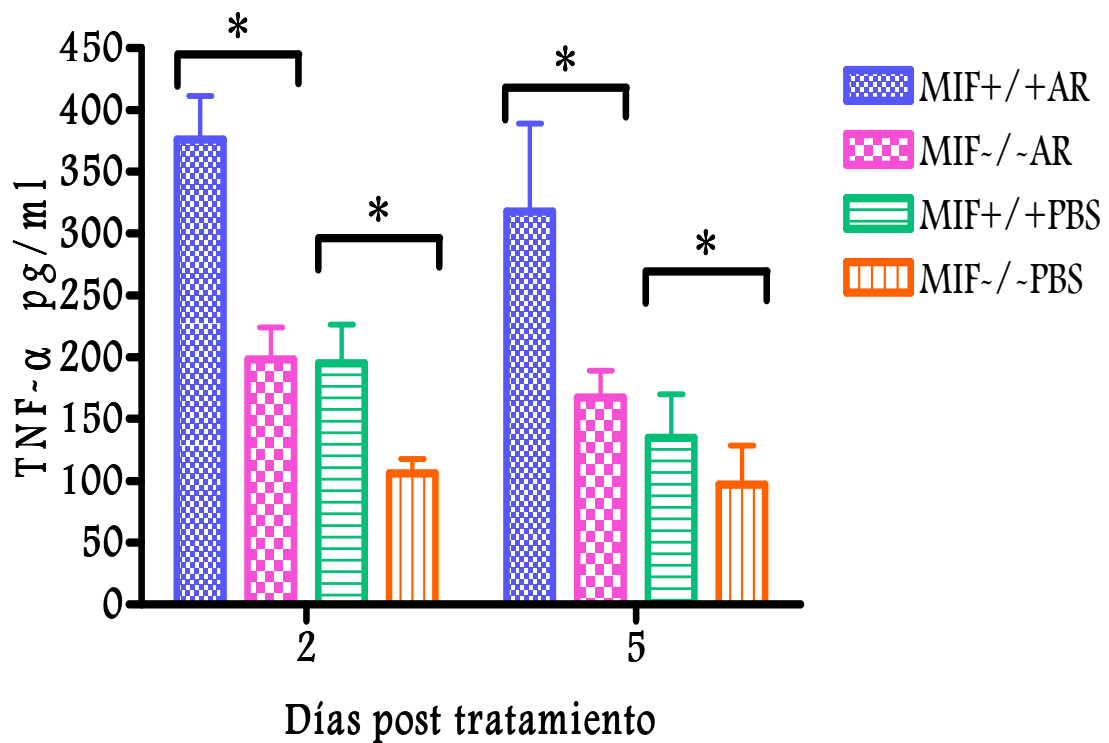


Figura 14. Concentración de TNF- α en suero de ratones con o sin artritis. $n = 45$ * $p < 0.05$, t de Students no pareada.

IL-1 β . Como puede observarse en la figura 15 los ratones MIF+/+ AR (376 +/- 35 y 330 +/- 69 pg/ml) presentaron una mayor liberación de esta citocina en los 2 días en los que fueron sangrados a comparación de los ratones MIF-/- AR (106 +/- 11 y 168 +/- 21 pg/ml). En los controles (MIF+/+ PBS, MIF-/- PBS) los niveles de IL-1 β estuvieron disminuidos en comparación con MIF+/+ AR.

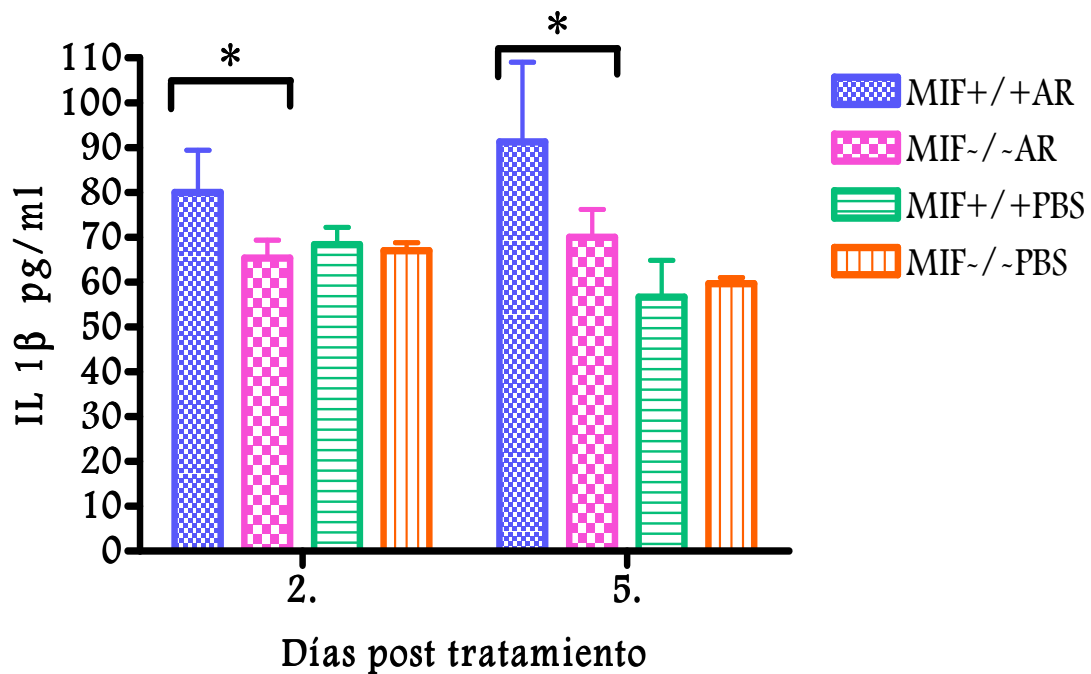


Figura 15. Concentración de IL-1 β en suero de ratones con o sin artritis. $n = 45$ * $p < 0.05$, t de Students no pareada.

IL-4: Para confirmar la importancia de IL-4 (Th2) en la AR se cuantificó la producción de la misma en el suero de todos los grupos experimentales. Los resultados de la figura 16 muestran que los ratones MIF^{+/+} AR (131 +/- 16 pg/ml) tuvieron disminuida la producción de IL-4 en comparación con los MIF^{-/-} AR (211 +/- 38 pg/ml). Los ratones control MIF^{-/-} PBS y MIF^{+/+} tuvieron niveles incrementados de IL-4 en el día 2 post-inducción, sin embargo para el día 5 disminuyeron los niveles sin presentar ninguna diferencia significativa entre ellos. El incremento inicial (día 2) y posterior (día 5) en los niveles de IL-4 observado en los controles, bien pudo ser el reflejo del eritema y edema provocado por la inmunización con PBS con el consecuente reflejo de la recuperación inmediata del trauma.

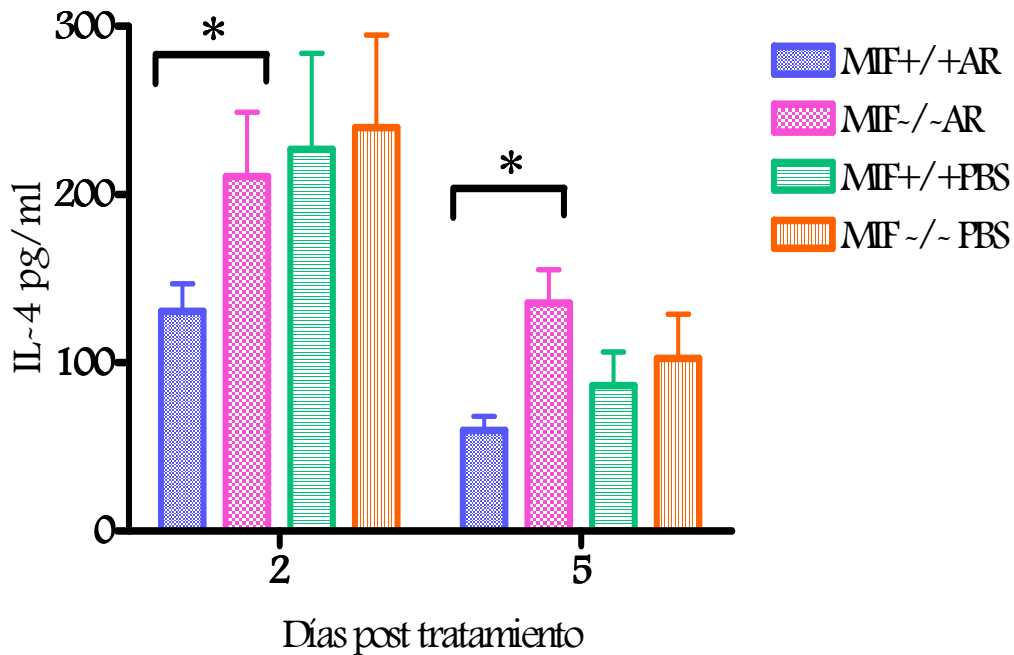


Figura 16. Concentración de IL-4 en suero de ratones con o sin artritis. $n = 45$ * $p < 0.05$, t de Students no pareada.

