



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación del efecto antiinflamatorio de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina en un modelo murino de artritis reumatoide inducida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Iván Sebastian Romero Altamirano

Directora de Tesis: Dra. María Teresa Corona Ortega



Tlaxcala, México, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento del proyecto DGAPA-PAPIIT IN216521, en el Laboratorio de Oncología Celular (LOCE) ubicado en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) y en el Laboratorio de Biología Experimental de Campus III de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FESZ). Dirigido por la Dra. María Teresa Corona Ortega, asesorado por el Dr. Benny Weiss Steider y la M. en C. Rosalva Rangel Corona.

Agradecimientos

Este trabajo va dedicado para todas las personas que lo hicieron posible. A mi padre, que me apoyó incondicionalmente, al mismo tiempo que me guió con cariño y paciencia; a mi madre, que me forjó con voluntad y carácter; a Itzel Hernández mi compañera en esta travesía que me sostuvo la mano en cada momento; a mis amigos que, a pesar de la distancia o el tiempo, siempre me esperaron con un abrazo como si solo hubiera pasado un segundo; a toda mi familia que me brindó sus consejos para mantener la mente fría y el corazón cálido.

Este logro no es mío, si no de la gente que me dio lo necesario para llegar aquí... mis maestros. Cada uno de los que me dieron una parte de sí mismos para formarme como un mosaico de valores y conocimientos, a cambio solo me pidieron una sola cosa: ser un buen ser humano. Entre todos hay algunos que me brindaron algunas de las lecciones más importantes de mi vida, que ahora son los pilares de mi identidad. Dra. Teresa Corona, mi mentora y mi más grande figura científica, me enseñó a aprender de mis errores, que la verdad y la ciencia son sinónimos, que el éxito se construye con derrotas admitidas y no con victorias falsas, sobre todo me enseñó... que el conocimiento no sirve si no sirve al bien común. Mtro. Gilberto Ciriaco, que me enseñó el valor de la honestidad, que somos nuestros ideales y debemos ser fieles a ellos para poder reconocernos. Mtro. Jorge Velázquez, me enseñó que un buen consejo puede mejorar más vidas que cualquier medicina, que una oportunidad puede cambiar el rumbo de una vida y me dio una de las mejores herramientas para hacerle frente al mundo... la perseverancia.

También quiero agradecerles a todos los que trabajaron en este proyecto. A mis compañeros Hans Mendoza, Yetzari Becerra y Antonio Rodríguez que realizaron aquí su servicio social, a mis asesores en el ámbito práctico el Dr. Adrián Vargas y la Mtra. Araceli Bautista, a la Dra. Guadalupe Gómez que brindó el apoyo técnico en el uso del citómetro, a la Dra. Adriana Altamirano responsable del bioterio que crío a los animales que se usaron en este estudio y a los técnicos laboratoristas de Campus 3 Juan Carlos Guerrero y David Sabedra.

Per aspera ad astra

ÍNDICE

Abreviaturas	
Resumen	
Introducción	1
Marco teórico.....	2
Artritis reumatoide	2
El proceso inflamatorio	4
Citocinas en la artritis reumatoide.....	4
TNF- α	6
MCP-1	6
IFN- γ	6
IL-10	7
IL-6	7
IL-12	7
D-penicilamina.....	8
Liposomas	9
Clasificación de liposomas	9
Aplicación de los liposomas	10
Formulaciones en gel	10
Modelos experimentales para artritis reumatoide	11
Modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno (CIA).	12
Planteamiento del problema	13
Hipótesis.....	13
Objetivo	14
Objetivos particulares	14
Método	14

Diseño de estudio.....	14
Muestra	15
VARIABLES	15
Técnicas.....	15
Técnica de inducción de AR por colágeno	15
Técnica de análisis de citocinas inflamatorias por matriz de perlas	16
PROCEDIMIENTO	16
Fabricación de la formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina	16
Preparación de gel mucoadhesivo	16
Preparación de solución de D-penicilamina	16
Preparación de gel con hidrocortisona	17
Preparación de liposomas	17
Implementación del modelo de artritis reumatoide en ratones DBA 1	17
Preparación de solución de colágeno	17
Preparación de emulsiones inmunizadoras con Adyuvante Completo de Freund (CFA) y con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA).....	17
Inoculación de emulsiones inmunizadoras	17
Determinación de citocinas inflamatorias	18
Evaluación del tamaño de bazos	19
Análisis estadísticos	19
Resultados	19
Citocinas inflamatorias en plasma sanguíneo.....	19
Inflamación articular	23
Evaluación del tamaño de bazos	25
Discusión.....	26
Conclusiones.....	29
Perspectivas.....	29
Anexos	30
.....	35
Referencias	37

Abreviaturas

Abreviatura:

GSLP: Formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina

(GT): Grupo testigo

(GC+): Grupo control positivo

(GC-): Grupo control negativo

(GE+): Grupo experimental AR+

AR: Artritis reumatoide

Th0: Células T vírgenes

Th1: Células T colaboradoras CD4 tipo 1

Th2: Células T colaboradoras CD4 tipo 2

Tc: Células T citotóxicas CD8

NKT: Células T asesinas naturales

APC: Células presentadoras de antígeno profesionales

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

IL-: Interleucina

MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos

CCL2: Ligando de quimiocina 2

IFN- γ : Interferón gamma

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es un padecimiento que tiene una prevalencia en un rango que va del 0.5 al 1.5 por cada 100 000 habitantes, con una comorbilidad que va en aumento a partir de los 65 años (Barile *et al.*, 2016). Existen en la actualidad medicamentos biológicos que controlan adecuadamente la enfermedad; sin embargo, son muy costosos y suelen causar intolerancia por parte del paciente. El efecto antiinflamatorio de la D-penicilamina en el tratamiento de la AR se ha demostrado ampliamente; no obstante, por sus efectos secundarios, su empleo ha sido restringido a casos extremos de la enfermedad. Aunado a lo anterior, se sabe que la implementación de sistemas liposomales ha demostrado bajar la toxicidad de los fármacos encapsulados y mejorar su direccionamiento sitio-específico. Nuestro grupo de trabajo estableció un modelo de inflamación inducida mediante el implante de pellets y probó el efecto antiinflamatorio de la D-penicilamina con el uso de 3.2 mg/kg de peso y describiendo que una cantidad mayor provoca un decremento de su actividad (Campos, 2019). En el presente trabajo implementamos un modelo de AR inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA para probar el efecto de una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina (GSLP) durante el proceso de inflamación. La evaluación del efecto se realizó a partir de detección de citocinas inflamatorias por citometría de flujo, medición del área del bazo y seguimiento fotográfico en articulaciones diartrodiales. El modelo CIA permitió una mejor evaluación de los efectos antiinflamatorios de GSLP sobre la inflamación presentada en la AR, mostrando un incremento en la mayoría de las citocinas inflamatorias, un incremento del área del bazo y una inflamación de las articulaciones diartrodiales. Los resultados obtenidos nos mostraron un claro efecto antiinflamatorio de GSLP al mostrar una disminución de los valores inflamatorios en comparación con el grupo control con AR inducida; sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si su efecto se realiza de forma local o sistémica.

Introducción

En México se ha detectado una prevalencia de artritis reumatoide (AR) de un 1.6 %, con una comorbilidad que va en aumento a partir de los 65 años, teniendo un gran costo económico para las instituciones de salud del estado, sumado a un costo significativo para el paciente y su familia, generando como resultado un enorme golpe económico para la sociedad (Barile *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2015). Además, el dolor implicado en el desarrollo de la enfermedad puede conllevar a la discapacidad debido a la disminución de la movilidad y a la dificultad para llevar actividades diarias (Pérez *et al.*, 2022).

La AR es una enfermedad inflamatoria autoinmune caracterizada por afectar a las articulaciones diartrodiales, generando la hipertrofia de la membrana sinovial y la destrucción de cartílago y hueso. La etiología de la enfermedad es aún desconocida, aunque si se han encontrado factores de riesgo como el sexo femenino, el tabaquismo o el sobrepeso (Martínez *et al.*, 2021). Existen diversos medicamentos para su tratamiento, el más usado en la actualidad es el metotrexato; sin embargo, presenta una alta hepatotoxicidad (Igalada *et al.*, 2016).

La D-penicilamina es la forma dextro de un compuesto resultante de la hidrólisis de la penicilina. Su fórmula difiere del aminoácido cisteína por la presencia de 2 grupos CH₃ en el carbono β (β, β-dimetilcisteína) (Gómez & Solís, 2007). El empleo de la D-penicilamina en el tratamiento de la AR se ha llevado a cabo desde hace más de 50 años (Jaffe, 1963); no obstante, debido a problemas con su toxicidad y baja disponibilidad, su uso se ha limitado a casos críticos, ya que se su administración se ha correlacionado con anemia hipoplásica, bronquiolitis obliterante y afectación glomerular (Nieves *et al.*, 2017).

Los liposomas son estructuras compuestas por bicapas lipídicas que pueden ser uni o multilaminares, pequeñas o grandes. Pueden ser diseñados con las características deseadas, como el tipo de carga, tamaño, estructura o adicionarle anticuerpos específicos; lo que modifica la farmacocinética de las moléculas acarreadas en su interior, permitiendo la liberación sitio-específica de compuestos terapéuticos, mejorando su seguridad y eficacia (Andrews *et al.*, 2017).

Por lo anterior, creemos que al encapsular la D-penicilamina en un sistema liposomal puede reducirse su toxicidad y al formularlo en gel mejorar y modular su liberación sitio-específica. Nuestro grupo de trabajo previamente estableció un modelo de inflamación inducida mediante el implante de pellets y probó el efecto antiinflamatorio de una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina (GSLP) con el uso de 3.2 mg/kg de peso, describiendo que una cantidad mayor provoca un decremento de su actividad (Campos, 2019). En este trabajo se evaluó el efecto antiinflamatorio de GSLP a partir de un modelo con más similitud a la AR y con un mayor número de parámetros para determinar su efecto de forma específica en la inflamación articular.

Marco teórico

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica, se caracteriza por una inflamación crónica de la membrana sinovial y la infiltración de células del sistema inmune en ella, como lo son linfocitos T y B, células dendríticas y mastocitos, en conjunto con una neovascularización y la activación del endotelio (Aletaha & Smolen, 2018; Martínez *et al.*,2018). La membrana sinovial (Fig.1) es una estructura que tapiza la cavidad sinovial de las articulaciones diartrodiales y es la encargada de la producción del líquido sinovial que lubrica y nutre el cartílago; constituida por 2 capas: a) la capa íntima (lining), que limita con el espacio articular y varía en estructura, teniendo de una a cuatro capas de células entremezcladas en una matriz intercelular amorfa, libre de fibras; conformada por dos tipos celulares denominados sinoviocitos de tipo A o macrófagos sinoviales y de tipo B o fibroblastos sinoviales; y b) una capa más profunda llamada subíntima (sublining) que está unida al tejido conectivo fibroso, está vascularizada y presenta tejido conectivo con algunas células adiposas (Iturriaga *et al.*,2018; Izquierdo & Pablos, 2013; Edwards,2000).

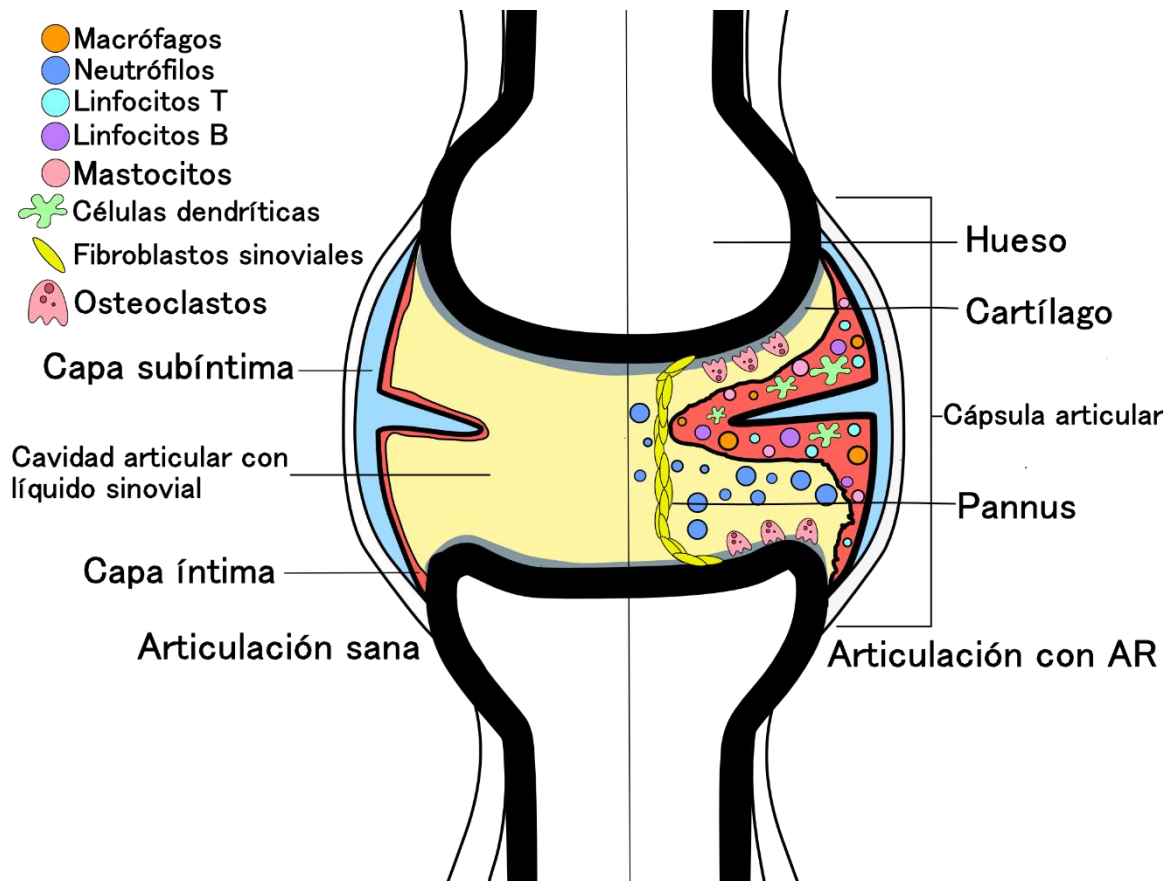


Fig.1. Esquema del proceso de patogénesis en las articulaciones con artritis reumatoide.

En una articulación sana los sinoviocitos se encargan de producir líquido sinovial, pero en la AR, debido a modificaciones epigenéticas, la membrana sinovial comienza a pasar por un proceso inflamatorio generado a través de la producción de mediadores solubles como citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas (Fig.1). Lo anterior provoca la activación del sistema inmune (innato y adaptativo), generando el reclutamiento en la membrana sinovial de células dendríticas, macrófagos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B que promueven y mantienen la inflamación, la proliferación de sinoviocitos fibroblásticos forma un frente invasivo, con la proteína de cohesión celular cadherina-11, llamado pannus que invade el cartílago articular y el hueso subcondral (Kolios *et al.*,2021; Martínez *et al.*, 2021), la pérdida de masa ósea es producto de la inducción de osteoclastos (células encargadas de la resorción ósea) y la supresión de los osteoblastos (células que sintetizan tejido óseo) (Pino *et al.*,2021; Florencio *et al.*,2015). La etiología de la AR es aún desconocida, se sabe que en el desarrollo de la enfermedad intervienen múltiples factores de riesgo que pueden ser genéticos o ambientales, entre los que se encuentra la portación de los subtipos HLA-DR1 y DR4 del gen *HLA DRB1*, el sexo femenino, el tabaquismo y la obesidad (Martínez *et al.*, 2021). Clínicamente la AR se presenta de forma muy heterogénea y cuenta con diversos mecanismos patogénicos, que inclusive pueden variar entre pacientes con un mismo diagnóstico (Smolen *et al.*, 2018). La determinación del factor reumatoide (FR) en suero humano ha sido el serológico más empleado para diagnosticar AR; sin embargo, aunque los individuos seropositivos tienden a tener un curso más severo de la enfermedad, algunos individuos resultan negativos para estos anticuerpos, (Casanova, 2020; López *et al.*, 2002; Mendoza & Alonso, 2015).

