



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

**“Evaluación farmacológica del IMMP en un
modelo experimental de artritis”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M.F. CARLOS ANTONIO ARJONA CANUL

DIRECTOR DE TESIS

DR. JORGE ALBERTO REYES ESPARZA

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO DEL 2020

Este trabajo se realizó en el laboratorio L-6 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado del Morelos, dentro del programa de Doctorado en Farmacia, bajo la dirección del Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza, en colaboración con el laboratorio de Patología del Hospital General Tláhuac con asesoría del Dr. Mario Garcia y en el Laboratorio de Patología del INSP con la Asesoría del M. en C. Francisco García, con el apoyo financiero de la beca No 228513, para estudios de Posgrado que otorga CONACYT.

Agradecimientos:

A mis padres Daniel Alfonso y María del Rosario por todo su apoyo, cariño, paciencia, esfuerzo y aliento para seguir adelante.

A mis hermanos, Guadalupe, Luis y Amelia y mis cuñados Jorge y Ezequías, por todo su apoyo brindado a lo largo de todos mis estudios de Doctorado.

A mis abuelos que me han impulsado a salir adelante a pesar de la adversidad.

A mi gran amigo, cómplice en esta vida Norvin, que no tengo palabras para agradecer toda lo que me has ayudado.

Al Dr. Jorge y la Dra. Lourdes, por recibirme en su laboratorio todo este tiempo de desarrollo desde la maestría hasta el Doctorado; por tener mucha pero mucha paciencia conmigo, por transmitirme todos sus conocimientos, consejos y regaños en casi más de dos años.

A los miembros de mi jurado y revisores de la tesis, por toda su infinita paciencia

A los Drs. Dea, Efrén, Angélica, Blanquita, Nallelyt, Judith, Montiel y Verónica por los consejos y conocimientos recibidos a lo largo del desarrollo del Doctorado

Al Dr. Miguel Rosado por creer en mi y por darme la fuerza y valor para comenzar este proyecto de vida.

A mis hermanos adoptivos del L-6 Toñita, Eli, Brisa, Lorena, Ana Isabel, Diana, Ángel, Ulises, por brindarme su amistad y apoyo en todo este tiempo.

A mis grandes amigos que conocí en esta aventura que comencé hace unos años, Diana, Virgilio, y Talia, la legión extranjera, por su valiosa amistad.

A mis excompañeros de Trabajo y mi segunda familia de la Universidad Latinoamericana, los Drs. Arreola, Lopez del Prado, Estrada, Ponciano, Alejandro; a las Dras. Velazquez, Nora Barrios, Gloria Pérez, Mariana, Liz y Lupita; por alentarme a terminar.

A mis amigos que conocí en esta etapa de vida Peter, Simón, Jaime y Enrique.

A todos mis alumnos y compañeros de trabajo de ULA por su paciencia y apoyo.

ÍNDICE	Página
I Índice de figuras	I
II Índice de tablas	II
III Abreviaturas	III
1.0 RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
1.2 INTRODUCCIÓN	3
1.2.1 ARTICULACIONES	3
1.2.2 ENFERMEDADES REUMÁTICAS	4
1.2.3 ARTRITIS REUMATOIDE	5
1.2.3.1 EPIDEMIOLOGIA	5
1.2.3.1.1 Situación Mundial	5
1.2.3.1.2 Situación en México	5
1.2.3.1.3 Comorbilidad	6
2.0 ANTECEDENTES	7
2.1 ETIOLOGIA	7
2.2 FACTORES DE RIESGO	8
2.3 ANATOMIA PATOLOGICA	8
2.3.1 SISTEMA INMUNE	9
2.3.2 TOLERANCIA INMUNOLOGICA	10
2.3.3 SISTEMA INMUNE Y LA ARTRITIS REUMATOIDE	12
2.3.3.1 Papel de las células T	13
2.3.3.2 Papel de las células B	13
2.3.3.3 Neutrófilos	13
2.3.3.4 Macrófagos	14
2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	14
2.4.1 Manifestaciones articulares	14
2.4.2 Manifestaciones extraarticulares	16
2.5 CONCECUENCIAS DE LA ENFERMEDAD	17
2.6 DIAGNÓSTICO	17
2.7 TRATAMIENTO	19
2.7.1 Tratamiento no farmacológico	19
2.7.2 Tratamiento farmacológico	20
2.7.2.1 Analgésicos no esteroides (AINES)	20
2.7.2.2 Glucocorticoides	21
2.7.2.3 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME)	21
2.7.3 NUEVOS TRATAMIENTOS	22
2.7.3.1 Inmunomoduladores	23
2.7.3.1.1 Metallo-peptido Inmunomodulador (IMMP)	23
3.0 JUSTIFICACIÓN	25
4.0 HIPÓTESIS	26
5.0 OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos particulares	26

	Página
6.0 METODOLOGÍA	27
6.1 Cuantificación de la inflamación	28
6.2 Cuantificación del daño articular	28
6.3 Evaluación de efectos sistémicos	29
6.4 Cuantificación de citocinas séricas.	29
6.5 Implementación del modelo	29
7.0 RESULTADOS	33
7.1 Efecto de diferentes dosis del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas.	33
7.2 Evaluación del efecto del IMMP (50ng/kg) sobre la inflamación y daño articular en el modelo de artritis	36
7.3 Comparación del efecto del IMMP y el MTX sobre la inflamación y el daño articular	39
8.0 DISCUSIÓN	48
8.1 Efecto de diferentes dosis del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas.	48
8.2 Evaluación del efecto del IMMP (50ng/kg) sobre la inflamación y daño articular en el modelo de artritis	48
8.3 Comparación del efecto del IMMP y el MTX sobre la inflamación y el daño articular	49
9.0 CONCLUSIONES	53
9.1 Conclusión general	53
9.2 Conclusiones particulares	53
10.0 PERSPECTIVAS	54
11.0 REFERENCIAS	55

I Índice de figuras	Página
Figura No. 1 Fisiopatología de la Artritis reumatoide	12
Figura No. 2 Caracterización del modelo de artritis inducido por colágeno bovino tipo II. Comparación de la altura de las almohadillas caudales entre el grupo control y el grupo con artritis.	30
Figura No. 3 Caracterización del modelo de artritis inducido por colágeno bovino tipo II. A: Comparación macroscópica, B: radiográfica, y C: Histológica por H&E del daño articular entre el grupo control y el grupo con artritis	31
Figura No. 4 Caracterización del modelo de artritis inducido por colágeno bovino tipo II. Comparación histológica por Hematoxilina y Eosina del Timo, Bazo, Riñón e Hígado entre el grupo control y el grupo con Artritis	32
Figura No. 5 Evaluación macroscópica (A) y radiográfica (B) del efecto de diferentes dosis del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas	34
Figura No. 6 Curva dosis respuesta del efecto del IMMP sobre la inflamación de las articulaciones caudales de ratas artríticas.	35
Figura No. 7 Evaluación del efecto del IMMP sobre el daño articular en un modelo de artritis. A: Evaluación macroscópica. B: Evaluación radiográfica. C Evaluación histológica	37
Figura No. 8 Efecto del IMMP sobre la altura de las almohadillas caudales en ratas con artritis.	38
Figura No. 9 Comparación histológica por Hematoxilina y Eosina del Timo y Bazo, entre el grupo con Artritis y el grupo con Artritis y tratado con IMMP	39
Figura No. 10 Efecto del IMMP en las almohadillas de las ratas con artritis. A) Evaluación macroscópica y B) radiográfica.	40
Figura No. 11 Comparación del efecto del IMMP y el MTX en las almohadillas en las ratas con artritis después de tres semanas de tratamiento.	41
Figura No. 12 Comparación del efecto farmacológico del IMMP y el MTX en las almohadillas caudales en las ratas con artritis. Evaluación histológica por H & E (A) y por Tricrómica de Masson (B) del daño articular	43
Figura No. 13 Comparación del efecto del IMMP y el Metotrexato sobre timo (A) y el bazo (B), respectivamente, de ratas artríticas. Evaluación histológica por H &E.	44
Figura No. 14 Efecto del tratamiento con IMMP y MTX sobre los niveles séricos de IL-1β, IL-4 e IFN-γ en ratas artríticas.	45

Figura No. 15 Niveles séricos de la quimiocina MCP-1 en ratas artríticas tratadas con IMMP y MTX. 46

Figura No. 16 Comparación del efecto del IMMP y el Metotrexato sobre el hígado en ratas artríticas. Evaluación histológica por H & E. 47

II Índice de tablas	Página
Tabla No. 1 Esquema de tratamiento de la evaluación de la Curva dosis-respuesta del IMMP	27
Tabla No. 2 Esquema de tratamiento de la evaluación del efecto de IMMP sobre la artritis.	28
Tabla No. 3 Evaluación del efecto farmacológico del IMMP vs Metotrexato	28
Tabla No. 4 Diferentes grados de reducción de la inflamación en respuesta a cuatro diferentes dosis del IMMP	36
Tabla No. 5. Diferentes grados de reducción de la inflamación en respuesta al IMMP y al Metotrexato	41
Tabla No. 6 Comparación del IMMP y el MTX sobre el daño articular en las almohadillas caudales de las ratas con artritis.	43

III Abreviaturas

Antígeno Leucocitario Humano	HLA
Clúster de diferenciación cuatro	CD4+
Receptor de células T	TCR
Fracción Cristalizable	Fc
Complejo Mayor de Histocompatibilidad	MHC
Artritis Reumatoide	AR
Interleucina	IL
Buffer Salino de Fosfatos	PBS
Metalopéptido Inmunomodulador	IMMP
Metotrexato	MTX
Hematoxilina y Eosina	H&E
Metaloproteasa	MMP

1.0 RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica degenerativa es la más frecuente de las enfermedades reumáticas, que se caracteriza por ser un proceso inflamatorio autoinmune. En nuestro país es considerada una de las primeras 20 causas de consulta médica. Existen diferentes tratamientos para tratar la enfermedad, como analgésicos, antiinflamatorios y fármacos que modifican la enfermedad. Sin embargo, estos tratamientos producen efectos adversos y tóxicos en los pacientes, y no logran controlar la respuesta inmune responsable de la enfermedad. Dado que el IMMP es un octapéptido que en estudios previos preclínicos y clínicos ha mostrado poseer la capacidad de modular la respuesta inmune. En el presente estudio se evaluó el efecto farmacológico y toxicológico del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en un modelo experimental de artritis inducida por colágeno tipo II en ratas Wistar. Los resultados mostraron que las ratas con artritis que fueron tratadas con 50 ng/kg de IMMP disminuye la inflamación y daño articular. La disminución de la inflamación se observó macroscópicamente al disminuir el tamaño de la almohadilla de las articulaciones caudales de las ratas y al reducir los niveles séricos de la citocina proinflamatoria IL-1 β , e incrementa los niveles de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IFN- γ . El daño articular se evaluó por medio de radiografías y cortes histológicos con las tinciones de H & E y Tricrómica de Massón; el IMMP disminuye la destrucción de cartílago y hueso, disminuye la hiperplasia sinovial y evita la reducción del espacio sinovial. Al evaluar histológicamente el efecto del IMMP sobre el Timo y el Bazo se apreció una disminución de los centros de proliferación en ambos órganos, tampoco produce efectos tóxicos en el hígado ni en los riñones en comparación con un tratamiento como el Metotrexato. Estos resultados nos sugieren que el IMMP puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la artritis al regular la respuesta inmune.

1.1 ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is a chronic degenerative disease is the most frequent of the rheumatic diseases, which is characterized as an autoimmune inflammatory process. In our country one of the first 20 causes of medical consultation is described. There are different treatments to treat the disease, such as analgesics, anti-inflammatories and drugs that modify the disease. However, these treatments control the adverse and toxic effects in patients, and fail to control the immune response responsible for the disease. The IMMP is an octapeptide that in previous preclinical and clinical studies has demonstrated the ability to modulate the immune response. The present study evaluated the pharmacological and toxicological effect of IMMP on inflammation and joint damage in experimental model of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. The results that affect rats with arthritis who were treated with 50 ng / kg of IMMP detect inflammation and joint damage. The decrease in inflammation is reduced macroscopically by decreasing the pad size of the caudal joints of the rats and by reducing the serum levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , and increasing the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IFN- γ . Joint damage was assessed by radiographs and histological sections with H&E and Trichrome stains of Massón; The IMMP modified the destruction of cartilage and bone, modified synovial hyperplasia and prevents the reduction of synovial space. When histologically assessing the effect of the IMMP on the thymus and the spleen, a decrease in the proliferation centers in both organs was observed, nor were there effects on the liver or kidneys compared to a treatment such as Methotrexate. These results indicate that IMMP can be a good alternative for the treatment of arthritis by regulating the immune response.

1.2 INTRODUCCIÓN

El aparato locomotor permite al ser humano interactuar con el medio que le rodea mediante el movimiento o locomoción. Este aparato está formado por las estructuras encargadas de sostener y originar los movimientos del cuerpo, lo constituyen dos sistemas; el sistema óseo el cual es el elemento pasivo, formado por los huesos, los cartílagos, los ligamentos y las articulaciones; y el sistema muscular, el cual está formado por los músculos, los cuales al contraerse provocan el movimiento del cuerpo. Además de estos dos sistemas, se debe considerar el sistema nervioso, ya que éste es el responsable de la coordinación y la estimulación de los músculos para producir el movimiento (Burgos PR, 2002).

1.2.1 ARTICULACIONES

Las articulaciones son la unión funcional de dos o más huesos; se pueden clasificar en tres grandes grupos: articulaciones fijas (sinartrosis), articulaciones semimóviles (cartilaginosas) y articulaciones móviles (sinoviales). Las sinartrosis son articulaciones que dan integridad estructural, permiten un mínimo movimiento y carecen de espacio articular, un ejemplo son las suturas craneales. Las articulaciones semimóviles se dan entre cartílago y hueso, permiten muy poca movilidad, un ejemplo son la unión de las costillas al esternón. Las articulaciones sinoviales poseen una cápsula sinovial, tienen gran movilidad, están formadas por osificación endocondrial, permanecen unidas por densas capas fibrosas reforzadas por ligamentos y músculos, por ejemplo, el codo. El espacio articular limita con la membrana sinovial, la cual está firmemente anclada a la cavidad subyacente. Sus contornos son lisos excepto cerca de las intersecciones óseas, donde forman números pliegues. Está revestida por varias capas superpuestas (1 a 4 capas) de sinoviocitos que no llegan a cubrir la superficie del cartílago articular. El revestimiento sinovial carece de membrana basal y se fusiona con el estroma de tejido conjuntivo laxo subyacente que suele estar muy vascularizado. La ausencia de esta membrana basal permite el intercambio entre la sangre y el líquido sinovial se produce rápidamente.

El líquido sinovial es transparente y viscoso, es un filtrado del plasma que contiene principalmente ácido hialurónico; actúa como un lubricante y permite la nutrición del cartílago hialino articular. Este cartílago hialino es un tejido conjuntivo adaptado para funcionar como un amortiguador elástico y como una superficie resistente, carente de riego sanguíneo y de drenaje linfático. En el adulto este cartílago hialino tiene un espesor entre

2 a 4 mm siendo más grueso en la zona periférica de la articulación y está formado por colágeno tipo II, agua, proteoglicanos, y condrocitos. Las fibras de colágeno están dispuesta a manera de arcos, de tal forma que esta superficie es horizontal permite soportar la presión y reducir las fricciones. Los condrocitos son los que elaboran y digieren la matriz del cartílago de manera enzimática, generando un recambio que está regulado por los mismos condrocitos a través de enzimas proteolíticas e inhibidores de éstas (Inoue T, 2019; Coeran RS, 2000; Knedla A, 2007).

1.2.2 ENFERMEDADES REUMÁTICAS

El conjunto de enfermedades que afecta a los componentes del aparato locomotor se les conoce como enfermedades reumáticas. Las enfermedades reumáticas se pueden clasificar en siete grupos muy diferentes, según su origen y causa.

Enfermedades metabólicas óseas.

Infecciones y tumores.

Reumatismos degenerativos.

Reumatismo por microcristales.

Reumatismos de partes blandas.

Reumatismos no articulares generalizados.

Reumatismos inflamatorios crónicos.

Es en este último grupo es donde se agrupan las principales enfermedades reumáticas tales como el lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerodermia, síndrome de Sjogren y la artritis reumatoide. Estas patologías se caracterizan por presentar una inflamación de la membrana sinovial y la causa, en algunas de ellas, es autoinmune; suelen ser muy graves e incluso incapacitantes (Burgos PR, 2002).

1.2.3 ARTRITIS REUMATOIDE

1.2.3.1 EPIDEMIOLOGIA

1.2.3.1.1 Situación mundial

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica que afecta principalmente a las articulaciones sinoviales y a otros órganos corazón, pulmones y vasos sanguíneos. La artritis reumatoide es una inflamación crónica caracterizada por un infiltrado de macrófagos, células dendríticas, linfocitos y neutrófilos; los cuales se acumulan en el tejido sinovial (Cornish AL, 2009).

Está presente en todos los grupos étnicos del mundo, su prevalencia mundial es de 0.3 a 1.5%; en algunas tribus nativas de amerindios en los estados unidos se ha encontrado una prevalencia mayor (3.5 a 5.3%). El intervalo de edad donde ocurre la mayor frecuencia de esta enfermedad es de 40 a 65 años, no obstante, ésta se puede presentar a edades más tempranas e incluso en la niñez; afecta de dos a tres veces más a la población de mujeres que a los hombres. Produce discapacidad y disminución de la calidad de vida. Es la segunda enfermedad reumática que origina un mayor gasto económico tras la artrosis, conlleva el triple costo de atención médica, doble tasa de hospitalización y cuatro veces más visitas médicas que otras enfermedades, lo cual resulta en un alto costo para los sistemas de salud (Sherine EG, 2009; Gabriel SE, 2009; Emery P, 2002).

1.2.3.1.2 Situación en México

Las enfermedades Reumatoides afectan a aproximadamente 10 millones de mexicanos, siendo la Artritis Reumatoide y la Osteoartritis las dos más comunes en nuestro país, pues afectan a 1 y 8 millones de personas respectivamente. Un estudio realizado por Peláez-Ballestas en el 2011 en 5 regiones de México con una muestra de 19213 individuos, encontró que alrededor del 14% de la población de estudio padecía de alguna enfermedad reumática. Dentro de éstas, la AR tuvo una prevalencia de 1.6% dentro de la población de estudio (Peláez-Ballestas I, 2011).

Esta enfermedad predomina en el sexo femenino con un promedio de edad a partir de los 45 años. Sin embargo, puede aparecer en pacientes jóvenes, en México existen datos registrados de pacientes con inicio de enfermedad a los 12 años (Rodríguez-Jaillier JC, 2015)

Esta enfermedad trae una gran carga económica para el paciente como para su familia, en México, la población de más bajos recursos económicos es la que padece artritis reumatoide (Massardo L, 2012).

Por si esto fuera poco, una persona que padece Artritis Reumatoide tarda un promedio de 3 años en acudir al reumatólogo, presentando daños articulares severos entre otras complicaciones. Esta situación refleja también la falta de concientización y educación sobre la enfermedad (Álvarez-Hernández E, 2012).