Óxido nítrico. La altas concentraciones de oxido nítrico inducen la producción de metaloproteinasas de matriz que participan en la degradación del cartílago. El óxido nítrico es producto de la liberación de TNF- α e IL-1 β ; debido a los altos niveles de producción de citocinas encontrados se realizó la cuantificación de oxido nítrico en suero por medio de la Reacción de Greiss. En la figura 17 se muestran las concentraciones obtenidas, hubo existieron diferencias significativas en la producción de esta enzima proteolítica en todos los grupos experimentales. Por un lado los ratones MIF^{+/+} AR tuvieron mayor concentración de NO con respecto a los ratones MIF^{-/-} AR. Los ratones MIF^{+/+} PBS de igual forma en ambos tiempos de sangrado presentaron mayor producción de NO en comparación con los MIF^{-/-}-PBS. Cabe mencionar que estos niveles no disminuyeron en los dos muestreos.

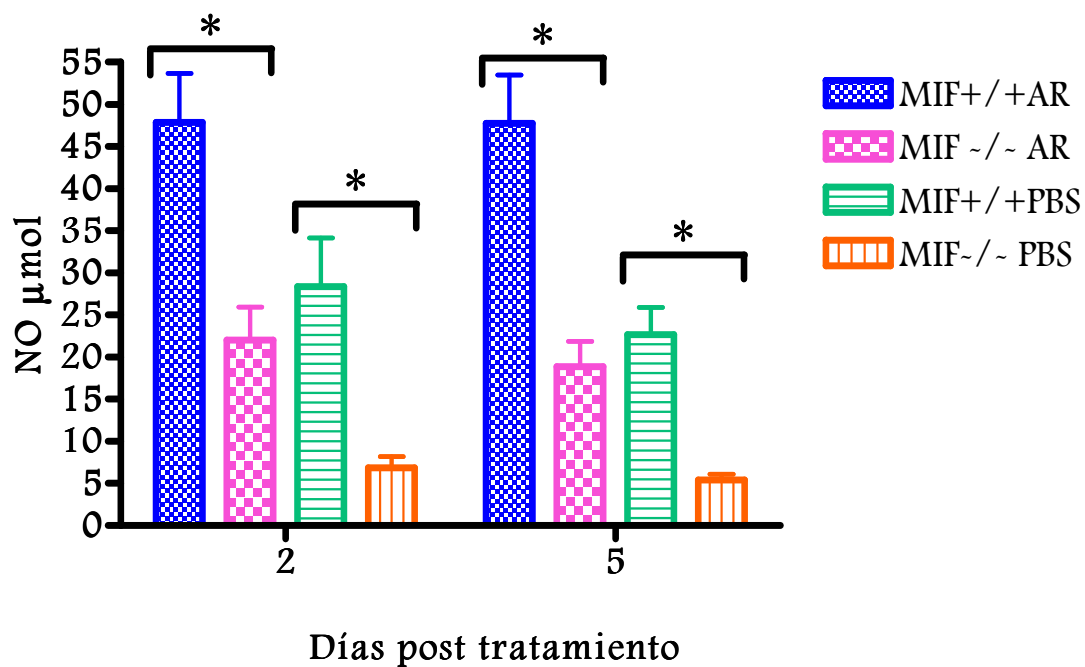


Figura 17. Producción de oxido nítrico en suero de ratones con o sin artritis. $n=45$ * $p < 0.05$, t de Students no pareada.

IgG1 específica. Al término del experimento (día 7 post inmunización) se obtuvo suero para la cuantificación de anticuerpos de la subclase IgG1 por medio de ELISA de todos grupos de ratones ya que se detectaron anticuerpos específicos para OVA. El punto último de titulación de IgG1 fue mayor en los ratones MIF +/+ (19000) en comparación con los ratones MIF-/- AR lo cuales mostraron una diferencia significativa respecto con los MIF+/+ AR. En lo referente a los ratones MIF+/+ PBS y MIF-/-PBS se mantienen sin ningún cambio. Este anticuerpo está relacionado con IL-4 y con una respuesta anti-inflamatoria Th2. (Figura 18)

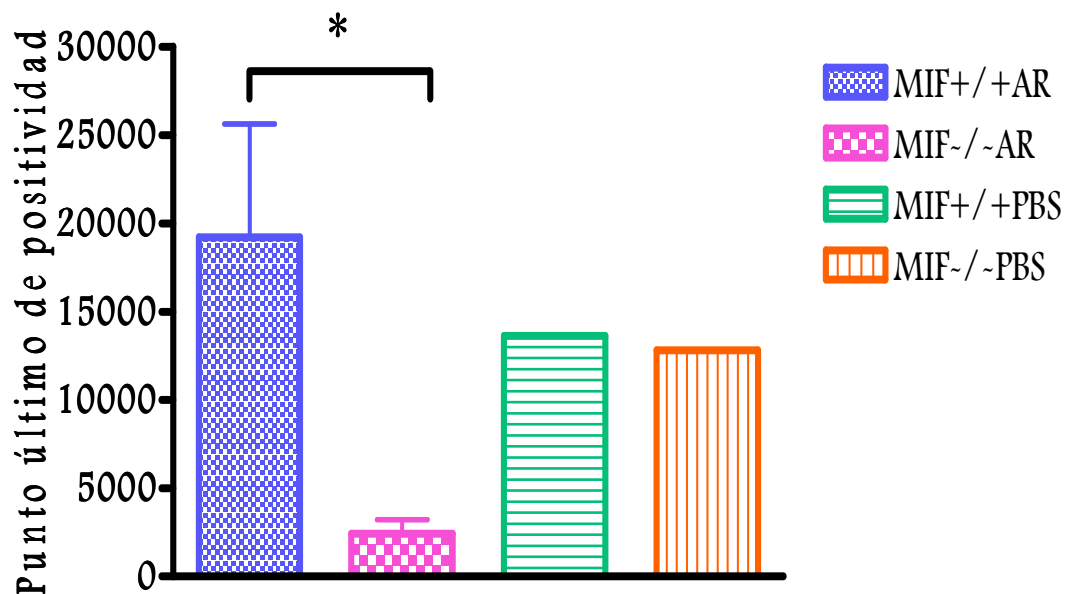


Figura 18. Producción de IgG1 en suero de ratones con o sin artritis. $n = 45$ * $p < 0.05$, t de Students no pareada.

Histología de articulaciones posteriores. Para observar si existía daño, hiperplasia, infiltrado inflamatorio hacia la cavidad sinovial y degradación o erosión del cartílago, los cortes histológicos se realizaron una vez concluido el tratamiento (17 días post inmunización con HAO), se obtuvieron cortes de 5 μ longitudinalmente y se tiñó con H&E.

En la figura 19 se muestran las tinciones con H&E de los cortes longitudinales de las superficies articulares que corresponden a la rodilla de los ratones controles (individuos sometidos al tratamiento mecánico de la inducción de AR pero que recibieron PBS, se observó que las articulaciones de los ratones MIF^{+/+} PBS (A) y MIF^{-/-} PBS (B) presentaron un ligero infiltrado inflamatorio en la base del cartílago, sin embargo no se observó invasión de linajes celulares mencionados. Los ratones controles MIF^{+/+} PBS presentaron una ligera deformación, propia de la inflamación provocada por el acúmulo de células, que no se apreció en los ratones MIF^{-/-} PBS. Aunque en los ratones MIF^{-/-} AR (C) hubo infiltrado celular como el daño fue menor; no se observó deformación de la membrana sinovial, aunque están presentes células de origen pro inflamatorio que pudiesen invadir la cápsula sinovial y provocar la deformación de la misma. El cartílago se observó homogéneamente más compacto, no se apreció la presencia de *pannus* y granulomas aunque también presentaron edema en la bolsa sinovial, infiltración y proliferación de células sinoviales, daño de pequeños vasos por engrosamiento de la membrana sinovial, debido al acumulo celular. No se observa daño a hueso. Los ratones MIF^{+/+} AR (D) presentaron un aumento significativo en el infiltrado celular, característico de una sinovitis reactiva que afecta también a la parte superior de los tendones y toda la base de la bolsa sinovial de la articulación. Este infiltrado celular en exceso lleva a un rompimiento de la membrana sinovial que posteriormente invade la cápsula sinovial que conlleva a una deformación y desaparición de la cápsula. Estos resultados muestran que el daño ocasionado es a nivel de la cápsula articular y cartílago.