Como ya se mencionó, en el desarrollo de la AR participan diversas moléculas, entre las que se encuentran las citocinas que son proteínas de bajo peso molecular y con vida media corta que tienen como función ser mediadores entre las señales intercelulares. Las principales citocinas que se relacionan con la AR son TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 e IL-23 que promueven la inflamación en el tejido de la membrana sinovial; además, la IL-17 también estimula la diferenciación de osteoclastos provocando la degradación de los proteoglucanos del cartílago (Martínez *et al.*,2018).

En la actualidad se emplean diversos fármacos para el tratamiento de la AR, por un lado, los Fármacos Modificadores de los Síntomas (FAMS) que pueden ser analgésicos o antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y por el otro, Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad (FAME) que son medicamentos que van más allá de los síntomas de la enfermedad al ejercer una acción para evitar la progresión y el daño estructural, promoviendo la remisión de la enfermedad (Morán *et al.*,2021). Entre los FAME se encuentra el metotrexato, leflunomida (LFN), sulfasalazina (SSZ) e hidroxicloroquina que pertenecen al grupo de los FAMES (sintéticos o no biológicos), y los FAMEb (biológicos) como el infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab o Abatacept. Algunos FAMEs como sales de oro,

azatioprina, D-penicilamina y ciclosporina se han dejado de utilizar debido a su menor eficacia o a sus efectos adversos (Morán *et al.*,2021; García & Prada, 2009).

El proceso inflamatorio

La inflamación es un mecanismo defensivo que en condiciones normales se activa en respuesta a la detección de señales de daño tisular, estrés celular o infección; tiene como objetivo promover la reparación de tejidos y establecer memoria inmunológica en el caso de una infección (Martín *et al.*,2021; Fullerton & Gilroy, 2016). La respuesta inflamatoria puede ser aguda o crónica; en la respuesta aguda el proceso inflamatorio se activa cuando las células residentes en los tejidos detectan señales de daño o infección, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que pueden ser patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados al daño (DAMP), posteriormente estas células secretan factores inflamatorios como mediadores lipídicos, quimiocina y citocinas. Lo anterior provoca que se lleve a cabo la activación del endotelio, promoviendo la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión, permitiendo así la migración transendotelial de leucocitos, este proceso es el responsable de los síntomas comunes de la inflamación (enrojecimiento, calor y tumefacción) (Jarlborg & Gabay, 2022). En el caso de la inflamación crónica, se puede presentar ya sea por un estímulo antigénico persistente, como en la AR, o por un estado patológico sin infección, como en la obesidad. Cabe destacar que tanto el sistema inmune innato como el adaptativo pueden estar involucrados en la respuesta inflamatoria (Martín *et al.*,2021). Cuando se elimina el agente que indujo la inflamación, sin importar si fue impulsada por el sistema innato o adaptativo, se comienza una fase de resolución, en donde la síntesis de mediadores proinflamatorios y la formación del edema se detiene, en conjunto con la retirada de las células inmunes del tejido, generando un proceso de desinflamación. En la actualidad se plantea que las enfermedades inflamatorias crónicas están relacionadas con una desregulación de la fase de resolución y una respuesta inmune adaptativa inadecuada (Fullerton & Gilroy, 2016).

Citocinas en la artritis reumatoide

Las citocinas son proteínas con un bajo peso molecular (80kDa), tienen como función servir como mensajeros para regular múltiples procesos en el cuerpo, pero principalmente están involucradas en mediar las respuestas inflamatorias e inmunológicas (Jarlborg & Gabay, 2022; De la Cruz Conde, 2014). Las citocinas se pueden clasificar de acuerdo con su función en el proceso inflamatorio, ya sea en citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias (Cuadro 1).

Dentro de las principales citocinas proinflamatorias se encuentran: Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interferón gamma (IFN- γ), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-32, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , factor estimulante de las colonias de neutrófilos (FECN), factor activador plaquetario (PAF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y la proteína-2 inflamatoria de macrófagos (MIP-2) (Singh *et al.*,2021; Chen *et al.*, 2021; Waldmann *et al.*, 2020; Kandikattu *et al.*,2019; González & González, 2019; Dinarello, 2019; Paunović *et al.*, 2008). Mientras que en las citocinas antiinflamatorias están: Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), IL-4, IL-10, IL-13, IL-35, IL-37, IL-38, IL-1Ra e IL-36Ra (Su *et al.*,2022; Iwaszko *et al.*,2021; Martínez *et al.*, 2021; Dinarello, 2019; Priyadharshini *et al.*, 2018; Garbers *et al.*,2018). Algunas citocinas también tienen propiedades duales dependiendo de su concentración, un ejemplo es la IL-6 que es una citocina proinflamatoria, en donde si existe una deficiencia puede producir una infiltración prolongada de neutrófilos en los sitios de infección (Jones & Jenkins, 2018); además, hay citocinas como IL-27 que aún no se conocen sus funciones completamente en el proceso inflamatorio y no se pueden catalogar con certeza en una u otra categoría (Han *et al.*,2021).

Cuadro 1. Principales citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias

Citocinas Proinflamatorias	Citocinas Antiinflamatorias
<ul style="list-style-type: none"> • TNF-α • IFN-γ • IL-1α • IL-1β • IL-6 • IL-8 • IL-12 • IL-17 • IL-18 • IL-21 • IL-23 • IL-32 • IL-33 • IL-36α • IL-36β • IL-36 • MCP-1 • FECN • PAF • GM-CSF • MIP-2 	<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β • IL-4 • IL-10 • IL-37 • IL-38 • IL-1Ra • IL-36Ra

Las citocinas tienen un papel crucial en la AR al ser mediadores para el reclutamiento, diferenciación y proliferación de diversos tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio, esto las vuelve esenciales para entender el origen y

desarrollo de la enfermedad (Kondo *et al.*,2021; Feria *et al.*,2020). Además, debido a que múltiples citocinas están relacionadas con la AR las convierte en marcadores para su diagnóstico (Zhao *et al.*,2021). Las principales citocinas relacionadas con la AR han sido TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, IL-32, IL-33, IL-35 y GM-CSF (Virtanen *et al.*, 2019). Debido a las características de la técnica de análisis de citocinas empleada en este estudio abordaremos de forma específica las citocinas TNF- α , MCP-1, IFN- γ , IL-10, IL-6 e IL-12.

TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una proteína homotrímica formada por 157 aminoácidos, la cual puede presentarse en forma transmembranal o soluble, generada principalmente por macrófagos activados, linfocitos T y células asesinas naturales, (Jang *et al.*,2021). El TNF tiene la capacidad de unirse a dos receptores diferentes, TNFR1 y TNFR2. La unión a cada receptor pone en marcha diferentes cascadas de señalización que pueden conducir a la apoptosis, diferenciación, proliferación y migración de células que provocan una reacción inflamatoria, clasificándola como una citocina proinflamatoria. Cabe destacar que igualmente tiene un papel inductor en la resorción ósea al atribuirse a la vía de señalización del receptor activador del ligando Nf-kB (RANKL), mediante la activación directa de las células precursoras de osteoclastos (Zamri & De Vries,2020).

MCP-1

La proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), también conocida como ligando de quimiocina 2 (CCL2), es una proteína monomérica formada por 76 aminoácidos. A diferencia de otras quimiocinas que desencadenan el fenotipo Th1, la MCP-1 actúa como regulador en la polarización de las células Th0 hacia un fenotipo Th2 (Singh *et al.*,2021). Es producida por diferentes tipos de células, incluidos monocitos, macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, células epiteliales, células mesangiales, células astrocíticas y células microgliales. MCP-1 regula el reclutamiento de monocitos y la activación de subpoblaciones de linfocitos T en enfermedades inflamatorias. Además, aumenta las propiedades de destrucción de monocitos y macrófagos, y mejora la supervivencia de macrófagos y neutrófilos, definiéndose como una citocina proinflamatoria (Gschwandtner *et al.*,2021; Bianconi *et al.*,2018).

IFN- γ

El interferón gamma (IFN- γ) es una proteína con una estructura de homodímero formada por la asociación no covalente de dos subunidades polipeptídicas que constituyen una molécula de 50 kDa. El interferón-gamma es secretado predominantemente por linfocitos activados como las células T colaboradoras CD4 tipo 1 (Th1) y las células T citotóxicas CD8 (Tc), las células T $\gamma\delta$ y las células asesinas naturales (NK) y, en menor medida, por las células T asesinas naturales (NKT), las células B y las células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Su expresión es inducida por mitógenos y citocinas, como IL-12, IL-15, IL-18 e IFN

tipo I (Castro *et al.*,2018). Las citocinas proinflamatorias, que incluyen TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-17A, inducen la producción de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) como MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13, fosfolipasa A2, y ciclooxigenasa-2, que inducen a fibroblastos sinoviales a producir VEGF, IL-8 y RANKL, y promueven la diferenciación de monocitos en osteoclastos, los cuales median la destrucción ósea en la AR (Zhao *et al.*,2021). También hay que mencionar que, aunque el IFN- γ generalmente se considera una citocina patógena en la autoinmunidad, múltiples modelos de autoinmunidad se ven exacerbados por su deficiencia (Jacobelli *et al.*,2022).

IL-10

La interleucina 10 (IL-10) humana es una proteína constituida por una cadena de 160 aminoácidos, con un peso molecular de 18.5 kD (Molina, 2000). Las células que la secretan son macrófagos, monocitos, CD, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y células asesinas naturales, además de linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y células B (Saraiva *et al.*,2020). La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que atenúa la liberación de citocinas proinflamatorias, particularmente IFN- γ , IL-2 y TNF- α (Putra *et al.*, 2018). Las concentraciones de esta citocina aumentan en el suero y en el líquido sinovial de pacientes con AR (Segura *et al.*, 2021).

IL-6

La interleucina 6 (IL-6) es una proteína con una estructura formada por 184 aminoácidos. (Španko *et al.*,2021). Es producida principalmente por monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, linfocitos T y B, células mesangiales y algunas células tumorales. En la AR, los fibroblastos que se encuentran en la membrana sinovial son la principal fuente de IL-6 (Contreras *et al.*, 2015). Esta citocina es crucial para la regulación de la respuesta inmune debido a que es esencial en el proceso de diferenciación de linfocitos T naive hacia linfocitos proinflamatorios Th17 o hacia linfocitos T regulador (Treg). Se han observado valores elevados de IL-6 en una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluida la AR (Hernández & Valor, 2018). Desde el inicio del proceso de la AR, la IL-6 se une a varios tipos de células y provoca la migración de neutrófilos hacia las articulaciones, lo que contribuye a la transición posterior de inflamación aguda a crónica, alteraciones en la diferenciación de células B, diferenciación de células T y angiogénesis (Favalli, 2020).

IL-12

La interleucina 12 (IL-12) es una proteína heterodimérica que está formada por 2 subunidades (p35 y p40), unidas por enlaces disulfuro. La coexpresión de estas dos subunidades da como resultado la formación de un heterodímero (p70) biológicamente activo (Ullrich *et al.*,2020). La IL-12 es producida por células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos, y es crucial para el reclutamiento y las funciones efectoras de las células T CD8 + y NK (Mirlekar & Pylayeva, 2021). La manifestación de la AR está influenciada por las células Th1 y Th17, asociadas con IL-12 e IL-23 (Ullrich *et al.*,2020).

D-penicilamina

La penicilamina es un producto de la degradación de la penicilina que puede presentarse en dos formas enantioméricas, los isómeros D-penicilamina y L-penicilamina. El isómero más utilizado en el ámbito médico es la D- penicilamina (Fig.2), esto debido a que la L- penicilamina presenta una alta toxicidad (Ishak & Abbas, 2013). La penicilamina tiene una estructura análoga a la cisteína; sin embargo; a diferencia de ésta la penicilamina posee dos grupos metilo en lugar de dos grupos hidroxilo en el C2 (Ruiz, 2013).

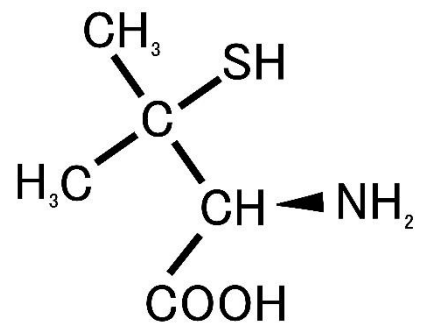


Fig.2 Estructura química de la D-penicilamina

Desde 1964 se ha empleado la D-penicilamina para el tratamiento de la AR, su efecto terapéutico se debe posiblemente a que conduce una disociación de los complejos inmunes y a la supresión de células T (Zampeli *et al.*,2015). También se ha utilizado en el tratamiento de cistinuria (Monzón *et al.*,2021; Badilla & Herrera, 2019), enfermedad de Wilson (Herrera *et al.*,2021), intoxicación por mercurio y plomo (Sanz & Martínez, 2019 ; Nogué & Corominas, 2018), miopatías inflamatorias idiopáticas (Hajkhan *et al.*, 2021), esclerodermia, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hepatitis crónica, queloides, queratosis folicular, amiloidosis, neuropatía periférica, sinovitis hemofílica, retinopatía del prematuro, proteinosis lipoide y para la desintoxicación de alcohol (Bialy & Brenner, 1996; Ishak & Abbas, 2013).

El uso de la D-penicilamina en la actualidad se ha limitado debido a sus efectos secundarios como rash morbiliforme, pénfigo, mucositis, síntomas gastrointestinales, nefrotoxicidad, aplasia medular, lupus inducido por fármacos y síndrome de Goodpasture (hemorragia pulmonar y glomerulonefritis progresiva) (Medina *et al.*, 2021; Viñas & Bruscas, 2021). El implemento de la D-penicilamina en el tratamiento de la AR ha sido sustituido por otros fármacos con mayor eficacia y menor número de efectos secundarios, conocidos como FAMES convencionales (FAMEsc), donde actualmente se incluyen Metrotexato, Leflunomida, Sulfasalazina e Hidroxicloroquina, además se ha optado por el empleo de FAMEb como Infliximab, Etanercept y Adalimumab, en monoterapia o en combinación con FAMEsc (Morán *et al.*,2021: Vicens, 2017).

Los mecanismos de acción de la D-penicilamina aún no están claros; sin embargo, se ha postulado que su grupo tiol podría alterar los receptores de la superficie celular mediante la reducción de enlaces disulfuro a partir de un intercambio tiol-sulfuro (Choy & Panayi, 1999).

Liposomas

Los liposomas son estructuras vesiculares constituidas por una o varias bicapas concéntricas (lamelas) de lípidos anfipáticos, en su mayoría fosfolípidos, que forman compartimientos en su interior (Gavira, 2020) y fueron descubiertos en 1961 por Bangham (Bangham, 1961). El principio para la formación de liposomas se basa en las características de los lípidos anfipáticos que tienen una estructura básica conformada por una parte hidrófoba y una hidrofílica, lo que les permite formar estructuras dinámicas ordenadas cuando entran en contacto con un medio acuoso. En el caso de los fosfolípidos la parte hidrófoba está constituida por dos cadenas de ácidos grasos y una parte hidrofílica formada por un grupo fosfato, que a su vez están usualmente unidos por una molécula de glicerol por enlaces tipo éster (Llopis & Díez, 2019); lo que les confiere propiedades anfipáticas, debido a la preferencia que tienen las cabezas de fosfoglicéridos a interactuar entre sí y con el medio acuoso a través de puentes de hidrógeno y a que las cadenas de ácidos grasos son repelidas por el medio acuoso e interaccionan entre sí por medio de fuerzas de Van der Waals (Villanueva, 2019). Los liposomas entonces tienen una estructura de bicapa lipídica con una región lipófila que se orienta al interior formada por los ácidos grasos y una región hidrofílica al exterior compuesta por las cabezas de fosfoglicéridos.