La Secretaría de Salud no lleva a cabo ningún programa o iniciativa para el control de las enfermedades reumáticas. Su acción se limita a garantizar el acceso a su tratamiento, dado que los medicamentos para la Artritis Reumatoide se encuentran cubiertos por las principales instituciones de salud (Seguro popular, 2016: IMSS, 2009). Sin embargo, dentro de estas instituciones, tampoco se observa un programa específico para controlar y atender estas enfermedades desde los aspectos educativos y preventivos. El diagnóstico y tratamiento en etapa avanzada se encuentra cubierto tanto a través del Seguro Popular, como el IMSS y el ISSSTE (Mould-Quevedo J, 2008).

1.2.3.1.3 Comorbilidad

En los pacientes con artritis reumatoide es muy común que presente otros padecimientos o que sean susceptibles a otras enfermedades. Las enfermedades cardiovasculares son más frecuentes en pacientes con artritis reumatoide porque ambos padecimientos tienen el mismo mecanismo fisiopatológico (un proceso inflamatorio crónico); en los pacientes con artritis reumatoide también se incrementa la predisposición a padecer cáncer en general, leucemias, linfomas de Hodking e infecciones microbianas, entre otros (Michaud K, 2007).

2.0 ANTECEDENTES

2.1 ETIOLOGIA

Se desconoce la causa de la artritis reumatoide, hasta el momento se manejan tres teorías que tratan de explicar el origen de esta enfermedad:

Factores genéticos del huésped

Infección microbiana desencadenante

Anormalidades inmunoreguladoras y autoinmunidad

Existen estudios que demuestran una susceptibilidad genética a la artritis reumatoide, por la presencia de determinados alelos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad DR4 (HLA-DR4), los cuales se presentan con mayor frecuencia en individuos afectados, mientras que en individuos que presentan el complejo HLA-DR1 son menos propensos a desarrollar la enfermedad. Además, se ha demostrado que la gravedad de la enfermedad se ve incrementada si la persona posee los dos alelos del complejo HLA-DR4 (homocigoto). A pesar de estos hallazgos existen individuos que carecen de los alelos para el HLA-DR4 y presentan artritis reumatoide (Pratt AG, 2009).

La segunda teoría apunta a que el origen de la AR es infeccioso, entre alguno de los agentes infecciosos que se cree pueden ser responsables, figuran los estreptococos, difteroides, micoplasmas, *Clostridium perfringes*, rubeola, parvovirus B19, y el virus de Epstein–Barr, entre otros. Todos estos agentes infecciosos son capaces de inducir procesos inflamatorios agudos, sin embargo, no se ha podido determinar si son capaces de producir una inflamación crónica (Alam J, 2017; Pratt AG, 2009).

El sistema inmune es un sistema de protección que posee el organismo para protegerse de las infecciones y de otros agentes dañinos. En general nuestro sistema inmune es capaz de reconocer tanto la invasión de agentes patógenos como las sustancias que ellos producen, de las sustancias endógenas de nuestro cuerpo. Sin embargo, en el caso de las enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, el sistema inmune carece de esta regulación lo cual lleva a una respuesta inflamatoria descontrolada y exacerbada (Alam J, 2017; Drexler SK, 2008).

La última teoría menciona que debido a que las moléculas de clase II del MHC son las encargadas de presentar antígenos al receptor de células T (TCR) en los linfocitos cooperadores CD4+, pareciera ser probable que existiera una respuesta inmune anormal, ya sea celular o humoral contra un antígeno, extraño o propio. En esta última posibilidad, se tienen varios candidatos como el colágeno tipo II, proteoglicanos, proteínas de choque térmico e inmunoglobulinas. Los cuales son capaces de inducir la producción de autoanticuerpos contra la fracción Fc de las inmunoglobulinas G o el factor reumatoide (pacientes seropositivos). Sin embargo, este marcador no es exclusivo de la AR, ya que aparece en presencia de otras enfermedades como sífilis, tuberculosis, endocarditis bacteriana, etc. (Pratt AG, 2009).

2.1 FACTORES DE RIESGO

Como se mencionó previamente, hasta la fecha no se ha podido determinar el agente etiológico responsable de originar la enfermedad, solamente contamos con teorías; sin embargo, se han realizado estudios de los diferentes factores de riesgos que predisponen a padecer artritis reumatoide. Algunos de los factores de riesgo que se encontraron fueron: el sexo femenino, un historial positivo de familiares que haya o padezcan artritis reumatoide, la edad (mayor a 45 años), la exposición a silicatos y el fumar. También se han encontrado factores que disminuyen el riesgo de padecer esta enfermedad; encontramos entre estos el alto consumo de vitamina D, el consumo de té, el uso de anticonceptivos orales y el embarazo (Rindfleisch JA, 2005)

2.3 ANATOMIA PATOLOGICA

La principal característica anatomopatológica de la artritis reumatoide (AR) es la proliferación y la tumoración (pannus) de la membrana sinovial con erosión del cartílago articular y el hueso subcondrial. La masa de células sinoviales conocida como pannus ocasiona la destrucción de estructuras intra y periarticulares, lo cual genera las deformaciones y la disfunción de la articulación que se puede observar en los pacientes (Alam J, 2017; Scott DL, 2010; Tutuncu Z, 2007; Kndela A, 2007).

La participación de la respuesta inmune celular y humoral, sobre la membrana sinovial, es necesaria para el desarrollo de las manifestaciones anatomopatológica. El proceso inicia cuando los linfocitos T son activados por un antígeno o antígenos desconocidos presentados por alguna de las células presentadoras presentes en los

antígenos, como dendríticas, macrófagos o células B. Esta activación provoca que los linfocitos T produzcan y liberen una serie de citocinas proinflamatorias, que, en su conjunto, promueve la proliferación sinovial e inflamación, así como la destrucción del cartílago y el hueso. Las principales citocinas proinflamatorias involucradas en la artritis reumatoide son: IL-1, 2, 6, 8, el factor de necrosis (TNF- α), factor estimulante de granulocitos (GM-CSF) y el factor beta de transformación del crecimiento (TGF- β) (Ridgley LA, 2018; Scott DL, 2010; Pablos-Álvarez JL, 2009; Drexler S, 2008; Miossec P, 2008; Iwamoto T, 2008; Brennan F, 2008).

Por otro lado, la respuesta inmune humoral también participa en la artritis reumatoide; las células B/células plasmáticas son activadas en la cavidad sinovial y comienzan a liberar IgM (factor reumatoide) que interactúa con la fracción Fc de las IgG del paciente, lo cual ocasiona la formación de inmunocomplejos que activan al complemento por la vía clásica. Como consecuencia de la activación del complemento, aumenta la permeabilidad vascular y la fagocitosis de los inmunocomplejos por parte de las células fagocíticas (Macrófagos y neutrófilos). Algunos de los complejos antígeno- anticuerpo formados dentro de la cavidad sinovial, pueden quedar atrapados en el cartílago hialino y causar daños en la matriz celular, otros complejos pueden provocar que las células fagocíticas liberen enzimas lisosomales y/o ROS, los cuales dañan la matriz extracelular, el cartílago y el hueso (Ridgley LA, 2018; Alam J, 2017; Scott DL, 2010; Schett G, 2008; Knedla A, 2007; Cope AP, 2008; Panayi GS, 2005).

Una vez iniciada la respuesta inmune, las primeras alteraciones observables incluyen lesiones microvasculares caracterizadas por edema intersticial e infiltración de células mononucleares, linfocitos T, leucocitos polimorfonucleares y células plasmáticas, así como proliferación moderada de células sinoviales. Conforme el proceso avanza aumenta la hiperplasia de las células del recubrimiento articular; al mismo tiempo el líquido sinovial (normalmente sin células), comienza a tener células mononucleares inflamatorias las cuales se pueden agregar en folículos alrededor de las vénulas poscapilares. El pannus se torna vellosa y altamente vascularizada por arteriolas, capilares y vénulas (Alam J, 2017; Scott DL, 2010; Van Zonneveld AJ, 2009; Cope AP, 2008).

2.3.1 SISTEMA INMUNE

El conjunto de células y moléculas responsables de proteger al cuerpo de las enfermedades constituyen el sistema inmunitario, y la reacción conjunta y coordinada frente

a la entrada de sustancias extrañas se le conoce como respuesta inmune. Las primeras respuestas frente a un microorganismo son generadas por la inmunidad innata, mientras que las respuestas posteriores son generadas por la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata (natural o espontánea), constituye la primera línea de defensa frente al ataque de los agentes patógenos, responden de manera rápida y del mismo modo frente a los agentes dañinos. Los principales elementos que conforman este tipo de inmunidad son: las barreras físicas y químicas (epitelios, mucosas, lágrimas), células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), proteínas sanguíneas (complemento, mediadores de la inflamación) y las citocinas (moléculas reguladoras de la inmunidad innata). Por otro lado, la inmunidad adaptativa es estimulada ante la exposición de un microorganismo, aumenta conforme se incrementa el número de exposiciones, es altamente específica y tiene capacidad de memoria. Los componentes de la inmunidad adaptativa (adquirida) son: los linfocitos (T y B), células presentadoras de antígenos, células efectoras y los anticuerpos; dependiendo cual sea el componente que produzca la respuesta inmune adaptativa puede clasificarse en inmunidad celular o humoral, respectivamente (Abbas AK, 2012).

La inmunidad innata recurre a diferentes receptores para el reconocimiento de las estructuras que solo están presentes en los microorganismos, que en general son indispensables para la supervivencia de dichos microorganismos (ácidos nucleicos, azúcares, glucolípidos y proteínas). Después de ser reconocidos, los microorganismos pueden ser fagocitados por los macrófagos, por los neutrófilos o lisados por el complemento. Durante la respuesta de la inmunidad innata se liberan diversas moléculas (citocinas), las cuales son capaces de estimular la inmunidad adaptativa e influir en la sobre la naturaleza de esta respuesta. La respuesta de la inmunidad adaptativa depende principalmente de la activación de los linfocitos a través de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas) y de las células efectoras que eliminan los antígenos. Tanto los linfocitos B y T expresan receptores específicos que reconocen al antígeno presentado por los macrófagos o células dendríticas (Abbas A K et al, 2012).

2.3.2 TOLERANCIA INMUNOLOGICA

La tolerancia inmunitaria se define como la falta de respuesta frente a un antígeno inducida por la exposición previa a ese antígeno. Esta tolerancia es una propiedad fundamental del sistema inmunitario normal, el fallo de ésta provoca enfermedades por

hipersensibilidad. Las respuestas inmunitarias patológicas pueden ser respuestas inmunes dirigidas contra antígenos propios o respuestas no controladas y excesivas frente antígenos propios o respuestas no controladas y excesivas contra antígenos extraños (Satpute SR, 2008).

Las enfermedades del sistema inmune en general se pueden dividir en los siguientes tipos:

Enfermedades autoinmunes; son causadas por reacciones inmunitarias contra antígenos propios.

Síndromes de inmunodeficiencia inmunitaria; son originados por defectos genéticos o adquiridos que provocan una disminución de la respuesta inmune.

Reacciones de hipersensibilidad; se produce una lesión tisular debido a una respuesta inmune exacerbada.

Dentro de las reacciones de hipersensibilidad encontramos a cuatro diferentes tipos:

Hipersensibilidad tipo 1 o de tipo anafiláctico, puede definirse como una reacción inmunológica de desarrollo rápido, que ocurre pocos minutos después de la combinación de un antígeno y un anticuerpo unido a los mastocitos o a basófilos en personas previamente sensibilizadas al antígeno en cuestión; un ejemplo de este tipo son las reacciones alérgicas al polen. Hipersensibilidad tipo II o hipersensibilidad de tipo citotóxico; esta se encuentra mediada por anticuerpos dirigidos contra antígenos existentes en la superficie de las células o en otros componentes de los tejidos; como por ejemplo la anemia perniciosa. Hipersensibilidad de tipo III o mediada por inmunocomplejos; se deben a complejos antígenos – anticuerpos que lesionan los tejidos a causa de su capacidad para activar al complemento, por ejemplo, la artritis reumatoide. Hipersensibilidad de tipo IV o hipersensibilidad tardía, este tipo de reacción esta mediada por linfocitos T, requiere más tiempo para llevarse a cabo, se desencadena una respuesta inmune que causa lesiones graves en los tejidos, como es el caso de la esclerosis múltiple (Abbas AK, 2012).

2.3.3 SISTEMA INMUNE Y LA ARTRITIS REUMATOIDE

El sistema inmune es parte importante en la fisiopatología de la artritis reumatoide, en donde las diferentes células contribuyen a desarrollar la enfermedad (Ver figura No. 1).

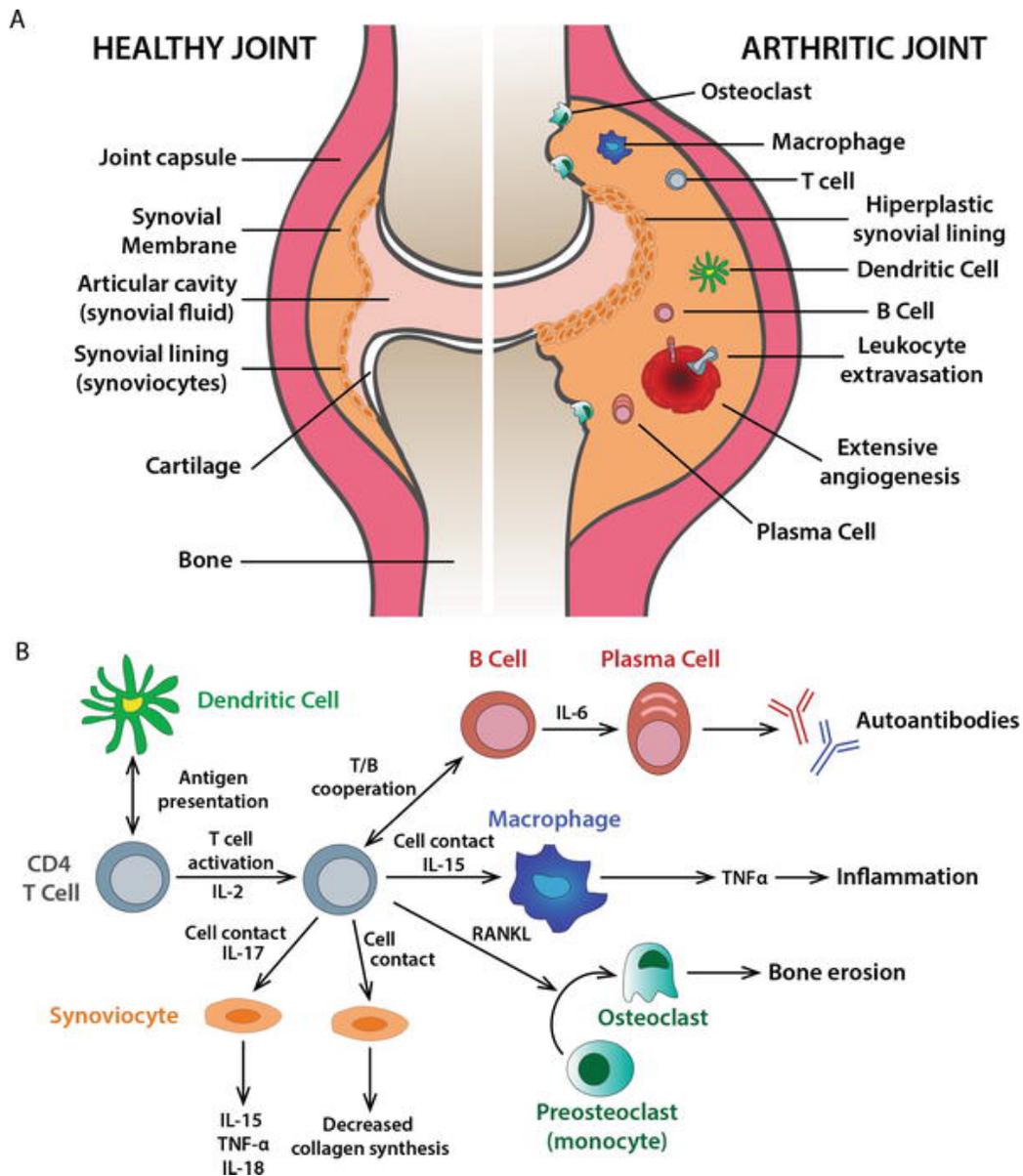


Figura No.1 Fisiopatología de la Artritis reumatoide. Tomado de Physiology and Pathology of Autoimmune Diseases: Role of CD4+ T cells in Rheumatoid Arthritis.

2.3.3.1 Papel de las células T

En la respuesta inmune de la artritis reumatoide las células presentadoras de antígenos (APC's) después de captar el antígeno, lo procesan hasta obtener pequeños péptidos que son colocados en el complejo mayor de histocompatibilidad HLA-DR4 para luego ser expuestos en su superficie. Posteriormente las células T CD4+, con ayuda de su receptor (TCR), reconocen el antígeno extraño y se activa. Después de ser activados los linfocitos T aumentan de tamaño y comienzan a expresar en su membrana numerosas moléculas, tales como, CD69 (activador de macrófagos), TNF- α (activador de macrófagos) y RANKL (activador de osteoclastos). Además de producir cambios en su superficie las células T activadas comienzan a liberar mediadores citocinas; IL-2, IL-17 (activador de osteoclastos), IFN- γ (Factor estimulante de los macrófagos para liberar interleucinas proinflamatorias) (Alam J, 2017; Komatsu N, 2015; Cope AP, 2008; Ranjeny T, 2008).

2.3.3.2 Papel de las células B

Los linfocitos B, al igual que las células presentadoras de antígenos (APC's), pueden procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, para que éstos se activen y produzcan la respuesta inflamatoria. Otra función que realizan los linfocitos B activados es la producción del factor reumatoide, el cual es responsable de la formación de los inmunocomplejos en el espacio sinovial y de la autoperpetuación de los linfocitos B (Alam J, 2017; Panayi GS, 2005).

2.3.3.3 Neutrófilos

La neutrofilia y la mielopoyesis son dos características de la artritis reumatoide activa, sin embargo, los neutrófilos no son considerados como células efectoras en esta enfermedad. Una gran cantidad de estas células se infiltran en el líquido sinovial en la AR, donde puede liberar una gran cantidad de mediadores inflamatorios, incluyendo el contenido de sus gránulos primarios y secundarios, citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno y proteasas. Las quimiocinas derivadas de los neutrófilos podrían tener un papel importante en atraer a otras células inmunes al sitio de inflamación. Los neutrófilos pueden localizarse en la unión cartílago-pannus y contribuir a la erosión del cartílago. Un estudio encontró un mayor número de neutrófilos inmaduros en el médula ósea de cresta ilíaca de pacientes con artritis reumatoide en comparación con el grupo control sin artritis reumatoide, además estos neutrófilos se asociaron estrechamente con

trabéculas óseas, lo cual plantea la posibilidad de un papel en la osteoporosis que está asociada con artritis reumatoide. La producción de TNF por los neutrófilos podría contribuir a la activación de las células dendríticas, y la activación de los macrófagos. Los neutrófilos también contribuyen a la activación y maduración de las células B por medio del BAFF. La respuesta inmune de las células T suprime a los neutrófilos a través de la producción de peróxido (Alam J, 2017; Cornis AL, 2009).