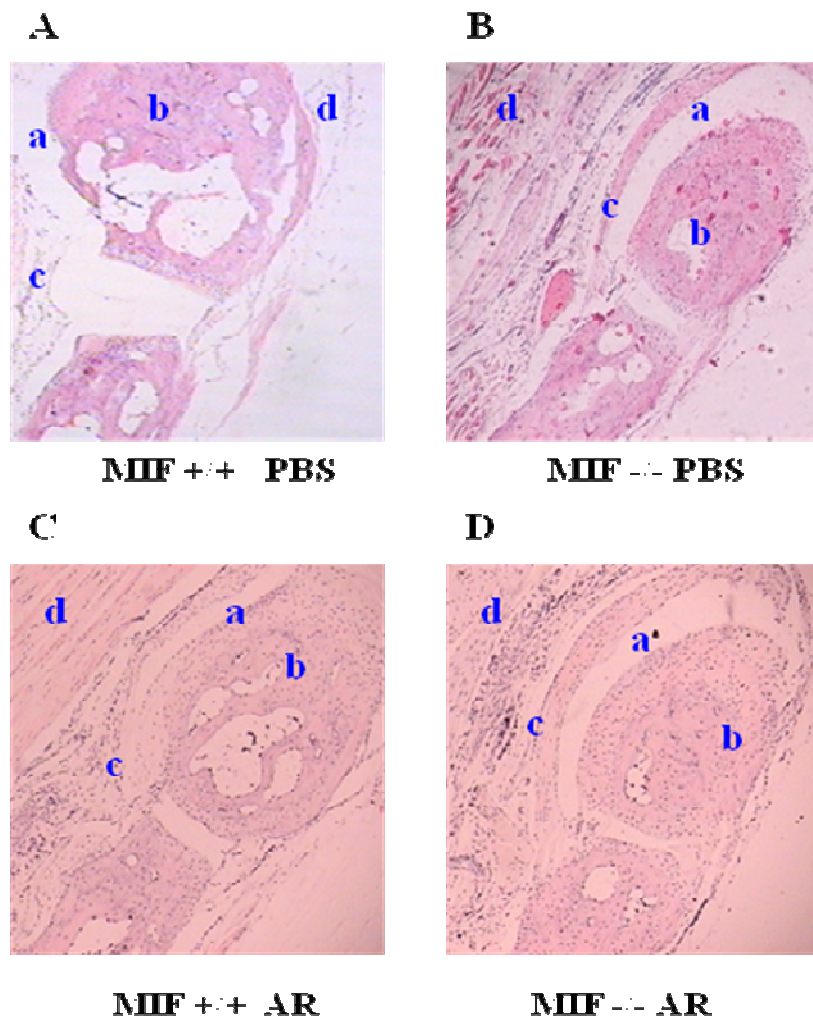


Figura 19. Cortes longitudinales de la articulación de ratones con AR. (10x) **a** Cápsula articular, **b** Bolsa sinovial (cartílago), **c** Membrana sinovial, **d** Tendón.

En la figura 20 se muestran cortes de la cápsula articular y la membrana sinovial que rodea a la bolsa sinovial. En los ratones MIF+/+ con AR se observó un infiltrado celular considerable que ocasiona la presencia de vasculitis (dilatación de los vasos sanguíneos) ya que las células del sistema inmunológico (macrófagos, monocitos, y linfocitos T) que penetran en el sinovia prolongan la inflamación y desarrollan tejido granuloso, exuberante llamado *pannus*, que se extiende sobre la superficie articular y se acompaña de destrucción de la membrana sinovial e invasión de la cápsula articular provocando un desgarramiento del cartílago lo que pueden causar daños en el tejido. Si esta inflamación persiste puede dar lugar a la destrucción de cartílago, erosión del hueso,

tendones y ligamentos cercanos. Se observó la presencia de vesículas las cuales en un tejido normal se encargan de transportar los desechos principalmente de metaloproteinasas hacia afuera de la matriz extracelular, sin embargo en la AR debido al aumento en la infiltración celular el espacio es obstruido impidiendo la salida de las mismas, que por lo tanto se acumulan y sus desechos son liberados provocando daño al cartílago (A). En los ratones MIF^{-/-} con AR ambas estructuras estaban íntegras (B), y aún cuando existe infiltrado inflamatorio moderado, no se acumuló en exceso alrededor de la membrana lo que permite que no se rompa y que no haya una invasión del infiltrado celular inflamatorio hacia la cápsula articular. Estas características se observan mejor en la membrana sinovial en mayor aumento (40X).

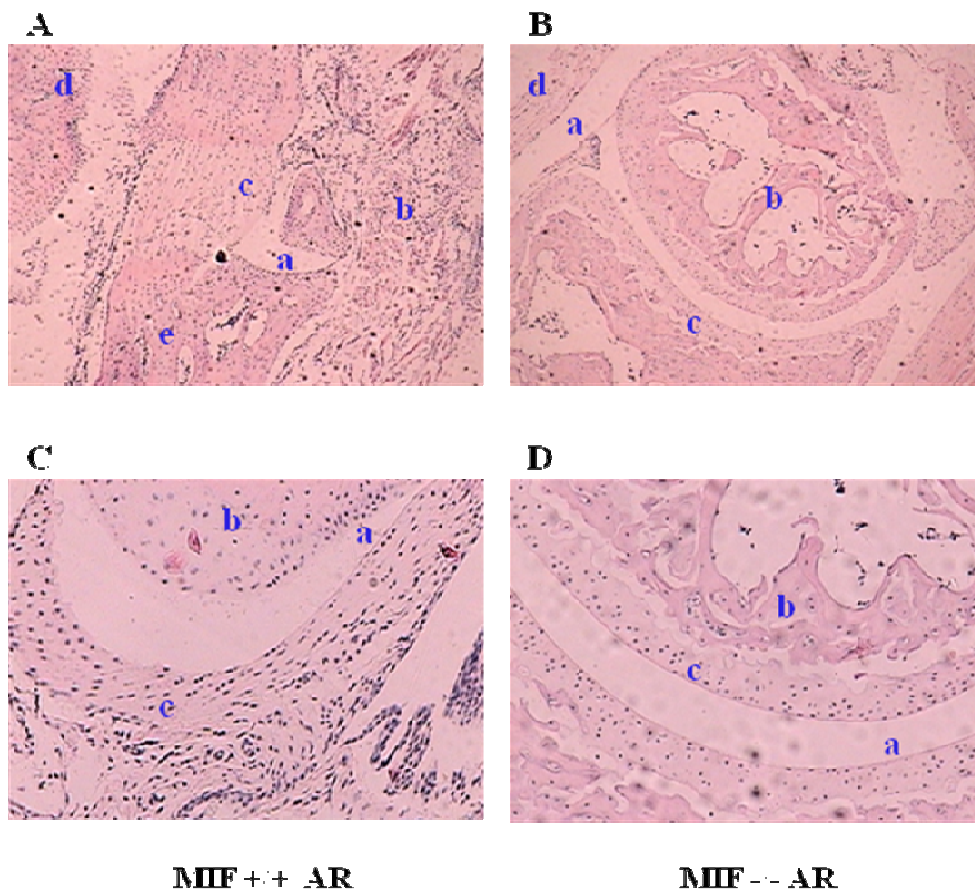


Figura 20. Cortes longitudinales de la cápsula articular de ratones con AR. A y B (10x), C y D (40x). a Cápsula articular, b Bolsa sinovial, c membrana sinovial, d tendón, e vesículas.

Expresión de las metaloproteínas de matriz sobre la base del cartílago.

En la figura 21 se observa la detección de MMP2. La MMP 2 se presentó en ambos grupos de ratones tanto en los controles con PBS como en los ratones experimentales con AR. En los ratones MIF^{+/+} PBS y MIF^{-/-} PBS (A, B) se observa que la MMP2 se detectó en toda la base del tejido (cartílago), sin embargo, en los ratones MIF^{+/+} PBS (B) la diferencia es el aumento de infiltrado inflamatorio que se presentó tanto en la base del cartílago como en la membrana sinovial ya que bajo condiciones de inflamación un gran número de células como macrófagos y fibroblastos derivadas de la circulación infiltran hacia la bolsa sinovial.