Clasificación de liposomas

Tamaño y número de lamelas:

Los liposomas se pueden clasificar en función de las estructuras que forman y su tamaño, cuando están conformados por dos o más lamelas de forma concéntrica separadas por una fase acuosa, se les conoce como vesículas multilaminares (Multilamellar Vesicles, MLV), mientras que las vesículas multivesiculares (Multivesicular Vesicle, MVV) contienen múltiples vesículas no concéntricas en su interior; se les denomina vesículas unilaminares pequeñas (Small Unilamellar Vesicles, SUV) cuando están constituidos por una sola bicapa lipídica y tienen un tamaño entre 20 y 80nm, vesículas unilaminares grandes (Large Unilamellar Vesicles, LUV) cuando son unilaminares pero de mayor tamaño que va desde los 80nm a 1µm y vesículas unilaminares gigantes (Giant Unilamellar Vesicle, GUV) cuando son de tamaño superior a 1µm (Núñez, 2021; Mateos, 2020).

Carga superficial:

La carga superficial de los liposomas está determinada por las cabezas polares de los lípidos anfipáticos que los componen, existen tres tipos de liposomas según su carga: catiónicos, neutros y aniónicos. Los liposomas catiónicos son aquellos que tienen una carga positiva en su superficie como el 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano catiónico (DOTAP); se han fabricado para la encapsulación de material genético debido a su capacidad para neutralizar su carga negativa, formando

complejos entre los lípidos catiónicos y el ADN, dotando de protección al material genético (Ruano, 2013). Los liposomas neutros tienen una carga neutra dada por lípidos zwitteriónicos como la fosfatidilcolina o el colesterol, se emplean en la administración de fármacos contra el cáncer como doxorubicina y paclitaxel. Los liposomas aniónicos están constituidos por lípidos anfipáticos como el dioleilfosfatidilglicerol o la fosfatidilserina con una carga negativa extra en sus grupos de cabeza; generalmente se usan para la administración de fármacos en combinación con cationes, pero también se han implementado para la administración de genes (Giulimondi *et al.*, 2019).

Aplicación de los liposomas

Los liposomas tienen una serie de ventajas en su empleo como vehículos en la administración de fármacos, entre éstas se encuentran que modifican la farmacocinética, no son tóxicos, son flexibles, biocompatibles, completamente degradables, no son inmunogénicos, reducen la toxicidad de los agentes encapsulados, aumentan la biodisponibilidad del fármaco y pueden transportar componentes tanto hidrófobos como hidrófilos (Núñez, 2021; Llopis & Díez, 2019; Iturbe, 2018). Se han empleado en la administración de diversos fármacos, algunos ejemplos son Doxiciclina, Doxil y Ambisome (Abascal, 2020; Gallego, 2017).

Una de las limitantes en su implementación es que los lípidos de los cuales se conforman pueden tener procesos de oxidación y degradación, reduciendo su estabilidad, por lo que deben de ser sometidos a modificaciones adicionales (Mateos, 2020).

Formulaciones en gel

Los geles son formas farmacéuticas con una consistencia semisólida, las cuales están compuestas por un disolvente y un coloide. La gelificación se lleva a cabo mediante la adición de un coloide polimérico a una fase líquida (solvente), el cual constituirá la fase dispersa y formará una red tridimensional, aumentando su viscosidad (de Diego & del Arco, 2016; Reyes-Arellano, A. 2008). Los geles se pueden clasificar de muchas formas, ya sea por el tipo de solvente, su origen (natural o artificial) o su composición (molecular o supramolecular). La más empleada es la clasificación por solventes, si el medio usado es de naturaleza orgánica se denomina organogel, si es agua se le llama hidrogel y aerogel en el caso de que el medio sea un gas (Oteo, 2013). En este estudio resultan de particular importancia los hidrogeles, los cuales han despertado gran interés científico en aplicaciones biomédicas debido a que presentan características ideales para utilizarlos como vehículos para la liberación controlada y selectiva de fármacos en el organismo; poseen una estructura tridimensional que permite almacenar moléculas pequeñas, pueden ser biocompatibles debido al gran contenido de agua que poseen en su estructura, reduciendo de esta forma la irritación producida por

fricción y también disminuyendo la desnaturalización de proteínas (Ramirez *et al.*,2016). En la actualidad el más estudiado de los poliacrilatos es el policarbofilo Noveon®, debido a sus características de mucoadhesión resultantes de la alta formación de entrelazamiento y las excelentes fuerzas de atracción entre sus grupos carboxilos y las mucinas presentes en la superficie de la mucosa (Perez, 2019). Noveon® es un un polímero de ácido acrílico de alto peso molecular reticulado químicamente con divinilglicol, empleado para la preparación de hidrogeles (Gainza *et al.*, 2015), en nuestro proyecto fue el utilizado para la preparación de GSLP (formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina) debido a su capacidad para adherirse a las superficies biológicas a pesar de la presencia de humedad permitiendo una mejor aplicación en zonas expuestas a la intemperie, como en el caso de las manos y pies.

Modelos experimentales para artritis reumatoide

Se han implementado diversos modelos animales para el estudio de la AR, su patogénesis y desarrollo. Debido a la heterogeneidad de la AR se han desarrollado modelos que permiten observar características específicas de la enfermedad, de tal modo que se puedan evaluar aspectos propios de una población en particular (Khorramizadeh & Saadat, 2020). Entre los organismos más comúnmente utilizados en los modelos experimentales para AR podemos encontrar a las ratas, los ratones y los monos Rhesus (Choudhary *et al.*,2018).

En la actualidad existen un gran número de modelos experimentales para AR, estos modelos permiten la evaluación de los efectos de moléculas de interés farmacológico cuando aún no se conocen los mecanismos exactos de su efecto o se requiere determinar su efecto global; por lo anterior, es de suma importancia establecer de forma correcta los modelos experimentales llevados a cabo para reducir al máximo el sufrimiento animal (Bessis *et al.*,2017). Podemos clasificar estos modelos en dos tipos: los modelos inducidos, que tienen como objetivo estimular la aparición y el desarrollo de AR o sus síntomas en el animal, a partir de la administración de un antígeno que al ser reconocido por el organismo genere una respuesta autoinmune similar a la AR, y los modelos genéticos que están diseñados para provocar una aparición espontánea de una respuesta inmune similar a la AR a partir de la modificación genética (Choudhary *et al.*,2018) (Cuadro 2). Cada tipo de modelo tiene sus particularidades, los modelos inducidos tienen las ventajas de tener un bajo costo, requerir un número reducido de individuos y la reproducibilidad de los protocolos; aunque, a diferencia de los modelos genéticos en estos la enfermedad se desarrolla con rapidez limitando así el estudio del inicio y la progresión de las etapas de la enfermedad (Fischer *et al.*,2017).

Cuadro 2. Modelos experimentales animales para AR. Modelos experimentales genéticos y de inducción para AR más empleados. Modificada de Choudhary *et al.*,2018.

Modelos para la inducción de AR	Modelos genéticos
<ul style="list-style-type: none"> • Artritis inducida por colágeno (Collagen induced arthritis,CIA) • Artritis inducida por adyuvante (Adjuvant induced arthritis) • Artritis inducida por Streptococcus (Streptococcal cell wall induced arthritis,SCW) • Artritis inducida por Proteína Oligomérica de la Matriz del Cartílago (COMP induced arthritis) • Artritis inducida por pristano (Pristane induced arthritis,PIA) • Artritis inducida por antígeno (Antigen induced arthritis,AIA) • Artritis inducida por proteoglicano (Proteoglycan induced arthritis) • Artritis inducida por G6PI (G6PI induced arthritis) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ratón K/BxN • Ratón SKG • Ratón HTNFG • Ratón IL-1ra-/-

Modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno (CIA).

El empleo del modelo de AR inducida por colágeno (CIA) ha permitido realizar diversos estudios de fármacos e identificar poblaciones de células y moléculas clave que contribuyen a la patogénesis de la AR, a pesar de esto un solo modelo de AR es incapaz de reproducir completamente la enfermedad humana, individualmente si permiten la disección molecular y espacio-temporal de varios procesos patológicos del desarrollo de la enfermedad (Benson *et al.*, 2018). El modelo CIA consta de la inmunización activa mediante la inoculación con colágeno heterólogo tipo II (CII) mezclado con adyuvante de Freund en cepas susceptibles de ratones de 8 a 10 semanas, con la que se logran signos clínicos de la enfermedad como la poliartritis caracterizada por infiltración de células inflamatorias sinoviales, hiperplasia sinovial, destrucción del cartílago y erosión ósea (Miyoshi & Liu, 2018). Los signos clínicos de artritis aparecen entre los días 21 y 25 después de la inoculación inicial. Dado que el CII es la principal proteína del cartílago articular, la respuesta inmunitaria

generada por CII y promovida por la combinación con adyuvante de Freund, se dirige principalmente a las articulaciones (Luan *et al.*,2021). Las dos características importantes del modelo CIA son el incumplimiento de la tolerancia y la generación de autoanticuerpos. La CIA es un modelo de poliartritis, que puede distinguirse por inflamación de la membrana sinovial, destrucción del cartílago y erosión ósea similar a la AR humana (Choudhary *et al.*, 2018). La susceptibilidad a la enfermedad se ha relacionado con cepas que tienen haplotipos MHC Clase II IA q como la DBA/1; sin embargo, muchas cepas de ratones muestran grados variables de susceptibilidad a la CIA. Aunque muchos grupos han desarrollado protocolos para el modelo CIA en ratones C57BL/6, los resultados han mostrado una incidencia baja (70%) en comparación con los ratones DBA/1 (100%) que son los más usados en la actualidad (Grötsch *et al.*,2019).

Planteamiento del problema

En la actualidad existen diversos medicamentos para el tratamiento de la artritis reumatoide; sin embargo, muchos de ellos presentan ya sea una alta toxicidad o un alto costo económico para el paciente. Por lo anterior, una ventana de oportunidad es buscar alternativas terapéuticas para la enfermedad que puedan reducir la toxicidad de los principios activos, reducir su costo y aumentar los efectos terapéuticos de los mismos. La D-penicilamina ha presentado buenos efectos en el tratamiento de la artritis reumatoide y presenta un bajo costo para su producción, pero debido a su hepatotoxicidad se ha restringido su uso. La evaluación de los efectos antiinflamatorios de formulaciones que potencialmente puedan reducir sus efectos nocivos e incrementar su efecto terapéutico, resulta crucial para encontrar mejores tratamientos para la artritis reumatoide.

Hipótesis

El efecto antiinflamatorio de la D-penicilamina para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) se ha demostrado ampliamente; sin embargo, por sus efectos secundarios su empleo ha sido restringido a casos extremos de la enfermedad. Aunado a lo anterior, se sabe que la implementación de sistemas liposomales ha demostrado bajar la toxicidad de los fármacos encapsulados y mejorar su direccionamiento sitio-específico; por lo que se espera que al suministrar un tratamiento con una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina en un modelo murino de AR inducida, se podrá observar una baja en las principales citocinas inflamatorias en sangre y una reducción de la inflamación en las articulaciones diartrodiales.

Objetivo

Evaluar el efecto antiinflamatorio de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina en un modelo murino de artritis reumatoide inducida, mediante la detección de citocinas inflamatorias por citometría de flujo, determinación del tamaño del bazo y seguimiento fotográfico en articulaciones diartrodiales.

Objetivos particulares

- Implementar un modelo de inducción de artritis reumatoide por colágeno en ratones DBA-1.
- Fabricar una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina en AR inducida por colágeno en ratones DBA-1, mediante la determinación de los cambios en la concentración en sangre de las principales citocinas inflamatorias.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina en AR inducida por colágeno en ratones DBA-1, a través de un seguimiento fotográfico de las diferencias morfológicas de las articulaciones diartrodiales.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina en AR inducida por colágeno en ratones DBA-1, a través de la medición del tamaño del bazo.

Método

Diseño de estudio

Se implementó un modelo experimental conformado por ratones macho DBA-1, con 8-10 semanas de edad al momento de iniciar el experimento, a partir de los cuales se constituyeron 4 grupos:

Grupo testigo (GT): Inoculación de solución salina, 4 individuos

Grupo control negativo (GC-): Inducción de AR, 3 individuos.

Grupo control positivo (GC+): Inducción de AR y suministro de tratamiento con hidrocortisona, 3 individuos.

Grupo experimental AR+(GE+): Inducción de AR y suministro de tratamiento con GSLP, 4 individuos.

El modelo de inducción de artritis reumatoide se basó en la metodología expuesta por Luan *et al.* (2021) y en los protocolos de Inglis *et al.* (2008), en donde se utilizó adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA) y colágeno tipo II de pollo de grado inmunológico (CII) liofilizado. Para la inducción de AR se realizó una primera inmunización con 100 µL de emulsión de CFA en combinación con CII (día 0). Posteriormente se llevó a cabo una segunda inmunización 21 días después de la primera, empleando la misma cantidad, con una emulsión de IFA y CII en la misma proporción.

En el día 21 posterior a la inmunización primaria se les suministró un tratamiento de forma tópica de GSLP a una concentración de 0.6 mg/ml de D-penicilamina al grupo GE+, mientras que al grupo GC+ se le proporcionó un tratamiento con hidrocortisona con una concentración de 15mg/Kg. La aplicación de los tratamientos con GSLP e hidrocortisona se realizó diariamente a la misma hora (12:00 pm) durante 11 días. El tratamiento se llevó a cabo en cada una de las patas derechas traseras de los individuos (vista dorsal), dentro del área comprendida entre el fémur y los dedos, mediante el sumergimiento de la extremidad dentro de un recipiente que contenía la formulación respectiva.

Muestra

Para el desarrollo del presente estudio se estableció una muestra de 20 ratones macho pertenecientes a la cepa DBA-1, los cuales tenían una edad de entre 8 y 10 semanas. Lo anterior en virtud de lo expuesto por Luan *et al.* (2021), en donde se menciona que dichas particularidades son necesarias para la óptima inducción de AR en los individuos. Debido al costo de los ejemplares y a las características del estudio la muestra se acotó a 14 ratones, a partir de los cuales se constituyeron 4 grupos, 2 grupos de 4 ratones (GT y GE+) y 2 grupos de 3 ratones (GC- y GC+).

VARIABLES

La evaluación del efecto antiinflamatorio de GSLP en la artritis reumatoide constó de un solo grado de manipulación (presencia o ausencia). Lo anterior debido a que el análisis se centró en la aparición de un efecto antiinflamatorio ejercido por el GSLP, dicha variable se desprendió de los análisis cuantitativos de la concentración de interleucinas inflamatorias en sangre, el cambio morfológico (inflamación) de las articulaciones diartrodiales inferiores, y el aumento de tamaño del bazo. Los resultados obtenidos responden a un análisis de varianza entre los grupos, tomando como “presencia” del efecto a los valores aproximados al grupo testigo (GT) y como “ausencia” a los valores aproximados al grupo control negativo (GC-).

Técnicas.