2.3.3.4 Macrófagos

Los macrófagos son componentes mejor caracterizados de la membrana sinovial en la artritis reumatoide. Los macrófagos sinoviales producen una serie de mediadores inflamatorios, incluyendo TNF, IL-1 e IL-6. El grado de la infiltración macrófagos sinoviales se correlaciona con la destrucción y el dolor en las articulaciones. Los macrófagos fagocitan las células apoptóticas del revestimiento sinovial, lo cual, normalmente resulta en una respuesta antiinflamatoria al impedir la liberación de mediadores tóxicos de los neutrófilos sometidos a necrosis. La respuesta proinflamatoria de macrófagos puede ser inducida por estímulos como el lipopolisacárido, TNF, así como los neutrófilos apoptóticos infectados. De hecho, la constante necesidad de fagocitar un gran número de leucocitos infiltrantes, podría ser un estímulo continuo para el reclutamiento de macrófagos en la cavidad sinovial y la activación de la artritis reumatoide (Alam J, 2017; Drexler SK, 2008).

2.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

2.4.1 Manifestaciones articulares

La forma de inicio de la artritis reumatoide es muy variable, la mayoría de los pacientes desarrollan dolor articular o rigidez, de manera insidiosa durante varias semanas a meses. Las primeras zonas donde aparecen los primeros síntomas son una o más articulaciones de manos, muñecas, hombros, rodillas o metatarsfalángicas o todas ellas. Además, de la molestia musculoesquelética se puede presentar malestar, fatiga y fiebre. Conforme progresa la enfermedad aparece tumefacción articular, hipersensibilidad y una coloración roja o azulosa. El patrón de daño es poliarticular y simétrico incluyendo articulaciones interfalángicas proximales (PIP), metacarpofalángicas, muñecas, codos, hombros rodillas tobillos y metatarsfalángicas (Khurana R, 2005)

Las manos son por lo general la primera zona afectada en la artritis reumatoide, los signos más frecuentes en esta zona son la tumefacción de las articulaciones interfalángicas proximales y metacarpo falángicas. Todas estas deformaciones ocasionan pérdida de la fuerza y destreza de las manos, así como de la capacidad de conservar una buena presión. Además de las deformaciones, las erosiones sinoviales de los tendones ocasionan que los pacientes pierdan la capacidad de extender uno o varios dedos. Las muñecas siempre están afectadas en la artritis reumatoide, muestran una sinovia pastosa, fácil de palpar. Se puede perder cierto grado de movilidad, se comprimen ciertos nervios ocasionando el síndrome del túnel carpo (Khurana R, 2005).

En aquellas articulaciones donde se soporta el peso es común que haya un derrame del líquido sinovial, especialmente en la rodilla, lo cual se puede observar como un abultamiento en la cara interna de la rodilla. Es común que exista un daño en los tejidos blandos que rodean la rótula provocando un deterioro en la marcha y la formación de quistes poplíteos, estos últimos pueden romperse y generar tromboflebitis. Las articulaciones metatarso falángicas (pies y de los tobillos) son también afectadas con gran frecuencia, a menudo la subluxación de las cabezas metatarsianas hacia las plantas de los pies, provoca deformaciones de tipo grifo en los dedos de los pies originando un caminar difícil y doloroso (Bennett CJ, 1996).

A medida que avanza la enfermedad el paciente tiene cada vez más dolor, rigidez y deterioro de la función articular, lo cual repercute en la calidad de vida (hábitos de sueños, depresión y pérdida de peso) y productividad del paciente. Cerca del 20% de los pacientes tienen un inicio agudo o súbito, otros presentan episodios recurrentes cada 24 y 48 horas. La evolución de la enfermedad es muy variada sin embargo la gran mayoría de los pacientes presentan deformaciones articulares y algún grado de discapacidad. Para valorar el grado de discapacidad el Colegio Americano de Reumatología (ACR) sugiere la siguiente clasificación dependiendo del nivel que afecta la artritis reumatoide en las actividades diarias del paciente (Khurana R, 2005).

Clase I: No hay restricción de la capacidad para llevar a cabo las actividades normales.

Clase II: Restricción moderada, pero con la capacidad para efectuar casi todas las actividades de la vida diaria.

Clase III: Restricción notable, con incapacidad para realizar la mayor parte de las actividades de la vida diaria y las ocupaciones.

Clase IV: Incapacidad, con confinamiento a la cama o a una silla de ruedas (Bennett CJ, 1996).

2.4.2 Manifestaciones extraarticulares

Las articulaciones son los principales sitios de manifestación de la artritis reumatoide, sin embargo, dado que esta enfermedad es sistémica puede afectar a diferentes órganos y sistemas diferentes a las articulaciones. Cerca del 40% de los pacientes pueden presentar afecciones en el pericardio en forma de lesiones fibrosas. Otras manifestaciones son derrames en el pericardio, taponamiento cardiaco pericarditis obstructiva. En raras ocasiones se desarrollan nódulos reumáticos en el miocardio, válvulas cardiacas e incluso puede presentarse vasculitis en las arterias coronarias (Alam J, 2017; Khurana R, 2005).

Entre un 20 a 25 % de los pacientes con artritis reumatoide presentan alteraciones en la piel, en forma de nódulos subcutáneos principalmente en estructura periarticulares y en áreas que son sometidas a presión (codos, tendones extensores y flexores de manos y pies, tendón de Aquiles, etc.), también es posible que los pacientes presenten eritema palmar, fragilidad de la piel y vasculitis (en uñas, pliegues y en arterias). Los pulmones pueden ser afectados por la artritis reumatoide, generalmente estas afecciones son asintomáticas, ocasionalmente pueden ocurrir derrame pleural lo cual se manifiesta como una dificultad para respirar. También es común la presencia de nódulos reumatoides los cuales pueden romperse y producir neumotórax e incluso hay presencia de infiltrados nodulares (Alam J, 2017; Michaud, WF, 2007; Khurana R, 2005).

Debido al aumento de la proliferación de las células sinoviales, estas pueden comprimir los nervios y producir neuropatías periféricas (síndrome de túnel de carpo y del tarso). La vasculitis reumatoide puede generar una pérdida de la sensibilidad de la muñeca o el pie. La complicación ocular más frecuente es el síndrome de Sjogren, lo cual causa un daño en la córnea por la resequedad ocular aunado a la xerostomía, tumefacción parotídea o ambos. También puede ocurrir enrojecimiento ocular con dolor (escleritis) quizás una de las complicaciones más graves de la artritis reumatoide sea el síndrome de Felty. El cual además de presentar AR se manifiesta con esplenomegalia y neutropenia, en ocasiones

puede manifestarse con linfopenia, hepatomegalia, anemia, trombocitopenia, fiebre y pérdida de peso. Esto ocasiona que el paciente sea más susceptible a las infecciones a pesar que la médula ósea este con hiperplasia (Alam J, 2017; Bennett CJ, 1996).

2.5 CONSECUENCIAS DE LA ENFERMEDAD

Si bien por algún tiempo se pensó que la artritis reumatoide era una enfermedad benigna, hoy se sabe que produce complicaciones graves e incluso su mortalidad es más alta de la esperada. Cerca del 20% de los pacientes con artritis reumatoide mejoran de manera espontánea durante el primer año, sin embargo, en la mayoría de los pacientes ocurre un avance de la enfermedad a una forma crónica y con deterioro funcional. Los estudios a largo plazo muestran que los pacientes con AR tienen una probabilidad seis veces mayor de limitaciones graves en las actividades, restricción en los días de actividad cuatro veces y un índice de incapacidad 10 veces mayor que la población general. Cerca del 50% de los pacientes tienen que dejar de trabajar después de 10 años de haberles detectado la artritis reumatoide. Esto ocasiona que la calidad de vida del paciente disminuya, además los servicios de salud deben de invertir en el tratamiento y terapia de estos pacientes (Pratt AG, 2009; Tutuncu Z, 2007).

2.6 DIAGNÓSTICO

Para realizar un adecuado diagnóstico se deben de seguir los criterios clínicos establecidos por el American Collage of Rheumatology, el cual refiere que se debe dar un diagnóstico de AR cuando existe al menos 4 de los 7 criterios, además de que el paciente posee lo criterios del 1 al 4 durante al menos 6 semanas:

Criterios del American Collage of Rheumatology

1. Rigidez matinal mayor a 1 hora
2. Artritis en tres o más articulaciones (Tumefacción articular, en las siguientes áreas: IFP, MCF, muñeca, codo, rodilla, tobillo, MTF)
3. Artritis de manos (Tumefacción articular de muñeca, MCF o IFP)
4. Artritis simétrica
5. Nódulos reumatoides

6. Factor reumatoide positivo

7. Cambios radiológicos (erosiones óseas u osteopenia de muñeca y manos) (American College of Rheumatology; 2015)

Los análisis de laboratorios y de gabinete son complementarios para el diagnóstico clínico de la AR. Existen diferentes estudios orientadores del diagnóstico, pero ninguno es de la sensibilidad y especificidad suficiente como para decir que es patognomónico o de certeza. Sin embargo, el conjunto de estudios sirve para confirmar el diagnóstico.

El factor reumatoide (RF) es una inmunoglobulina por lo general de tipo IgM que reconoce la fracción Fc de las Inmunoglobulinas, está presente en el suero del 75% de los pacientes, los altos títulos son comúnmente asociados con la severidad de una enfermedad reumática. Sin embargo, no es exclusiva de la artritis reumatoide. Los anticuerpos antinucleares pueden ser usados como un marcador más de la artritis reumatoide, sin embargo, no son excluyentes, ya que se encuentran presentes en las enfermedades inmunológicas, aun así, contribuyen a realizar el diagnóstico diferencial. Recientemente los anticuerpos anti-citrulina están surgiendo como una buena opción por su alta especificidad (90-98%) pueden ser útiles para detectar las etapas tempranas de la enfermedad, sin embargo, posee poca sensibilidad entre 50 y 56% (Cardiel MH, 2014).

Además de estos exámenes que permiten detectar la presencia de anticuerpos hay otros exámenes de laboratorio que permiten detectar si hay un proceso inflamatorio. La velocidad de sedimentación (VES) suele estar aumentada por la gran presencia de inmunoglobulinas en el suero y la proteína C reactiva (PCR) presenta títulos elevados (Cardiel MH, 2014; Pratt AG, 2009; Barreto G, 2006)

También se cuentan con pruebas que permiten un monitoreo del balance general de la enfermedad, así como el posible daño provocado por los fármacos al hígado y al riñón. En la biometría hemática se puede encontrar anemia normocítica normocrómica, el conteo de los leucocitos es alto y encontramos una gran cantidad de linfocitos y monocitos; en algunos casos se puede encontrar eosinofilia. Complementando a estos estudios de laboratorio también se encuentran estudios de imágenes que permiten determinar el grado de avance de la lesión en el cartílago y los huesos; entre estos estudios contamos con radiografías y con resonancia magnética nuclear (Cardiel MH, 2014; Pratt AG, 2009).

2.7 TRATAMIENTO

Los objetivos de los diferentes tratamientos, farmacológicos y no farmacológicos, son:

Aliviar el dolor.

Disminuir la inflamación.

Disminuir los efectos secundarios indeseables.

Conservar la fuerza muscular y la función articular.

Mantener la calidad de vida del paciente.

Desgraciadamente, este último objetivo raramente se consigue, ya que, actualmente, la AR no tiene tratamiento curativo. Actualmente podemos clasificar al tratamiento de la AR en dos grandes grupos; en tratamientos no farmacológicos y en tratamientos farmacológicos.

2.7.1 Tratamiento no farmacológico

El tratamiento adecuado requiere estrecha colaboración entre el médico familiar, el reumatólogo, fisioterapeuta y el ortopedista. El paciente y su familia deben tener conocimiento sobre la AR, y lo más importante es entender que no tiene cura. Deben ser informados además de las posibles ventajas y efectos secundarios, así como de la necesidad de introducir cambios en su estilo de vida y medidas de protección articular, con el fin de mantener una razonable calidad de vida. Disminuyen en lo posible, el grado de incapacidad física y se hacen más necesarios con el paso de los años, la terapia física, a medida que se acentúa el daño articular. La finalidad de la terapia física es mejorar la fuerza, resistencia y el arco de movimiento articular, facilitando con ello las actividades cotidianas, de la vida. Disminuir la restricción articular con masajes, modificar la postura o la termoterapia. También se recomienda a los pacientes con artritis reumatoide mantener una dieta apropiada y controlar la obesidad (Cardiel MH, 2014; Sales C, 2009; Barreto AG, 2006).

2.7.2 Tratamiento farmacológico

Dentro de los diferentes tratamientos farmacológicos que existen para la artritis reumatoide podemos clasificarlos en tres grupos:

2.7.2.1 Analgésicos no esteroides (AINES)

Es el tratamiento básico de primera elección, generalmente se usan salicilatos, los cuales son baratos, se toleran bastante bien y son eficaces para controlar el dolor y la inflamación. Las dosis que se utilizan son altas de 20 a 30 mg/ 100 mL. En la mayoría de los enfermos ello requiere entre 3 a 6 g/día de aspirina. En el caso de los salicilatos se debe de llevar un monitoreo de los efectos adversos (sordera, zumbidos e intolerancia gastrointestinal) Además de los salicilatos existen otros AINES que pueden ser usados para aliviar el dolor, la fiebre y la inflamación. Los derivados del ácido propiónico (ibuprofeno, cetoprofeno, furbiprofeno, oraprozina), los derivados de los ácidos naftalénicos (naproxeno, nabumetona), ácido pirrolalcanoico (tolmetín), ácido indolacético (indometacina, sulindac), ácido antranílico halogenado (meclofenamato sódico), piroxicam, diclofenaco diflunisal y etodolac. (Alam J, 2017; Cardiel MH, 2014)

Reducen los signos y síntomas de la enfermedad, disminuyendo el dolor y mejorando la movilidad de la articulación; sin embargo, no modifica el curso de la enfermedad. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de prostaglandinas proinflamatorias, inhibiendo la ciclooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico. No se deben de emplear como tratamiento único, se deben de emplear en conjunto con los fármacos modificadores de la enfermedad (FARME). Los efectos adversos de estos fármacos se deben a su propio mecanismo de acción; ya que al inhibir la ciclooxigenasa afecta mecanismos protectores del corazón y la coagulación. Esto provoca que los pacientes que reciben AINES tengan úlceras gástricas o problemas de coagulación. A pesar de contar con diferentes alternativas terapéuticas, se recomienda cambiar de uno a otro fármaco a fin de reducir los efectos secundarios (hemorragias gastrointestinales, úlceras, anemias y deterioro renal) y proporcionar un beneficio máximo a cada paciente (Alam J, 2017; Cardiel MH, 2014; Ranganath VK, 2007; Tutuncu Z, 2007).

2.7.2.2 Glucocorticoides

Se emplea sólo en pacientes cuyos beneficios a corto plazo sean mayores que su riesgo a largo plazo, porque producen una gran cantidad de efectos adversos. Generalmente se usa al principio de la enfermedad para controlar el dolor o en etapas tardías de la enfermedad cuando los tratamientos convencionales no surgen efecto. Sin embargo, produce una gran cantidad de efectos adversos tales como osteoporosis, gastritis, hemorragias, cataratas, hipertensión arterial, entre otras (Alam J, 2017; Cardiel MH, 2014; Galofre JC, 2009).

2.7.2.3 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME)

El proceso de destrucción del cartílago y del hueso que se produce en la artritis reumatoide se puede retardar con la administración de un grupo de fármacos distintos conocidos como fármacos antirreumáticos modificadores del curso de la enfermedad (FARME), en el que se incluyen antipalúdicos (cloroquina, hidroxiclороquina), penicilamina, sulfasalacina, inmunosupresores (azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato) y sales de oro. Los FARME no producen una mejoría inmediata, requieren 4-6 meses de tratamiento para una respuesta completa. Su uso a largo plazo está limitado por la toxicidad y la pérdida de eficacia. Las reacciones adversas con los FARME son frecuentes y pueden amenazar la vida del paciente; es necesaria una vigilancia cuidadosa para evitar la toxicidad grave (Cardiel MH, 2014; Tutuncu Z, 2007).

El metotrexato es un antagonista del ácido fólico cuya rápida acción y seguridad, lo colocan como un fármaco de primera elección. Actúa a nivel celular (inhibe la función de los neutrófilos, de los macrófagos y de los linfocitos), sobre las citocinas y sobre diferentes enzimas, sugiriendo también una acción inmunosupresora. Puede producir intolerancia digestiva, fiebre, astenia, exacerbación breve de la sintomatología articular, o elevación transitoria de las enzimas hepáticas. Las sales de oro en estudios in vitro e in vivo muestran que estas sales inhiben la capacidad fagocítica de los neutrófilos, inactivan parcialmente la cascada del complemento, bloquean las funciones de los linfocitos T y monocitos, incluyendo la producción de citocinas. Sin embargo, sus efectos son menores en comparación con otros fármacos (Brown PM, 2016; Cipriani P, 2014; Cardiel MH, 2014; Ranganath VK, 2007).

El mecanismo de acción de los antipalúdicos (cloroquinona e hidroxicloroquinona) se relaciona con la inhibición de la liberación de prostaglandinas y enzimas lisosomales, con la inhibición de la proliferación linfocítica y producción de inmunoglobulinas, probablemente vía bloqueo de IL-1, y mediante la modificación del procesamiento del antígeno por las moléculas HLA-II, alterando el pH lisosomal. La ciclofosfamida se indica en la AR refractaria. Es un agente alquilante que inhibe la replicación de ADN, elimina los linfocitos B e interfiere en sus funciones, produciendo una disminución en la producción de inmunoglobulinas. Los efectos secundarios tales como la neutropenia y cistitis hemorrágica han limitado su uso (Cardiel MH, 2014; Ranganath VK, 2007; Z, Kavanaugh A, 2007).

La azatioprina es un análogo de las purinas que tiene acción inmunorreguladora y antiinflamatoria. Mediante la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la Azatioprina bloquea la producción de células inmunocompetentes, produciendo una linfopenia T y B. Su acción antiinflamatoria se debe a la inhibición de la división de células precursoras de monocitos, limitando la infiltración por éstos en zonas de inflamación. El efecto secundario adverso más importante es la aplasia medular, fundamentalmente de linfocitos y monocitos (Cardiel MH, 2014; Ranganath VK, 2007; Barreto G, 2006).

2.7.3 NUEVOS TRATAMIENTOS

En el proceso patológico de la artritis reumatoide se ven implicados citocinas, células, rutas de transducción de señales; cada una de ellas son posibles sitios diana para desarrollar nuevos fármacos. Entre las nuevas terapias encontramos anticuerpos monoclonales, receptores solubles que inhiban citocinas, agonistas de receptores y pequeñas moléculas que interfieren directamente en las rutas de señalización que producen las citocinas (Burmester GR, 2017; Stoll JG, 2009).

Entre las nuevas alternativas farmacéuticas encontramos tres nuevos antagonistas del TNF- α , un anticuerpo monoclonal humanizado adalimumab (ADA); una construcción peptídica que se une al receptor del TNF- α , el etanercept (ETE) y un anticuerpo quimérico infliximab (IFX). Otra alternativa terapéutica es el diseño de nuevos fármacos que actúen sobre las células B, tal es el caso del Rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico que actúa sobre la molécula CD20 de los linfocitos B, evitando su activación (Alam J, 2017; Maneiro JR, 2017; Burmester GR, 2017; Bingham CO, 2008).