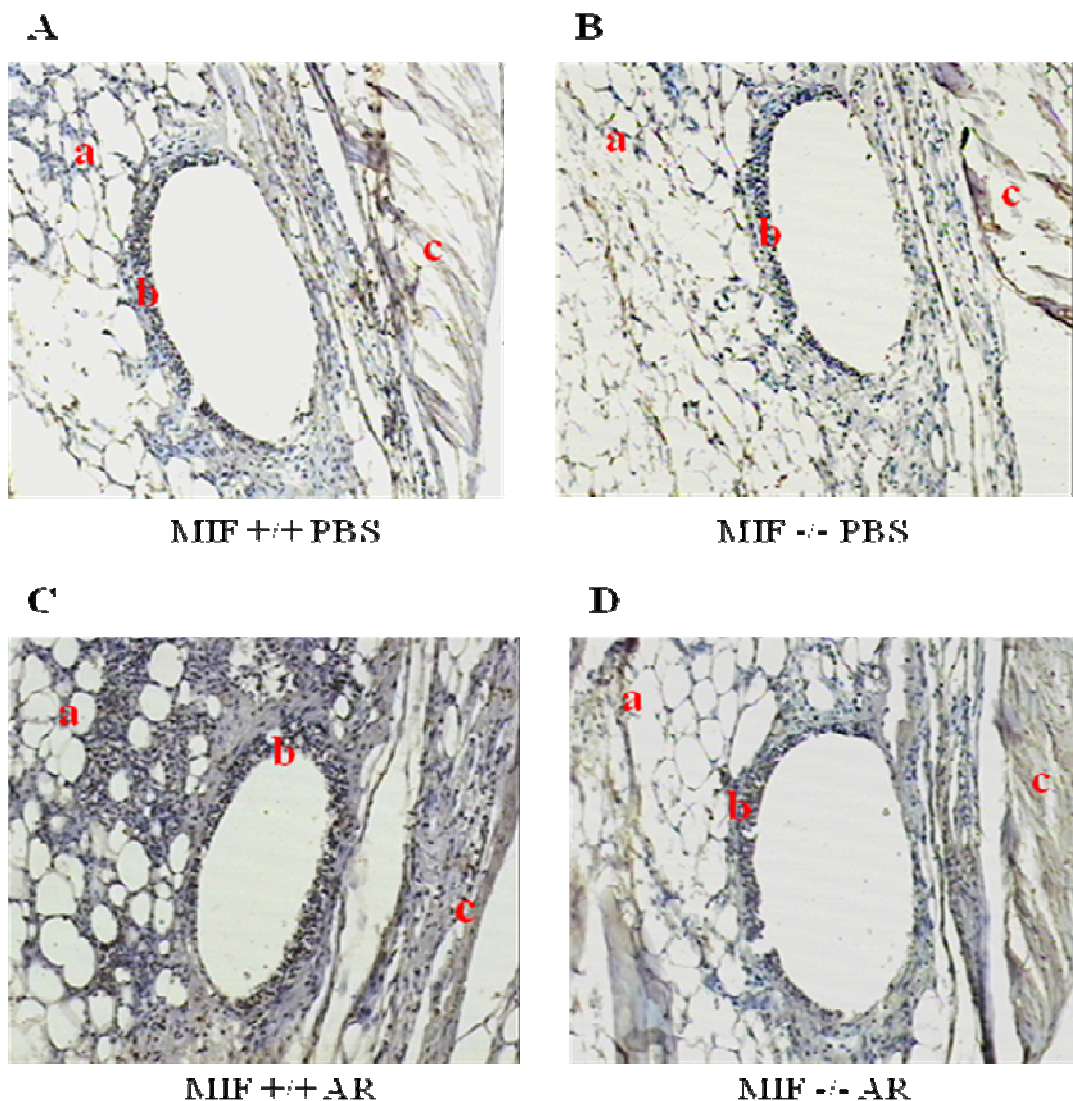


Figura. 21. Inmunohistoquímica para MMP2 del cartílago de ratones con o sin AR (10x)

a Cartílago , b membrana sinovial, c tendón.

El cartílago de ratones MIF^{+/+} AR (C) presento infiltrado mayor, tanto en la base del cartílago como en la membrana sinovial, es importante hacer notar el acumulo de células inflamatorias que se presentan en el tendón, lo que en casos crónicos propiciaría la rigidez y pérdida de movimiento en la articulación afectada. La expresión de la MMP-2 se observó intensamente en agregados celulares que se distribuyen por toda la bolsa sinovial. En comparación con los MIF^{-/-} (figura 21D) en los cuales existe un infiltrado inflamatorio.

En la figura 22 se muestra un aumento mayor del infiltrado inflamatorio a nivel del cartílago. En los ratones MIF^{+/+} (A) se observan agregados celulares que se encontraron en la base del cartílago y de la membrana sinovial en comparación con los ratones MIF^{-/-} PBS (B) en los cuales las células se encontraron uniformemente distribuidas a lo largo de la base del cartílago. De igual forma en los ratones experimentales MIF^{+/+} AR (C) y MIF^{-/-} AR (D) se observó MMP 2 proporcional a la cantidad de infiltrado inflamatorio siendo mayor en los MIF^{+/+}.

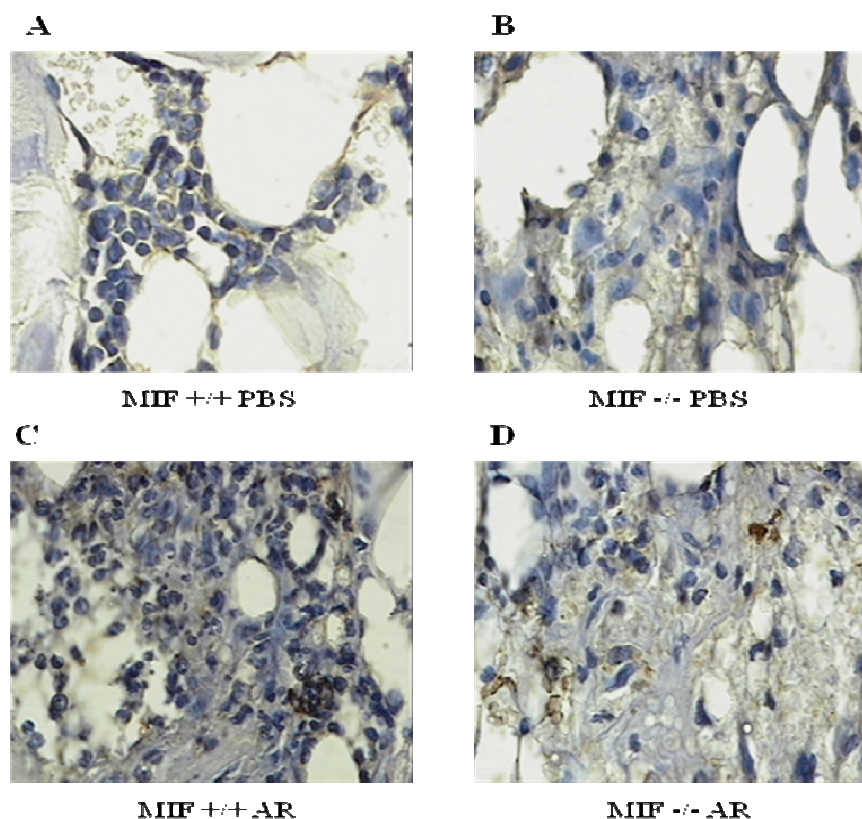


Figura 22. Inmunohistoquímica para MMP2 del infiltrado inflamatorio del cartílago de ratones con o sin AR (50x).

También se realizó inmunohistoquímica para detectar la presencia de MMP9. En la figura 23 se observa MMP9 en los animales control de ambos grupos, (A y B) incrementó en el número de células productoras de MMP-9 en los ratones MIF+/+ AR (C) y MIF-/- (D) se muestra un infiltrado inflamatorio abundante, sobre todo en el MIF+/+ AR (C). La ausencia de MIF disminuyó la expresión de MMP9 en los animales control, aunque MIF no parecen participar directamente en la producción de MMPs en el tejido, sino en la cantidad de infiltrado celular.