Técnica de inducción de AR por colágeno

El modelo de inducción de artritis reumatoide por colágeno se basó en la metodología expuesta por Luan *et al.* (2021) y en los protocolos de Inglis *et al.* (2008), en donde se establece el método para inducción de AR por colágeno.

Se utilizó adyuvante completo de Freund (CFA), adyuvante incompleto de Freund (IFA) y colágeno tipo II de pollo de grado inmunológico (CII) liofilizado para la activación de la respuesta autoinmune. La inducción de AR se realizó mediante dos inmunizaciones en la base de la cola, se inyectaron 100 µl de emulsión de CFA en combinación con CII el primer día (día 0) y posteriormente se llevó a cabo una segunda inmunización 21 días después, empleando la misma cantidad, con una emulsión de IFA y CII en la misma proporción.

Técnica de análisis de citocinas inflamatorias por matriz de perlas

El análisis de citocinas por medio de matriz de perlas (Cytometric bead array (CBA)) consta de 6 tamaños distintos de microperlas, asociados cada uno a una citocina inflamatoria específica (IL-6, IL-10, IL-12P70, MCP-1, IFN- γ y TNF- α). Para la técnica se preparó una suspensión que contuviera las micro perlas para su unión a las citocinas inflamatorias contenidas en el plasma sanguíneo de cada uno de los individuos. Los elementos dentro de la muestra se unieron con su respectivo anticuerpo generando complejos con las microperlas correspondientes, posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo en un equipo BD FACSAria II®.

Procedimiento

Fabricación de la formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina

La preparación de la formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina (GSLP) se realizó a partir de la modificación de la metodología empleada por Campos (2020).

Preparación de gel mucoadhesivo

El gel mucoadhesivo se fabricó a partir de una mezcla de policarbofilo Noveon® y de agua ultrapurificada obtenida a través de sistema Milli Q®. Se hirvió el agua MilliQ® durante 10 min, se dejó enfriar y se le adicionó lentamente la cantidad suficiente de Noveon® para la formación de gel, mientras se mezclaba a 250 rpm por medio de un agitador Caframo Petit®. Integrado por completo el polímero se adicionó 40% más de agua Milli Q® respecto al volumen inicial, la mezcla obtenida se dejó hidratar por 24 horas. Hidratada la mezcla se agitó a 800 rpm durante 5 min, para después ajustar su pH mediante la adición de trietanolamina previamente filtrada con un filtro de poro de 0.22 µm, hasta alcanzar un pH compatible con el sistema liposomal; finalmente, se agitó nuevamente a 800rpm durante 5 min y se dejó gelificar durante 20 min.

Preparación de solución de D-penicilamina

La solución de D-penicilamina se preparó con base en los resultados preliminares de Campos (2020), en donde se mostró un mejor efecto antiinflamatorio con una cantidad de 0.6 mg/ml de gel mucoadhesivo. Para su preparación se utilizó la

cantidad necesaria de solución amortiguadora de fosfatos para disolver 18mg de D-penicilamina, agitándose suavemente para homogenizar.

Preparación de gel con hidrocortisona

En una concentración de 3mg/ml se mezcló hidrocortisona en polvo (succinato sódico de hidrocortisona) con gel mucoadhesivo, después se agitó por medio de un equipo Caframo Petit® a 200rpm durante 5 min. Cuando la mezcla quedo homogenizada se procedió a acondicionar la mezcla en viales Eppendorf® de 2 ml.

Preparación de liposomas

Para la preparación de liposomas se utilizó 1 mM de lípidos por mililitro en proporción 1:1 de fofatidilcolina y espermidil colesterol, ambos se mezclaron en un tubo de ensaye con ayuda de cloroformo grado HPLC. Para la obtención de la película lipídica se evaporó el cloroformo mediante una corriente de aire filtrado con un filtro de 0.22 µm, la formación de la capa delgada de lípido en el fondo se logró evaporando de forma suave, uniforme y evitando salpicaduras. Se procedió a colocar D-penicilamina para llegar a una concentración final de 0.6mg/ml, se sonicó en un equipo Avanti® en 3 ciclos de 5 segundos con descansos de 10 segundos entre cada uno. Por último, la suspensión liposomal obtenida se integró en gel mucoadhesivo y se acondicionó en viales Eppendorf® de 2 ml.

Implementación del modelo de artritis reumatoide en ratones DBA 1

La inducción de artritis reumatoide por colágeno, parte del principio de la presentación de un autoantígeno al sistema inmune con ayuda de un adyuvante, se realizó mediante lo establecido por Luan *et al.* (2021) y en los protocolos de Inglis *et al.* (2008).

Preparación de solución de colágeno

Se preparó una solución de CII en ácido acético glacial al 0.1 M estéril en una relación 4:1 p/v. Después se mezcló mediante un agitador magnético a 200 rpm en refrigeración durante 24 horas. Pasado el tiempo, se acondicionó en tubos Eppendorf® de 2ml dejándose a temperatura ambiente.

Preparación de emulsiones inmunizadoras con Adyuvante Completo de Freund (CFA) y con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA)

Para la inmunización se prepararon emulsiones de CII con adyuvantes (CFA o IFA) en relación 1:1. Se mezclaron en un Vortex Genie 2® a máxima velocidad durante 5 ciclos de 30 segundos con descansos de 20 segundos; después se utilizó un sonicador Avanti® durante 4 ciclos de 5 segundos con descansos de 10 segundos. Las emulsiones se mantuvieron en hielo y se colectaron con jeringas de 1ml para inocular a los individuos en un plazo no mayor a 6 horas.

Inoculación de emulsiones inmunizadoras

Se realizó la inoculación de la emulsión inmunizadora con CFA en el día 0 del experimento, mientras que la inoculación de la emulsión inmunizadora con IFA se

implementó el día 21 posterior a la primera. Para la inoculación, se rasuró a cada ratón en la base de la cola para permitir una correcta introducción de la aguja, se anestesió por vía intraperitoneal a cada ratón con una solución de Midazolam y Fentanilo adecuada a su peso. La inoculación se llevó a cabo mediante una jeringa de 1ml, a cada individuo se le inyectaron de forma subdérmica 100 µL dosificados en dos inyecciones de 50 µL, una en la base de la cola y otra a 2 mm de la primera.

Determinación de citocinas inflamatorias

El día 32 posterior a la primera inmunización se extrajo el plasma sanguíneo de los individuos, para posteriormente llevar a cabo la cuantificación de seis citocinas inflamatorias (IL-6, IL-10, IL-12P70, MCP-1, IFN-γ y TNF-α), mediante citometría de flujo utilizando un kit de microperlas para citocinas inflamatorias de ratón BD®.

Los ratones se sacrificaron por exanguinación, para lo cual se anestesiaron y a partir de un corte en la cola, se extrajo la sangre periférica de cada uno. Las muestras se colectaron en tubos con citrato de sodio como anticoagulante; posteriormente, se centrifugó a 1500g durante 15 minutos en una centrífuga clínica refrigerada, separado el paquete celular se recolectó el plasma. Con las muestras obtenidas, se continuó con un análisis de citocinas inflamatorias de ratón por citometría de flujo mediante un kit de microperlas BD® Cytometric Bead Array (CBA)®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Evaluación de la inflamación articular

La evaluación del cambio morfológico en las articulaciones diartrodiales se hizo a través de un seguimiento fotográfico de las patas traseras, el cual se realizó una vez por semana, desde el día de la primera inmunización (día 0) hasta el día del sacrificio (día 32). Se fotografiaron las patas traseras derechas de todos los grupos. Los parámetros de evaluación (Cuadro 2) se basaron en lo expuesto por Luan *et al.* (2021), modificando las categorías para una AR con fenotipo menos exacerbado.

Cuadro 2. Criterios de puntuación para la artritis inducida por colágeno en ratones. Modificada de Luan *et al.* (2021).

Puntuación de gravedad	Grado de inflamación
0	Sin eritema ni hinchazón
1	Eritema y tumefacción leve limitada a la articulación del tarso, el tobillo o la pata, con tumefacción leve en una sola extremidad
2	Eritema e inflamación leve que se extiende desde el tobillo hasta los tarsos o eritema e inflamación leve de más de un dedo del pie
3	Eritema e inflamación moderada que se extiende desde el tobillo hasta las articulaciones metatarsianas o toda la pata con inflamación y eritema evidente
4	Eritema y toda la pata con hinchazón severa que abarca el tobillo, el pie y los dedos, o anquilosis de la extremidad y disfunción de las articulaciones anteriores

Evaluación del tamaño de bazos

Para detectar si hay un cambio en el tamaño de los bazos, producto de la aparición de AR inducida por colágeno, se llevó a cabo la extracción de los bazos de todos los individuos. Posteriormente fueron colocados en solución amortiguadora de fosfatos y medidos de forma digital a partir de una escala física milimétrica.

Análisis estadísticos

Los resultados provenientes de los datos obtenidos de las concentraciones de citocinas inflamatorias determinadas mediante la técnica de matriz de perlas y su análisis por citometría de flujo, además de las áreas de los bazos extraídos de los individuos, se trataron mediante el análisis de varianzas entre grupos; esto con el objetivo de determinar si existe una diferencia significativa entre los valores de cada grupo. Para estandarizar los valores del número de eventos detectados por citometría de cada una de las citocinas detectables por el kit utilizado, se procedió a calcular el cociente del número de eventos detectados de cada citocina entre el número de eventos totales de la muestra, al cual se le denominó número de eventos relativos. Además, se evaluó la morfología articular mediante el instrumento de *Luan et al. (2021)* en valores categorizables a partir de la metodología expuesta por *Inglis et al. (2008)*, estos valores se evaluaron mediante la prueba de Tukey.

Resultados

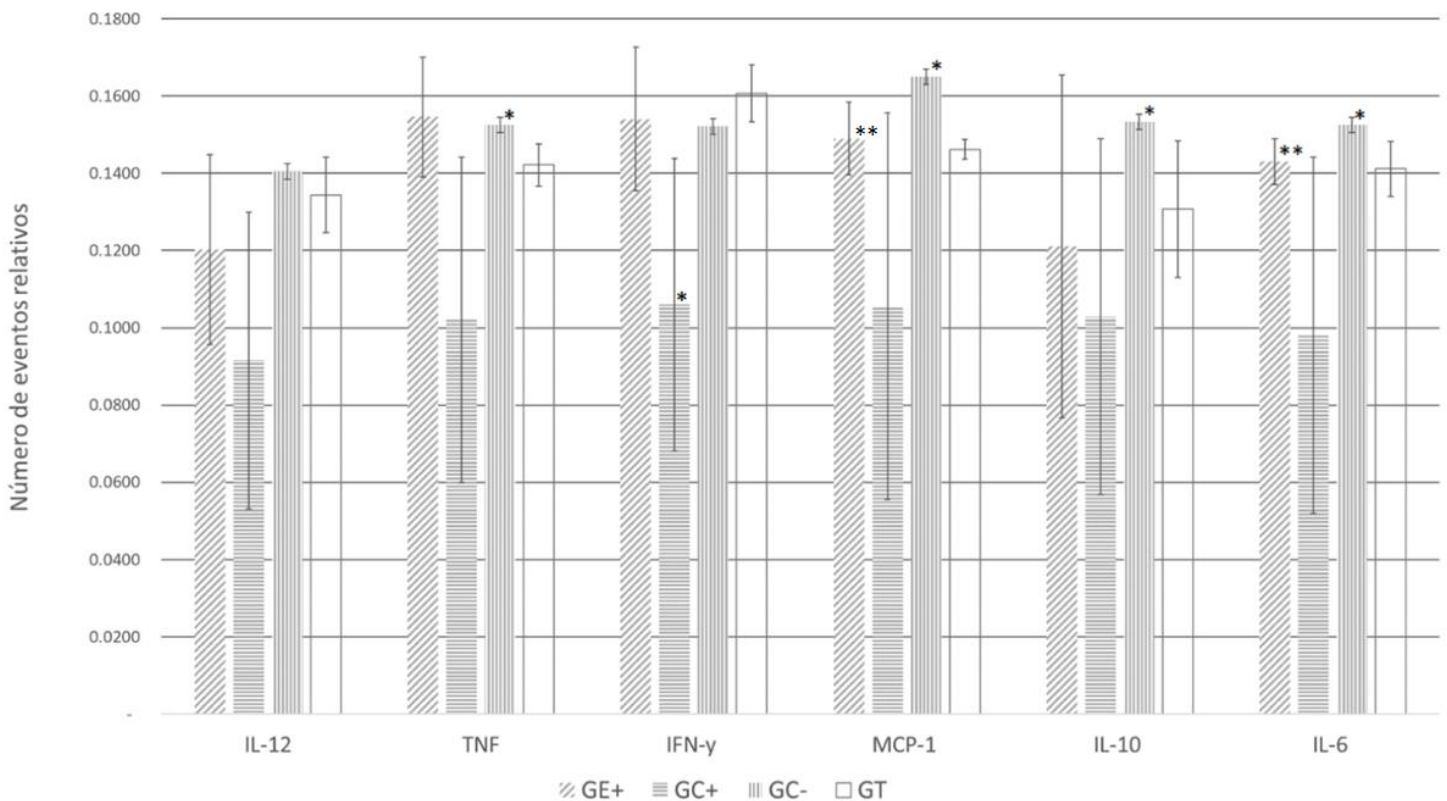
Citocinas inflamatorias en plasma sanguíneo

Con la finalidad de evaluar las citocinas inflamatorias en los animales control y tratados, se utilizó el modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno en ratones DBA. Se utilizaron cuatro grupos: ratones testigo (GT), ratones con artritis inducida y sin tratamiento GC-, ratones con artritis inducida tratados con penicilamina (GE+) y un grupo control positivo tratado con hidrocortisona (GC+). Una vez pasado el tiempo de inducción de artritis se trató a los ratones con penicilamina como grupo experimental y con hidrocortisona como control positivo. Al cabo de 11 días de tratamiento los animales fueron sacrificados por exanguinación y se obtuvo el plasma correspondiente. Posteriormente se utilizó el Kit de perlas CBA para evaluar las seis citocinas inflamatorias principales por citometría de flujo.