También se están trabajando con inhibidores de las citocinas proinflamatorias; las dos estrategias en esta rama consisten en el diseño de anticuerpos contra las interleucinas o contra su receptor, recientemente se ha aprobado un solo bloqueador de la citocina IL-1, anakinra, el cual es antagonista del receptor de IL-1. En cuanto a la IL-6 se han hecho grandes avances en cuando al diseño de fármacos que bloqueen esta citocina se ha diseñado un anticuerpo contra el receptor (tocilizuman), el cual espera la aprobación de su comercialización por la FDA. Varios laboratorios están desarrollando pequeñas moléculas que pueden inhibir vías de señalización intracelular, tales como JAK3, SYK JAK2, en este momento estas moléculas se encuentran en estudios de fase clínica (Alam J, 2017; Maneiro JR, 2017; Burmester GR, 2017; Stoll JG, 2009; Bingham CO, 2008; Schett G, 2008).

También se ha considerado el empleo de fármacos inmunomoduladores y antiinflamatorios que permitan regular la respuesta inmune que se desencadena en la artritis, como es el caso del Tracolumus, el cual actúa sobre inhibiendo la calcineurina disminuyendo su capacidad para iniciar la transcripción de genes de las citocinas proinflamatorias, en particular TNF- α , IL-2 e INF- γ (Alam J, 2017; Maneiro JR, 2017; Burmester GR, 2017).

2.7.3.1 Inmunomoduladores

Los inmunomoduladores son sustancias (de origen natural o sintético) capaces de cambiar la respuesta inmune, con la finalidad de obtener un efecto terapéutico, a través de mecanismos (directos o indirectos) que involucran a las células efectoras del sistema inmune. Ejemplos de estos inmunomoduladores son las hormonas y los extractos del timo (timomodulina), los cuales han demostrado ser capaces de restituir la respuesta inmune contra virus y bacterias, e incluso son capaces de contribuir a la terapia contra el cáncer e infecciones (Burmester GR, 2017; López PG, 1996).

2.7.3.1.1 Metallo-péptido Inmunomodulador (IMMP)

El IMMP es un complejo molecular zinc-péptido que ha mostrado modificar la inmunidad. Modifica la activación de macrófagos, incrementando la proliferación y fagocitosis de monocitos y macrófagos de origen humano y de pollo. Incrementa la proliferación de timocitos y linfocitos T cooperadores. Induce la producción del factor de inhibición de migración leucocitaria. Induce la maduración de timocitos CD4+ en ratas recién

nacidas. En un modelo in vivo de hepatitis autoinmune inducida, en ratas macho Wistar, con suero porcino el IMMP los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y mantiene las citocinas anti-inflamatorias (IL-10) y disminuyó la fibrosis.

No se han encontrado en la literatura estudios sobre la toxicidad y bioseguridad; sin embargo hay estudios realizados por estudiantes de la Facultad de Farmacia en donde han evaluado la seguridad Badillo A. realizo un estudio toxicológico empleando ratones hembras C57BL/6J; los resultados mostraron que en un rango de 50 a 500000 ng/kg de peso no mostraba efectos letales ni alteraciones en el peso, el hígado bazo o riñones. En este mismo estudio se evaluó la embriotoxicidad y se encontró que el IMMP es seguro en dosis menores a 170000 ng/kg de peso (Badillo A, 2005). Osuna L evaluó su bioseguridad en varios parámetros bioquímicos y hematológicos usando ratas machos Wistar. Sus resultados no mostraron cambios importantes en dichos parámetros (Osuna L 2008); con estos resultados nos permiten considerar que su uso es seguro.

3.0 JUSTIFICACION

La artritis reumatoide es una patología autoinmune y es la más frecuente de las enfermedades reumáticas, que se caracteriza por ser un proceso inflamatorio autoinmune de etiología desconocida, afecta cerca del 1% de la población mundial de adultos mayores entre los 45 y 55 años, afectando principalmente a las mujeres.

En México es considerada una de las primeras 20 causas de consulta médica, al igual que el resto del mundo la incidencia en México es cercana al 1% pero a diferencia de éste, en nuestro país la población en riesgo a padecer artritis reumatoide está en aumento (2 millones), además la edad donde comienza los primeros síntomas van de los 35 a los 45 años, lo cual conlleva a una disminución de la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad. Esta disminución se debe a una disminución de la movilidad de la articulación lo cual lleva una pérdida de horas de trabajo y a un aumento en los costos de tratamiento.

Para solucionar este problema existen en el mercado algunos fármacos; algunos de los cuales son usados para aminorar el dolor producido en las articulaciones afectadas (analgésicos), otros buscan reducir los efectos de la inflamación (AINES) o impedir el avance de la enfermedad (FARME). Sin embargo, muchos de estos tratamientos producen efectos adversos en los pacientes, tales como úlceras gástricas, hemorragias, cataratas, tolerancia y dependencia.

Ante este problema es necesario buscar nuevos tratamientos que sean más efectivos para el tratamiento de la artritis reumatoide que eviten el progreso de la enfermedad y al mismo tiempo sean seguros y con menos efectos adversos que los tratamientos actuales. Actualmente el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos está encaminado al desarrollo de bloqueadores de citocinas proinflamatorias, antagonistas de citocinas e incluso sustancias inmunomoduladoras para regular la respuesta inmune.

El IMMP es un octapéptido que en estudios previos preclínicos y clínicos ha mostrado poseer la capacidad de modificar la respuesta inmune tanto celular como humoral, al promover la proliferación de linfocitos y al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias. Dado que este metalo-péptido posee actividad inmunomoduladora nos hace considerarlo como una alternativa terapéutica para combatir la artritis reumatoide, la cual es una enfermedad donde el sistema inmune es el responsable de la fisiopatología.

4.0 HIPÓTESIS

El IMMP disminuirá el daño provocado por un modelo experimental de artritis

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto farmacológico del IMMP en un modelo experimental de artritis

5.2 Objetivos Particulares

1. Estandarizar un modelo de inducción de artritis por colágeno tipo II.
2. Evaluar el efecto del IMMP sobre la inflamación articular en un modelo de artritis por colágeno tipo II.
3. Comparar el efecto del IMMP con del metotrexato en mismo modelo experimental, sobre la inflamación y el daño articular.
4. Comparar el efecto farmacológico del IMMP en base a las vías de administración.
5. Evaluar la seguridad del uso del IMMP en un modelo experimental de artritis.
6. Evaluar la seguridad del tratamiento con IMMP en un modelo experimental de artritis.

6.0 METODOLOGIA

Se utilizaron ratas Wistar hembras, con un peso entre 120 y 140 gramos (Harlem Cgo. México), las cuales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, y con ciclos de luz de 12x12 horas y a 25°C. El diseño experimental consistió en dos partes, una etapa de inducción de artritis y una etapa de tratamiento (Cope A, 2008).

Inducción de la artritis. Los animales se dividieron en dos grupos, un grupo de inducción y un grupo sin inducción (control). El grupo sin inducción de artritis solamente recibió el vehículo formado por Adjuvante completo (primera aplicación) o incompleto de Freund (segunda aplicación) disuelto en ácido acético; el otro grupo con inducción de artritis se le administro 200µL de una solución de el colágeno tipo II (1mg/mL) disuelto en el vehículo previamente descrito. La administración se llevó a cabo en dos tiempos, el primero a tiempo cero y el segundo 7 días después. Durante todo el proceso de inducción de artritis y desarrollo del protocolo, se llevó a cabo un monitoreo de la altura de las almohadillas (Nielasen RH, 2008; Ishikawa T, 2005; Dure FH, 1994).

Etapa de tratamiento. Posteriormente, después de 21 días del inicio de la inducción de artritis, aquellas ratas que presentaron una altura de las almohadillas caudales dos veces mayor al grupo sin inducción, continuaron en el estudio y se subdividieron en los siguientes grupos de acuerdo al esquema de tratamiento.

Tabla No. 1 Esquema de tratamiento de la evaluación de la Curva dosis-respuesta del IMMP

Grupo	Subgrupo	Esquema de tratamiento
Sin inducción de artritis	Control	Solución Salina IP/3 semanas
Con inducción de artritis	AR	Solución Salina IP/3 semanas
	AR + 25 IMMP	25 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas
	AR + 50 IMMP	50 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas
	AR + 100 IMMP	100 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas
	AR + 200 IMMP	200 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas

Tabla No. 2 Esquema de tratamiento de la evaluación del efecto de IMMP sobre la artritis

Grupo	Subgrupo	Esquema de tratamiento
Sin inducción de artritis	Control	Solución Salina tres veces por semana IP/3 semanas
	IMMP	50 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas
Con inducción de artritis	AR	Solución Salina tres veces por semana IP/3 semanas
	AR + IMMP	50 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas

Tabla No. 3 Evaluación del efecto farmacológico del IMMP vs Metotrexato

Grupo	Subgrupo	Esquema de tratamiento
Sin inducción de artritis	Control	Solución Salina tres veces por semana IP/3 semanas
	IMMP	50 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas
	MTX	1 mg/kg tres veces por semana VO/3 semanas
Con inducción de artritis	AR	Solución Salina tres veces por semana IP/3 semanas
	AR + IMMP	50 ng/kg tres veces por semana IP/3 semanas
	AR + MTX	1 mg/kg tres veces por semana VO/3 semanas

AR, Artritis; IMMP: metalo péptido inmunomodulador; IP: intraperitoneal; MTX: metotrexato; VO: vía oral.

6.1 Cuantificación de la inflamación

En este estudio se optó usar el método de vernier, ya que es un proceso sencillo, no invasivo, y rápido para medir el grado de inflamación de las articulaciones, aunque algunos autores lo consideran semicuantitativo debido a la posibilidad de la variación en el sitio de lectura. Para minimizar este riesgo se marcó con tinta indeleble el sitio de lectura.

6.2 Cuantificación del daño articular

Para evaluar el daño articular realizamos un análisis macroscópico y uno microscópico. El análisis macroscópico se realizó mediante radiografías de la zona afectada y fotografías de la zona que sirvieron para hacer comparaciones; el análisis microscópico se realizó mediante cortes y tinciones histológicas de la zona afectada. Las

radiografías y fotografías de las extremidades se tomaron después del sacrificio de los animales (Wunder A et al 2005).

En el análisis macroscópico y radiográfico se realizó tomando fotografías de las articulaciones afectadas, así como radiografías simples de cada una de las extremidades caudales de las ratas con artritis. En el análisis microscópico consistió en un estudio histológico tanto de las articulaciones como de órganos linfoides (timo y bazo) y no linfoides (hígado y riñones). Cada articulación caudal se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 días, posteriormente se cortaron en el plano sagital y se descalcificaron por 3 días en una solución al 5% de ácido clorhídrico y 5 % de ácido fórmico. Después del proceso de descalcificación, se fijaron en una solución de PBS con formaldehído al 4% a pH 7 de 24 a 48 horas; después las piezas fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Posteriormente se obtuvieron cortes de 2 micras y se hicieron las siguientes tinciones, tinción de hematoxilina y eosina y Tinción Tricrómica de Massón (Ishikawa T, 2005).

6.3 Evaluación de efectos sistémicos.

Los órganos linfoides y no linfoides no se sometieron al proceso de descalcificación, después de ser obtenidos fueron fijados en la solución de PBS y formaldehído al 4%, deshidratados e incluidos como se describió previamente. Posteriormente se hicieron cortes de 2 micras de las articulaciones, el timo, bazo, hígado y los riñones y se les realizó la tinción de hematoxilina y eosina (Ishikawa T, 2005).

6.4 Cuantificación de citocinas séricas.

Después de evaluar la inflamación y el daño articular en las inflamaciones, se decidió cuantificar, por el método de ELISA, en el suero alguna de las diferentes citocinas y quimiocinas que se encuentran involucradas en el proceso fisiopatológicas de la artritis, con la finalidad de tener nociones sobre el mecanismo de acción del IMMP sobre la respuesta inmune presente en la artritis. Las citocinas y quimiocinas que se decidieron evaluar fueron: IFN- γ , IL-1 β , IL-4, MCP-1.

6.5 Implementación del modelo

Una vez que decidimos utilizar el modelo de Colágeno tipo II en ratas, el cual, según reportes de la literatura reproduce los aspectos que nos interesa estudiar en este

proyecto, procedimos a la administración del colágeno, como se indicó en la metodología, para producir la artritis en los animales.

Aumento de las almohadillas. Como se puede observar en la figura 3, la administración del colágeno tipo II produjo, a las dos semanas después de la inoculación del colágeno, un aumento del tamaño de las almohadillas de las patas caudales; el cual continuó incrementando una semana más, cuando alcanzó un tamaño de casi una y media vez, el tamaño de la almohadilla de los animales control, en el 80 % de los animales. El restante 20 % no presentó cambios significativos en el volumen de la almohadilla. Para estandarizar el modelo se consideró un animal con artritis, a aquel que presentó un incremento en el volumen de las almohadillas del 100 %, con respecto al grupo control.

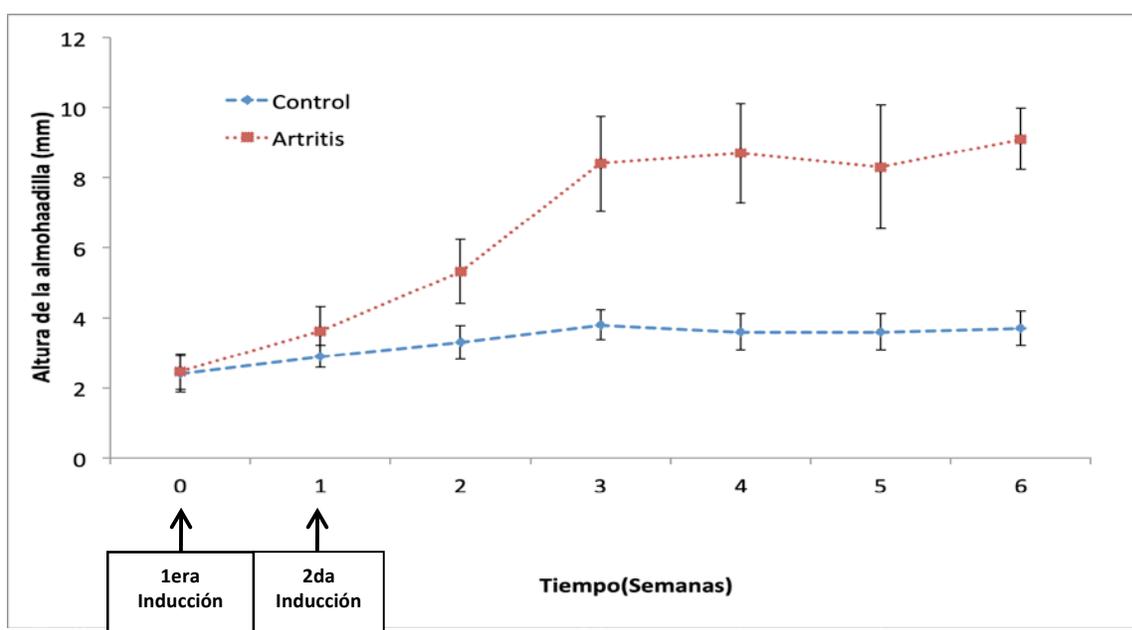


Figura No. 2 Caracterización del modelo de artritis inducido por colágeno bovino tipo II. Comparación de la altura de las almohadillas caudales entre el grupo control y el grupo con artritis. Cada punto representa el promedio de tres experimentos con un n=6. * p < 0.05, con respecto al grupo control.

Protocolo de tratamiento:

Se utilizó el metalo-péptido constituido por el péptido (sintetizado por New England Peptid (Mi, USA) y Zn, elaborado mediante el proceso descrito por Reyes Esparza y col (PCT/MX 2011/000117). La pureza del péptido fue del 98% y se corroboró por HPLC y

cromatografía de fluorescencia. El colágeno bovino, el ácido acético y los adyuvantes completos e incompletos de Freund fue obtenido con la distribuidora SIGMA-ALDRICH. El metotrexato utilizado fue obtenido de una presentación comercial.

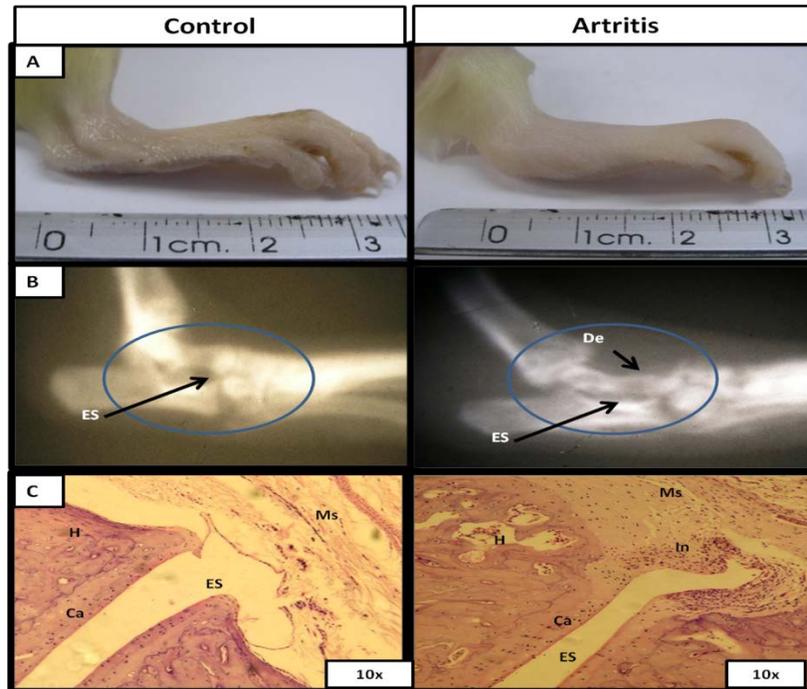


Figura No. 3 Caracterización del modelo de artritis inducido por colágeno bovino tipo II. A: Comparación macroscópica, B: radiográfica, y C: Histológica por H&E del daño articular entre el grupo control y el grupo con artritis (ES: espacio sinovial; De: degradación; H: hueso; Ca: cartílago; In: infiltrado; Ms: membrana sinovial).

Daño articular. A la sexta semana de la primera administración del agente inductor, se sacrificó a los animales y se tomaron tanto fotografías como radiografías de las articulaciones sinoviales. De las extremidades. La figura 3A muestra los cambios macroscópicos en las articulaciones caudales presentes en las ratas con artritis, tales como incremento del volumen de la almohadilla plantar y deformación de dedo. En la figura 3B las radiografías de los animales control se observan los espacios articulares, así como los bordes articulares bien definidos, mientras que, en las imágenes de los animales con artritis, se observa la presencia de incremento en los tejidos blando, que los espacios articulares están disminuidos, y que los bordes articulares están irregulares.

Como se puede observar en la figura 3C, el grupo con artritis presenta disminución del espacio sinovial, infiltrado de células inflamatorias, así como degradación ósea y del cartílago. Una vez que observamos y analizamos los cambios macro y microscópicos en

las articulaciones, concluimos que, como era de esperarse, la administración del colágeno bovino de tipo II, produjo en las ratas una artritis caracterizada por: aumento en el volumen de las almohadillas plantares, debido a la presencia de edema, reducción en los espacios articulares, erosión de la superficie articular, presencia de un infiltrado.

Por lo anterior, consideramos que el modelo esta implementado y procedimos a la siguiente fase.