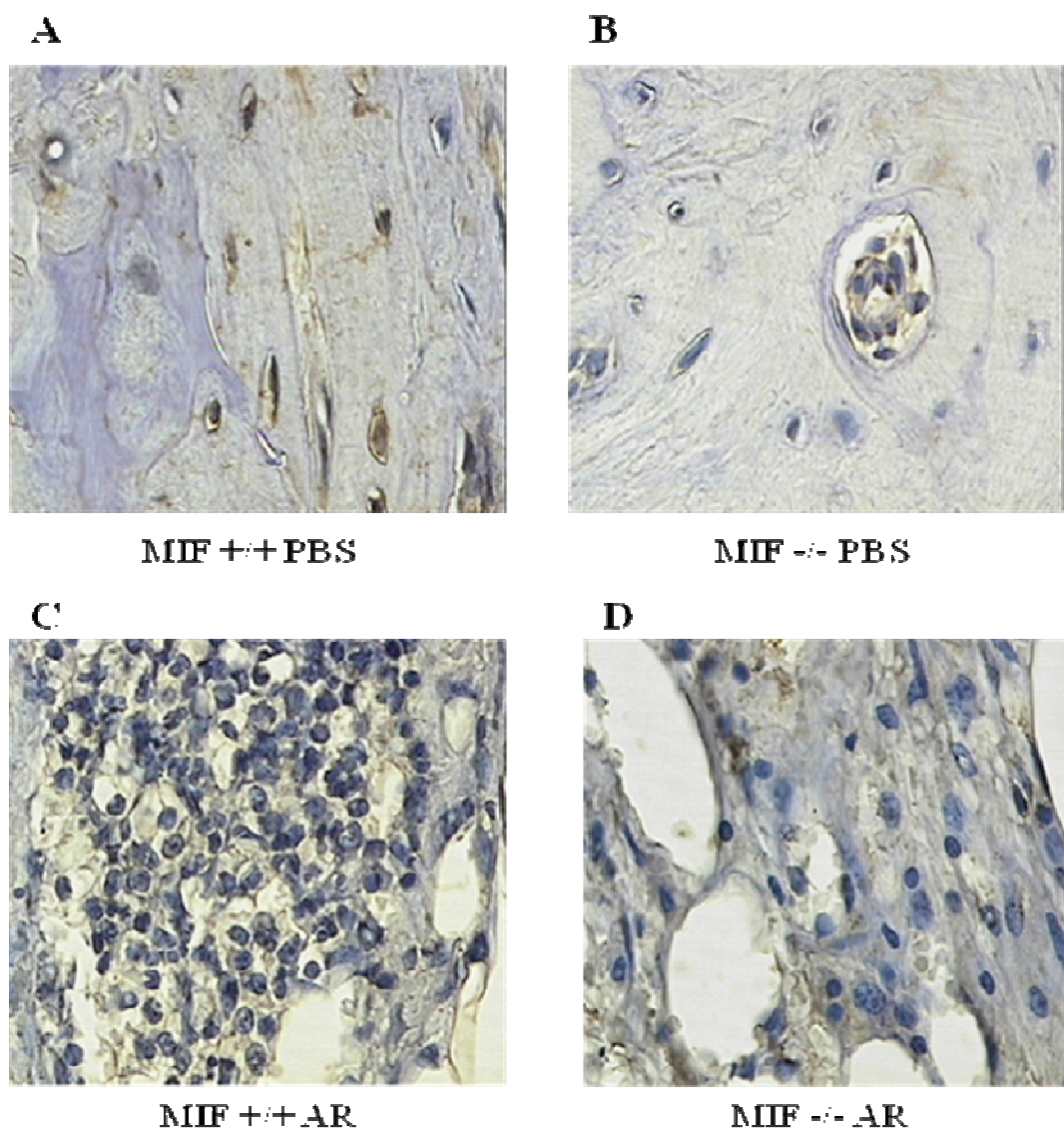


Figura 23. Inmunohistoquímica para MMP9 del infiltrado inflamatorio del cartilago de ratones con y sin AR. (50x)

DISCUSIÓN

La AR es una enfermedad de tipo autoinmune con elevados niveles de IFN- γ que favorecen la respuesta inmune celular, activación de macrófagos y producción de anticuerpos de la subclase IgG2a. La mayoría de los autores coinciden en que la principal fuente del IFN- γ son los linfocitos TCD4+ [86] que están significativamente incrementados en los fluidos sinoviales [87-89], así estas células participan en el inicio, desarrollo y perpetuación de la AR [84].

El modelo para la inducción de AR que se desarrolló en este trabajo está basado en una transferencia adoptiva de células TCD4+ transgénicas para OVA (con un TCR-OVA) y diferenciadas *in vitro* con IL-12 a células de naturaleza Th1. Esto se corroboró por citometría de flujo (TCD4+) y con la determinación de IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante del cultivo. El incremento significativo de IFN- γ y los niveles casi ausentes de IL-4 no dejaron lugar a dudas de que las células que se utilizaron en la transferencia eran de naturaleza Th1, lo que aseguró un ambiente sistémico inflamatorio. En estas condiciones la inmunización con HAO cercana a la articulación desencadenó un reconocimiento inmediato de los linfocitos Th1 transferidos y un proceso reactivo semejante a los procesos de la autoinmunidad observados en la artritis reumatoide [84].

Así, una vez establecido y validado este modelo de AR se procedió a evaluar la participación de MIF en los procesos inflamatorios generados en el modelo. Para este fin se desarrolló el modelo citado en ratones silvestres (MIF+/+) y en ratones deficientes en el gen que codifica para MIF (MIF-/-), ambos con fondo genético BALB/c. El modelo de transferencia reveló datos importantes a partir del día siguiente.

La presencia evidente de un edema prominente junto con la coloración rojiza, dada por la inflamación, son las características principales en el desarrollo de la AR [5, 84, 90]. Se observó la presencia de edema y eritema en el transcurso de los 8 días posteriores a la inmunización. El efecto se midió en los días 2 y 5 y se observó que el edema y el eritema fueron muy visibles en ambos grupos, esta observación coincide con reportes anteriores. Sin embargo los ratones MIF-/- desarrollaron menor grado, tanto de inflamación como de eritema, que los ratones MIF+/+ correlacionando esta observación con el mayor grado, de inmovilización parcial que presentaron los ratones MIF+/+ con AR respecto a los MIF -/- con AR en los extremos de las articulaciones posteriores.

Debido a que en los días 2 y 5 la inflamación y eritema eran muy evidentes, se realizó la determinación de citocinas pro y anti-inflamatorias. Los niveles incrementados de IFN- γ , en los ratones MIF+/+ AR son resultado de la transferencia de células Th1 diferenciadas *in vitro*, dado que en los grupos control no se observó ninguna variación significativa. Esta observación apoya la aseveración de que IFN- γ es una citocina que guía, desde un inicio, el desarrollo y la perpetuación de la inflamación en la AR [92-95]. En esta patología se ha sugerido que el IFN- γ es liberado por linfocitos, macrófagos y células sinoviales responsables de la degradación de colágena (principal componente del cartílago), además se ha descrito que los niveles altos de IFN- γ inducen incremento en la expresión de metaloproteínas las que posteriormente degradaran la matriz extracelular [91]. En contraste con esta observación, los ratones MIF-/- AR no tuvieron niveles incrementados de IFN- γ , los niveles observados fueron similares a los controles que no recibieron la transferencia de células. Esto se puede explicar en función de la ausencia de MIF ya que se ha reportado en diferentes estudios que MIF induce la liberación de IFN [90, 91].

En la determinación de la IL-12 se observó un fenómeno similar, ratones MIF+/+ AR expresaron niveles incrementados mientras que los MIF-/- tuvieron los niveles de IL-12 sin cambios, semejantes a los controles, estos resultados fueron congruentes con la expresión de IFN- γ descrita en la parte superior, puesto que la IL-12 favorece la producción de IFN- γ . El sinergismo IL-12, IFN- γ es por todos aceptado que incrementa la respuesta inflamatoria [94] en diferentes modelos animales de AR, lo que concuerda con los resultados obtenidos, en los que los grupos experimentales MIF+/+ AR presentaron mayor grado de edema y eritema que los MIF-/- AR. Nuevamente, los elevados niveles de estas citocinas IL-12, IFN- γ correlacionaron con niveles altos de TNF- α e IL-1 β que facilitan la producción de IFN- γ por células T en la AR [93, 96]. Con estos resultados se puede inferir que la producción de IL-12 está estrechamente ligada a la producción de citocinas proinflamatorias, y que la relación entre IL-12 y la gravedad del edema y eritema correlacionaron con el desarrollo de la enfermedad. Así mismo, IL-12 ha sido considerada como una citocina que juega un papel inmunorregulador en la patogénesis de la AR, entre otras cosas, por la perpetuación de la inflamación [97]. Esta citocina es producida por células sinoviales (fibroblastos), monocitos y macrófagos, las cuales infiltran la membrana sinovial y son los principales linajes celulares característicos de una inflamación crónica

[98]. Por otro lado, los macrófagos pueden producir IL-12 durante la fagocitosis del cartílago, tejido dañado y necrosado o durante la fagocitosis de restos celulares, ejerciendo así una regulación en el desarrollo, perpetuación y mantenimiento de la respuesta Th1 en la AR [99].

En estudios realizados con anterioridad se ha podido establecer que TNF- α al ser liberada por monocitos, macrófagos y células sinoviales como fibroblastos entre otras, induce la producción de metaloproteinasas (MMP1, MMP3 y MMP13) que destruyen los componentes de la matriz extracelular y liberan óxido nítrico participando en la degradación y erosión del cartílago [100], por lo que los resultados del presente trabajo coinciden con esta descripción, ya que los ratones MIF+/+ presentaron mayores signos y síntomas en el desarrollo de la AR. Sin embargo los estudios anteriores sólo describen la presencia de esta citocina en suero; en este trabajo se describen los resultados a nivel articular causados por mayor liberación de TNF- α , daño mayor a nivel de la base del cartílago visto en la histología de los ratones MIF+/+.