Los análisis de varianza indicaron que existen diferencias significativas en los grupos GC- y GT en los niveles de las citocinas MCP-1, IL-10, TNF- α e IL-6, donde GC- presenta una mayor cantidad. Cabe mencionar que en los niveles de IFN- γ se observa un cambio en los niveles de GC- con respecto a GT sin ser estadísticamente significativos. En cuanto al IFN- γ se reflejaron diferencias significativas entre los grupos GC+ y GT, mostrando una reducción del nivel de IFN- γ en el grupo GC+. En GE+ se mostró una diferencia significativa en IL-6 y MCP-1 con respecto al grupo GC-. En los demás casos no se obtuvieron diferencias

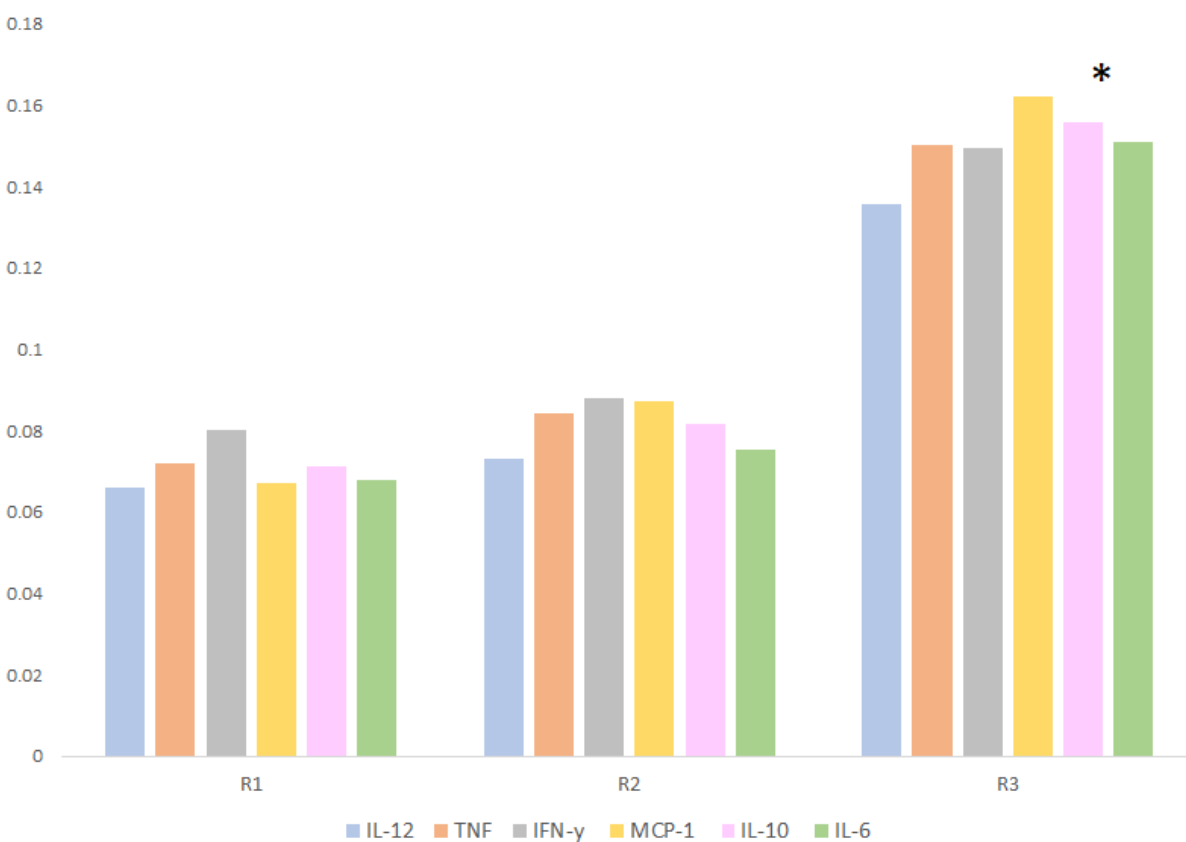
significativas entre los grupos, pero si se observó un comportamiento de las medias, en donde GC+ mantuvo de forma constante una media menor que los demás grupos, pero con una desviación estándar alta generada por valores extremos, lo que permite observar una heterogeneidad en este grupo. Otro caso similar es el de GE+, el cual mostró una gran variabilidad en los valores correspondientes a IL-10, IFN- γ e IL-12, pero que en general mantuvo un comportamiento muy similar a GT (Graf.1, Anexo 1).

Gráfica 1. Promedio de número de eventos relativos de citocinas por grupo de individuos. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT). (*) Diferencias significativas respecto a GT. (**) Diferencias significativas respecto a (GC-).

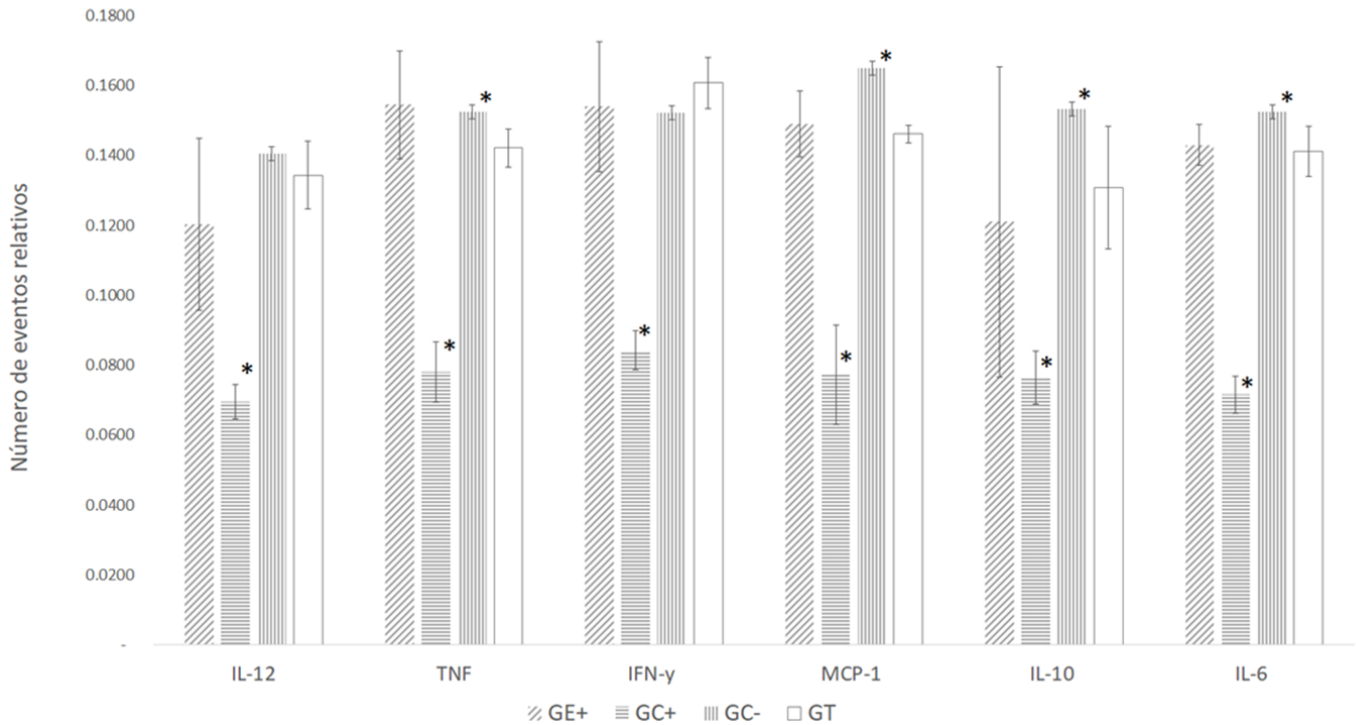


En el grupo GC+ existe una amplia diferencia en todos los niveles de citocinas entre el ratón 3 (R3) y el resto del grupo (Graf. 2). Estos datos modifican la desviación estándar, generando que los valores de la media no expresen el evento biológico real. Si omitimos los valores expresados por R3, se observa un cambio significativo en todas las citocinas en el grupo GC+ en comparación con GT (Graf. 3).

Gráfica 2. Niveles de citocina en el grupo experimental (GC+). Se aprecia un patrón inflamatorio definido con valores extremos con respecto al grupo en el ratón 3 (R3) *. Ratón 1 (R1), ratón (R2), ratón 3 (R3).



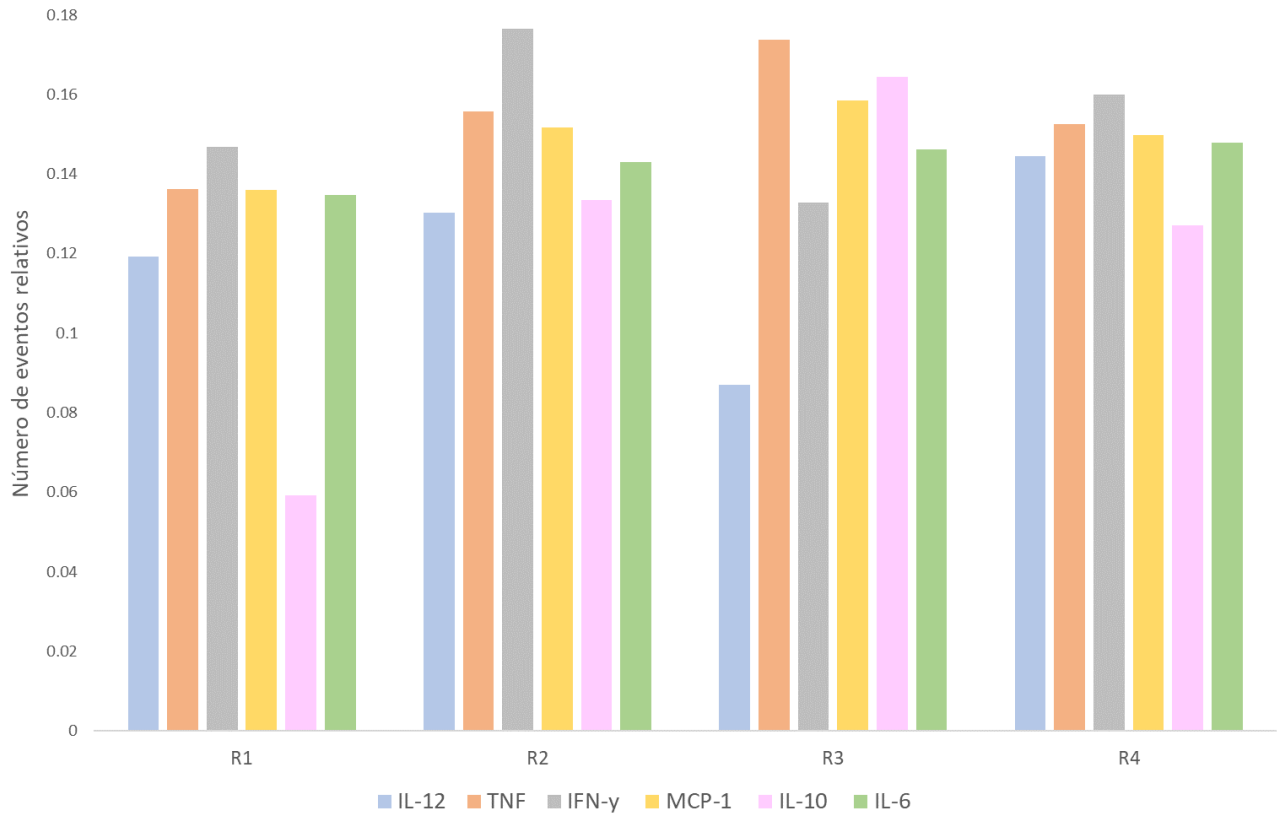
Gráfica 3. Comparación de los niveles de citocinas entre los grupos, eliminando el error generado por valores extremos en GC+ por el ratón 3. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT). (*) Diferencias significativas respecto al testigo.



En comparación, el grupo GE+ también presentó valores extremos en varias citocinas (Graf.1), a pesar de lo anterior no se distinguió un patrón en ninguno de los individuos que mostrara una baja o alta global de las principales citocinas inflamatorias respecto al grupo (Graf.4), esto representa una heterogeneidad en los ratones respecto a los niveles de cada uno de los tipos de citocinas, pero no se logró determinar un patrón que excluyera a algún individuo del grupo.

Los resultados obtenidos de la prueba estadística de desviación estándar se pueden encontrar en el anexo 1, mientras que en el anexo 2 se observan los resultados completos del número de eventos relativos de cada uno de los grupos. Cabe mencionar que para el análisis de citometría se utilizaron únicamente las muestras de plasma con características viables para el estudio, esto quiere decir que no hayan tenido hemólisis y que se obtuviera una cantidad ideal para la prueba con microperlas. De esta forma se obtuvieron 4 muestras para el grupo GE+ y GT, 3 muestras para el grupo GC+ y una muestra para el grupo GC- (ratón 1).

Gráfica 4. Comparación de los niveles de citocinas en el grupo GE+. No se observa un patrón definido en ningún ratón distinto al grupo.



Inflamación articular

Con el objetivo de evaluar la inflamación articular se realizó un seguimiento fotográfico semanal de la morfología articular y una evaluación de inflamación cualitativa de acuerdo con lo descrito en metodología. La prueba estadística de Tukey mostró que hubo una diferencia significativa entre todos los grupos (Anexo 3). Se logró apreciar que el grupo que presentó mayor inflamación corresponde a GC-, mientras que en GT no se percibió inflamación alguna (Cuadro.3). El grupo GE+ mostró una reducción de la inflamación en comparación con GC-, aunque no alcanzó la disminución mostrada por GC+. Lo anterior muestra una clara inflamación del grupo con inducción de AR y un efecto antiinflamatorio de GSLP, aunque no tan importante como el mostrado por la hidrocortisona (Cuadro 3).

Cuadro 3. Grados de inflamación por individuo. Escala basada en Luan *et al.* (2021).

	Grados de inflamación
GE+	1
	2
	2
	2
GC+	1
	1
	1
GC-	3
	3
	3
GT	0
	0
	0
	0

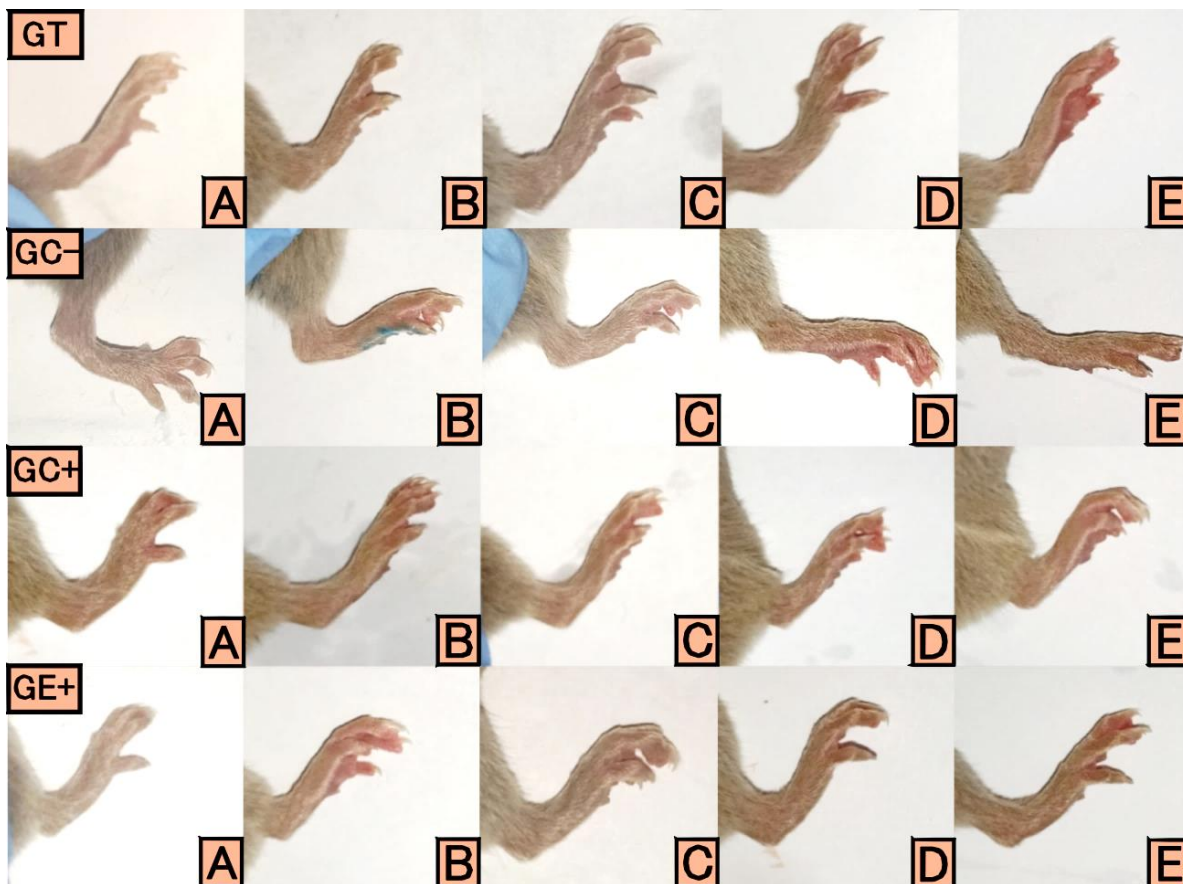
Particularmente se observó una inflamación en la zona de la articulación astragalocrural (tobillo) y las articulaciones interfalángicas (articulaciones presentes en el extremo distal de los dedos), al igual que un enrojecimiento generalizado de la extremidad (Fig.2). Cabe destacar que no se reflejó en ninguno de los casos un fenotipo inflamatorio exagerado como en el mostrado en la literatura; sin embargo; si se mostró una inflamación perceptible y notoria en los grupos con AR inducida (Fig.3).