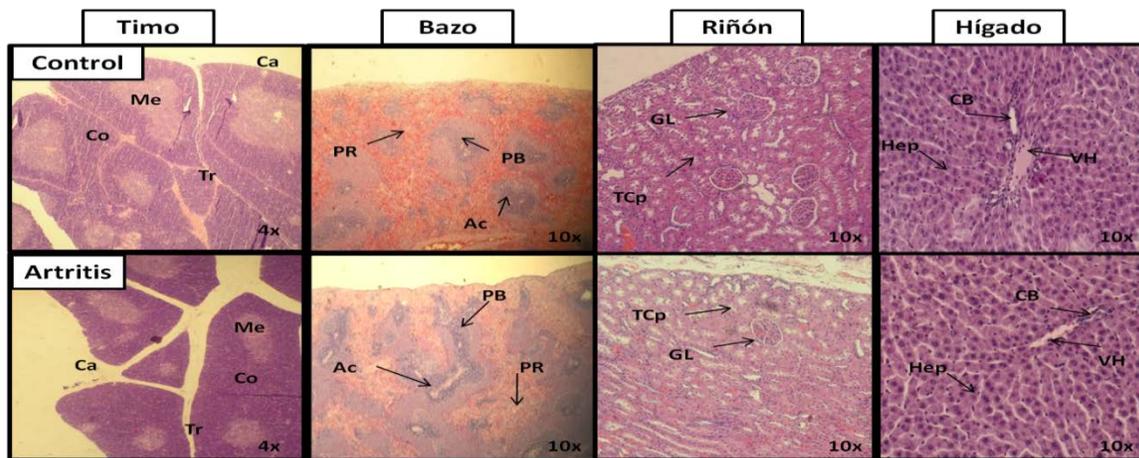


Figura No. 4 Caracterización del modelo de artritis inducido por colágeno bovino tipo II. Comparación histológica por Hematoxilina y Eosina del Timo, Bazo, Riñón e Hígado entre el grupo control y el grupo con Artritis (Co: corteza; Me: Médula; Tr: Travécula; PB: Pulpa blanca; PR: Pulpa roja; Ac: arteria central; GL: glomérulo; TCp: Túbulo contorneado proximal; CB: conducto biliar; Hep: Hepatocitos, VH: vena hepática).

La evaluación histológica del timo mostrada en la figura 4, muestra que las ratas con artritis, poseen un incremento de los pro-linfocitos en la corteza, con respecto al grupo control. En el bazo de las ratas artríticas se encontraron uniones entre los nódulos y cambios significativos en la distribución de las células en la pulpa blanca y la pulpa roja. Estos datos muestran que durante el proceso de la artritis, hay cambios de la distribución y activación de las poblaciones de linfocitos responsables del proceso patológico.

Al realizar la histología de hígado y riñón figura 4, no se encontró que la inducción de la artritis por colágeno tipo II ocasionará efectos tóxicos ni en el hígado ni en los riñones. Lo cual también nos dice que el modelo solamente afecta a las articulaciones sinoviales. Los resultados nos muestran que bajo nuestras condiciones es posible inducir el modelo de artritis por colágeno tipo II bovina en ratas Wistar hembras, el daño provocado por el modelo está localizado en las articulaciones.

7.0 RESULTADOS

7.1 Efecto de diferentes dosis del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas.

Una vez caracterizado el modelo de artritis, decidimos realizar una curva dosis - respuesta del IMMP vs inflamación, para encontrar una dosis óptima para evaluar el efecto del IMMP en el modelo de artritis. Para tal efecto probamos 4 dosis del IMMP: 25, 50, 100 y 200 ng/kg, administrado según el esquema del tratamiento descrito en la tabla No.1.

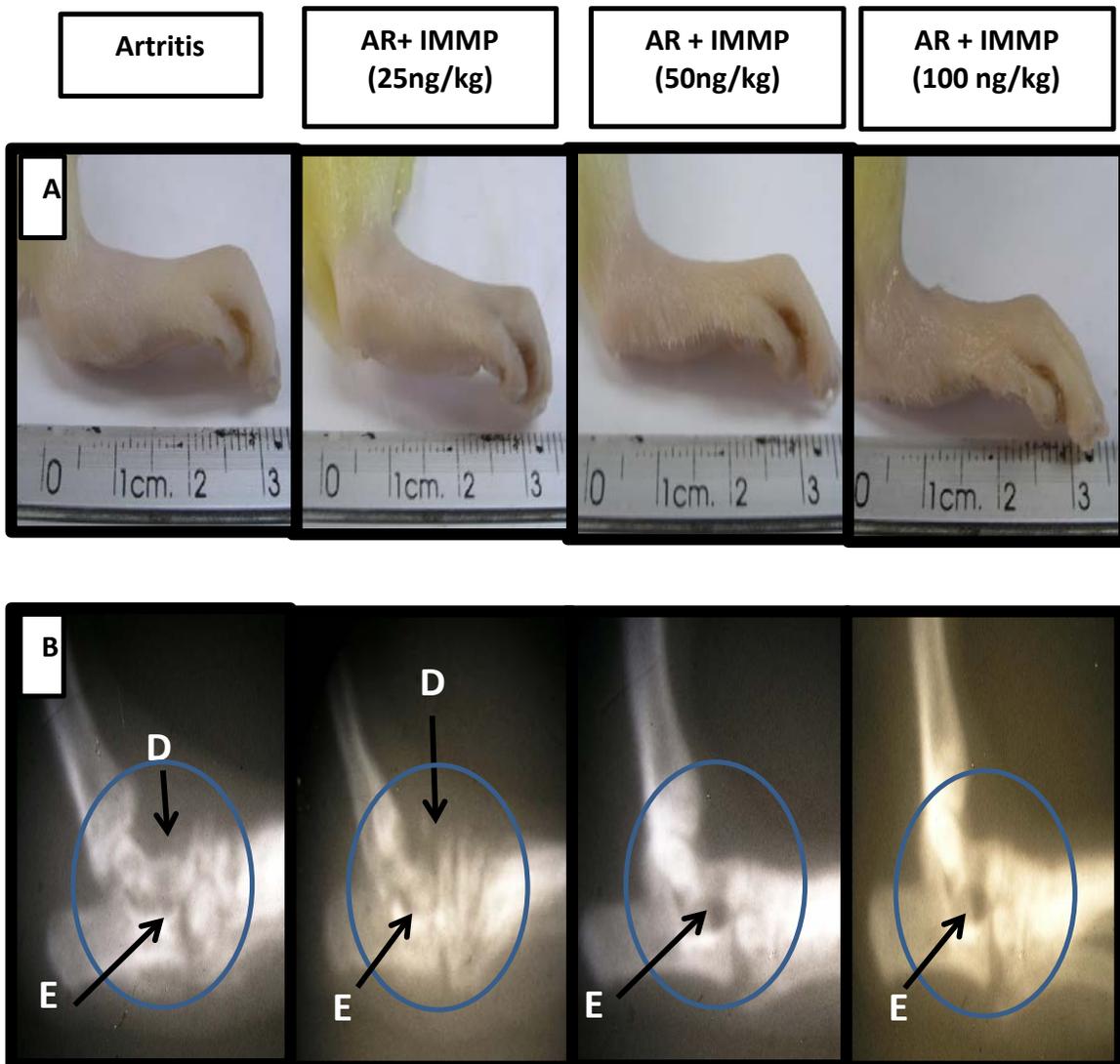


Figura No. 5 Evaluación macroscópica (A) y radiográfica (B) del efecto de diferentes dosis del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas (AR, artritis; IMMP. Metalopéptido inmunomodulador; De, degradación; ES, espacio sinovial).

El efecto del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas se muestra en la figura No. 5. Como se muestra en la figura No. 5A, en las ratas artríticas que recibieron el tratamiento con IMMP a una dosis de 25 ng/Kg, no se observó una disminución en la inflamación de las almohadillas caudales, con respecto al control de artritis. Sin embargo, en las ratas que recibieron el tratamiento con IMMP a las dosis de 50 y 100 ng/Kg sí se observó una disminución en la inflamación de las almohadillas caudales. Dado que el grupo tratado con la concentración más alta de IMMP (200 ng/Kg) mostró el mismo efecto que las concentraciones de 50 y 100 ng/Kg, no fue incluido en la figura.

Por otro lado, cuando analizamos el efecto del IMMP, a las diferentes dosis, sobre el daño articular (figura 5B), observamos que, de igual manera, a las concentraciones de 50 y 100 ng/Kg, la integridad de los huesos articulares se ve más conservada, ya que tanto los bordes de dichos huesos, como el espacio sinovial se observan más definidos con respecto al grupo control de artritis. En la concentración de 25 ng/Kg de IMMP, no se observaron diferencias significativas en la integridad de los huesos sinoviales ni espacio sinovial, con respecto al grupo control de artritis.

Los resultados anteriores nos sugieren que el tratamiento con IMMP a dosis ≥ 50 ng/Kg reduce la inflamación y el daño articular en ratas artríticas.

Los resultados del análisis macroscópico y radiográfico sugirieron que el IMMP disminuía la inflamación y el daño articular en ratas artríticas. Sin embargo, para corroborar estos resultados, decidimos realizar la medición de la altura de las almohadillas plantares caudales de las ratas artríticas tratadas con IMMP y compararlas con nuestro grupo control de artritis, para determinar de forma cuantitativa el posible efecto del IMMP sobre la inflamación.

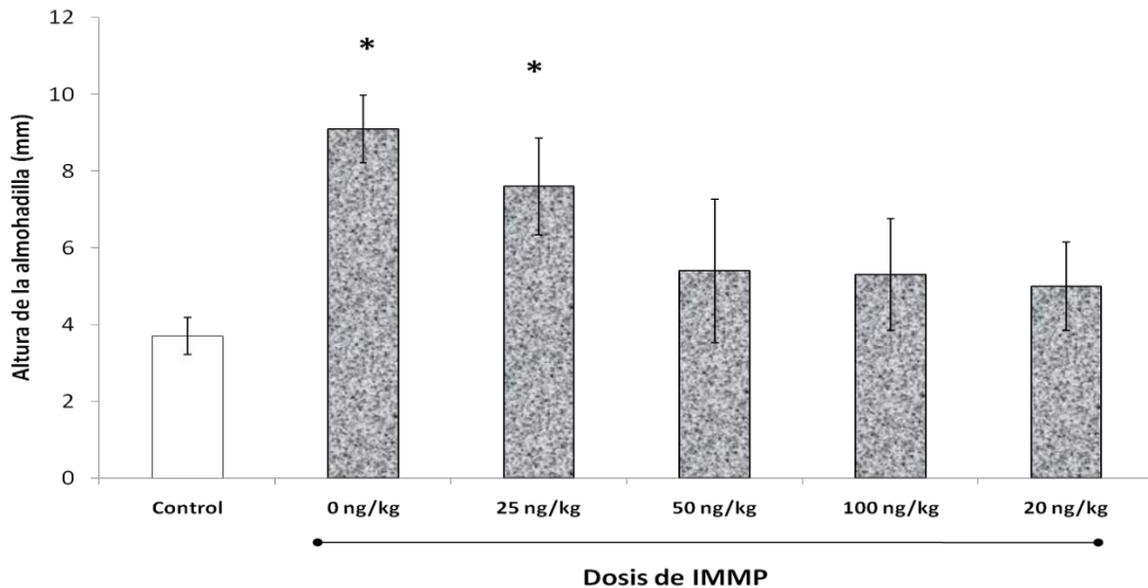


Figura No.6 Curva dosis respuesta del efecto del IMMP sobre la inflamación de las articulaciones caudales de ratas artríticas. Cada punto representa el promedio de tres experimentos con un n=6. * $p < 0.05$, con respecto al grupo control (IMMP, Metallo-péptido inmunomodulador).

Los resultados de la altura de las almohadillas plantares caudales de ratas artríticas tratadas con IMMP se muestran en la figura No. 6. La altura de la almohadilla plantar de las ratas artríticas tuvieron un incremento de 4.2 mm con respecto al grupo control sano. Este resultado nos muestra que debido a la inducción de artritis, hubo un incremento de las almohadillas debido probablemente a la presencia de edema, el cual es característico de la fisiopatología de la artritis. Por otro lado, observamos que la altura de las almohadillas plantares disminuyó 70% en las ratas artríticas tratadas con 50, 100 y 200 ng/Kg, respectivamente ($p < 0.05$) comparado con el grupo control de artritis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo tratado con IMMP a 25 ng/Kg comparado con el grupo control de artritis. En resumen, los resultados mostrados anteriormente nos sugieren que el IMMP tiene un efecto antiinflamatorio dado que se observó una disminución en la altura de las almohadillas plantares caudales y en el análisis macroscópico y radiológico se observó que había una reducción en el tamaño de las almohadillas y una mejor integridad del hueso y espacio sinovial en las ratas tratadas con dosis ≥ 50 ng/Kg.

Debido a que entre grupos de una población que reciben un tratamiento puede existir variación biológica y por estos resultados decidimos realizar un análisis más

exhaustivo de los diferentes grados de respuesta a las dosis del IMMP, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

% reducción de inflamación	Dosis de IMMP			
	25ng/kg	50ng/kg	100 ng/kg	200ng/kg
100	0	40	40	40
75	0	13	20	40
50	0	36	40	20
25	40	10	0	0
0	60	0	0	0
	% De animales			

Tabla No. 4 Diferentes grados de reducción de la inflamación en respuesta a cuatro diferentes dosis del IMMP

El análisis nos mostró que la proporción (40%) de ratas que tuvieron una reducción del 100 % de la inflamación, fue igual en las tres dosis mayores (50, 100 y 200 ng/kg), sin embargo, se observa que el 40 % de los animales presenta una reducción del 75% a la dosis mayor (200 ng/kg), mientras que sólo el 20 y 13 % de los animales presentas esta reducción a las dosis de 100 y 50 ng/kg, respectivamente. Dado que no existe diferencia en la proporción de animales que presentaron una reducción del 100% en la inflamación, decidimos usar la dosis de más baja donde encontramos el efecto farmacológico, 50 ng/kg para todos los experimentos siguientes.

7.2 Evaluación del efecto del IMMP (50ng/kg) sobre la inflamación y daño articular en el modelo de artritis.

La siguiente fase consistió en evaluar la actividad farmacológica del IMMP en el modelo de artritis implementado, según las condiciones descritas previamente.

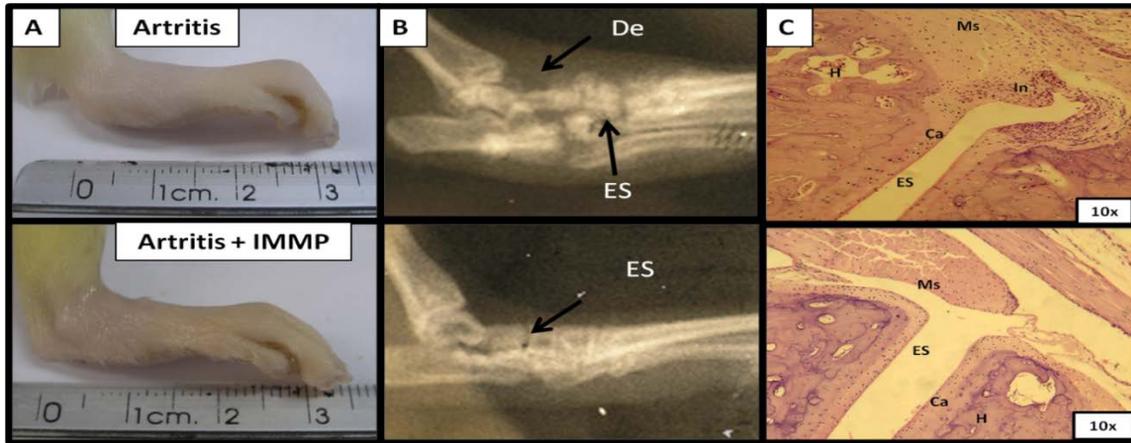


Figura No. 7 Evaluación del efecto del IMMP sobre el daño articular en un modelo de artritis. A: Evaluación macroscópica. B: Evaluación radiográfica. C Evaluación histológica (De: Degradación; ES: Espacio sinovial; Ca: cartílago; H: hueso; IMMP: Metalopéptido-Inmunomodulador).

El efecto del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas se muestra en la figura No. 7, como se puede ver en la evaluación macroscópica (figura 7A), el tratamiento con IMMP reduce el tamaño de las almohadillas caudales; y en la evaluación radiográfica (figura 7B), mantiene la estructura de los bordes de los huesos de la articulación y el espacio sinovial con respecto al grupo de ratas artríticas que no recibieron el tratamiento, lo cual se había observado en los experimentos previamente y nos sugirió que el IMMP disminuye la inflamación y el daño articular. Para determinar el efecto del IMMP sobre la histología de la articulación, se realizó una evaluación histopatológica con la tinción de H&E (figura 7C). Los resultados de esta evaluación, nos muestran que las ratas que recibieron el tratamiento con IMMP, presentan menor infiltrado celular en el espacio sinovial, disminución de la hiperplasia de la membrana sinovial y conservación de la estructura del cartílago y el hueso, con respecto al grupo de ratas artríticas que no recibió el tratamiento.

El tratamiento con IMMP, a las ratas con artritis, produjo, como se observa en la figura 7A una disminución del diámetro de las almohadillas plantares, lo que podemos interpretar como una menor inflamación, que el grupo de animales sin tratamiento. Asimismo, las ratas con artritis, que recibieron el tratamiento con IMMP presentaron un menor diámetro de las almohadillas plantares, es decir, menor inflamación, que el grupo de animales no tratado. En la figura 7B se observa, que los animales tratados, presentan bordes articulares continuos y lisos, lo que indica menor degradación del hueso que el grupo no tratado. Al analizar los cortes histopatológicos de las articulaciones afectadas por la artritis, en los animales tratados con IMMP se observa un menor infiltrado celular en el

espacio sinovial, el cartílago sinovial se encuentra conservado y degradación ósea es menor; con respecto al grupo de ratas sin tratamiento. En su conjunto los resultados muestran que el tratamiento con IMMP detiene el daño articular.

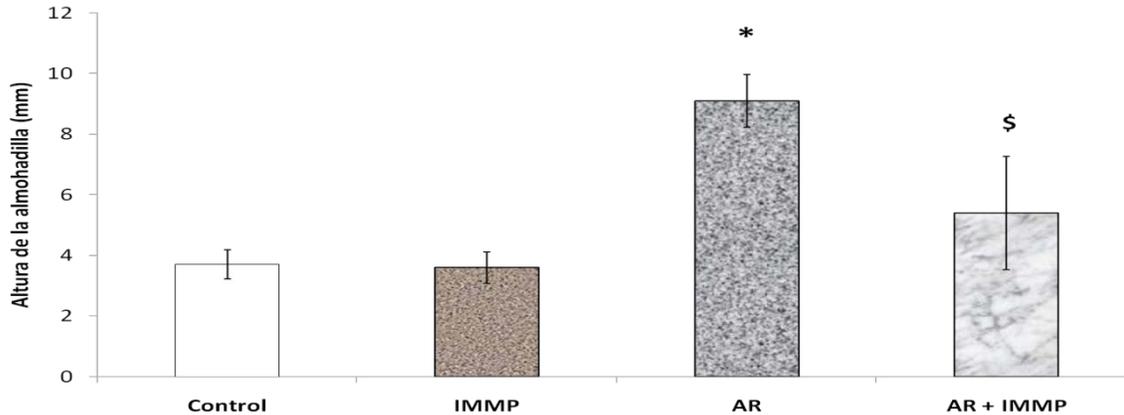


Figura No. 8 Efecto del IMMP sobre la altura de las almohadillas caudales en ratas con artritis. Cada valor representa el promedio de tres experimentos con un n=6. *, $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo control; \$ $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo con artritis $p < 0.05$, con respecto al grupo con artritis.