Una citocina potente inductora de óxido nítrico es IL-1 β que se libera en las fases agudas de la AR, particularmente está involucrada en inhibir la síntesis, degeneración y degradación de proteoglicanos [101]. IL-1 β es un mediador clave en la reabsorción ósea e invasión y destrucción del cartílago en la AR [102], pero podría no jugar un papel dominante en el edema y eritema de la articulación; incrementa la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 y participa en la formación de *pannus* alrededor de la articulación así como en la formación de vesículas presentes en el cartílago dañado [100]. Los ratones MIF+/+ AR presentaron vesículas linfáticas sobre la base del cartílago, estas vesículas transportan y recirculan los componentes de la matriz extracelular desde el flujo intersticial hacia el torrente circulatorio, lo que ayuda a eliminar los productos de desecho. Sin embargo, el acúmulo de células provocado por la infiltración y migración de las mismas hacia la membrana sinovial impiden el paso de estas vesículas hacia fuera, lo que conlleva a que los productos de desecho se queden dentro de la cápsula sinovial y provoquen una inflamación evidente y posteriormente necrosis debida a los productos de desecho. Dado que esta citocina es parecida a TNF- α en cuanto a sus efectos, sólo se relaciona con la fase de destrucción de hueso y degradación del cartílago [103]. Esta aseveración la podemos relacionar con el aumento de IL-1 β en los ratones MIF+/+ AR, y

si bien no se observa daño en el hueso, existe una destrucción de la cápsula articular. Con estas observaciones podemos decir que MIF participa como inductor de esta citocina y de los daños ocasionados por la misma, aunque aun es necesario determinar si lo hace de manera directa o indirectamente.

En lo referente a la citocina IL-4, se ha reportado que ésta se encuentra en bajas concentraciones en la AR dado que es una citocina anti-inflamatoria (Th2). Esta citocina es un mediador de los efectos supresores en enfermedades autoinmunes como la AR, ya que suprime los efectos provocados por IL-1 β y TNF- α [33, 104, 105], lo que concuerda con nuestros resultados ya en los grupos experimentales la presencia de MIF (MIF+/+) provocó la disminución en la producción de IL-4. Se puede asociar la carencia de IL-4 en los ratones MIF+/+ con la disminución de IgG1 ya que se sabe la importancia de esta citocina para el cambio a este isotipo.

Por otro lado, se ha reportado que IL-4 ejerce funciones supresoras y protectoras en la liberación de metaloproteínas y proliferación celular [106], la degradación de la matriz, inhibición de la actividad de los osteoclastos que participan en la degradación del cartílago y bloquea la reabsorción del hueso *in vitro* [107]. Este resultado sugiere que MIF ejerce un efecto supresor de la producción de IL-4 (que puede participar evitando el desarrollo de la AR) y que a su vez IL-4 es importante para la regulación de la artritis reumatoide, por lo que en su ausencia podría disminuir la protección contra la inflamación y la AR.

El sinovio está altamente expuesto a la acción que ejercen los diferentes tipos de células que infiltran la cavidad sinovial y se acumulan alrededor de ella. Estas células a su vez liberan citocinas pro-inflamatorias las cuales inducen la liberación de otras sustancias que actúan directamente en el cartílago, dañando y degradando la superficie de la matriz extracelular. El óxido nítrico es una sustancia liberada por la acción conjunta de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β [108] y está involucrado en la degradación del cartílago, erosión del hueso, y remodelación de la matriz extracelular por la síntesis de metaloproteinasas de matriz y necrosis de tejido dañado[109]. En este caso para los ratones MIF+/+ AR el nivel alto de producción de esta enzima proteolítica se debe a la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, linfocitos TCD4⁺ y fibroblastos [110]; esto indica que MIF en los ratones con AR participa como potente inductor y

regulador de la liberación de NO y a consecuencia se presente una inflamación propia de la AR.

Dado que la liberación de TNF- α e IL-1 β llevan a su vez a la síntesis de enzimas proteolíticas, como productos finales en la patología de la AR, que se caracteriza por una inflamación sinovial, seguida de la infiltración celular en la cápsula articular. En este proceso la producción de enzimas proteolíticas como las MMP liberadas principalmente por macrófagos y sinoviocitos tipo fibroblastos, puede resultar en una degradación del tejido presente en la bolsa sinovial con la consecuente destrucción del hueso. Estas enzimas participan en la remodelación de la matriz extracelular y son responsables de la degradación de la capa hialina del cartílago (colágena), de la fibronectina y de la cápsula articular [111]. En la actualidad se han relacionado directamente a la MMP-2 (Gelatinasa A) y MMP-9 (Gelatinasa B) en fluidos sinoviales típicos en enfermedades inflamatorias, particularmente en AR. La activación de estas enzimas es mediada por la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , las cuales juegan un papel importante en su síntesis. Se ha detectado la presencia de MMP 2 y MMP 9 en ensayos inmunohistoquímicos y se ha observado que ambas metaloproteinasas se presentan en los sitios de inflamación y linajes celulares de la superficie sinovial como linfocitos, macrófagos y fibroblastos.

En los últimos años se ha descrito que MIF juega un papel importante la destrucción del hueso y cartílago ya que participa como inductor de la producción de MMP9, MMP13 y principalmente MMP2, es detectable en la sinovia inflamada de pacientes con AR y se ha relacionado significativamente en el proceso de erosión del hueso ya que se ha encontrado incrementada en tejido sinovial. Nuestros resultados confirman la importancia de la participación de MIF en la producción de MMP2 ya que los ratones MIF $^{-/-}$ AR presentaron menor expresión en esta enzima que los ratones MIF $^{+/+}$ AR.

Con el conjunto de resultados generados en este trabajo se sugiere el posible mecanismo de la participación de MIF en la patología de la AR, que se muestra en la figura 24.

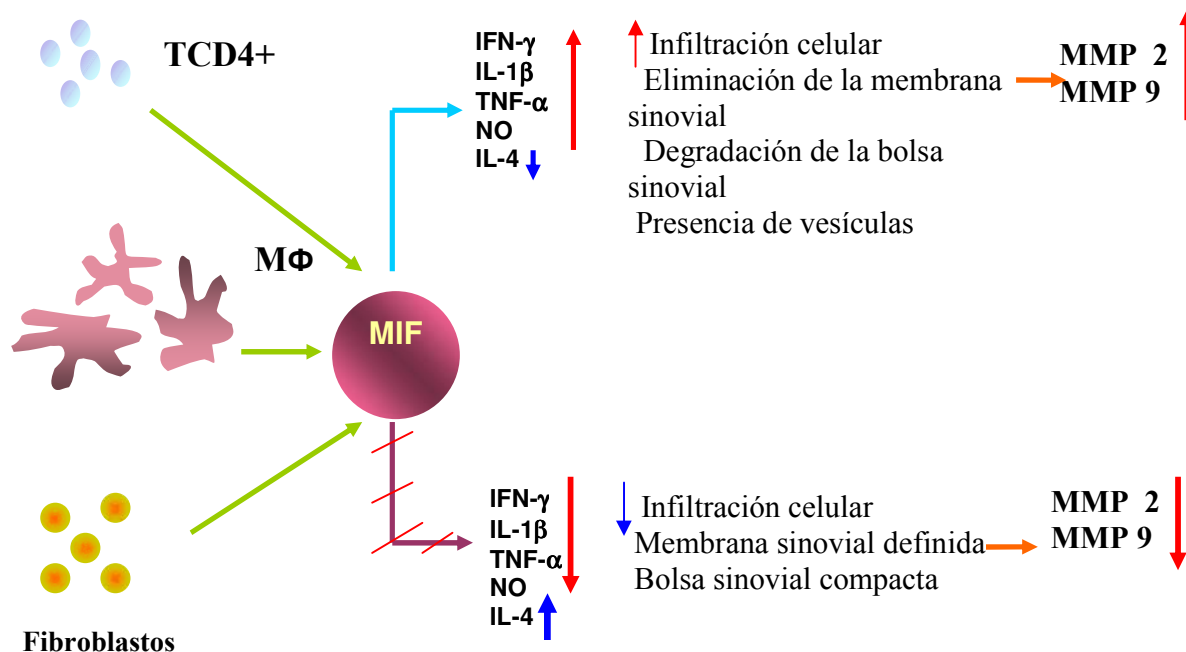


Figura. 24 Posible mecanismo de MIF en la artritis experimental murina. La Artritis Reumatoide es una enfermedad que se caracteriza principalmente por la invasión del sinovio de linfocitos TCD4+ y macrófagos, siendo estos los principales iniciadores de la inflamación local en las articulaciones. Además este tipo de células son inductores potenciales de MIF, el cual a su vez induce la liberación de citocinas pro inflamatorias como IFN- γ , IL-1 β y TNF- α que, en conjunto, propician la secreción de moléculas que degradan el cartílago, como óxido nítrico y metaloproteinasas de matriz que inician y perpetúan la degradación del cartílago y la erosión del hueso. En la actualidad la mayoría de los medicamentos que se utilizan para controlar la inflamación severa que presentan los pacientes con esta enfermedad están basados en la administración de anticuerpos contra TNF- α sin embargo este tipo de medicamentos producen una disminución en la producción de células de la médula ósea por lo que el paciente queda inmunodeprimido y puede aparecer cualquier otro tipo de infección o enfermedad puede aparecer.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- El modelo murino establecido de artritis reumatoide fue exitoso.
- La transferencia de células TCD4⁺ es necesaria para la inducción de AR en los ratones con fondo genético BALB/c, debido al reconocimiento de un antígeno exógeno.
- MIF participa en la patología de la AR a través de la inducción de citocinas IL-1 β , TNF- α , y óxido nítrico. La ausencia de MIF resultó en una regulación positiva de IL-4
- MIF participa en la inducción de IgG1 en este modelo.
- MIF participa en la regulación de la migración e infiltración celular a nivel del cartílago y al ser liberado por macrófagos y células sinoviales contribuye significativamente al desarrollo del daño articular, favoreciendo la invasión del sinovio dentro del cartílago.
- La presencia de MIF favorece la liberación de las metaloproteínas de matriz (MMP 2 Y MMP 9) de manera proporcional a la cantidad de infiltrado inflamatorio que invade el tejido sinovial.
- MIF funge como mediador en la génesis, desarrollo y perpetuación de la inflamación en la AR.