Figura 2. Principales puntos de inflamación presentes en ratones con AR inducida.



Figura 3. Seguimiento de la inflamación desde el día 0 al día 32 a partir de la inoculación primaria de colágeno. Individuos representativos de cada grupo. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT).

(A) Día 0, (B) Día 10, (C) Día 18, (D) Día 26, (E) Día 32.

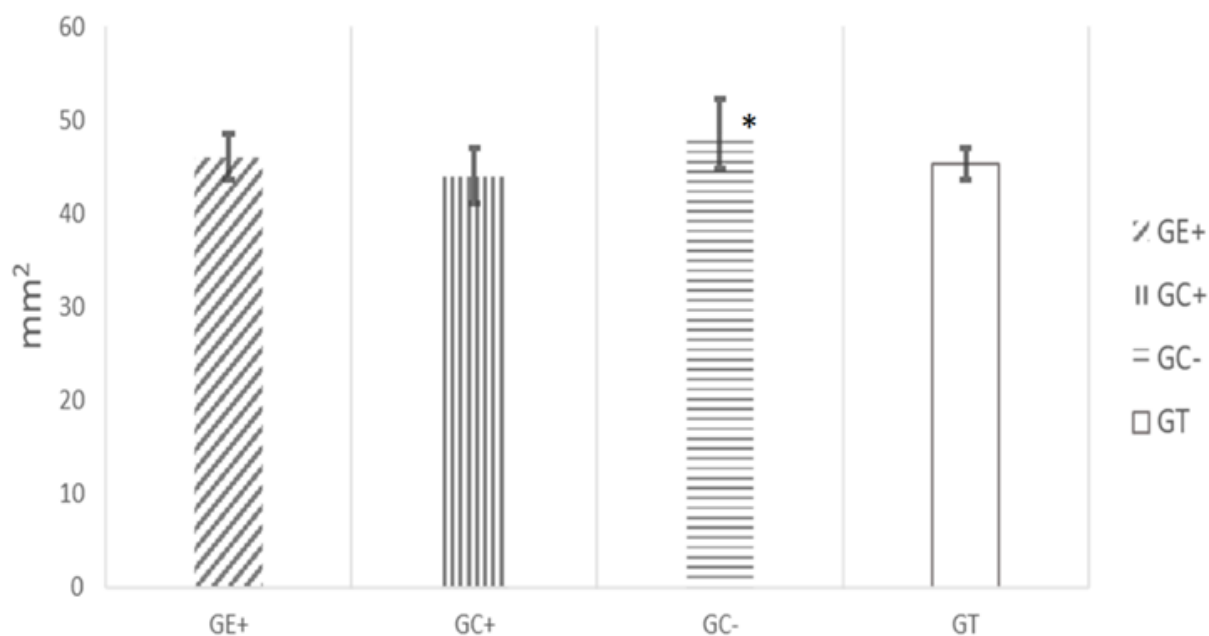


Evaluación del tamaño de bazo

Para determinar un posible crecimiento del bazo, inmediatamente después del sacrificio, se extrajeron los bazo a cada animal y se determinó su área de forma exacta. En los resultados de la medición de la inflamación de los bazo de cada individuo se aprecian diferencias significativas entre GC- y todos los demás grupos, mostrando de un 13% a 18.2% de incremento en el tamaño del bazo. A pesar de que entre los demás grupos no aparecieron diferencias significativas, si se presentó un patrón de la media, similar a lo mostrado en los niveles de citocinas, ya que GC+ presentó el promedio de área más baja de entre todos los grupos con 43.99 mm², siguiéndole GT con 45.3 mm² y GE+ con 46.08 mm², dejando a GC- como el grupo con mayor área con 52.01 mm² (Gráfica 6). Lo anterior también refleja un encogimiento del bazo respecto a GT debido al tratamiento con hidrocortisona en GC+.

El análisis estadístico y los promedios de tamaño de cada grupo pueden consultarse en el anexo 4 y 5 respectivamente, las fotografías a escala se pueden consultar de igual forma en el anexo 6.

Gráfica 6. Promedio de áreas de bazo extraídos por grupo. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT). (*) Diferencia significativa respecto a GT.



Discusión

En el presente trabajo se evaluó el efecto antiinflamatorio de GSLP mediante la detección de citocinas inflamatorias, evaluación de morfología articular y medición del tamaño del bazo. Los resultados de detección de citocinas inflamatorias se obtuvieron a partir de la detección de IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, IFN- γ y TNF- α por medio de citometría de flujo; es importante mencionar que IL-6, IL-12, MCP-1, IFN- γ y TNF- α tienen un efecto proinflamatorio, mientras que IL-10 se ha caracterizado por ser una citocina antiinflamatoria. Durante la inflamación las citocinas proinflamatorias incrementan, al igual que las antiinflamatorias que participan en el proceso de resolución.

Nuestros resultados indicaron que los niveles de las citocinas IL-6, IL-10, MCP-1 y TNF- α del grupo GC- fueron significativamente más altos a comparación de GT. Las citocinas tienen diversas funciones en el organismo, su papel en el proceso

inflamatorio es sumamente importante ya que participan en el reclutamiento, proliferación y mantenimiento de las células del sistema inmune en el tejido. Las citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α que obtuvieron niveles considerablemente altos en GC- tienen características particulares que nos permiten dilucidar los eventos biológicos en la inflamación presente. La IL-6 que mostró una alta concentración en GC-, ha mostrado ser responsable de la transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica, al participar en el reclutamiento celular en las articulaciones afectadas y promover la maduración de linfocitos B, observándose un incremento de ésta en el líquido sinovial y suero sanguíneo; el incremento en las concentraciones en GC- muestra el reconocimiento de un antígeno y un proceso inmunológico, mientras que su disminución en GE+ refleja una atenuación del proceso de autoinmunidad (Hernández & Valor, 2018).

El incremento de MCP-1 refleja un reclutamiento de monocitos y la activación de subpoblaciones de linfocitos T, además modula la respuesta inmunitaria promoviendo la diferenciación al fenotipo Th1 mediante la supresión selectiva de la diferenciación de células T vírgenes (Th0) en células T colaboradoras CD4 tipo 1 (Th1), mediante la regulación de la capacidad de liberación de IL-12 de las células dendríticas (Singh *et al.*, 2021), explicando así el poco cambio de concentración en los niveles de IL-12 en todos los grupos y el aumento de MCP-1 en GC-, por lo que se puede inferir un efecto antiinflamatorio de GSLP al presentar una disminución de MCP-1 en GE+ en contraste con GC- .

La IL-10 por su parte, es una citocina antiinflamatoria que funciona como un potente inhibidor de la presentación de antígenos al reducir la expresión de MHC II así como de receptores coestimuladores, también inhibe la diferenciación y maduración de células dendríticas; además; tiene un potente efecto inhibidor en la producción de las principales citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α (Montañés, S. G. (2016), regulando además la diferenciación y la supervivencia de las células Th2; en contraposición al fenotipo Th1 característico de un perfil proinflamatorio (Coomes *et al.*,2017), la alza en sus concentraciones exhibe un proceso de intento de regulación de la inflamación en GC-.

TNF- α es una de las principales citocinas proinflamatorias, ya que además de promover la inflamación, los condrocitos y las células sinoviales son el blanco de citocinas como IL-1 y TNF- α para la producción de proteasas de la matriz y para suprimir la síntesis de colágeno y proteoglicanos, causando así una sinovitis crónica (Benítez *et al.*,2019), el incremento de TNF- α muestra la actividad degradante y el reclutamiento de las células del sistema inmune a las articulaciones en el grupo con AR inducida sin tratamiento (GC-). Además, al no presentarse niveles lo suficientemente altos de otras citocinas proinflamatorias como IL-12 e IFN- γ , puede sugerirse que enfrentamos una etapa temprana de la enfermedad.

El grupo con el tratamiento con GSLP (GE+) no presentó diferencia significativa con referencia a GT en ninguna de las citocinas inflamatorias y mostró una disminución

respecto a GC- en IL-6 y MCP-1. Los valores de las demás citocinas para GE+ muestran una amplia desviación, lo cual provoca que no se pueda evaluar con exactitud el comportamiento del grupo; sin embargo, la disminución de IL-6 y de MCP-1 con respecto a GC- y su similitud a los valores de GT muestran un claro efecto antiinflamatorio. Los cambios en las concentraciones de citocinas en plasma sanguíneo también demuestran una absorción exitosa de D-penicilamina a través de vía tópica, aunque no se tiene información suficiente para determinar si su efecto se lleva a cabo de forma local o sistémica.

En otro orden de ideas, la evaluación de la inflamación articular concuerda con la información obtenida de los niveles de citocinas inflamatorias, ya que mostró una nula inflamación en GT y una alta inflamación en GC- (grado 3), mientras que los promedios de las áreas de los bazos concordaron igualmente, al mostrar un aumento significativo de GC- en comparación con todos los demás grupos. De acuerdo con Luan *et al.*,2021, el agrandamiento de los bazos se presenta en ratones con AR inducida por CIA, incluso si no hay síntomas de inflamación evidentes, constatando una correcta inducción de AR en el grupo GC-. Se presentó una disminución de la inflamación articular de GE+ con respecto a GC-, mostrando un efecto antiinflamatorio en el área de inoculación, esto se respalda con los resultados del tamaño de los bazos que mostraron una reducción de su área en comparación con GC- y valores similares a GT. A pesar de esto, los resultados del tratamiento con GSLP no se acercan a los obtenidos con el tratamiento con hidrocortisona, el cual mostró una reducción de todas las citocinas inflamatorias y una reducción del área del bazo en contraste con todos los grupos; esto es congruente ya que la hidrocortisona es un glucocorticoide excretado por las glándulas suprarrenales en respuesta al estrés con potentes efectos inmunosupresores (Nicolaidis *et al.*,2015).

Al observar la inflamación articular no se logró identificar un fenotipo severo en las articulaciones diartrodiales, esto se puede explicar debido a que de acuerdo con Luan *et al.*, (2021) los signos visibles de la AR se presentan entre los días 25 y 26 después de la primera inmunización y la deformación de las articulaciones entre los días 31 y 41; nuestro seguimiento fotográfico se llevó a cabo hasta el día 32 por lo cual es probable que la deformación y el hinchamiento excesivo de las articulaciones no se presentara aún en el último día de evaluación. También, esto se apoya con los resultados obtenidos de otros estudios donde se observó una inflamación moderada alrededor del día 30 y una exacerbada hasta el día 35, obteniéndose valores máximos pasados los 40 días (Ansari *et al.*,2021; Zhang *et al.*,2019; Gwon *et al.*,2018; Mitra *et al.*,2017; Matsumoto *et al.*,2016; Hsiao *et al.*,2016; Wang *et al.*,2013).

Finalmente, todos nuestros resultados nos muestran una correcta inducción de AR, particularmente la evaluación de citocinas y la inflamación articular nos indican características de una etapa temprana de AR. Aunado a lo anterior se logró determinar un efecto antiinflamatorio causado por el tratamiento con GSLP.

Conclusiones

1. Se logró inducir la artritis por colágeno en ratones DBA-1, mostrando un fenotipo propio del inicio de la enfermedad.
2. Se fabricó de forma correcta una formulación en gel con liposomas cargados con D-penicilamina.
3. La implementación del análisis por citometría de flujo de citocinas inflamatorias, en conjunto con la evaluación de la morfología articular y el tamaño del bazo permitieron evaluar de forma más completa el efecto antiinflamatorio del sistema liposomal con penicilina en gel mucoadhesivo, permitiendo tener un panorama más amplio de sus efectos biológicos.
4. El tratamiento con una formulación en gel de un sistema liposomal cargado con D-penicilamina mostró un efecto antiinflamatorio en todos los parámetros evaluados, con diferencias significativas con respecto al grupo control sin tratamiento y valores cercanos al grupo testigo.
5. El tratamiento con D-penicilina de forma tópica podría resultar como una alternativa segura y eficaz para el tratamiento contra la artritis reumatoide.

Perspectivas

Los resultados de la evaluación del nivel de citocinas inflamatorias en plasma sanguíneo, la morfología articular y el cambio del área del bazo, permitieron evaluar con un número mayor de parámetros el efecto antiinflamatorio de una formulación en gel para un sistema liposomal cargado con D-penicilamina, posibilitando el determinar su efecto antiinflamatorio con mayor precisión; sin embargo, resulta de gran interés el continuar con el estudio de los efectos de la aplicación tópica de la D-penicilamina. Algunas de las interrogantes que quedan por resolver son si su efecto se genera de forma local o sistémica, en que etapas de la enfermedad es más eficaz y en que concentraciones puede tener un mayor efecto terapéutico, sin dejar a un lado el estudio de su farmacocinética, farmacodinámica y toxicidad.

Anexos

Anexo 1. Análisis de varianza de las citocinas presentes en el plasma de los ratones. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT).

	IL-12 (p)					MCP-1 (p)			
	GE+	GC+	GC-	GT		GE+	GC+	GC-	GT
GE+		0.7234	0.8495	0.6727	GE+		0.8590	**0.9853	0.4120
GC+	0.7234		0.9082	0.9214	GC+	0.8590		0.5878	0.8451
GC-	0.8495	0.9082		0.7462	GC-	**0.9853	0.8909		*0.999994
GT	0.6727	0.9214	0.7462		GT	0.4120	0.8451	*0.999994	
	TNF- α (p)					IL-10 (p)			
	GE+	GC+	GC-	GT		GE+	GC+	GC-	GT
GE+		0.93460352	0.08853025	0.20391585	GE+		0.3800	0.8045	0.3014
GC+	0.93460352		0.59071764	0.89285466	GC+	0.3800		0.8694	0.6918
GC-	0.20391585	0.89285466		*0.9911	GC-	0.8045	0.8694		*0.9575
GT	0.82046535	0.89039287	*0.9911		GT	0.3014	0.6918	*0.9575	
	IFN- γ (p)					IL-6 (p)			
	GE+	GC+	GC-	GT		GE+	GC+	GC-	GT
GE+		0.9262	0.1558	0.4694	GE+		0.9020	**0.9823	0.2830
GC+	0.9262		0.8981	*0.9668	GC+	0.9020		0.8897	0.8846
GC-	0.1558	0.8981		0.9396	GC-	**0.9823	0.8897		*0.9809
GT	0.4694	*0.9668	0.9396		GT	0.2830	0.8846	*0.9809	

Anexo 2. Número de eventos relativos por grupo. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT). Ratón 1 (R1), ratón (R2), ratón 3 (R3), ratón 4 (R4).