Para determinar el efecto antiinflamatorio del IMMP se cuantificó la altura de las almohadillas plantares caudales de las ratas artríticas. El efecto del tratamiento con IMMP sobre la altura de las almohadillas se observa en la figura 8, ahí se aprecia que las ratas del grupo con artritis que no recibieron tratamiento presentan el doble de altura de la almohadilla plantar con respecto al grupo de ratas sanas, por otro lado, las ratas artríticas que recibieron el tratamiento con el IMMP presentan una disminución del 75% de la altura de la almohadilla respecto al grupo de ratas artríticas sin tratamiento. Con estos resultados se demuestra que el IMMP es capaz de disminuir la inflamación en las articulaciones sinoviales.

Después de conocer los efectos del tratamiento con IMMP sobre la articulación y dado que el IMMP es un metalo péptido inmunomodulador, decidimos evaluar el efecto del IMMP en dos órganos linfoides, el timo y el bazo (figura No.9).

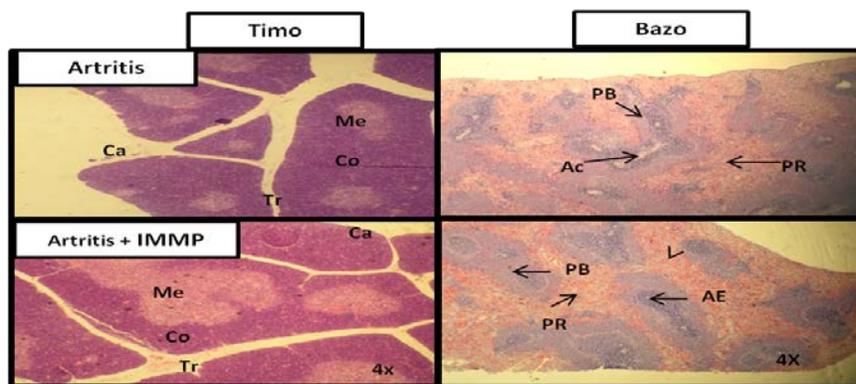


Figura No.9 Comparación histológica por Hematoxilina y Eosina del Timo y Bazo, entre el grupo con Artritis y el grupo con Artritis y tratado con IMMP (Co: corteza; Me: Médula; Tr: Travécula; PB, Pulpa blanca; PR, Pulpa roja; Ac, arteria central).

La evaluación del efecto del IMMP sobre el timo y el bazo se realizó con tinciones por H&E, los resultados muestran que el tratamiento con IMMP incrementa la medula del timo e incrementa la pulpa blanca y los nódulos de proliferación en el bazo, lo cual nos sugiere que el IMMP es capaz de modificar la distribución de las poblaciones de los linfocitos en el timo y el bazo. Probablemente el IMMP pueda estimular la generación de una población reguladora o reducir la población de linfocitos Th17, responsable de la patología de la artritis, dichas hipótesis se deben de corroborar por inmunohistoquímica.

Todos estos resultados nos demuestran que el IMMP es capaz de disminuir la inflamación y el daño articular; por lo cual nos planteamos la siguiente pregunta ¿Qué tan eficaz es el efecto del IMMP, comparado con un fármaco empleado en el tratamiento de la artritis? Con la finalidad de tener un parámetro de referencia y dado que el metotrexato es el fármaco de referencia en los estudios de nuevos fármacos contra la artritis reumatoide, decidimos realizarla comparación entre el efecto del IMMP y este fármaco en el modelo de artritis utilizado. Para ello comparamos el efecto sobre la inflamación y el daño articular con la metodología descrita.

7.3 Comparación del efecto del IMMP y el MTX sobre la inflamación y el daño articular

La comparación del efecto del IMMP vs el MTX a nivel macroscópico y radiográfico se puede observar en la figura 10. En primer lugar, los resultados de la comparación del efecto del IMMP y el MTX a nivel macroscópico, (figura 10A) nos indican que tanto el IMMP

como el MTX disminuyen la inflamación en las articulaciones caudales con respecto al grupo de ratas artríticas sin tratamiento.

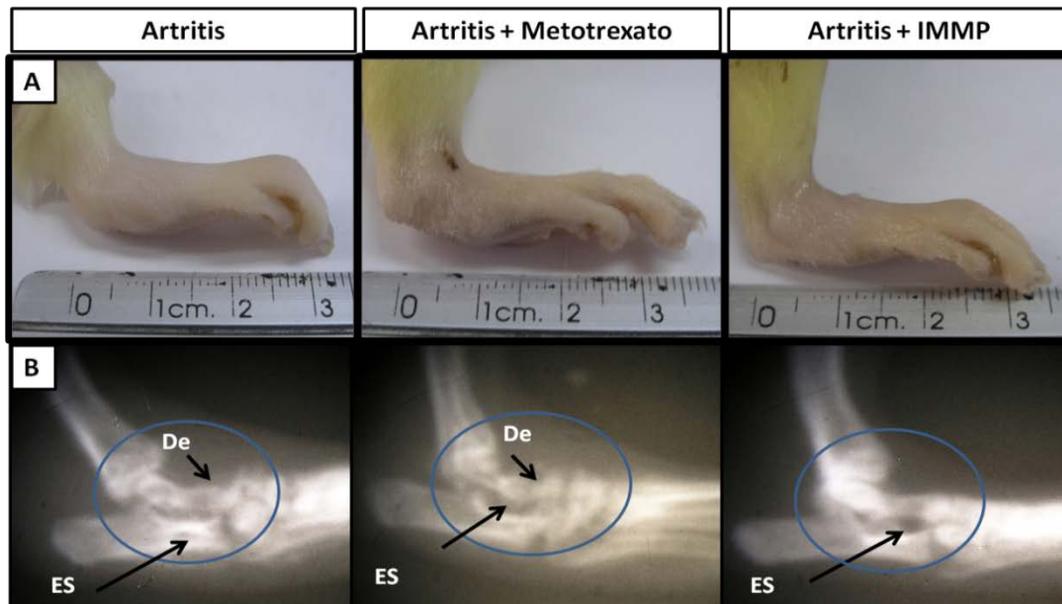


Figura No. 10 Efecto del IMMP en las almohadillas de las ratas con artritis. A Evaluación macroscópica y B radiográfica. IMMP, Metalopéptido inmunomodulador. El grupo con artritis y tratado con IMMP presento menor inflamación que el grupo con artritis.

Para evaluar el daño articular, se realizaron radiografías de las extremidades. En la figura 10B se pueden observar las radiografías de las extremidades caudales. En ellas se aprecia que el grupo con artritis y sin tratamiento presenta mayor degradación de hueso, el espacio sinovial se ve reducido y los bordes de los huesos de la articulación están degradados. El grupo con artritis y Metotrexato presenta menor daño articular con respecto al grupo de artritis sin tratamiento. El grupo con artritis que recibió el IMMP, presenta menos daño ya que en la radiografía, se observa menor degradación, el espacio sinovial está más conservado y los bordes de las articulaciones se conservan.

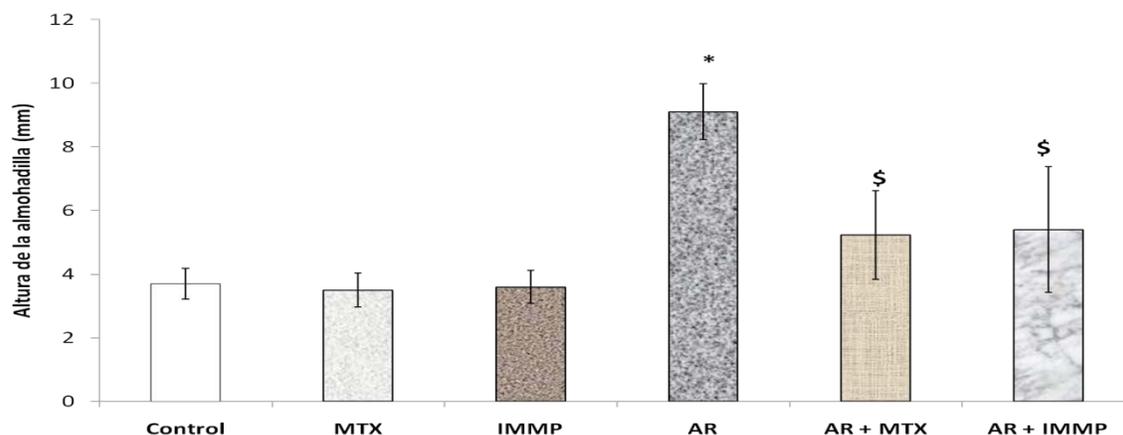


Figura No. 11 Comparación del efecto del IMMP y el MTX en las almohadillas en las ratas con artritis después de tres semanas de tratamiento. IMMP, Metalopéptido inmunomodulador; MTX, metotrexato; AR, artritis reumatoide. *: $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo control; \$ $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo con artritis.

Los resultados anteriores nos muestran de manera cualitativa el efecto del IMMP y del MTX sobre la inflamación; por lo que decidimos realizar una comparación cuantitativa del efecto antiinflamatorio del IMMP y el MTX; midiendo la altura de las almohadillas de las ratas que recibieron estos tratamientos. Nuestros resultados, figura No.11, muestran que las ratas artríticas que recibieron el IMMP disminuyen la inflamación en un 70% y aquellas que recibieron el MTX disminuyen la inflamación en un 90% con respecto al grupo con artritis.

Los resultados anteriores nos indican que la actividad antiinflamatoria del IMMP es menor que la del MTX, por lo que decidimos realizar un análisis de los diferentes grados de disminución de la inflamación de cada una de las ratas artríticas que recibieron el tratamiento con IMMP o con MTX.

% de reducción de inflamación	IMMP (50ng/kg)	MTX (1 mg/kg)
100	40	80
75	13	0
50	36	20
25	10	0
0	0	0
	% de animales	

Tabla No. 5 Diferentes grados de reducción de la inflamación en respuesta al IMMP y al Metotrexato (IMMP: metalopéptido inmunomodulador, MTX: metotrexato).

Los resultados del análisis de los diferentes grados de reducción de la inflamación de las ratas artríticas que fueron tratadas con el IMMP o el MTX se presenta en la tabla No. 5, estos resultados nos muestran que tanto el IMMP como el MTX disminuyen la inflamación en diferentes proporciones. Este análisis arrojó que el 80% de las ratas tratadas con MTX no tienen inflamación y el 20% restante presentan una reducción de la inflamación del 50%. Con respecto a las ratas tratadas con IMMP se observó que existe mayor variación biológica ya que el 40% de las ratas tratadas con IMMP no tienen inflamación, otro 13% disminuyó la inflamación en un 75% y el 36% de las ratas que recibieron este tratamiento redujeron en un 50% la inflamación.

Estos resultados nos indican que el IMMP presenta mayor variación biológica y menor actividad antiinflamatoria que el MTX. Dado estos resultados, queríamos comparar el efecto del IMMP y el MTX sobre el daño articular; para lo cual decidimos realizar una evaluación histológica empleando las tinciones con H & E y Tricrómica de Masson.

La comparación del efecto del IMMP y del MTX sobre el daño articular fue evaluado por medio de las tinciones histológicas con H&E y Tricrómica de Masson. Los resultados del efecto del IMMP y el MTX sobre el daño articular, evaluados por la tinción de H&E (figura 11A) muestran menor infiltrado celular en el espacio sinovial, conservación del cartílago y el hueso, así como disminución de la hiperplasia sinovial; mientras que las ratas tratadas con MTX presentan infiltrado celular en el espacio sinovial, degradación de hueso e hiperplasia sinovial. Por otra parte, la comparación del efecto del IMMP y el MTX sobre la degradación de la matriz ósea se realizó por medio de la tinción de Tricrómica de Masson (figura 11B). Nuestros resultados muestran que las ratas tratadas con IMMP presentan menos degradación de la matriz ósea; por el contrario, las ratas artríticas que recibieron el MTX persiste la degradación de hueso, en comparación con el grupo de ratas artríticas sin tratamiento.

Decidimos realizar una comparación cuantitativa del efecto del IMMP y el MTX sobre el daño articular, empleando para ello los cortes histológicos teñidos con H&E y Tricrómica de Masson, tomando en consideración los siguientes cuatro parámetros; erosión del hueso, erosión del cartílago, disminución del espacio articular e hiperplasia sinovial.

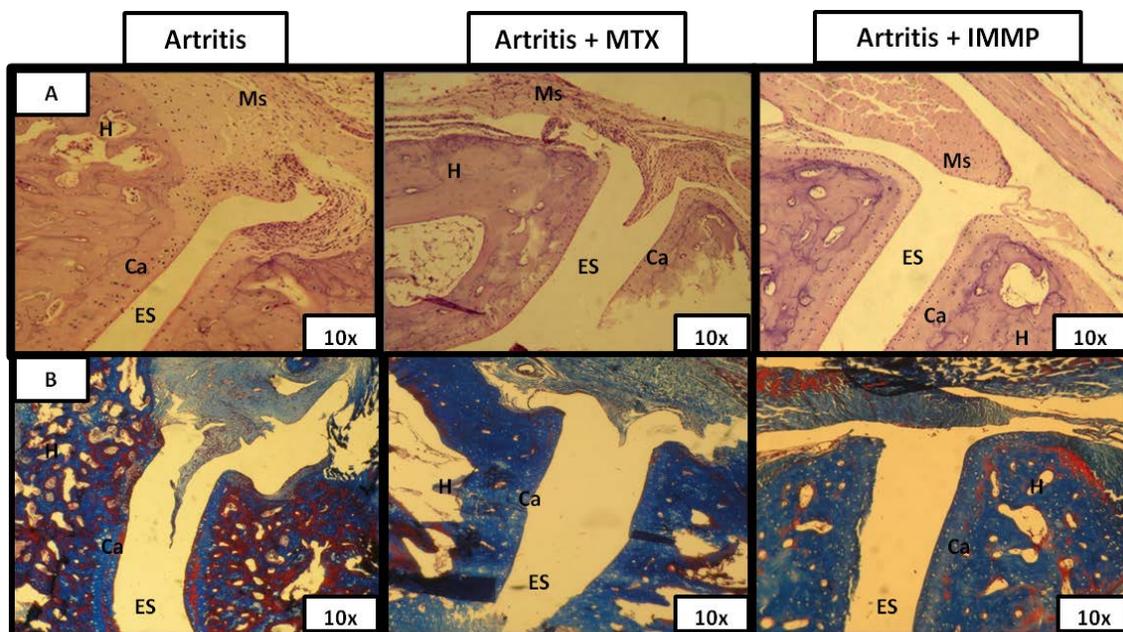


Figura No. 12 Comparación del efecto farmacológico del IMMP y el MTX en las almohadillas caudales en las ratas con artritis. Evaluación histológica por H & E (A) y por Tricromía de Masón (B) del daño articular. C: Cartílago. H: Hueso; ES: Espacio Sinovial, MS: Membrana sinovial.

Hallazgo histológico	Artritis	IMMP (50ng/kg)	MTX (1 mg/kg)
Erosión del hueso	+++	+	+
Erosión de cartílago	+++	+	++
Disminución del espacio articular	+++	-	++
Hiperplasia	+++	+	+++

Tabla No. 6 Comparación del IMMP y el MTX sobre el daño articular en las almohadillas caudales de las ratas con artritis.

Los resultados de este análisis se presentan en la tabla No.6 éstos muestran que las ratas tratadas con IMMP disminuyen el daño articular, dado que reduce la erosión del hueso y cartílago, hay menor disminución del espacio sinovial e hiperplasia de la membrana sinovial, con respecto al grupo de ratas que no recibió tratamiento. El MTX también disminuyó el daño articular en comparación con el grupo de ratas sin tratamiento; sin embargo, el efecto fue mucho menor en comparación con el grupo tratado con IMMP; ya que el MTX solamente disminuyó dos de los cuatro parámetros que evaluamos para el daño articular (la erosión del cartílago y la disminución del espacio sinovial).

Todos estos resultados nos permiten decir que el IMMP es más eficaz para reducir el daño articular que el MTX y también nos hizo preguntarnos ¿Cómo el IMMP modula la respuesta inmune para disminuir el daño articular? Para resolver esta pregunta decidimos comparar el efecto del IMMP y el MTX sobre el timo y el bazo.

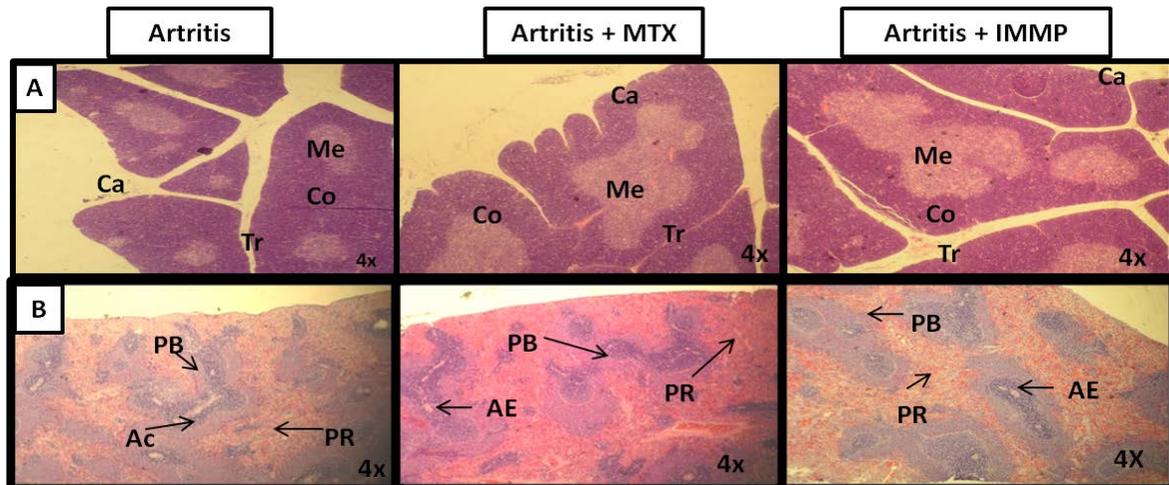


Figura No. 13 Comparación del efecto del IMMP y el Metotrexato sobre timo (A) y el bazo (B), respectivamente, de ratas artríticas. Evaluación histológica por H & E (Co: corteza; Me: Médula; Tr: Travécula; PB: Pulpa blanca; PR: Pulpa roja; AE: arteria esplénica).

Nuestros resultados, figura 13A, muestran el efecto del IMMP y el MTX sobre el timo por medio de cortes histológicos teñidos con H&E. Tanto las ratas tratadas con IMMP como con MTX mostraron un incremento de las células de la médula del timo, con respecto al grupo con artritis, lo cual nos indica que hay un incremento en el número de células en proliferación. También evaluamos el efecto del IMMP y del MTX en el bazo (figura 13B), las ratas que recibieron el tratamiento con MTX presentan menos nódulos de proliferación que las ratas sin tratamiento, dicho efecto se debe al efecto inmunosupresor del MTX sobre los linfocitos en el bazo. Por otro lado, aquellas ratas que fueron tratadas con IMMP presentan un incremento en la pulpa blanca y un aumento del tamaño de los nódulos secundarios. Estos resultados nos sugieren que el efecto del IMMP pudiera darse a través de la modificación de las poblaciones de linfocitos.