REFERENCIAS

1. Arend, W.P. *Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist*. Semin Arthritis Rheum, 2001. **30**(5 Suppl 2): p. 1-6.
2. Abbas AK, et al. *Inmunología celular y molecular*. 5ta. ed, ed. Elsevier. 2004, España. 563pp.
3. Mosmann, T.R., et al. *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
4. Lee, S.J., et al. *Autoimmunity, vasculitis, and autoantibodies*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S445-50.
5. Moctezuma, R. *Manifestaciones articulares de la Artritis Reumatoide*. Rev. Mex.Reumatología, 2002. **17**: p. 211-219.
6. Finck, B.K., et al. *Treatment of murine lupus with CTLA4Ig*. Science, 1994. **265**(5176): p. 1225-7.
7. Greene, J.L., et al. *Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26762-71.
8. Janeway, C.A., et al. *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
9. Cornelis, F., et al. *New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10746-50.
10. Ma, Y., et al. *Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 380-7.
11. Behar, S.M., et al. *Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(4): p. 458-76.
12. Friedman, S.M., et al. *A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(4): p. 468-80.
13. L.I.A, et al. *Mechanisms of disease: Molecular Mimicry and autoimmunity. chromatographic procedures*. N Engl J Med, 1999(324): p. 2068-2074.
14. Weyand, C.M., et al. *The influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(5): p. 817-22.
15. Rose, N.R., et al. *The autoimmune diseases. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease*. Semin Immunol, 1998. **10**(1): p. 5-13.
16. Kremers, H.M., et al. *Therapeutic strategies in rheumatoid arthritis over a 40-year period*. J Rheumatol, 2004. **31**(12): p. 2366-73.
17. Firestein, G.S. *Rheumatoid synovitis and pannus*. Editado por J.Klippel, P Dieppe. ST Louis,, ed. F. edition. 1997, Mosby.
18. Morand, E.F., et al. *Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(5): p. 558-62.
19. Mikulowska, A., et al. *Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5514-7.
20. Zanelli, E., et al. *HLA class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations*. Hum Immunol, 2000. **61**(12): p. 1254-61.

-
21. Whitton, J.L., et al. *Viruses as triggers of autoimmunity: facts and fantasies*. *Curr Opin Microbiol*, 1999. **2**(4): p. 392-7.
 22. Heath, W.R., et al. *Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 47-64.
 23. Kurts, C., et al. *CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(22): p. 12703-7.
 24. Morgan, D.J., et al. *Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 723-7.
 25. Firestein, G.S. *Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?* *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(11): p. 1781-90.
 26. FR;, C., et al. *Lecciones de Anatomia Patológica*. ed. B. Chuaqui. 2002.
 27. Rheumatology., A.C.o. *Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis Rheum.*, 2002. **46**: p. 346.
 28. Hasunuma, T., et al. *Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis*. *Springer Semin Immunopathol*, 1998. **20**(1-2): p. 41-52.
 29. Nishino, T., et al. *Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland*. *Mol Med*, 1995. **1**(7): p. 781-8.
 30. Kontny, E., et al. *Taurine chloramine inhibition of cell proliferation and cytokine production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(12): p. 2552-60.
 31. Harada, S., et al. *Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(7): p. 1508-16.
 32. Westhoff, C.S., et al. *Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(7): p. 1517-27.
 33. Borghaei, R.C., et al. *Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(8): p. 1398-406.
 34. Morand, E.F., et al. *Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis*. *Front Biosci*, 2005. **10**: p. 12-22.
 35. Shimizu, T., et al., *Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor-deficient mice*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(6): p. 1478-87.
 36. David, J.R. *Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1966. **56**(1): p. 72-7.
 37. Weiser, W.Y., et al. *Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(19): p. 7522-6.
 38. Bucala, R. *MIF, a previously unrecognized pituitary hormone and macrophage cytokine, is a pivotal mediator in endotoxic shock*. *Circ Shock*, 1994. **44**(1): p. 35-9.
 39. Calandra, T., et al. *The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor*. *J Exp Med*, 1994. **179**(6): p. 1895-902.

-
40. Bacher, M., et al. *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
 41. Bernhagen, J., et al., *MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia*. Nature, 1993. **365**(6448): p. 756-9.
 42. Shioji, K., et al. *Fc receptor-mediated inhibitory effect of immunoglobulin therapy on autoimmune giant cell myocarditis: concomitant suppression of the expression of dendritic cells*. Circ Res, 2001. **89**(6): p. 540-6.
 43. Matsui, Y., et al. *Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(2): p. 557-66.
 44. Bacher, M., et al., *Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia*. Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 235-46.
 45. Waeber, G., et al. *A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress*. Diabetes Metab Res Rev, 1999. **15**(1): p. 47-54.
 46. Nishibori, M., et al. *Presence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in ependyma, astrocytes and neurons in the bovine brain*. Neurosci Lett, 1996. **213**(3): p. 193-6.
 47. Lan, H.Y., et al. *The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1455-65.
 48. Boyce, N.W., et al. *Lymphokine (MIF) production by glomerular T-lymphocytes in experimental glomerulonephritis*. Kidney Int, 1986. **30**(5): p. 673-7.
 49. Yabunaka, N., et al. *Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2000. **23**(2): p. 256-8.
 50. Onodera, S., et al. *High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints*. Cytokine, 1999. **11**(2): p. 163-7.
 51. Denking, C.M., et al. *Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2004. **52**(6): p. 389-400.
 52. Pollak, N., et al. *Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6488-92.
 53. Calandra, T., et al. *Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11383-8.
 54. Bloom, B.R., et al. *Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity*. Science, 1966. **153**(731): p. 80-2.
 55. Ohkawara, T., et al. *Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(3): p. 412-21.
 56. Ohkawara, T., et al. *Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis*. Clin Exp Immunol, 2005. **140**(2): p. 241-8.
 57. de Jong, Y.P., et al. *Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1061-6.
 58. Ishiguro, Y., et al. *Macrophage migration inhibitory factor and activator protein-1 in ulcerative colitis*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1029**: p. 348-9.

-
59. Mizue, Y., et al. *Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(40): p. 14410-5.
 60. Weiser, W.Y. et al. *Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill Leishmania donovani*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 2006-11.
 61. Rosengren, E., et al. *The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction*. Mol Med, 1996. **2**(1): p. 143-9.
 62. Kleemann, R., et al. *Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase*. J Mol Biol, 1998. **280**(1): p. 85-102.
 63. Rosengren, E., et al. *The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase*. FEBS Lett, 1997. **417**(1): p. 85-8.
 64. Hermanowski-Vosatka, A., et al. *Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12841-9.
 65. Bucala, R. *MIF re-discovered: pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of cytokine production*. Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(1): p. 19-24.
 66. Nathan, C.F., et al. *Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes*. J Exp Med, 1971. **133**(6): p. 1356-76.
 67. Nathan, C.F., et al. *Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions*. J Exp Med, 1973. **137**(2): p. 275-90.
 68. Morand, E.F. *New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor*. Intern Med J, 2005. **35**(7): p. 419-26.
 69. Lubberts, E., et al. *The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(1): p. 29-37.
 70. Toh, M.L., et al. *Regulation of IL-1 and TNF Receptor Expression and Function by Endogenous Macrophage Migration Inhibitory Factor*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4818-25.
 71. Donn, R., et al. *Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(9): p. 2402-9.
 72. Leech, M., et al. *Regulation of macrophage migration inhibitory factor by endogenous glucocorticoids in rat adjuvant-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(4): p. 827-33.
 73. Santos, L., et al. *Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(2): p. 309-14.
 74. Leech, M., et al. *Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(5): p. 910-7.
 75. Onodera, S., et al. *Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 444-50.