		Número de eventos relativos					
		IL-12	TNF	IFN- γ	MCP-1	IL-10	IL-6
GC-	R1	0.1405	0.1525	0.1521	0.1650	0.1533	0.1525
GC+	R1	0.0659	0.0718	0.0803	0.0673	0.0711	0.0677
	R2	0.0729	0.0841	0.0881	0.0874	0.0818	0.0753
	R3	0.1357	0.1502	0.1494	0.1622	0.1557	0.1511
GE+	R1	0.1193	0.1362	0.1469	0.1359	0.0591	0.1346
	R2	0.1303	0.1558	0.1764	0.1518	0.1335	0.1430
	R3	0.0869	0.1738	0.1328	0.1584	0.1643	0.1461
	R4	0.1446	0.1524	0.1600	0.1497	0.1271	0.1479
GT	R1	0.1282	0.1492	0.1593	0.1442	0.1454	0.1441
	R2	0.1481	0.1411	0.1644	0.1468	0.1051	0.1482
	R3	0.1267	0.1360	0.1681	0.1441	0.1368	0.1408
	R4	0.1343	0.1422	0.1510	0.1495	0.1355	0.1315

Anexo 3. Prueba estadística de Tukey entre grupos referente a la inflamación articular. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT).

	GE+	GC+	GC-	GT
GE+		0.9784	0.999344	0.9999802
GC+	0.9784		0.9999783	0.9966
GC-	0.999344	0.9999783		0.99999973
GT	0.9999802	0.9966	0.99999973	

Anexo 4. Área de bazos extraídos a cada grupo. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT). Ratón 1 (R1), ratón (R2), ratón 3 (R3), ratón 4 (R4).

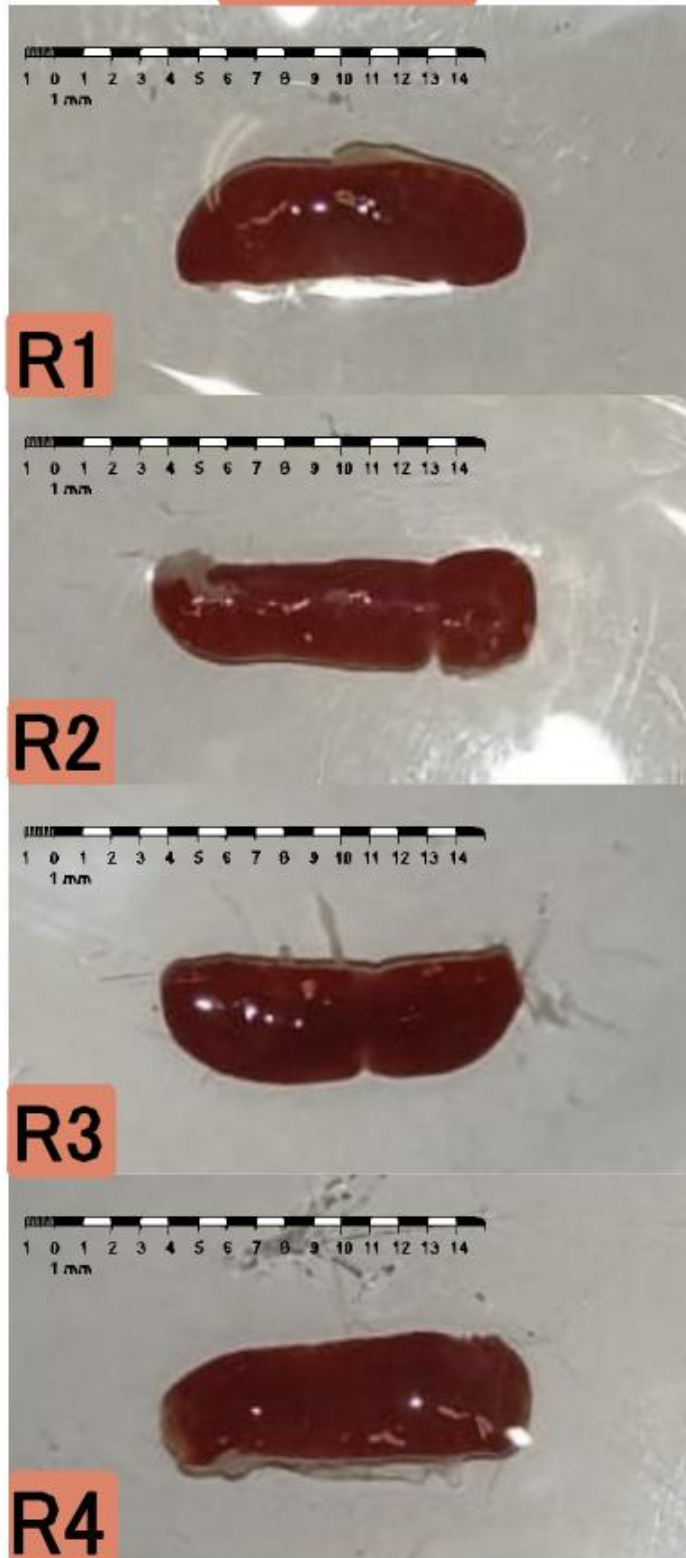
		Área	Promedio de área
GC-	R1	48.477	52.01633333
	R2	51.683	
	R3	55.889	
GC+	R1	40.76	43.99733333
	R2	44.761	
	R3	46.471	
GE+	R1	44.31	46.03575
	R2	49.48	
	R3	46.136	
	R4	44.217	
GT	R1	44.449	45.30675
	R2	44.112	
	R3	44.826	
	R4	47.84	

Anexo 5. Prueba estadística de desviación estándar de los bazos extraídos a cada grupo. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT).

	GE+	GC+	GC-	GT
GE+		0.6385	*0.951	0.3560
GC+	0.6385		0.9574	0.5140
GC-	*0.951	0.9574		*0.9773
GT	0.3560	0.5140	*0.9773	

Anexo 6. Bazos extraídos de cada uno de los grupos. Grupo experimental positivo (GE+), grupo control positivo (GC+), grupo control negativo (GC-), grupo testigo (GT).

GT



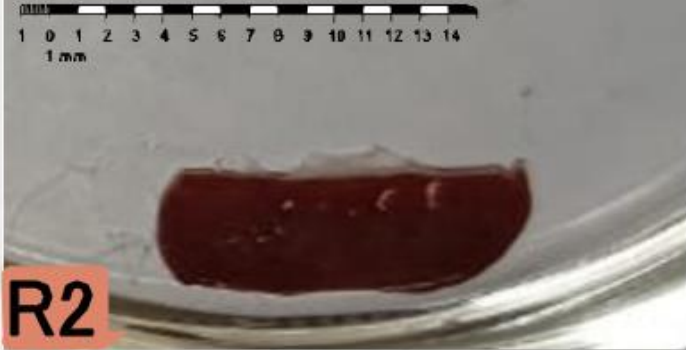
GC-



GE+



R1



R2

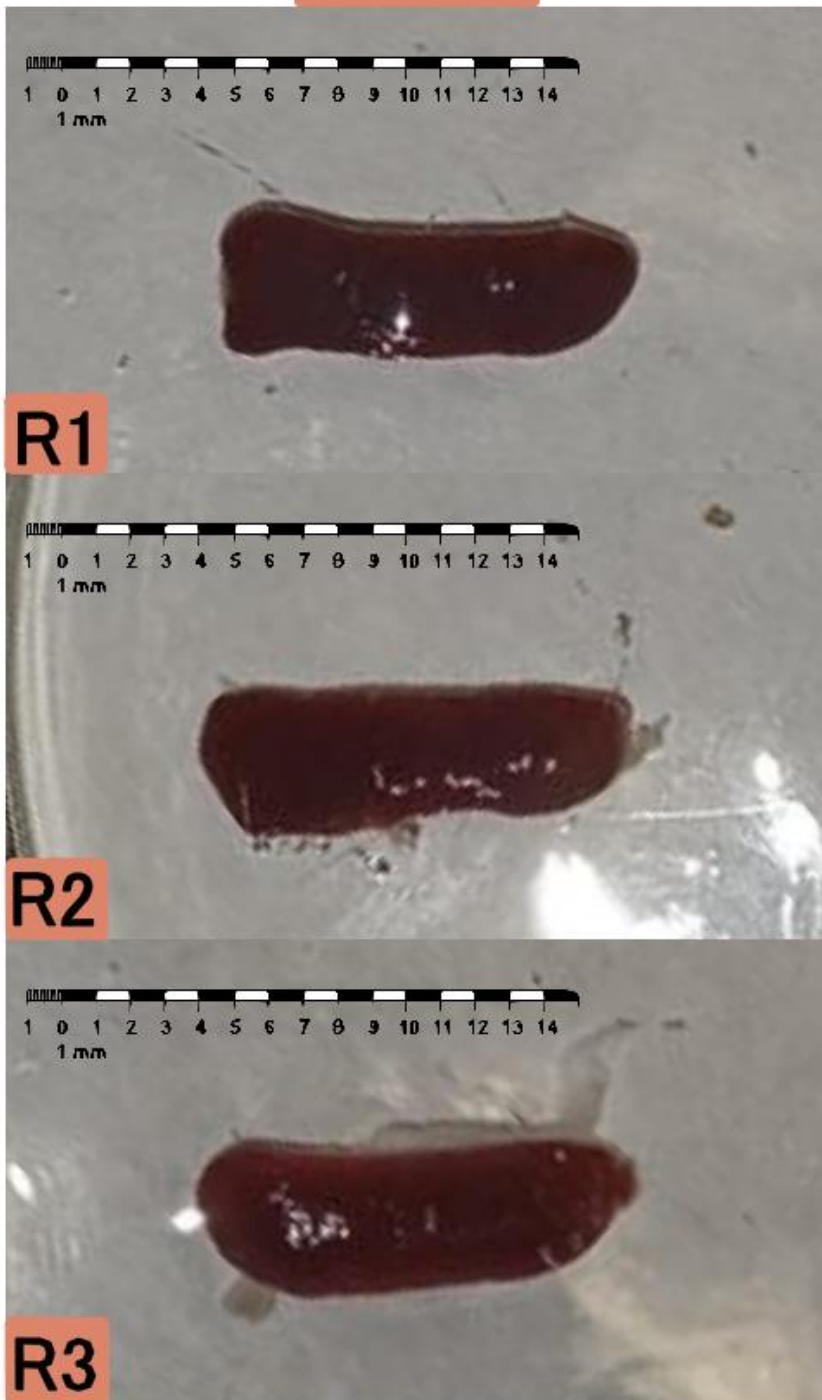


R3



R4

GC+



Referencias

1. Abascal Ceruti, L. (2020). Transportadores lipídicos de nanopartículas para usos terapéuticos. Tesis de licenciatura. Universidad de Cantabria.
2. Aletaha, D., & Smolen, J. S. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *JAMA*, 320(13), 1360.
3. Andrews, H. E., Marquez, E. G., Guevara, E. A., Guerrero, A. R., Ciapara, I. H., Eugenia, D. C., ... & Avila, M. A. R. (2017). Tecnologías de nano/microencapsulación de compuestos bioactivos. Primera Edición. México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.
4. Ansari, M. A., Nadeem, A., Bakheet, S. A., Attia, S. M., Shahid, M., Alyousef, F. S., ... & Ahmad, S. F. (2021). Chemokine receptor 5 antagonism causes reduction in joint inflammation in a collagen-induced arthritis mouse model. *Molecules*, 26(7), 1839.
5. Badilla García, J., & Herrera Corrales, J. A. (2019). Urinary lithiasis in pediatrics. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 118-126.
6. Bangham, A. (1961). A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. *Nature*, 23: p. 1.
7. Barile-Fabris, L.A., Pérez-Cristobal, M., Merlos-López, R.J., Xibillé-Friedman, D. (2016). Síndrome de fragilidad en pacientes con artritis reumatoide. *Rev Med Inst Mex Seg Soc;54 Supl 2: S210-5*.
8. Benítez, J. G. S., Campos, Y. F., & Reynoso, M. O. (2019). Uso de fármacos biotecnológicos anti-TNF- α en la artritis reumatoide y su inmunogenicidad. *Revista Cubana de Farmacia*, 52(2), 1-23.
9. Benson, R. A., McInnes, I. B., Garside, P., & Brewer, J. M. (2018). Model answers: rational application of murine models in arthritis research. *European journal of immunology*, 48(1), 32-38.
10. Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L., & Boissier, M.C. (2017). Arthritis models: usefulness and interpretation. *Seminars in Immunopathology*, 39(4), 469–486. doi:10.1007/s00281-017-0622-4
11. Bialy-Golan, A., & Brenner, S. (1996). Penicillamine-induced bullous dermatoses. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 35(5), 732-742.
12. Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S. L., & Pirro, M. (2018). The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Current opinion in hematology*, 25(1), 44-51.
13. Campos-Castilla, B. (2020). Evaluación antiinflamatoria de un sistema nanoacarreador en gel que contiene penicilamina para el tratamiento de ratones CBA como modelo experimental de artritis reumatoide. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.

14. Casanova-Lau, K. P. (2020). Relación entre niveles séricos de factor reumatoide y grado de actividad de enfermedad en pacientes con artritis reumatoide. Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO).
15. Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Frontiers in immunology*, 9, 847.
16. Chen, D., Tang, T. X., Deng, H., Yang, X. P., & Tang, Z. H. (2021). Interleukin-7 biology and its effects on immune cells: mediator of generation, differentiation, survival, and homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 5156.
17. Choudhary, N., Bhatt, L. K., & Prabhavalkar, K. S. (2018). Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(3), 193–200.
18. Choy, E., & Panayi, G. (1999). Mechanisms of action of second-line agents and choice of drugs in combination therapy. *Clinical and experimental rheumatology*, 17, S-20.
19. Contreras, M. G., Bonilla-Lara, D., Pérez-Guerrero, E. E., Ruiz-Padilla, A. J., Saucedo-Ulloa, M., Saldaña-Anguiano, J. M., ... & González-López, L. (2015). Niveles altos de IL-6 asociados a efectos sistémicos y locales en la artritis reumatoide. *El Residente*, 10(1), 38-42.
20. Coomes, SM, Kannan, Y., Pelly, VS, Entwistle, LJ, Guidi, R., Pérez-Lloret, J., ... & Wilson, MS (2017). Las células CD4+ Th2 están directamente reguladas por la IL-10 durante la inflamación alérgica de las vías respiratorias. *Inmunología de las mucosas*, 10 (1), 150-161.
21. Coussette, U. M., & Biosca, M. E. A. (2015). Factor reumatoide con marcadores de riesgo aterogénico en pacientes con artritis reumatoide. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 34(1), 33-43.
22. de Diego, M., & del Arco, J. (2016). Geles. *Panorama actual del medicamento*, 40(398), 1042-1047.
23. De la Cruz Conde, J. C. (2014). Citocinas proinflamatorias: participación en la modulación de la actividad del melanoma experimental B16. Disertación doctoral, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea
24. Dinarello, C. A. (2019). The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(10), 612–632. doi:10.1038/s41584-019-0277-8
25. Edwards J., C. (2000). Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res.*;2:344–7.
26. Favalli, E. G. (2020). Understanding the role of interleukin-6 (IL-6) in the joint and beyond: a comprehensive review of IL-6 inhibition for the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology and therapy*, 7(3), 473-516.