Dado que encontramos que el IMMP puede modificar la población de linfocitos pensamos que quizás esos cambios se deban a cambios en el perfil de citocinas y quimiocinas, así que decidimos evaluar el efecto del IMMP y el MTX sobre los niveles séricos de IL-1 β , INF- γ , IL-4 y una quimiocina MCP-1.

En la figura No.14 mostramos el efecto del IMMP y el MTX sobre los niveles séricos de IL-1 β , INF- γ , IL-4. Las ratas tratadas con IMMP presentan disminución de los niveles séricos de IL-1 β con respecto al grupo de ratas sin tratamiento; en el proceso patológico de la artritis la IL-1 β es producida principalmente por los macrófagos y es la encargada de la expresión de factores quimioatrayentes en las células endoteliales las cuales permitirán la migración de células al espacio sinovial, también estimula a los sinoviocitos y condrocitos para que ellos secreten metaloproteasas las cuales degradan el cartílago además la IL-1 β permite la activación de osteoclastos (Kay J, 2004), nuestros resultados nos sugieren que el proceso inflamatorio es menor cuando administramos el IMMP, así como el reclutamiento de células inflamatorias en la articulación y menor degradación del cartílago, cuando se disminuyen las MMPs (Noh E et al 2009) y hueso lo cual se puede observar en el análisis histológico de las articulaciones. Las ratas que recibieron el MTX presentan tendencia a disminuir los niveles séricos de esta citocina, esto explicaría el efecto antiinflamatorio que observamos en los resultados previos.

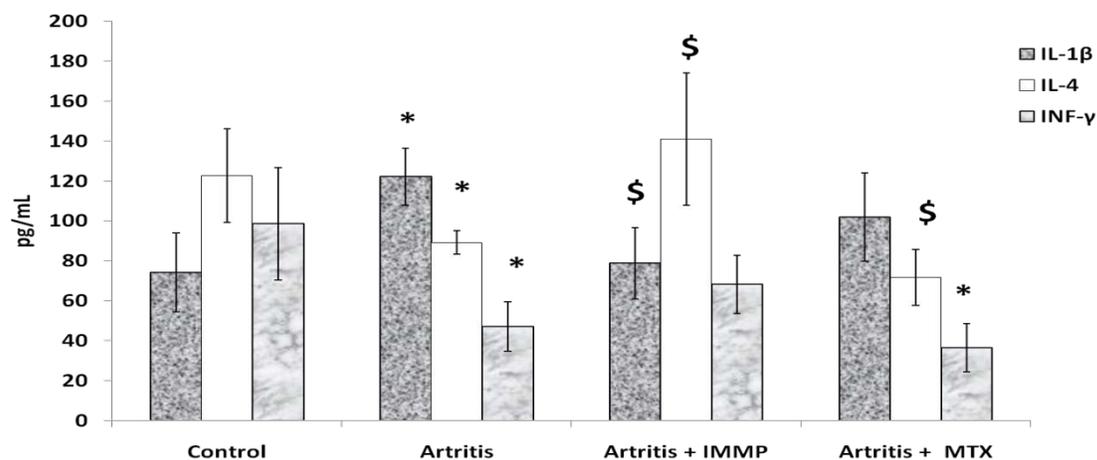


Figura No. 14 Efecto del tratamiento con IMMP y MTX sobre los niveles séricos de IL-1 β , IL-4 e INF- γ en ratas artríticas. (IMMP, Metalopéptido inmunomodulador; MTX, metotrexato; AR, artritis reumatoide. *, $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo control; \$ $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo con artritis).

Nuestros resultados también muestran que el tratamiento con IMMP incrementa los niveles séricos de IL-4 con respecto al grupo con artritis; la IL-4 es considerada una citocina antiinflamatoria porque inhibe la síntesis de IL-1 β , TNF- α e IL-6, la activación de los linfocitos Th17 y la angiogénesis presentes en la artritis (Wallis S K et al 2011), estos resultados sugieren una disminución del proceso inflamatorio y del daño articular como se puede observar en los resultados previos y las histologías. Por otro lado, el tratamiento con

MTX disminuye los niveles de IL-4 con respecto al grupo de ratas artríticas, al disminuir esta citocina, el proceso de angiogénesis continua y por lo tanto el infiltrado celular presente en las histologías de las ratas que recibieron este tratamiento.

También se determinaron los niveles séricos de INF- γ , observando que el grupo de ratas artríticas tratadas con IMMP presenta la tendencia a incrementar los niveles de esta citocina con respecto al grupo con artritis; reportes previos indican que un incremento en los niveles séricos de IL-4 e INF- γ disminuye la respuesta Th17 implicada en la patología de la artritis (Wallis S K et al 2011), nuestros resultados sugieren que el IMMP disminuye la población Th17 y en consecuencia la inflamación y el daño articular. El grupo de ratas tratadas con el MTX mantiene niveles séricos de esta citocina, lo cual nos sugiere que la respuesta Th17 continúa así como el daño articular.

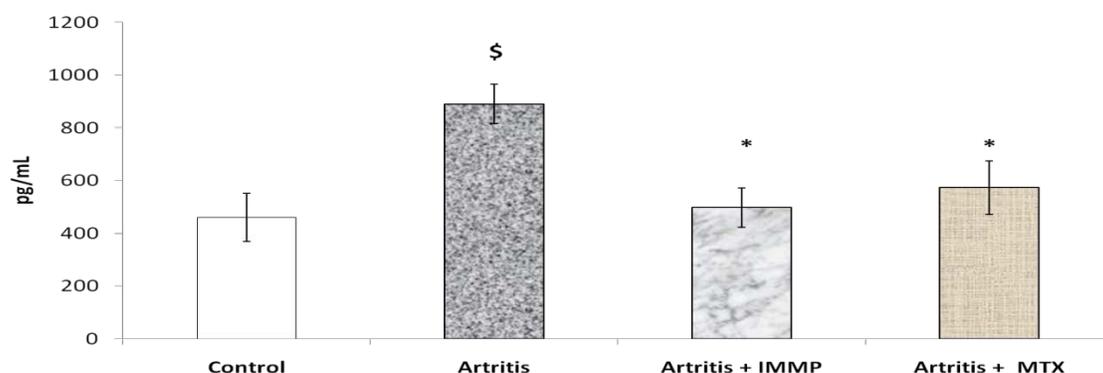


Figura No. 15 Niveles séricos de la quimiocina MCP-1 en ratas artríticas tratadas con IMMP y MTX. (IMMP, Metalopéptido inmunomodulador; MTX, metotrexato; AR, artritis reumatoide. *, $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo control; \$ $p < 0.05$ hay diferencia respecto al grupo con artritis).

Cuando determinamos los niveles séricos de MCP-1 encontramos una disminución de los niveles séricos de quimiocinas MCP-1, esta quimiocina es producida por monocitos, células endoteliales vasculares, células epiteliales y células osteoclasticas, cuya función es atraer monocitos, es inducida por IL-1 β y TNF- α , pero es inhibida su expresión por INF- γ (Robín BH et al 1992; Williams S R et al 1992) nuestros hallazgos explicarían la disminución del infiltrado de monocitos encontrados en el espacio sinovial de las articulaciones, así como una disminución del daño articular por una menor activación de los osteoclastos. Dado que el IMMP disminuyó los niveles séricos del MCP-1, nos sugiere una disminución de Metaloproteasas y por consiguiente menor degradación del cartílago; como lo

encontrado en estudios previos realizados por Evans L et al 2011 y Nanjundaiah S M et al 2012.

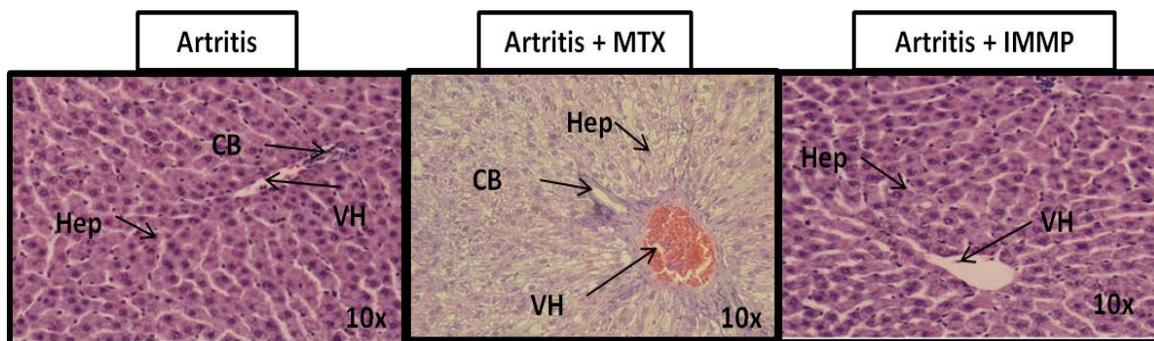


Figura No.16 Comparación del efecto del IMMP y el Metotrexato sobre el hígado en ratas artríticas. Evaluación histológica por H & E. (IMMP Metalo-péptido inmunomodulador; CB, conducto biliar; Hep; Hepatocitos, VH, vena hepática).

Después de determinar los efectos del IMMP y el MTX sobre la inflamación, el daño articular y las citocinas; decidimos evaluar si estos tratamientos tienen efectos tóxicos en los riñones y el hígado.

Los resultados de la evaluación histológicas por H& E de los hígados tratados con IMMP y MTX se presentan en la figura No. 16. Observamos que el MTX provocó hepatotoxicidad en las ratas artríticas que recibieron este tratamiento, sin embargo, las ratas que recibieron el IMMP no mostraron hepatotoxicidad. Por otro lado, también se evaluó si el IMMP y el MTX eran capaces de producir efectos nefrotóxicos; se encontró que ni el IMMP ni el MTX son capaces de provocar daño en los riñones (histologías no mostradas). Estos resultados nos indican que el tratamiento con hepatotóxico, a diferencia del tratamiento con MTX, el cual provocó hepatotoxicidad.

8.0 DISCUSIÓN

8.1 Efecto de diferentes dosis del IMMP sobre la inflamación y el daño articular en ratas artríticas.

Se realizó una curva dosis respuesta del efecto del IMMP sobre la inflamación de las articulaciones de las ratas, empleando las dosis de 0, 25, 50, 100 y 200 ng/kg; decidimos usar estas dosis ya que en un estudio previo realizado por Osuna-Martinez et al 2011, emplearon dosis similares para evaluar el efecto inmunomodulador de un Octapeptido en un modelo de fibrosis y daño hepático de origen inmunológico. Los resultados de esta curva nos sugieren que el tratamiento con IMMP a dosis ≥ 50 ng/Kg reduce la inflamación en un modelo de artritis inducida por colágeno tipo II.

Para evaluar el efecto del IMMP sobre el daño articular se tomaron radiografías de las extremidades de las ratas que recibieron las diferentes dosis del IMMP y se comparó con las ratas control que no desarrollaron artritis, Los resultados muestran que las ratas que recibieron dosis >50 ng/kg presentaron menor daño, ya que conservaron el espacio sinovial y hay menor erosión de hueso y cartílago.

Los resultados del análisis macroscópico del tamaño de la almohadilla y radiográfico sugirieron que el IMMP disminuye la inflamación y el daño articular en ratas artríticas inducidas por colágeno tipo II; dado que no existe diferencia significa en estos dos parámetros cuando se administraron 50, 100 y 200 ng/kg, se decidió usar la dosis más baja donde encontramos el efecto farmacológico, 50 ng/kg para todos los experimentos siguientes.

8.2 Evaluación del efecto del IMMP (50ng/kg) sobre la inflamación y daño articular en el modelo de artritis.

Después de que se determinó la dosis de 50 ng/kg para los experimentos, se evaluó el efecto del IMMP sobre la inflamación empleando una evaluación macroscópica de las articulaciones y midiendo el tamaño de las mismas. Los resultados mostraron que el IMMP disminuye el tamaño de la articulación con respecto al grupo de artritis reumatoide que no recibió tratamiento, lo cual sugiere que disminuye la inflamación. Para determinar si el IMMP detenía el daño articular se hizo una evaluación nivel radiográfico e histológico empleando la tinción de H &E.

Las radiografías de los animales tratados con 50ng/kg, presentan bordes articulares continuos y lisos, lo que indica menor degradación del hueso que el grupo no tratado. Al analizar los cortes histopatológicos de las articulaciones afectadas por la artritis, en los animales tratados con IMMP se observa un menor infiltrado celular en el espacio sinovial, el cartílago sinovial se encuentra conservado y la degradación ósea es menor; con respecto al grupo de ratas sin tratamiento. En su general los resultados muestran que el tratamiento con IMMP detiene el daño articular.

Dado que observamos cambios histopatológica en la articulación sinovial de las ratas que recibieron el IMMP, esto nos sugiere que el IMMP produce cambios en las células inmunes involucradas en el daño articular. Por eso se decidió evaluar el efecto del IMMP en dos órganos linfoides el timo, órgano linfoide primario y el bazo, órgano linfoide secundario.

La evaluación del efecto del IMMP sobre el timo y el bazo se hizo con la tinción de H&E. Se observó que el tratamiento con IMMP incrementa la medula del timo e incrementa la pulpa blanca y los nódulos de proliferación en el bazo, lo cual nos sugiere que el IMMP es capaz de modificar la distribución de las poblaciones de los linfocitos en el timo y el bazo. Probablemente el IMMP pueda estimular la generación de una población reguladora de linfocitos T o reducir la población de linfocitos Th17, la cual es responsable de la patología de la artritis de acuerdo a los estudios hechos por Roeleveld DM, en 2015.

Los resultados nos muestran que aplicando 50 ng/kg del IMMP disminuye la inflamación y detiene el daño articular, probablemente modificando la respuesta inmune. Para conocer que tan eficaz es el IMMP se decidió hacer una evaluación comparativa entre el IMMP y el Metrotexato (MTX), se usó este medicamento porque es el más empleado para probar nuevos tratamientos contra la artritis reumatoide.

8.3 Comparación del efecto del IMMP y el MTX sobre la inflamación y el daño articular

Los resultados de la comparación del efecto del IMMP y el MTX a nivel macroscópico al cuantificar el tamaño de las articulaciones nos indican que tanto el IMMP como el MTX disminuyen la inflamación en las articulaciones caudales con respecto al grupo de ratas artríticas sin tratamiento; el IMMP disminuyen la inflamación en un 70% y

mientras que el MTX disminuyen la inflamación en un 90% con respecto al grupo con artritis.

Los resultados anteriores nos indican que la actividad antiinflamatoria del IMMP es menor que la del MTX, por lo que decidimos realizar un análisis de los diferentes grados de disminución de la inflamación de cada una de las ratas artríticas que recibieron el tratamiento con IMMP o con MTX.

Para hacer la comparación del efecto del IMMP y del MTX sobre el daño articular se usaron las tinciones histológicas con H&E y Tricrómica de Masson. La tinción de H&E de las ratas tratadas con IMMP muestra menor infiltrado celular en el espacio sinovial, conservación del cartílago y el hueso, así como disminución de la hiperplasia sinovial; mientras que las ratas tratadas con MTX siguieron presentando infiltrado celular en el espacio sinovial, degradación de hueso e hiperplasia sinovial.

La tinción de Tricrómica de Masson nos permite evaluar el grado de daño articular sobre el colágeno y la matriz ósea. Los resultados muestran que las ratas tratadas con IMMP presentan menos degradación de la matriz ósea y conservación del cartílago; por el contrario, las ratas artríticas que recibieron el MTX persiste la degradación de hueso, en comparación con el grupo de ratas artríticas sin tratamiento.

Estos resultados nos indican que el IMMP es más eficaz para reducir el daño articular que el MTX.

En los resultado previos se observó que el IMMP puede modificar las poblaciones de linfocitos tanto en el timo como en el bazo, cuando se compararon los cortes histológicos tenidos con H & E se encontró que tanto las ratas artríticas tratadas con el IMMP como el MTX incrementan las poblaciones de linfocitos en el timo; pero al analizar los cortes histológicos de los bazos, se encontramos que el número de nódulos de proliferación en el bazo de la ratas artríticas tratadas con MTX es menor en comparación con las ratas artríticas tratadas con el IMMP.

Estos resultados nos sugieren que el tratamiento con el MTX presenta un efecto inmunosupresor sobre los linfocitos en el bazo. Por otro lado aquellas ratas que fueron tratadas con IMMP presentan un incremento en la pulpa blanca y un aumento del tamaño

de los nódulos secundarios. Estos resultados nos sugieren que el efecto del IMMP pudiera darse a través de la modificación de las poblaciones de linfocitos.

Dado que encontramos que el IMMP puede modificar la población de linfocitos se sugiere que los cambios en la población de linfocitos se debe a cambios en el perfil de citocinas y quimiocinas, para lo cual se decidió evaluar el efecto del IMMP y el MTX sobre los niveles séricos de IL-1 β , INF- γ , IL-4 y una quimiocina MCP-1.

Las ratas tratadas con IMMP presentan disminución de los niveles séricos de IL-1 β con respecto al grupo de ratas artríticas sin tratamiento; como se ha reportado en el proceso patológico de la artritis la IL-1 β es producida principalmente por los macrófagos y es la encargada de la expresión de factores quimioatrayentes en las células endoteliales las cuales permitirán la migración de células al espacio sinovial, también estimula a los sinoviocitos y condrocitos para que ellos secreten metaloproteasas las cuales degradan el cartílago, además la IL-1 β permite la activación de osteoclastos (Kay J, 2004) encargados de la degradación del hueso, Nuestros resultados nos sugieren que el proceso inflamatorio es menor cuando administramos el IMMP, así como el reclutamiento de células inflamatorias en la articulación y menor degradación del cartílago y hueso cuando se disminuyen las MMPs (Noh E, 2009). Mientras que las ratas que recibieron el MTX presentan tendencia a disminuir los niveles séricos de esta citocina, esto explicaría el efecto antiinflamatorio que observamos en los resultados previos de ambos grupos de animales.

La determinación de los niveles séricos de MCP-1 nos mostró una disminución de los niveles séricos de quimiocinas MCP-1, esta quimiocina es producida por monocitos, células endoteliales vasculares, células epiteliales y células osteoclasticas, cuya función es atraer monocitos, es inducida por IL-1 β y TNF- α , pero es inhibida su expresión por INF- γ (Robín BH et al 1992; Williams S R et al 1992) nuestros resultados explicaría la disminución del reclutamiento e infiltrado de monocitos encontrados en el espacio sinovial de las articulaciones, así como una disminución del daño articular por una menor activación de los osteoclastos.

Dado que el IMMP disminuyó los niveles séricos del MCP-1, nos sugiere una disminución de Metaloproteasas y por consecuente menor degradación del cartílago; como lo encontrado en estudios previos realizados por Evans L et al 2011 y Nanjundaiah S M et al 2012. Estos resultados nos indican que el MTX disminuye la inflamación debido a un efecto supresor de las células linfoides en el bazo, pero no es eficaz en detener el daño

articular; por otro lado, el IMMP es más eficaz en detener la inflamación y el daño articular ya que regulan la respuesta inmune sin suprimirla al disminuir tanto la citocinas inflamatorias como la quimioquina MCP1 que es encargada del reclutamiento de los monocitos y la activación de los osteoclastos y sus MMPs.