-
76. Sampey, A.V., et al. *Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(6): p. 1273-80.
 77. Clancy, R.M., et al. *The role of nitric oxide in inflammation and immunity*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(7): p. 1141-51.
 78. Donnelly, S.C., et al. *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease*. *Mol Med Today*, 1997. **3**(11): p. 502-7.
 79. Calandra, T., et al. *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 791-800.
 80. van den Berg, W.B., *Animal models of arthritis: applicability*. *Oxford Textbook of Arthritis*, 1998: p. 559.
 81. Waeber, G., et al. *Transcriptional activation of the macrophage migration-inhibitory factor gene by the corticotropin-releasing factor is mediated by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element-binding protein CREB in pituitary cells*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(5): p. 698-705.
 82. Skapenko, A., et al. *The role of the T cell in autoimmune inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7 Suppl 2**: p. S4-14.
 83. Anderson, D.M., et al. *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. *Nature*, 1997. **390**(6656): p. 175-9.
 84. Maffia, P., et al. *Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(1): p. 151-6.
 85. Simpson, S.J., et al. *Expression of pro-inflammatory cytokines by TCR alpha beta+ and TCR gamma delta+ T cells in an experimental model of colitis*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(1): p. 17-25.
 86. Davis, L.S., et al. *Rheumatoid synovial CD4+ T cells exhibit a reduced capacity to differentiate into IL-4-producing T-helper-2 effector cells*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(1): p. 54-64.
 87. Ehinger, M., et al. *Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis*. *Immunology*, 2001. **103**(3): p. 291-300.
 88. Van Boxel, et al. *Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes*. *N Engl J Med*, 1975. **293**(11): p. 517-20.
 89. Berner, B., et al. *Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(5): p. 1128-35.
 90. Hanaoka, R., et al. *A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2003. **5**(2): p. R74-81.
 91. Christodoulou, C. et al. *Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Med*, 2006. **6**(1): p. 13-9.
 92. Pan, J.H., et al. *Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Circulation*, 2004. **109**(25): p. 3149-53.
 93. Kim, W., et al. *The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA)*. *Clin Exp Immunol*, 2000. **119**(1): p. 175-81.

-
-
94. Morita, Y., et al. *Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(2): p. 306-14.
 95. Leonard, J.P., K.E. Waldburger, and S.J. Goldman, *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12*. *J Exp Med*, 1995. **181**(1): p. 381-6.
 96. Gattorno, M., et al. *Serum interleukin 12 concentration in juvenile chronic arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 1998. **57**(7): p. 425-8.
 97. Sakkas, L.I., et al. *Interleukin-12 is expressed by infiltrating macrophages and synovial lining cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. *Cell Immunol*, 1998. **188**(2): p. 105-10.
 98. Fulton, S.A., et al. *Interleukin-12 production by human monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis: role of phagocytosis*. *Infect Immun*, 1996. **64**(7): p. 2523-31.
 99. Burrage, P.S., et al. *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 529-43.
 100. Dayer, J.M. *Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis?* *J Rheumatol Suppl*, 2002. **65**: p. 10-5.
 101. Schiff, M.H. *Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59 Suppl 1**: p. i103-8.
 102. Dinarello, C.A. *The IL-1 family and inflammatory diseases*. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. **20**(5 Suppl 27): p. S1-13.
 103. Seitz, M., et al. *Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes--regulation by IFN-gamma and IL-4*. *J Immunol*, 1994. **152**(4): p. 2060-5.
 104. Taylor, D.J. *Interleukin-4 (IL-4) induces down-modulation and shedding of the p55 tumour necrosis factor receptor and inhibits TNF alpha's effect on rheumatoid synovial fibroblasts*. *Rheumatol Int*, 1994. **14**(1): p. 21-5.
 105. Dechanet, J., et al. *IL-4 inhibits growth factor-stimulated rheumatoid synoviocyte proliferation by blocking the early phases of the cell cycle*. *J Immunol*, 1993. **151**(9): p. 4908-17.
 106. Postlethwaite, A.E., et al. *Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(4): p. 1479-85.
 107. Chenevier-Gobeaux, C., et al. *Effects of pro- and anti-inflammatory cytokines and nitric oxide donors on hyaluronic acid synthesis by synovial cells from patients with rheumatoid arthritis*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **107**(3): p. 291-6.
 108. Hilliquin, P., et al. *Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(8): p. 1512-7.
 109. Grabowski, P.S., H. Macpherson, and S.H. Ralston, *Nitric oxide production in cells derived from the human joint*. *Br J Rheumatol*, 1996. **35**(3): p. 207-12.
 110. Curran, S., et al. *Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis*. *J Pathol*, 1999. **189**(3): p. 300-8.
 111. Milner, J.M., et al. *Matrix metalloproteinase knockout studies and the potential use of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic diseases*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005. **4**(3): p. 363-75.

-
112. Yamada, H., et al. [*Mechanism of cartilage destruction in rheumatoid arthritis*]. Clin Calcium, 2003. **13**(6): p. 702-8.
 113. Sohen, S. [*Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis*]. Clin Calcium, 2003. **13**(2): p. 154-7.
 114. Sosa-Rivadeneira, M., et al. *Molecular modeling of salt (lithium chloride) effects on the enantioselectivity of diethylzinc addition to benzaldehyde in the presence of chiral beta-amino alcohols*. J Org Chem, 2003. **68**(6): p. 2369-75.

APENDICE 1

- Amortiguador de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10 Lts y pH 7.4

80 gr NaCl	(J.T. Baker)
11.6 gr Na ₂ HPO ₄	(J.T. Baker)
2 gr KH ₂ PO ₄	(J.T. Baker)
2 gr KCl	(ICN Biomedicals Inc.)

- Amortiguador de lisis

200 mM NaCl	(J.T. Baker)
5 mM de Ácido Etilenediaminatetraacético	(EDTA) (J.T. Baker)
0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS)	(J. T. Baker)
100 mM Tris HCl, pH 8.5	(ICN Biomedicals Inc.)

Se afora con agua destilada hasta 1Lt.

- Solución hemolizante

Tris base	0.17 M	(ICN Biomedicals Inc.)
NH ₄ Cl	0.16 M	(JT. Baker)

Se prepara para 300 ml.

- Amortiguador TBE 10x

Tris base	(890mM)	(Sigma Chemicals)
Ácido Bórico	(890mM)	(J.T. Baker)
40ml. De 0.5M	Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA)	

dísodico (J.T. Baker)

Esta mezcla se ajusta a pH 8 y se afora a 500 ml. con agua destilada

- Amortiguador de pegado (ELISA)
0.1 M de Na₂HPO₄ (J.T. Baker)
para 1 lt con agua destilada.
- Solución de lavado (ELISA)
1000 mL de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega co.)
- Solución de bloqueo (ELISA)
100 ml de PBS más 1% de Albumina serica bovina (ICN Biochemicals)

-
-
- Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biomedicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (Tecsiquim) en agua destilada y con NaOH llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

- Bromuro de Etidio

Stock 1000 X solución 0.5 mg/ml.

50 mg de Bromuro de etidio

100 ml de agua

Diluir 1:1000 para teñir geles y proteger de la luz.

- Medio de cultivo DMEM

Se adicionó 25 ml de Suero Fetal Bovino a una concentración de 5% y 5 ml de Antibiótico al 1%.

HISTOLOGIA

REACTIVOS

FIJADORES

- Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído (Sigma) 4 g

PBS o H₂O 80ml

Calentar a 60°C con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar unas gotas de NaOH al 1M acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehído y dejar enfriar. Ajustar el pH con HCL 1N o NaOH según sea el caso hasta ajustar a pH 7.4 y aforar a 100 ml. Guardar a 4°C no usar hasta después de 15 días elaborado.

SOLUCIÓN DESCALSIFICANTE

- EDTA al 7%

EDTA sódico 7g

Agua destilada 80 ml

Mezclar y poner en agitación, adicionar NaOH 1N hasta que se disuelva el EDTA posteriormente ajustar el pH con HCL 1N a 7.4 a 100ml.

SOLUCIONES PARA PEGAR LAS MUESTRAS

SINALIZAR

Dimetildiclorosilano (Sigma No. 33009) 3 ml

Acetona 97ml

Guardar en un frasco ámbar y a 4°C, lavar las laminillas en alcohol absoluto. Se deja secar al aire libre. Posteriormente se bañan las laminillas en Silano 5', escurrir e incubar a 60°C por 24 hrs.

LISINAR

Poli-lysina (Sigma P8960) 10ml

Agua Mq 90ml

Guardar en refrigeración no más de 15 días ya preparada.

Dejar las laminillas 10' escurrir e incubar a 60°C por 24 hrs.

RUYTER (Después del corte)

Solución A

Agua destilada 80 ml

Albúmina glicerinada 20 gotas

Adicionar la albúmina al agua destilada

Solución B

Acetona 20 ml

Benzoato de metilo 20 gotas

Disolver el benzoato en la acetona

Mezclar ambas soluciones gota a gota (muy lentamente, pues se forma precipitado de no hacerlo) y después filtrar.

Albúmina glicerinada

Albúmina glicerinada 1:1

Clara de huevo de gallina vaciar a una probeta y agregar mismo volumen de glicerina posteriormente se guarda a 4°C. Este reactivo puede durar varios meses después de su preparación.