27. Feria Díaz, G. E., Leyva Proenza, C. A., Concepción Parra, W., Castro Maquilón, A. G., & Larrea Meza, I. S. (2020). Papel de las citoquinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide. *Correo Científico Médico*, 24(1), 341-360.
28. Fischer, B. D., Adeyemo, A., O'Leary, M. E., & Bottaro, A. (2017). Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 1-9.
29. Florencio-Silva, R., da Silva Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells.
30. Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews Drug discovery*, 15(8), 551-567.
31. Gainza, G., Chu, W. S., Guy, R. H., Pedraz, J. L., Hernández, R. M., Delgado-Charro, B., & Igartua, M. (2015). Development and *in vitro* evaluation of lipid nanoparticle-based dressings for topical treatment of chronic wounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1-2), 404-411.
32. Gallego Londoño, V. (2017). Desarrollo de un sistema de liberación controlada de doxiciclina a partir de dos prototipos de encapsulación: secado por aspersión y liposomas.
33. Garbers, C., Heink, S., Korn, T. y Rose-John, S. (2018). Interleucina-6: diseño de terapias específicas para una citocina compleja. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17 (6), 395-412.
34. García, C. H., & Prada, C. M. (2009). Uso de fármacos modificadores de la enfermedad en artritis reumatoide. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 33(4), 99-109.
35. Gavira-Heredia, F. J. (2020). Preparación de liposomas biocompatibles. ventajas de su utilización en los tratamientos contra el cáncer. Tesis de licenciatura. Universidad de Sevilla. España.
36. Giulimondi, F., Digiaco, L., Pozzi, D., Palchetti, S., Vulpis, E., Capriotti, A. L., ... & Caracciolo, G. (2019). Interplay of protein corona and immune cells controls blood residency of liposomes. *Nature communications*, 10(1), 1-11.
37. Gómez-Gómez G., & Solís-Herruzo J.A. (2007). El lugar en terapéutica de... D-penicilamina. *GH Continuada*.;6(4):184-187.
38. González-Costa, M., & González, A. A. P. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: Desafío a la medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-44.
39. Grötsch, B., Bozec, A., & Schett, G. (2019). In vivo models of rheumatoid arthritis. In *Bone Research Protocols* (pp. 269-280). Humana Press, New York, NY.
40. Gschwandtner, M., Derler, R., & Midwood, K. S. (2019). More than just attractive: how CCL2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. *Frontiers in immunology*, 10, 2759.

41. Gwon, S. Y., Rhee, K. J., & Sung, H. J. (2018). Gene and protein expression profiles in a mouse model of collagen-induced arthritis. *International journal of medical sciences*, 15(1), 77.
42. Hajkhan, A. M., Pérez, A. A., Heras, C. B., & Gómez, A. P. (2021). Miopatías inflamatorias idiopáticas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(32), 1799-1808.
43. Han, L., Chen, Z., Yu, K., Yan, J., Li, T., Ba, X., ... & Tu, S. (2021). Interleukin 27 Signaling in Rheumatoid Arthritis Patients: God or Evil?. *Frontiers in Immunology*, 12.
44. Hernández-Flórez, D., & Valor, L. (2018). IL-6: su papel en la patogenia de la artritis reumatoide. *Consecuencias clínicas. Reumatol. clin., Supl.(Barc.)*, 7-10.
45. Herrera-Quiñones, G., Da Fieno, A. M., Compta, Y., Forns, X., & Mariño, Z. (2021). Enfermedad de Wilson: consideraciones para optimizar el seguimiento a largo plazo. *Gastroenterología y Hepatología*.
46. Hsiao, H. B., Hsieh, C. C., Wu, J. B., Lin, H., & Lin, W. C. (2016). Ginsenoside inhibits the inflammatory mediator release in a type-II collagen induced arthritis mouse model by regulating the T cells responses. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-12.
47. Igualada Quintanilla, J., Romero Candel, G., & Tejada Cifuentes, F. (2016). Metotrexato: toxicidad pulmonar, hepática y hematológica. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 9(3), 159-166.
48. Inglis, J. J., Simelyte, E., McCann, F. E., Criado, G., & Williams, R. O. (2008). Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. *Nature protocols*, 3(4), 612–618. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.19>
49. Ishak, R., & Abbas, O. (2013). Penicillamine revisited: historic overview and review of the clinical uses and cutaneous adverse effects. *American journal of clinical dermatology*, 14(3), 223-233.
50. Iturbe Balzola, A. (2018). Nuevos vectores en la aplicación vía tópica de medicamentos. *Liposomas (I)*. Tesis de licenciatura. Universidad Complutense.
51. Iturriaga, V., Mena, P., Oliveros, R., Cerda, C., Torres, D., & del Sol, M. (2018). Value of synovial fluid in the temporomandibular joint and its implications in articular pathology. *International Journal of Morphology*, 36(1), 297-302.
52. Iwaszko, M., Biały, S., & Bogunia-Kubik, K. (2021). Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis. *Cells*, 10(11), 3000.
53. Izquierdo, E., & Pablos, J. L. (2013). Fibroblastos sinoviales. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 14(4), 121-128.
54. Jacobelli, J., Buser, A. E., Heiden, D. L., & Friedman, R. S. (2022). Autoimmunity in motion: Mechanisms of immune regulation and destruction revealed by in vivo imaging. *Immunological Reviews*, 306(1), 181-199.

55. Jaffe, IA (1963). Comparación del efecto de la plasmaféresis y la penicilamina sobre el nivel de factor reumatoide circulante. *Anales de las enfermedades reumáticas*, 22 (2), 71.
56. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., ... & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2719.
57. Jarlborg, M., & Gabay, C. (2022). Mediadores de la inflamación reumática. *EMC-Aparato Locomotor*, 55(2), 1-16.
58. Jones, S. A., & Jenkins, B. J. (2018). Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 18(12), 773-789.
59. Kandikattu, H. K., Venkateshaiah, S. U., & Mishra, A. (2019). Synergy of Interleukin (IL)-5 and IL-18 in eosinophil mediated pathogenesis of allergic diseases. *Cytokine & growth factor reviews*, 47, 83-98.
60. Khorramizadeh, R., & Saadat, F. (2020). Animal models for human disease. *Animal Biotechnology*, 153-171.
61. Kolios, A. G., Tsokos, G. C., & Klatzmann, D. (2021). Interleukin-2 and regulatory T cells in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 1-18.
62. Kondo, N., Kuroda, T., & Kobayashi, D. (2021). Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 10922.
63. Llopis, A., & Díez, O. (2019). Liposomas en las terapias del siglo XXI. *Academia de farmacia de la comunitat valenciana*.
64. López Longo, F. J., Fernández, G., Monteagudo Sáez, I., & Carreño Pérez, L. (2002). Autoanticuerpos en la artritis reumatoide. *Revista Española de Reumatología Suplementos*, 1(1), 27-35.
65. Luan, J., Hu, Z., Cheng, J., Zhang, R., Yang, P., Guo, H., ... & Gou, X. (2021). Applicability and implementation of the collagen-induced arthritis mouse model, including protocols. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(3), 1-10.
66. Martín, A. P., Gómez, A. P., Lahoz, A. G., & Escudero, J. B. (2021). Inflamación, activación del endotelio vascular y trombosis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(33), 1906-1916.
67. Martínez, M. R., Morán-Álvarez, P., Arroyo-Palomo, J., Expósito, M. V., & Díaz, M. V. (2021). Artritis reumatoide. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(30), 1669-1680.
68. Martínez-Ferrer, A., Aguilar-Zamora, M., Montolio-Chiva, L., Valls-Pascual, E., Ybáñez-García, D., Alegre-Sancho, J.J. (2018). Tofacitinib: una nueva molécula en el tratamiento de la artritis reumatoide. *Revista de la SVR: Sociedad Valenciana de Reumatología*, 7(3), 12-18.

69. Mateos Maroto, A. (2020). Recubrimiento y transporte activo de liposomas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
70. Matsumoto, T., Takahashi, N., Kojima, T., Yoshioka, Y., Ishikawa, J., Furukawa, K. & Yamamoto, A. (2016). Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. *Arthritis research & therapy*, 18(1), 1-13.
71. Medina, A. A., Armentia, S. M., & Cortés, S. F. (2021). Alergia a los medicamentos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(28), 1564-1571.
72. Mendoza, U., & Alonso, M. E. (2015). Factor reumatoide con marcadores de riesgo aterogénico en pacientes con artritis reumatoide. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 34(1), 33-43.
73. Mirlekar, B., & Pylayeva-Gupta, Y. (2021). IL-12 family cytokines in cancer and immunotherapy. *Cancers*, 13(2), 167.
74. Mitra, A., Kundu-Raychaudhuri, S., Abria, C., Rona, A., Chaudhari, A. J., & Raychaudhuri, S. P. (2017). In-vivo quantitative assessment of the therapeutic response in a mouse model of collagen-induced arthritis using 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Clinical & Experimental Immunology*, 188(2), 293-298.
75. Miyoshi, M., & Liu, S. (2018). Collagen-induced arthritis models. In *Rheumatoid Arthritis* (pp. 3-7). Humana Press, New York, NY.
76. Molina, J. T. (2000). La IL-10 en la artritis reumatoide. *Revista española de reumatología: Órgano Oficial de la Sociedad Española de Reumatología*, 27(6), 300-302.
77. Montañés, S. G. (2016). Farmacogenética de la artritis reumatoide, papel de los neutrófilos en la patología (Doctoral dissertation, Universitat de València).
78. Monzón, A. J., Pérez, P. P., Múgica, M. Á., & Barmadah, S. E. (2021). Interpretación del estudio metabólico en la litiasis renal y su tratamiento. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 47(1), 38-46.
79. Morán-Álvarez, P., Arroyo-Palomo, J., Martínez, M. R., Corral, F. B., & Díaz, M. V. (2021). Artritis reumatoide: Tratamiento. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(30), 1681-1693.
80. Nicolaidis, N. C., Kyrtzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2015). Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), 6-19.
81. Nieves, A. T., Holguera, R. M., Gómez, A. P., & de Mon-Soto, M. Á. (2017). Artritis reumatoide. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(28), 1615-1625.
82. Nogué Xarau, S., & Corominas, N. (2018). Utilización del EDTA y otros quelantes en la intoxicación por plomo (saturnismo). *Boletín de Antídotos de Cataluña*.1(2),3.

83. Núñez del Prado, P. (2021). Nanopartículas en la terapia contra el cáncer: estudio comparativo de nanotúbulos de carbono y liposomas en el tratamiento del cáncer. Universidad Europea de Madrid. España.
84. Oteo, M. J. C. (2013). Synthesis, characterization and study of supramolecular gel materials based on glycoamphiphiles. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
85. Paunović, V., Carroll, H. P., Vandebroek, K., & Gadina, M. (2008). Signalling, inflammation and arthritis: crossed signals: the role of interleukin (IL)-12, -17, -23 and -27 in autoimmunity. *Rheumatology*, 47(6), 771-776.
86. Perez González, G. L. (2019). Fibras mucoadhesivas cargadas para la administración bucal de fármacos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California.
87. Pérez, D. C. D. M. L., Álvarez, C. T. M., & Aguirre, A. Á. (2022). Implicaciones de la capacidad funcional en la funcionalidad familiar de las personas con artritis reumatoide. *Atención Familiar*, 29(1), 51-53.
88. Pino Falconí, P. E., Moya Romero, K. S., Ramos Veintimilla, W. Y., & Guevara Acurio, A. L. (2021). Patogenia de la artritis reumatoide, manejo terapéutico actual y perspectivas futuras. *Revista Cubana de Reumatología*, 23(3).
89. Priyadharshini, B., Loschi, M., Newton, R. H., Zhang, J. W., Finn, K. K., Gerriets, V. A., ... & Turka, L. A. (2018). Cutting edge: TGF- β and phosphatidylinositol 3-kinase signals modulate distinct metabolism of regulatory T cell subsets. *The Journal of Immunology*, 201(8), 2215-2219.
90. Putra, A., Ridwan, F. B., Putridewi, A. I., Kustiyah, A. R., Wirastuti, K., Sadyah, N. A. C., ... & Munir, D. (2018). The role of TNF- α induced MSCs on suppressive inflammation by increasing TGF- β and IL-10. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 6(10), 1779.
91. Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas de Astudillo, L., & Rojas de Gáscue, B. (2016). Materiales polímeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108-130.
92. Reyes-Arellano, A. (2008). Geles moleculares y organogelantes. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 11(2), 101-104.
93. Rodríguez Jaillier, J. C., Posada Arango, A. M., & Martínez Pérez, D. A. (2015). Challenges faced in Latin America for the implementation of an ideal health-care model for rheumatoid arthritis patients: are we ready? *Clinical rheumatology*, 34 Suppl 1(Suppl 1), S79–S93.
94. Ruano-Aldea, M. (2013). Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.
95. Ruiz, J. M. (2013). Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de Lacasa. Tesis de doctorado, Universidad de Murcia.

96. Sanz-Martín, N., & Martínez-Miguel, P. (2019). Afectación renal por fármacos, medios diagnósticos y tóxicos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(82), 4840-4848.
97. Segura-González, A. K., Tovar-Sánchez, C., Franco-Cortés, M. A., & Rodríguez-Camacho, L. S. (2021). Efecto del Rituximab sobre los niveles circulantes de citocinas y quimiocinas producidas o no por los linfocitos B en pacientes con Artritis Reumatoide. *Latreia*, 35(3), 297-309
98. Singh, S., Anshita, D., & Ravichandiran, V. (2021). MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *International immunopharmacology*, 101, 107598.
99. Smolen, JS, Aletaha, D., Barton, A., Burmester, GR, Emery, P., Firestein, GS,... Yamamoto, K. (2018). Artritis reumatoide. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18001.
100. Španko, M., Strnadová, K., Pavlíček, A. J., Szabo, P., Kodet, O., Valach, J., ... & Lacina, L. (2021). IL-6 in the ecosystem of head and neck cancer: Possible therapeutic perspectives. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11027.
101. Su, X., Zhang, M., Qi, H., Gao, Y., Yang, Y., Yun, H., ... & Yang, R. (2022). Gut microbiota-derived metabolite 3-iodoleacetic acid together with LPS induces IL-35+ B cell generation. *Microbiome*, 10(1), 1-20.
102. Ullrich, K. A. M., Schulze, L. L., Paap, E. M., Müller, T. M., Neurath, M. F., & Zundler, S. (2020). Immunology of IL-12: An update on functional activities and implications for disease. *EXCLI journal*, 19, 1563.
103. Vicens Sancho, C. (2017). Bases moleculares y aspectos inmunológicos de la Artritis Reumatoide. Tesis de licenciatura. Universidad de las Islas Baleares. España.
104. Villanueva-Alvaro, D. (2019). Síntesis, optimización y caracterización de liposomas como transportadores moleculares. Tesis de licenciatura. Universidad de Cantabria.
105. Viñas Barros, A., & Bruscas Izu, C. (2021). Actualización del tratamiento de la artritis reumatoide: Revisión bibliográfica. Tesis de licenciatura. Universidad de Zaragoza. España.
106. Virtanen, T., A., Haikarainen, T., Raivola, J., & Silvennoinen, O. (2019). Selective JAKinibs: prospects in inflammatory and autoimmune diseases. *BioDrugs*, 33(1), 15-32.
107. Waldmann, T. A., Miljkovic, M. D., & Conlon, K. C. (2020). Interleukin-15 (dys) regulation of lymphoid homeostasis: Implications for therapy of autoimmunity and cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1).
108. Wang, L., Jia, J., Wang, C., Ma, X., Liao, C., Fu, Z., ... & Chen, Z. (2013). Inhibition of synovitis and joint destruction by a new single domain antibody specific for cyclophilin A in two different mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 15(6), 1-13.

109. Zampeli, E., Vlachoyiannopoulos, P. G., & Tzioufas, A. G. (2015). Treatment of rheumatoid arthritis: unraveling the conundrum. *Journal of autoimmunity*, 65, 1-18.
110. Zamri, F., & De Vries, T. J. (2020). Use of TNF inhibitors in rheumatoid arthritis and implications for the periodontal status: For the benefit of both? *Frontiers in immunology*, 11, 591365.
111. Zhang, Z., Cao, Y., Yuan, Q., Zhang, A., Zhang, K., & Wang, Z. (2019). Shexiang-wulong pills attenuate rheumatoid arthritis by alleviating inflammation in a mouse model of collagen-induced arthritis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
112. Zhao, J., Guo, S., Schrodi, S. J., & He, D. (2021). Molecular and cellular heterogeneity in rheumatoid arthritis: Mechanisms and clinical implications. *Frontiers in Immunology*, 12, 790122.