Nuestros resultados también muestran que el tratamiento con IMMP incrementa los niveles séricos de IL-4 con respecto al grupo con artritis; la IL-4 es considerada una citocina antiinflamatoria porque inhibe la síntesis de IL-1 β , TNF- α e IL-6, la activación de los linfocitos Th17 y la angiogénesis presentes en la artritis (Wallis SK, 2011).

Estos resultados sugieren una disminución del proceso inflamatorio y del daño articular como se puede observar en los resultados previos y las histologías. Por otro lado el tratamiento con MTX disminuye los niveles de IL-4 con respecto al grupo de ratas artríticas, al disminuir esta citocina, el proceso de angiogénesis continúa y por lo tanto el infiltrado celular presente en las histologías de las ratas que recibieron este tratamiento.

También se determinaron los niveles séricos de INF- γ , observando que el grupo de ratas artríticas tratadas con IMMP presenta la tendencia a incrementar los niveles de esta citocina con respecto al grupo con artritis; reportes previos indican que un incremento en los niveles séricos de IL-4 e INF- γ disminuye la respuesta Th17 implicada en la patología de la artritis (Wallis S K et al 2011), nuestros resultados sugieren que el IMMP disminuye la población Th17 y en consecuencia la inflamación y el daño articular. El grupo de ratas tratadas con el MTX mantiene niveles séricos de esta citocina, lo cual nos sugiere que la respuesta Th17 continúa, así como el daño articular.

9.0 CONCLUSIONES

9.1 Conclusión general

El tratamiento con IMMP a ratas con artritis, disminuye la inflamación y daño articular de manera dosis dependiente.

9.2 Conclusiones Particulares

El tratamiento con IMMP a ratas con artritis, disminuye los niveles séricos de la citocina proinflamatoria IL-1 β , e incrementa los niveles de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IFN- γ , asimismo, reduce los niveles séricos de la quimiocina MCP-1, quimioatrayente de monocitos, en un modelo de artritis.

No se observaron efectos tóxicos producidos por la administración del IMMP.

La respuesta al tratamiento no es uniforme en todo el grupo de animales tratados, las dosis mayores de 50 ng/kg elimina el 100 % de la inflamación en aproximadamente el 40 % de los animales.

Los efectos producidos por el IMMP y el metotrexato son diferentes; el IMMP disminuye la destrucción de cartílago y hueso, disminuye la hiperplasia sinovial, y evita la reducción del espacio sinovial, todos ellos en mejor proporción que el MTX, por lo contrario, el metotrexato disminuye la inflamación en mayor proporción que el IMMP.

El IMMP modifica la histología del timo y del bazo, pero pareciera no ser que los cambios sean nocivos; mientras que el MTX provoca produce una disminución de los linfocitos del bazo (reducción de la pulpa blanca) y es tóxico para el hígado, produciendo necrosis y esteatosis.

El tratamiento con IMMP modifica los niveles de algunas citocinas séricas: disminuye la IL-1 β , e incrementa IL-4 e INF- γ .

El tratamiento con IMMP disminuye los niveles séricos de la quimiocina MCP-1.

10.0 PERSPECTIVAS

Realizar la evaluación sérica de la IL17 en el suero de las ratas artríticas

Realizar Inmunohistoquímicas en el tejido articular para determinar la población de Th17 involucrada en la artritis reumatoide

Realizar Inmunohistoquímicas en el tejido articular para determinar la población de linfocitos Treg con el marcador de FOXP3

Realizar Inmunohistoquímicas en el tejido linfoides secundario para determinar la población de Th17 involucrada en la artritis reumatoide

Realizar Inmunohistoquímicas en el tejido linfoides secundario para determinar la población de linfocitos Treg con el marcador de FOXP3

Determinar la producción de MMP3 en las articulaciones de las ratas con artritis reumatoide

Comparar los niveles de IL17 entre las ratas artríticas y las ratas artríticas tratadas con IMMP

Comparar las poblaciones de Th17 y Treg en la articulación sinovial de las ratas artríticas y las ratas artríticas tratadas con IMMP

Comparar las poblaciones de Th17 y Treg en el tejido linfoides secundario de las ratas artríticas y las ratas artríticas tratadas con IMMP

Comparar los niveles de MMP3 en las ratas artríticas y las ratas artríticas tratadas con IMMP

11.0 REFERENCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Inmunología celular y molecular**. Editorial Elsevier, 7ma Edición (2012): 55-75.

Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. **Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy**. *Biomed Pharmacother.* (2017); 92:615-633.

Álvarez-Hernández E, Peláez-Ballestas I, Boonen A, Vázquez-Mellado J, Hernández-Garduño A, Rivera FC, Teran-Estrada L, Ventura-Ríos L, Ramos-Remus C, Skinner-Taylor C, Goycochea-Robles MV, Bernard-Medina AG, Burgos-Vargas R. **Catastrophic health expenses and impoverishment of households of patients with rheumatoid arthritis**. *Reumatol Clin.* (2012); 8(4):168-173.

American College of Rheumatology. **Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis 2015 Update**. *Arthritis Rheum.* (2015); 46:328-346.

Badillo-Jiménez AL. **Evaluación farmacológica y toxicológica del THF**. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. (2005): 56-62.

Barack Y, Hahn T, Pecht M, Karov Y, Berrebi A, Zaizov R, Stark B, Buchner V, Burstein Y, Trainin N. **Thymic humoral factor gama 2, an immunoregulatory peptide, enhances human hematopoietic progenitor cell grow**. *Exp Hematol.* (1992); 20(2): 173-177.

Barreto G, Cichevski V, Duarte A, Ferreira A, Lorenzo E. **Manual de diagnóstico y tratamiento de la Artritis reumatoide**. *Biomedicina.* (2006); 2, (2): 108-120.

Beatty DW, Handzel ZT, Pecht M, Ryder CR, Hughes J, McCabe K, Trainin N. **A controlled trial of treatment of acquired immunodeficiency in severe measles with thymic humoral factor**. *Clin Exp Immunol.* (1984), 56 (3): 479-485.

Ben-Hur H, Pecht M, Netzer L, Borenstein R, Blickstein I, Burstein Y, Trainin N. **Immune modulation exerted by thymic humoral factor (THF-gama 2), on T-cell subsets and IL-2 production of umbilical cord blood lymphocytes**. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* (1990); 12(1):123-33.

Bennett CJ, Plum F. **Cecil Tratado de medicina interna**. Editorial Mc Graw Hill Interamericana México D.F. (2000) 2: 1663-1693.

Bingham CO. **Emerging Therapeutics for Rheumatoid Arthritis**. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* (2008); 66(3):210-5.

Brennan FM, McInnes IB. **Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis**. *J Clin Invest.* (2008); 118(11):3537-3545.

Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. **Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers**. *Nat Rev Rheumatol.* (2016); 12(12):731-742

Burgos-Portillo R, Aríspe-Céspedes J, Arias-Ledesma A. **Artritis Reumatoidea**. *Rev. Pacea Med Fam* (2006); 3(4): 62-66.

Burmester GR, Pope JE. **Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis**. *Lancet*. (2017); 389(10086):2338-2348.

Burstein Y, Buchner V, Pecht M, Trainin N. **Thymic Humoral Factor gama 2: purification and amino acid sequence of an immunoregulatory peptide from calf thymus**. *Biochemistry*. (1988); 27(11):4066-4071.

Cardiel MH, Díaz-Borjón A, Vázquez del Mercado-Espinosa M, Gámez-Nava JI, Barile-Fabrise LA, Pacheco-Tena C, Silveira-Torre LH, Pascual-Ramos V, Goycochea Robles MV, Aguilar-Areola JE, González-Díaz V, Álvarez-Nemegyei J, González-López LC, Salazar-Páramo M, Portela-Hernández M, Castro-Colín Z, Xibillé-Friedman DX, Álvarez-Hernández E, Casasola-Vargass J, Cortés-Hernández M, Flores-Alvarado DE, Martínez-Martínez LA, Vega-Morales D, Flores-Suárez LF, Medrano-Ramírez G, Barrera-Cruz A, García-González A, López-López SM, Rosete-Reyes A, Espinosa-Morales R **Actualización de la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología**. *Reumatol Clin*. 2014; 10(4): 227–240

Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. **Methotrexate in rheumatoid arthritis: optimizing therapy among different formulations. Current and emerging paradigms**. *Clin Ther*. (2014); 36(3):427-435

Cope A. **T cells in the rheumatoid arthritis**. *Arthritis research and therapy*. (2008); 10, (1): S1-S10.

Cornish A L, Campbell I K, McKenzie B S, Chatfield S, Wicks P. **G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis**. *Nat. Rev. Rheumatol*. (2009); 5: 554–559

Cotran, Kumar, Collins **Patología Estructural y Funcional (Robbins)** Editorial Mc Graw Hill, 9a ed. (2015).

Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Caputi A P, Salvemini D. **Effects of Combination M40403 and Dexamethasone Therapy on Joint Disease in a Rat Model of Collagen-Induced Arthritis**. *Arthritis & Rheumatism* (2005); 52(6): 1929–1940.

Di Paola R, Cuzzocrea S. **Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis**. *Autoimmunity Reviews* (2008); 8: 73–75.

Di YM, Zhou ZW, Guang Li C, Zhou SF. **Current and future therapeutic targets of rheumatoid arthritis**. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. (2011); 10(2): 92-120.

Dinser R. **Animal model for arthritis**. *Best Pract Res ClinRheumatol*. (2008); 2 (22): 253-267.

Drexler S K, Kong P L, Wals J, Foxwell B M. **Cell signaling in macrophages, the principal innate immune efftor cells of rheumatoid arthritis**. *Arthritis research and Therapy*. (2008); 10, 5: 216-228.

Durie F H, Fava R, Noelle R. **Short Analytical Review. Collagen- induced Arthritis as a model of Rheumatoid Arthritis.** *Clinical immunology and immunopathology.* (1994); 73(1): 11-18

Emery P, Breedveld F C, Dougado M. **Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence development of clinical guide.** *Ann Rheum. Dis.* (2002); 61: 29:297.

Gabriel SE, Michaud K. **Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic.** *Arthritis Research and Therapy.* (2009); 11(3): 1-16.

Galofre JC. **Manejo de los corticoides en la práctica clínica.** *Rev Med Univ Navarra.* (2009); 3(1): 9 -18.

Goldblatt F, Isenberg D A. **New therapies for rheumatoid arthritis.** *Clinical and experimental Immunology.* (2005); 140: 195-204.

Hsu Y, Li H, Hsieh M, Liu M, Huang K, Chin L, Chen P, Cheng H, Chang M. **Function of Interleukin-20 as a Proinflammatory Molecule in Rheumatoid and Experimental Arthritis.** *Arthritis Rheum.* (2006); 54(9): 2722-2733.

IMSS. **Evaluación de Riesgos Considerados en el Programa de Administración de Riesgos Institucionales.** (2009).

Ishikawa T, Nishigaki F, Miyata S, Hirayama Y, Minoura K, Imanishi J, Neya M, Mizutani T, Imamura Y, Naritomi Y, Murai H, Ohkubo Y, Kagayama A, Mutoh S. **Prevention of progressive joint destruction in collagen-induced arthritis in rats by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, FR255031.** *Br J Pharmacol.* (2005); 144(1):133-43.

Inoue T, Kohno M, Nagahara H, Murakami K, Sagawa T, Kasahara A, Kaneshita S, Kida T, Fujioka K, Wada M, Nakada H, Hla T, Kawahito Y. **Upregulation of sphingosine-1-phosphate receptor 3 on fibroblast-like synoviocytes is associated with the development of collagen-induced arthritis via increased interleukin-6 production.** *PLoS One.* (2019); 14(6): 1-15.

Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. **Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients.** (2008); 275: 4448-4455.

Rodríguez-Jaillier, JC, Posada-Arango, AM, Martínez-Pérez, DA. **Challenges faced in Latin America for the implementation of an ideal health-care model for rheumatoid arthritis patients: are we ready?** *Clin Rheumatol.* (2015); 34(1): 79-93

Katorza E, Pecht M, Apte RN, Benharroch D, Burstein Y, Trainin N, Ranger-Zisman B. **Restoration of immunological responses by THF, a thymic hormone, in mice infected with murine cytomegalovirus.** *Br J Pharmacol.* (2005); 144(1): 133–143.

Khurana R, Berney SM. **Clinical aspects of rheumatoid arthritis.** *Pathophysiology* (2005); 12(3): 153-165.

Knedla A, Neuman E, Muller-Lander U. **Developments in the synovial biology field 2006.** *Arthritis Res Ther.* (2007); 9(2): 209-224.

Komatsu N, Takayanagi H. **Regulatory T cells in Arthritis.** *Prog Mol Biol Transl Sci.* (2015); 136: 207-215.

Ku IA, Imboden J B, Hsue P Y, Ganz P. **Rheumatoid Arthritis – A model of systematic inflammation riving Atherosclerosis.** *Circ J.* (2009); 73: 977-985.

Maneiro JR, Souto A, Gómez-Reino JJ. **Risks of malignancies related to tofacitinib and biological drugs in rheumatoid arthritis: Systematic review, meta-analysis, and network meta-analysis.** *Semin Arthritis Rheum.* (2017); 47(2):149-156.

Massardo L, Pons-Estel BA, Wojdyla D, Cardiel MH, Galarza-Maldonado CM, Sacnun MP, Soriano ER, Laurindo IM, Acevedo-Vásquez EM, Caballero-Urbe CV, Padilla O, Guibert-Toledano ZM, da Mota LM, Montufar RA, Lino-Pérez L, Díaz-Coto JF, Achurra-Castillo AF, Hernández JA, Esteva-Spinetti MH, Ramírez LA, Pineda C, Furst DE (2012). **Early rheumatoid arthritis in Latin America: low socioeconomic status related to high disease activity at baseline.** *Arthritis Care Res (Hoboken).* (2012); 64(8):1135-1143.

Michaud K, Wolfe F. **Comorbidities in rheumatoid arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol.* (2007); 2(21): 885- 906.

Miossec P. **Dynamic interactions between T cell and dendritic cells and their derived cytokines/chemokines in the rheumatoid synovium.** *Arthritis Res Ther.* (2008); 10: S1-S6.

Mould-Quevedo, Joaquín, et al. **El costo de las Principales Enfermedades Reumáticas Inflamatorias desde la Perspectiva del Paciente en México.** *Gac Med Mex* 144.3 (2008)

Nielsen R H, Christiansen C, Stolina M, Karsdal M A. **Oestrogen exhibits type II collagen protective effects and attenuates collagen-induced arthritis in rats.** *Clin Exp Immunol.* (2008); 152(1): 21–27.

Ochi T, Goto T. **Diferential effect of FR122047, a selective cyclo-oxygenase-1inhibitor, in rat chronic models of arthritis.** *Br J Pharmacol.* (2002); 135(3): 782–788.

Ofosu W, Morgan K, Holt L. **Native type II collagen-induced in the rat. III Relationship between the cellular immune response to native type II collagen and arthritis.** *Ann Rheum Dis.* (1983); 42(3): 331–337.

OMS Formulario Modelo de la OMS (2015).

Osuna MartinezL U **Evaluación del Factor TímicoHumoral (THF) en el daño hepático agudo experimental.** Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México; 2008: 71-76.

Pablos Álvarez J L. **La interleucina 6 en la fisiopatología de la artritis reumatoide.** *Reumatol. Clin.* (2009); 1: 34-39.

Panayi G S. **B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?** *Rheumatology* (2005); 44: 3-7.

Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Álvarez-Nemegyei J, Burgos Vargas R, Garza-Elizondo M, et al., Grupo de Estudio Epidemiológico de Enfermedades Músculo Articulares (GEEMA). **Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology.** *J Rheumatol.* 2011; 86:3-8.

Pratt AG, Isaacs JD, Matthey DL. **Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol.* (2009); 23, 1: 37-48.

Rager-Zisman B, Zuckerman F, Benharroch D, Pecht M, Burstein Y, Trainin N. **Terapy of a fatal murine Cytomegalovirus infection with thymic humoral metalopéptido inmunomodulador (THF-gama 2) trated immune spleen cells** *Clin Exp Immunol.* (1990); 79(2):246-252.

Ranganath VK, Furst DE. **Diseases-Modifying Antirheumatic Drug use in the Ederly Rheumatoid Arthritis Patient.** *Rheum Dis Clin North Am.* (2007); 33(1):197-217.

Thomas R, Turner M, Cope AP. **High avidity autoreactive T cells with low signalling capacity through the T-Cell receptor: central to rheumatic arthritis pathogenesis?** *Arthritis Res Ther.* (2008); 10(4):210-219.

Ridgley LA, Anderson AE, Pratt AG. **What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis?** *Curr Opin Rheumatol.* (2018); 30(2):207-214.

Wasserman AM. **Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis.** *Am Fam Physician.* (2011); 84(11): 1245-1252.

Sales C, Pliviero F, Spinella P. **II modelo nutrizionale mediterraneo nelle mattie reumatiche infiammatorie.** *Rumatismo* (2009); 61, 1: 10-14.

Satpute SR, Durai M, Moudgli KD. **Antigeni-Specific Tolerogenic and Immunomodulatory Strategies for Treatment of Autoimmune Arthritis.** *Semin Arthritis rheum* (2008); 38(3): 195-207.

Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B. **How Antirheumatic Drugs Protect Joints from Damage in Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis and rheumatism.* (2008); 58(10): 2936-2948.

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. **Rheumatoid arthritis.** *Lancet.* (2010); 376(9746): 1094-1108.

Seguro Popular. **Catálogo Universal de Servicios de Salud CAUSES** (2016).

Small M, Trainin N. **Control of Autoreactivity by humoral factor of the thymus (THF)** *Cell Immunol* (1975); 20(1): 1-11.

Stoll J G, Yasothan U. **Rheumatoid arthritis market.** *Nat Rev Drug Discov.* (2009); 8(9): 693-694.

*Trainin N, Rotter V, Yakir Y, Leve R, Handzel Z, Shohat B, Zaizov R. **Biochemical and biological properties of THF in animal and human model.** Ann n Y Acad Sci. (1979); 332: 9-22.*

Tutuncu Z, Kavanaugh A. **Rheumatic Disease in the elderly: Rheumatoid Arthritis.** *Rheum Dis Clin Am.* (2007); 33(1): 57-70.

Van Zonneveld A J, De Boer H C, Van der Veer E P, Rabelick T J. **Inflammation, vascular injury and repair in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* (2010); 69 (Supple 1): 57-60.

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: MARIA DE LOURDES RODRIGUEZ FERGOSO

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

3 Marzo 2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

 Maestría en Farmacia

 X Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Diana Lizbeth Gámez Galicia

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

 X Si se aprueba tal como se presenta

 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

03-marzo-2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

5 marzo 2020

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado:

Dr. Alfonso Reyes Salas
[Firma]
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

[Firma]
Firma del miembro del jurado

030320
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Vicente Madrid Marina

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (sólo en caso de rechazo): Poner los tiempos de los experimentos en los pies de Figura de los experimentos.


Firma del miembro del jurado

05-03-2020
Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Natividad Sara Concepción GARCÍA Jiménez

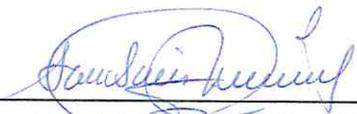
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

14 - Mayo - 2020
Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Carlos Antonio Arjona Canul

Título de la tesis: "Evaluación farmacológica del IMMP en un modelo experimental de artritis"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra Julieta Juane Castro Romero

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Firma del miembro del jurado

6/marzo/2020
Fecha